



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANA BİLİM DALI**

**BALB/C FARELERDE FARKLI ZAMANLARDA YAPILAN
BCG AŞISININ ALLERJİK DUYARLANMA VE ASTIM
GELİŞİMİNE ETKİSİ**

Dr. Tugay TEPE

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Gülbin BİNGÖL KARAKOÇ

ADANA - 2008

TEŞEKKÜR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan değerli hocalarıma, tezimi hazırlarken her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç. Dr. Gülbin BİNGÖL KARAKOÇ'a, katkılarından dolayı Doç. Dr. Mustafa YILMAZ, Vet. Dr. Kenan DAĞLIOĞLU ve Doç. Dr. Derya GÜMÜRDÜLÜ'ye teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarına katkılarından dolayı kimyager Filiz AYKAÇ'a, teknisyen Sibel ERKOÇ'a, biyolog Hatice İRDAY'a teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim süresince maddi ve manevi olarak her daim yanımda olan aileme, her türlü zorluğu beraberce göğüslediğim hayat arkadaşım Seda'ya ve sabırla yolunu gözlediğimiz oğluma...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
TABLO LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
KISALTMA LİSTESİ	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Astım.....	5
2.2. Astım Patogenezindeki Anahtar Olay; Allerjik Enflamasyon.....	7
2.3. Allerjik Enflamasyonda Rol Oynayan Hücreler	8
2.3.1. B lenfositler	8
2.3.2. IgE ve Reseptörleri	8
2.3.3. Eozinofiller	10
2.3.4. Mast Hücreleri	10
2.3.5. Bazofiller	11
2.3.6. Nötrofiller	11
2.3.7. Makrofajlar	12
2.3.8. T lenfositler	12
2.4. Allerjik Enflamasyonda Sitokin Fonksiyonu	16
2.5. T hücre Fonksiyonları ve Enflamasyondaki Etkileri	18
2.6. Th1 Yanıtını Etkileyen Faktörler.....	19
2.7. BCG ve Astım İlişkisi	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Farelerin Takibi.....	25
3.2. Denek Grupları.....	25
3.3. Farede Astım Modelinin Oluşturulması	27
3.4. BAL Alınması	27
3.5. Akciğer Dokusunun Alınması	28
3.6. Bal Sıvısında Hücre Sayımı	28
3.7. Akciğer Dokusunun Değerlendirilmesi	28
3.8. Fare Bal Sıvısında IL-4, IL-10, IL-12, IF- γ 'nın Eliza Yöntemi İle Değerlendirilmesi.....	29
3.9. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. Gruplar.....	32
4.2. BAL Bulguları	33
4.3. Akciğer Biyopsi Bulguları.....	35
4.3.1. İnflamasyon Skoru	35
4.3.2. Goblet Hücre Dağılımı.	37
4.4. BAL Sıvısında Sitokin Değerleri	39
4.4.1. İnterlökin-4	39
4.4.2. İnterlökin-12	41
4.4.3. İnterlökin-10	43
4.4.4. İnterferon Gamma.....	44
4.5. Korelasyon	46
4.5.1. İnterlökin-4	46
4.5.2. İnterlökin-10	48
4.5.3. İnterlökin-12	49
4.5.4. Eozinofil ve İnflamasyon Skoru	50
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇLAR	61
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ.....	69

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Gruplardaki Fare Sayısının Dağılımı	32
Tablo 2. BAL Sıvısındaki Hücrelerin Dağılımı (%)	34
Tablo 3. BAL Sıvısındaki Eozinofil Sayılarının Gruplar Arası Karşılaştırılması (p)	34
Tablo 4. Akciğer Biyopsisinde İnflamasyon Skoru	35
Tablo 5. Akciğer Biyopsisinde İnflamasyon Skorunun Gruplar Arası Karşılaştırılması (p).....	36
Tablo 6. Akciğer Biyopsisinde Goblet Hücre Dağılımı	38
Tablo 7. BAL Sıvısında Sitokin Dağılımı (%).....	40
Tablo 8. BAL Sıvısındaki İnterlökin-4 Değerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması (p).....	40
Tablo 9. BAL Sıvısındaki İnterlökin-12 Değerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması (p).....	42
Tablo 10. BAL Sıvısındaki İnterlökin-10 Değerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması (p).....	44
Tablo 11. BAL Sıvısındaki İnterferon Gamma Değerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması (p)	45
Tablo 12. İnterlökin-4 ile İlgili Korelasyonlar	47
Tablo 13. İnterlökin-10 ile İlgili Korelasyonlar	49
Tablo 14. İnterlökin-12 İle İlgili Korelasyonlar.....	49
Tablo 15. Eozinofil ve İnflamasyon Skoru Arasındaki Korelasyon.....	50

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Hipersensitivite Reaksiyonları. Kuby Immunology. 4th ed.'dan alınmıştır	5
Şekil 2. Tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonunun patogenezi. 'Kumar: Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease, 7th ed.'dan alınmıştır.....	7
Şekil 3. Allerjik reaksiyonda IgE oluşumu	9
Şekil 4. Allerjik hastalıklarda T hücre sitokin salınımı. Patterson's Allergic Diseases 2004' den alınmıştır 16	
Şekil 5. 7 günlük yavru farelerde astım modelinin oluşturulması	26
Şekil 6. Deney hayvanlarına uygulanan işlemlerin zamansal gösterimi.....	27
Şekil 7. Kuyucukları plak üzerindeki dizilimi ve adlandırılması.....	30
Şekil 8. 7 günlükken BCG yapılmayan grubun BAL sıvısında eozinofil hücreleri (Papanikolau boyası ile boyanma, büyütme 40x)	34
Şekil 9. Akciğer biyopsisinde inflamasyon skor dağılımının şematik gösterimi	36
Şekil 10. Akciğer biyopsisinde peribronşiyal inflamasyon derecesine göre inflamasyon skorunun gösterimi. (a) Peribronşiyal inflamasyonun olmadığı normal akciğer dokusu (Grup IV), (b) bronş etrafında lokal inflamatuvar hücre birikiminin olduğu 1+ peribronşiyal inflamasyon (Grup IA), (c) bronş etrafında 5 den az hücre dizisinde mononükleer hücre birikiminin olduğu 2+ peribronşiyal inflamasyon (Grup IIA) ve bronş etrafında 5 den fazla hücre dizisinde mononükleer hücre birikiminin görüldüğü 3+ peribronşiyal inflamasyon (Grup IIIA) (hematoksilen eozinle boyanma, büyütme 20x).	37
Şekil 11. Akciğer biyopsisinde goblet hücre dağılımı	38
Şekil 12. 7 günlükken BCG yapılmayan grubun akciğer dokusunda goblet hücreleri (müsin boyası ile boyanma, büyütme 20x).....	39
Şekil 13. IL-4 değerlerinin şematik olarak gruplar arası karşılaştırılması	41
Şekil 14. IL-12 değerlerinin şematik olarak gruplar arası karşılaştırılması	42
Şekil 15. IL-10 değerlerinin şematik olarak gruplar arası karşılaştırılması	44
Şekil 16. IFN- γ değerlerinin şematik olarak gruplar arası karşılaştırılması.....	46
Şekil 17. 7 günlükken BCG yapılan grupta korelasyonların şematik gösterimi. (a) IL-4 ile IL-12 arasındaki korelasyon, (b) IL-4 ile IL-10 arasındaki korelasyon, (c) IL-12 ile IFN- γ arasındaki korelasyon, (d) IL-12 ile IL-10 arasındaki korelasyon.	51
Şekil 18. 14 günlükken BCG yapılan grupta korelasyonların şematik gösterimi. (a) IL-4 ile IL-12 arasındaki korelasyon, (b) IL-12 ile IL-10 arasındaki korelasyon, (c) korelasyon, (d) IL-12 ile IFN- γ arasındaki korelasyon.....	52

KISALTMA LİSTESİ

Th	: Yardımcı T hücre
Th2	: Yardımcı T hücre 2
Th1	: T yardımcı hücre 1
IL-4	: İnterlökin-4
IL-5	: İnterlökin-5
IFN-γ	: İnterferon- γ
IgE	: İmmunglobulin E
BCG	: Basil Calmette-Guerin
FcϵRI	: Yüksek affiniteli IgE reseptörü
FcϵRII	: Düşük affiniteli IgE reseptörü
STAT	: Sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivatörleri
IL-13	: İnterlökin-13
NF-κB	: Nükleer faktör kapa beta
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
RANTES	: CCL5 olarak adlandırılan kemotaktik sitokin
MCP	: Membran kofaktör protein
MBP	: Majör basic protein
ECP	: Eozinofilik katyonik protein
EPO	: Eozinofil peroksidaz
sLT	: Sisteinil lökotrienler
LTC4	: Lökotrien C4
PGD2	: Prostoglandin D2
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
ICAM-1	: İntrasellüler adezyon molekül-1
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekül-1
BAL	: İnterferon gama
Tr	: Regülatuar T hücre
TGF-β	: Tümör büyüme faktör beta
NK	: Naturel Killer
TRL	: Toll-like –reseptörler
mRNA	: messenger RNA
OA	: Ovalbumin
IP	: İntra peritoneal
PBS	: Fosfat tampon solusyonu.
μl	: Mikrolitre
nm	: nanometre
pg	: pikogram
ID	: İntra dermal

ÖZET

Balb/c Farelerde Farklı Zamanlarda Yapılan BCG Aşısının Allerjik Duyarlanma ve Astım Gelişimine Etkisi

Amaç; Basil Calmette-Guerin (BCG) aşısının allerjik hastalıkların gelişimi üzerine etkisinin olduğunu belirten birçok çalışma vardır. Bu çalışmada BALB/c farelere hayatın farklı dönemlerinde (doğum sonrası birinci, ikinci haftalarda ve erişkin dönemde) BCG aşısı yapılarak aşının allerjik enflamasyon ve astım gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem; Çalışmaya alınan denekler BCG uygulanma zamanına göre farklı gruplara ayrıldı. Grup IA; 7 günlükken BCG yapılan, Grup IB; 7 günlükken BCG yapılmayan, Grup IIA; 14 günlükken BCG yapılan, Grup IIB; 14 günlükken BCG yapılmayan, Grup IIIA; erişkin dönemde BCG yapılan, Grup IIIB; erişkin dönemde BCG yapılmayan, Grup IV; herhangi bir işlem uygulanmayan olarak belirlendi. BCG yapılan farelere 8 hafta sonra intraperitoneal OVA uygulandı (0, 7, 14, ve 21. günde) ve daha sonra 21-28 günler arasında ise OVA ile ‘challenge’ yapılarak astım modeli oluşturuldu. BAL sıvı örnekleri ve akciğer dokusu alındı. BAL sıvısından ‘cytospin’ preparatlar hazırlanarak hücre morfolojisi belirlendi. Ayrıca ELİZA yöntemiyle IL-4, IL-12, IL-10 ve IFN- γ bakıldı. Akciğer biyopsisinde inflamasyon skoru ve goblet hücre sayıları belirlendi.

Bulgular; Eozinofil sayısı ve inflamasyon skoru hayatın 7. gününde ve hayatın 14. gününde BCG uygulanan gruplarda BCG uygulanmayan ve yetişkin dönemde BCG uygulanan (grup IIIA) gruba göre istatistiksel anlamlı düşüktü ($p<0,05$). Allerjik duyarlanma oluşturulan tüm farelerin akciğerlerinde goblet hücreleri saptandı, ancak BCG yapılan grupta goblet hücre sayısı daha düşüktü. IL-4 düzeyleri grup IA ve grup IIA da grup IB, grup IIB ve grup IIIA’ya göre istatistiksel anlamlı düşük bulundu ($p<0,05$). IL-12 düzeyleri grup IIA’da, IIB ve IIIA’dan daha yüksekti ($p<0,05$). Bununla birlikte grup IA ve grup IIA arasında istatistiksel fark yoktu. Benzer olarak IL-10 ve IFN- γ düzeyleri grup IA ve IIA’da IB, IIB ve IIIA ile karşılaştırıldığında yüksek bulundu ($p<0,05$). Grup IA’da IL-4 ve IL-12, IL-4 ve IL-10 arasında istatistiksel anlamlı ters korelasyon vardı (sırasıyla, $r=-0,702$; $p=0,023$, $r=-0,807$; $p=0,005$). Grup IIA’da IL-4 ve IL-12 düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı ters korelasyon vardı ($r=-0,706$, $p=0,023$), ancak IL-4 ile IL-10 arasında ters korelasyona karşın istatistiksel anlamlı değildi. Grup IA, grup IIA ve grup IIIA’da IL-12 ve IFN- γ arasında istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon vardı ($r=0,796$; $p=0,006$, $r=0,867$; $p=0,001$, $r=0,916$; $p=0,001$).

Sonuç; BCG aşısının allerjik enflamasyon ve astım gelişimini engelleyebilir. BCG'nin erken uygulanımında IL-4 ve IL10 ile IL-12 arasındaki ters korelasyondan ve daha sonra aşılanan grupta sadece IL-4 ve IL-12 arasında ters korelasyondan dolayı bu etkinin erken dönemde Treg hücreleri ve Th1 hücreleri aracılığıyla, daha geç dönemde ise Th1 hücrelerinden IL-12 üretimi üzerinden olduğunu öne sürebiliriz. Ancak kesin mekanizmanın aydınlatılması için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: BCG aşısı, astım, Balb/c fareler, inflamasyon skoru, IL 4, IL 10, IL 12, IFN- γ

ABSTRACT

Effect of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Administration at Various Age in Balb/c Mice on Allergic Responsiveness and Asthma Development

Backgrounds and Aims; There are several reports about the effect of Basil Calmette-Guerin (BCG) vaccine on development of allergic diseases. In this study we aimed to evaluate the effects of BCG administration on allergic responsiveness and asthma development at various age of life (first and second week after birth and adulthood) in Balb/c mice.

Material and Method; Balb/c mice included to the study were divided into different groups according to the BCG administration time. Groups were labeled as Group IA; BCG administered at 7th day of life, Group IB; without BCG administration at 7th day of life, Group IIA; BCG administered at 14th day of life, Group IIB; without BCG administration at 14th day of life, Group IIIA; BCG administered at adulthood, Group IIIB; without BCG administration at adulthood, Group IV; no procedure was performed. In first three groups mice were sensitized intraperitoneally with OVA after 8 weeks (on 0, 7, 14 and 21th days) and after that challenge was performed with inhaled OVA between 21-28 days to develop asthma model. Following ketamine anesthesia and servical dislocation mice were sacrificed, BAL fluid and lung tissues were taken. Cytospin slides were prepared from BAL fluid and cell morphology was determined. IL-4, IL-12, IL-10 and IFN- γ were evaluated by ELISA method. Inflammation score and goblet cell count were defined on lung biopsy.

Results; Eosinophil count and inflammation score was low statistically significant in groups in which BCG administered at 7th day of life and at 14th day of life compared to groups without BCG administration and group with BCG administration at adulthood ($p < 0.05$). In all allergic sensitized mice lungs goblet cells were found, but goblet cell count was lower in BCG administered group ($p < 0.05$). IL-4 levels were found to be lower in group IA and IIA compared to group IB and IIB and IIIA ($p < 0.05$). IL-12 levels were higher in IIA than IIB and IIIA ($p < 0.05$). However there was no statistically difference between Group IA and IIA. Similarly IL-10 and IFN- γ levels were higher in group IA and IIA compared to IB, IIB and IIIA ($p < 0.05$). In group IA there were statistical significant reverse correlation between IL-4 and IL-12, and between IL-4 and IL-10 ($r = -0.702$; $p = 0.023$ and $r = -0.807$; $p = 0.005$, respectively.). In group IIA there was statistical significant reverse correlation between IL-4 and IL-12 levels ($r = -0.706$, $p = 0.023$), however despite the reverse correlation between IL-4

and IL-10, it was not statistical significant. In Group IA, Group IIA and Group IIIA, there was statistical significant positive correlation between IL-12 and IFN- γ ($r=0.796$; $p=0.006$, $r=0.867$; $p=0.001$; $r=0.916$, $p=0.001$).

Conclusion; BCG vaccination may prevent allergic inflammation and asthma development. Because of reverse correlation between IL-4 and IL-10 and IL-12 in early administration of BCG and reverse correlation only between IL-4 and IL-12 in later vaccinated group, we may suggest that this effect mediated by Treg cells and Th1 cells in early period and by IL-12 via production from Th1 cells in late period. However to identify the exact mechanism further investigation should be performed.

Keywords: BCG vaccination, asthma, Balb/c mice, inflammation score, IL 4, IL 10, IL 12, IFN- γ

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Allerjik hastalıklar tüm dünyada önemi giderek artan bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bronşiyal astım, allerjik rinit, atopik dermatit gibi allerjik hastalıkların sıklığı gerek ülkemizde gerekse dünyanın birçok ülkesinde gittikçe artmaktadır. Bu artışın nedenleri hala kesin olarak bilinmemesine karşın, gelişmekte olan ülkelerde batılı yaşam tarzı, allerjen maruziyetinin artışı, ailede birey sayısının azalmasının ve yaşam kalitesinin iyileşmesinin önemli rol oynadığı düşünülmektedir.^{1,2}

Allerjik hastalıkların çoğu çocukluk çağında başlamakta, okul çağı döneminde pik yapmakta ve sonraki dekatlarda azalarak her yaş grubunda görülebilmektedir. Son yıllarda yapılan geniş popülasyonlu epidemiyolojik çalışmalar çocuklardaki atopik hastalıkların sıklığında önemli bir artış olduğunu göstermektedir.² Literatürde yaşam tarzının iyileşmesi ve aşı programlarının artmasıyla bakteriyel ve viral enfeksiyonların azalmasının atopik hastalıkların sıklığını arttırdığını savunan hipotezler mevcuttur.^{3,4} Ayrıca sanayileşmiş toplumlardaki modern ev yaşam tarzı, hava kirliliği, sigara içimi gibi faktörlerin de etkili olduğu ileri sürülmektedir.⁵ Sitokinler aracılığıyla T yardımcı hücre 2 (Th2)'nin farklılaşmasını engelleyen çocukluk çağına özgü enfeksiyonların, özellikle de tüberkülozun azalması, allerjik hastalıkların sıklığının artışı ile paralellik gösterdiği düşünülmektedir.³⁻⁶

Yaşamın diğer dönemlerine kıyasla fetal hayat ve erken bebeklik döneminde immün cevabın yetersiz olduğu eskiden beri bilinmektedir.⁷ Bağışıklık sisteminde T hücrelerinin alt tipi olan doğal T hücreleri uyarı ile T yardımcı hücre 1 (Th1) ve T yardımcı hücre 2 (Th2)'ye dönüşür. Th2 hücreleri allerjik hastalıkların gelişiminde önemli rol oynarlar. 1989 yılında Strachan ve arkadaşlarının ortaya attığı 'hijyen hipotezine' göre; aile içi enfeksiyon sıklığında azalma atopik hastalıkların sıklığının artmasıyla sonuçlanmaktadır.⁸ Bu hipotezde kardeş sayısındaki artışın, dolayısıyla da enfeksiyon kaynağının artışının allerjik hastalıklara karşı koruyucu bir mekanizma oluşturduğu öne sürülmüştür. Hayatın erken döneminde mikrobiyal etki ile immün sistemin Th2 yanıtı Th1 yanıtına doğru kaydığı düşünülmüştür.⁸ Enfeksiyonların atopi gelişimi üzerinde inhibe edici etkisinin nedeni, Th1 sitokinlerinin salınımını arttırması ve dolayısıyla bu sitokinler aracılığıyla hücrel immün yanıtı Th1'e çevirmesi olarak

açıklanabilir.⁹ Atopik bireylerde Th2 hücreleriyle ilişkili olarak interlökin-4 (IL-4) ve interlökin-5 (IL-5) seviyelerinde artış ve interferon- γ (IFN- γ) seviyesinde azalma saptanmıştır. Mikrobiyal ajanlar; özellikle hücre içi bakteriler, virüsler, bazı protozoanlar ve mantarlar IFN- γ salınımı ile IL-4'e bağlı IgE yapımını azaltarak Th2'ye dönüşümü doğrudan inhibe edip atopide baskın olan Th2 yanıtını azaltırlar.¹⁰ BCG de içeren mikobakteri türleri türberkülozdan korunmak için aşı olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında Th1 yanıtını güçlü bir şekilde arttırdıkları bilinmektedir.⁹ Fareler üzerinde yapılan çalışmalar mikobakteriyel enfeksiyonlarının önceden allerjenle duyarlaştırılan farelerde Th2 immün yanıtını inhibe ettiğini göstermiştir.¹¹ *Micobacterium vaccae*'nin Th1 yanıtını arttırıp Th2 yanıtını azaltması ile baskın bir Th1 cevabı oluşturarak atopi gelişmesinin engellediği bildirilmiştir. BCG ile aşılamanın astım, allerjik rinit ve atopik dermatit prevelansındaki rolü tam olarak anlaşılmış değildir. Mikobakteriyel antijenlerinin immünglobulin E (IgE) aracılığı ile duyarlanma ve astım gelişimi üzerine etkisi birçok modelde araştırılmıştır.^{1,4,12} Bizim çalışmamızda ovalbumin ile duyarlanmış *BALB/c* farelere hayatın farklı dönemlerinde (doğum sonrası birinci, ikinci haftalarda ve erişkin dönemde) BCG aşısı yapılmış ve aşının allerjik enflamasyon ve astım gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Allerji, atopik bireylerde immünolojik mekanizmalarla ortaya çıkan aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Akut aşırı duyarlılık reaksiyonu, ilk kez 1902 yılında Richet ve Portier tarafından tanımlanmış ve köpeklere bağışıklama amacıyla verilen yabancı maddelere karşı gelişen bu yanıtı anafilaksi adı verilmiştir.¹³ İnsanlarda ise tetanoz ve difteriye karşı pasif immünizasyon sağlamak amacıyla verilen at serumu sonrasında anafilaksi tanımlanmıştır. 1906'da ise Clemon von Pirquet, immünite ve hipersensitivite reaksiyonları arasındaki ilişkinin yabancı madde ile immün sistem arasındaki etkileşime bağlı olduğunu tahmin etmiş ve ilk kez allerji terimini kullanmıştır.¹³ Diğer çalışmalarla beraber Ishizakas, 1969 yılında yeni bir immünglobulin sınıfının, IgE'nin bulunduğunu onayladı.¹⁴ Günümüzde allerjik reaksiyonlar; temasla, solunum, oral veya parenteral yollarla alınan yabancı antijenlere karşı B lenfositlerde IgE antikör yapımının artışı ile karakterize genetik olarak belirlenmiş hastalıkları kapsamaktadır.

Hipersensitivite reaksiyonları hem humoral hem de hücre aracılı yanıt olarak ortaya çıkabilir.¹⁵ Bu reaksiyonlar, olayı başlatan mekanizmalar açısından Gell ve Coombs tarafından dört tip olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 1).^{15,16}

Tip I ; Anafilaktik tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu (IgE aracılı)

Tip II; Sitotoksik tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu (IgG ve IgM aracılı)

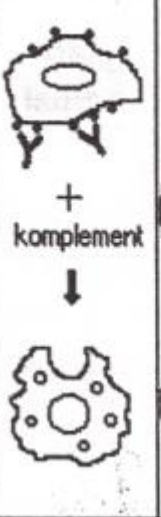
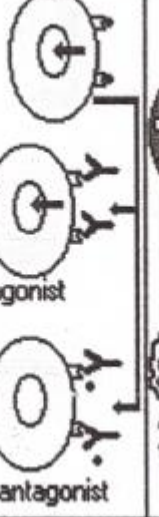
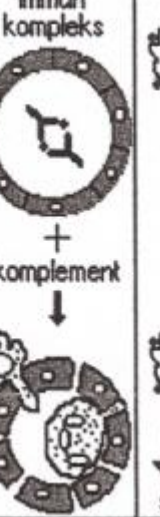
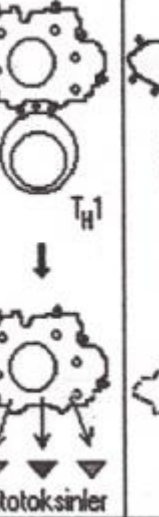
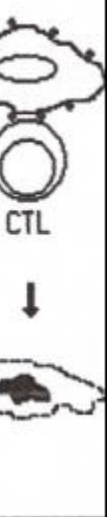
Tip III; İmmün kompleks tipi aşırı duyarlılık reaksiyonu (IgG ve IgM immünkompleks aracılı)

Tip IV; Gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu (T hücre aracılı)

Burada ilk üç reaksiyon antikörlara bağımlı olup erken (birkaç dakika veya saat) veya geç faz yanıt şeklinde oluşabilir. Erken faz yanıtta deri reaksiyonları oluşturabilirler ve bu reaksiyonlar aynı süreler içinde sona erer. Dördüncü tip reaksiyon ise gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak adlandırılıp T hücreleri ve makrofajlara bağımlı olarak gelişir ve sonraki 48-72 saat içinde cilt reaksiyonu ortaya çıkabilir. Bu reaksiyon günler ve haftalarca devam edebilir.¹⁷ Allerjik reaksiyonun temelini Tip I hipersensitivite reaksiyonu oluşturur. Allerjik reaksiyonlar, allerjen adı verilen antijenlere karşı duyarlı bireylerde allerjen ile yeniden karşılaşma sonucu ortaya çıkmakta ve basit lokal reaksiyonlardan ölüme kadar

değişen derecelerde görülebilmektedir.¹⁸ Gelişen reaksiyonların şiddeti allerjenin türüne, temas şekline ve kişinin duyarlılık derecesine göre değişmektedir. Allerjenle ilk kez karşılaşma bireyde zararlı bir etki oluşturmaz. Ancak allerjenin T hücreleri tarafından tanınmasına ve B hücrelerinin IgE sentezi için uyarılmasına sebep olur. Oluşan IgE antikorları mast hücreleri ve bazofillerin yüzeyinde bulunan yüksek afiniteli (FcεRI) ve düşük afiniteli (FcεRII) IgE reseptörlerine bağlanır. Bu aşamadan sonra birey allerjene duyarlı hale gelmiştir. Aynı allerjene yeniden maruz kalındığında mast hücreleri tetiklenir ve degranülasyon sonucu vazoaktif aminler, lökotrienler ve sitokinler gibi enflamasyon ve ödem tablosuna yol açan moleküller ortama salınır. IgE adezyon molekülleri, ortama salınan sitokinler, mediyatörler ve diğer faktörler de bu enflamasyona katkıda bulunurlar. Bunun sonucunda ise doku hasarı meydana gelir ve ortaya çıkan klinik tablo astım, atopik dermatit, allerjik rinit ve sistemik anaflaksi olarak adlandırılır.¹⁹

En sık rastlanan allerjik hastalıklar; atopik dermatit, astım bronşiyale ve allerjik rinittir. Bu hastalıkların hepsi bir arada olabileceği gibi, bazen ardışık bir sıra izleyerek ortaya çıkmakta ve belki de immün sistemin matürasyonu ile ilişkili olarak belli yaş dönemlerinde daha fazla görülebilmektedirler. Allerjik hastalıklar genellikle “allerjik yürüyüş” olarak da adlandırılan bir kronolojik sıra izlemektedir. Yaşamın ilk yıllarında daha çok besinlere bağlı olarak ortaya çıkan atopik dermatit insanın hayatındaki ilk allerjik reaksiyon iken, daha sonra özellikle 2 yaş civarında bronş allerjisi (astım) ve okul çağlarında da allerjik rinit ön plana çıkmaktadır.

	TIP 1	TIP 2		TIP 3	TIP 4	
İmmün Reaktan	IgE Antikorları, T _H 2 hücreleri	IgG Antikorları		IgG Antikorları	T Hücreleri	
Antijen	Çözünebilir Antijen	Hücre veya matrikse bağlı Antijen	Hücre yüzey reseptörleri	Çözünebilir Antijen	Çözünebilir Antijen	Hücreye bağlı Antijen
Etki Mekanizması	Mast hücresi aktivasyonu	Komplement, FcR ⁺ Hücreleri (Fagositler, NK Hücreleri)	Antikor aracılığıyla sinyal iletimi	Komplement fagositleri	Makrofaj aktivasyonu	Sitotoksiste
						

Şekil 1. Hipersensitivite Reaksiyonları. Kuby Immunology. 4th ed.'dan alınmıştır

2.1. Astım

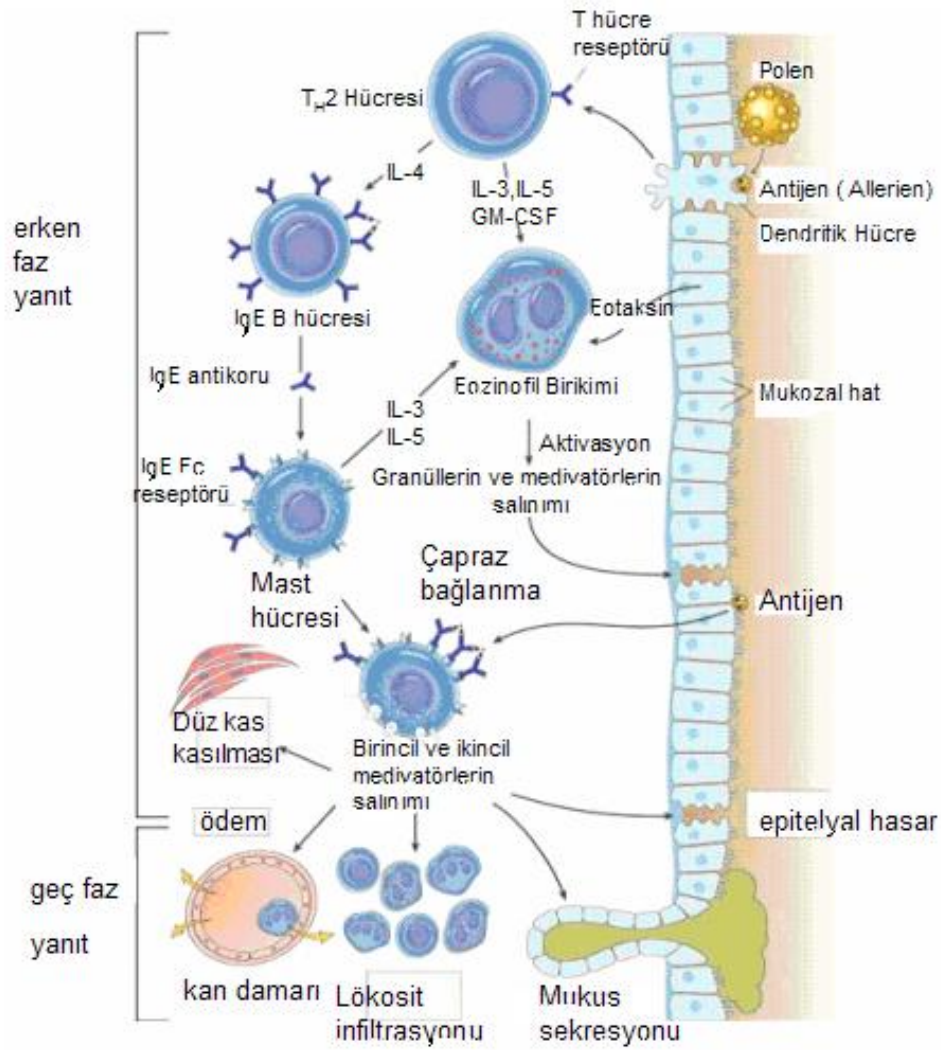
Astım, çocukluk çağıının en sık görülen kronik hastalığı olup havayollarının enflamatuvar hastalığı olarak tanımlanır. Akciğerde birçok kompleks enflamatuvar süreç sonucunda havayollarında ödem, aşırı mukus sekresyonu, lökosit infiltrasyonu ve havayolu hiperreaktivitesi gelişir. Havayolu enflamasyonu pek çok hücrenin birbiriyle kompleks etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Eozinofiller, T lenfositler, makrofajlar ve nötrofiller bu enflamasyonda önemli rol oynar.²⁰ Bu hücreler dışında havayolunun kendi hücrelerinden olan epitel, endotel, düz kas hücreleri ve fibroblastlar da ortama saldıkları mediyatörler, sitokinler ve kemokinler aracılığıyla etkin rol oynarlar ve enflamasyonun devamına katkıda bulunurlar.²¹

Astımda temel patoloji geri dönüşümlü havayolu obstrüksiyonu ve bronşiyal düz

kas aşırı duyarlılığıdır. Astımlı hastalarda meydana gelen havayollarındaki yapısal değişiklikler akciğer fonksiyonlarının bozulmasında önemli rol oynar. Epitel hücrelerinin yapısındaki bozulma, mukus bezleri, düz kas ve kan damarlarının hiperplazisi, kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks proteinlerinin subepitelyal depolanması sonucu havayollarında kalınlaşma gibi yapısal değişimler havayollarında ‘remodelling’ (yeniden yapılanma) şeklinde tanımlanmaktadır.²⁰ Bu durum enflamasyonla oluşan doku hasarına tamir yanıtı şeklinde gelişen aktif ve kompleks bir süreçtir.

Astım patofizyolojisinde temel unsurların kronik enflamasyon ve havayolu ‘remodelling’i olduğu gösterilmiştir.^{17,20} Astım yanıtı, allerjenlerle tetiklenir. Antijenin allerjen yapıda olabilmesi için öncelikle dendritik hücre, T ve B lenfosit aracılığıyla sensitizasyon gerçekleştirdikten sonra IgE yanıtına neden olması gerekmektedir. Ayrıca aynı ve benzer antijene tekrar maruziyet sonrasında yeniden erken ile geç faz yanıtların ortaya çıkmasını sağlamalıdır.²²

Allerjik enflamasyonun temelini erken tip hipersensitivite reaksiyonu oluşturur ve erken ve geç faz olmak üzere iki evrede gerçekleşir. Erken fazda mediyatör salınımı ön plandayken geç faz ise T lenfositler ve eozinofiller başta olmak üzere ortama hücre göçü ve doku enflamasyonu ile karakterizedir (Şekil 2). Erken ve geç faz yanıtı, bronşiyal allerjenlerin IgE aracılığıyla havayolu hiperreaktivitesine neden olur. Enflamasyonda temel unsur allerjene karşı spesifik IgE’nin oluşmasıdır. Erken faz yanıtı geçici olup allerjenle karşılaşma sonrasında 5-30 dakikada ortaya çıkar ve kendiliğinden veya tedaviyle düzelir. Geç faz yanıtı ise erken fazdan 3 ile 8 saat sonra gelişir ve daha sonra havayolu aşırı duyarlılığını arttıran ajanlarla tekrar gelişebilir. Geç faz allerjenle tekrar karşılaşılmadan da gerçekleşebilir ve birkaç gün sürebilir. Ancak allerjenle tekrar karşılaşıldığında geç faz yanıtının süresi uzar.²³ Allerjik hastalıklarda enflamatuvar yanıt uygunsuz bir biçimde tetiklenir ve şiddetli bir doku infiltrasyonu ve epitelyal hasarına neden olur. Sonuçta da doku tahribatı ile yarardan çok zarar verir.



Şekil 2. Tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonunun patogenezi. ‘Kumar: Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease, 7th ed.’dan alınmıştır

2.2. Astım Patogenezindeki Anahtar Olay; Allerjik Enflamasyon

Allerjik enflamasyon, birkaç farklı mekanizmanın rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Enflamasyonun başlaması için allerjenin dendritik hücreler gibi aracı hücrelerle immün sisteme tanıtılması gerekmektedir. Antijen sunan hücreler tarafından alınan madde parçalanarak Major Histokompatibilite Kompleksi Klass II (MHC Class II) içerisinde T lenfositlere tanıtılır. Antijenlere karşı geliştirilen spesifik immün yanıt Th1 ve Th2 hücrelerinin karşılıklı etkileşimi sonucunda oluşur. T hücrelerinin aktive edilmesi allerjik enflamasyonun temelini oluşturmasına rağmen esasen Th2 dönüşümü kilit rol oynar. Allerjik enflamasyonda antijenin antijen sunan hücrelerle etkileşimi sonrasında B hücreleri IgE yapımına başlar ve Th2 hücrelerinin salgıladığı sitokinler ile

mast hücreleri, eozinofiller makrofajlar ve nötrofiller enflamasyona dahil olur. Burada B lenfositler, eozinofiller, mast hücreleri, bazofiller, nötrofil, makrofaj ve T lenfositler etkin rol oynarlar.

2.3 Allerjik Enflamasyonda Rol Oynayan Hücreler

2.3.1. B lenfositler

Allerjik hastalıklarda B hücreleri, IgE salınımı ile enflamasyonun gelişmesine neden olur. Plazma hücrelerinin uygun uyarı sonrasında B hücrelerine dönüşmesi sonucu IgE sentezlenir. Bu dönüşümün gerçekleşebilmesi için IL-4 ve IL-13 gibi iki önemli sitokin varlığının yanısıra ardışık gelişen iki sinyalin iletimi önemlidir.

a) STAT sistemi (Sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivatörleri) ; IL-4 ve IL-13 birlikte immün globülinin α zincirine bağlanır ve ağır zincirin sabit bölgesindeki epsilon (ϵ) sınıfı dönüşümü için gerekli gen transkripsiyonuna neden olur. Bunu diğer sinyal iletimi takip etmelidir.

b) NF-kB (nükleer faktör kapa beta); B hücrelerinde bulunan CD40, T hücrelerindeki CD40 ligandı ile karşı karşıya gelmelidir.

B hücrelerindeki bu iki sinyal iletimi sonucunda IgE yapımı gerçekleşir. Allerjen için özgün IgE geliştirmiş kişi, o allerjen için duyarlı hale gelmiş olur. IgE sentezlendikten sonra kanda serbest olarak dolaşır. Daha sonra yüksek afiniteli IgE reseptörü (Fc ϵ RI) taşıyan mast hücresi ve bazofile, düşük afiniteli IgE reseptörü (Fc ϵ RII) taşıyan lenfosit, eozinofil, trombosit ve makrofaja bağlanır.²⁴

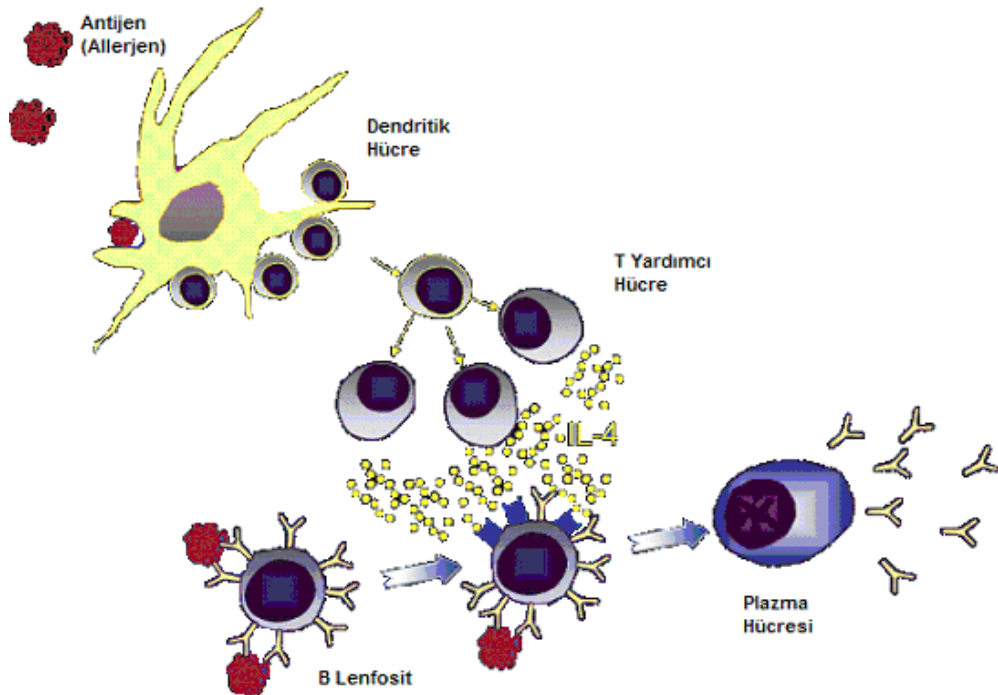
2.3.2. IgE ve Reseptörleri

Tip I hipersensitivite reaksiyonlarına aracılık eden IgE, allerjik hastalıkların patogeneğinde temel mekanizmayı oluşturur (Şekil 3). IgE sentezi yapan B hücreleri, esas olarak solunum ve gastrointestinal sistemdeki lenfoid dokularda yerleşmiştir. Bu nedenle IgE antikoru, antijenin vücuda girdiği yerde sentezlenir ve öncelikle bu bölgelerdeki mast hücresi ve bazofillere, geri kalanı da dolaşım yoluyla tüm vücuda yayılarak hem dokudaki mast hücrelerine hem de dolaşımdaki bazofiller üzerindeki IgE reseptörlerine bağlanır.²⁵

Serbest IgE'nin serumdaki yarı ömrü 2-3 gün kadardır. Mast hücresi veya Langerhans hücresi üzerindeki Fc ϵ RI'ne bağlandığında yarı ömrü birkaç haftaya kadar

uzar. Serumda sadece monomer halinde bulunur ve komplemanı çok zayıf bağlar. Sekretuar parçası yoktur ve mukozalardan aktif olarak salgılanmaz. Bununla birlikte IgE sistemi insanlarda daha çok mukozalarda etkidir.²⁶

İnsanda 14. kromozomun ikinci immüngobülin ağır zincir gen bölgesinde tek fonksiyonel E geni bulunur.²⁷ IgE için hücreler üzerinde 2 farklı reseptörün varlığı bilinmektedir. Bunlar; yüksek afiniteli IgE reseptörleri (FcεRI) ve düşük afiniteli IgE reseptörleridir (FcεRII). Patojenlere karşı verilen IgE tipi immün yanıtın allerjik enflamatuvar yanıtı dönüşmesinde bazofil ve mast hücreleri üzerinde bulunan FcεRI önemli rol oynar. Bunun yanında Langerhans hücrelerinin yüzeyinde bulunan FcεRI, ciltteki antijenin yakalanmasında ve antijenin sunulmasında görev alır. FcεRI'nin yapısında bir alfa (α), bir beta (β) ve iki gama (γ) zinciri bulunur. Alfa zinciri IgE bağlama görevini üstlenir. FcεRII (CD23 antijen)'in α ve β formları mevcuttur. Alfa formu B hücresi ve Langerhans hücrelerinde bulunur, IL-4 ile ekspresyonu artar.²⁸ Beta formu ise makrofaj, B hücresi, folliküler dendritik hücreler ve muhtemelen eozinofillerde bulunur. Bu reseptörlerin hücre yüzeyinde ifade edilmesi antijenle uyarı sonrasında olur.



Şekil 3. Allerjik reaksiyonda IgE oluşumu

2.3.3. Eozinofiller

Eozinofiller, allerjik hava yolu hastalıklarında epitelyal hasar, deskuamasyon, subepitelyal fibrozis ve havayolu aşırı duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir. Havayolundaki eozinofil sayısı genel olarak astımın şiddeti ile doğru orantılıdır. Eozinofiller bazı sitotoksik proteinleri salgılayarak, hücrel sitotoksikite, muskarinik M₂ reseptörlerinin düzenlenmesi, mast hücrelerinin ve bazofillerin degranülasyonu, mukus sekresyonunun uyarılması gibi allerjik hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkili olan olayları düzenler. Ayrıca lipid mediyatörlerin, sisteinil lökotrienlerin ve özellikle de lökotrien C4'ün kaynağıdır. Günümüzde sisteinil lökotrienlerin ve bunun gibi diğer bazı mediyatörlerin in vitro olarak allerjenle uyarılmış insan akciğerleri tarafından salındığı gösterilmiştir.²⁹

Eozinofillerin yarı ömrü 24 saatten az olup IL-3, IL-5 ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) varlığında enflamasyon alanına göç ederler. Damar endotelini geçtikten sonra doku içerisinde ilerlemesi için mast hücreleri, makrofaj, aktive epitel ve T-lenfositler tarafından salgılanan Eotaksin-1, Eotaksin-2, Eotaksin-3, RANTES (CCL5 olarak adlandırılan kemotaktik sitokin), membran kofaktör protein 3 (MCP-3) ve MCP-4 gibi kemokinlere ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte bu kemokinlerin varlığında eozinofil ömrü uzayarak ortamda eozinofil birikimi olur. Eozinofiller içerdikleri toksik ürünler nedeniyle allerjik enflamasyonun geç fazının efektör hücresi gibidir. İçerdikleri majör basic protein (MBP), eozinofilik katyonik protein (ECP), eozinofil peroksidaz (EPO) ve eozinofil kökenli nörotoksin solunum yollarında epitelyal hasara neden olur. Sisteinil lökotrienler (sLT) ise vasküler permeabilitede artmaya, düz kas kontraksiyonuna ve hipertrofisine, mukus bezlerinde hipertrofiye ve ek eozinofil göçüne yol açarlar. Makrofajlara benzer şekilde matriks metalloproteinazlarını sentezlerler. Bu enzimler ise ekstrasellüler matriks yıkımına neden olur.³⁰

2.3.4. Mast Hücreleri

Önceden duyarlanmış kişilerde tekrar allerjenle karşılaşma sonrası allerjen, mast hücresi üzerinde allerjen için önceden oluşturulmuş IgE molekülü ile birleşerek mast hücresini aktive eder ve allerjik enflamasyonun erken faz cevabını oluşturur. Havayolunda bulunan mast hücreleri, bağ dokusu mast hücreleri olarak submukozada ve mukozal mast hücreleri olarak epitelde bulunurlar ve farklı türde kimyasal madde

salgılar. Allerjen maruziyeti sonrası bu iki tip mast hücrelerinin sayısında artış tespit edilmiştir. Mast hücrelerinin aktivasyonu ile başta histamin olmak üzere lökotrien C4 (LTC4) ve prostoglandin D2 (PGD2) salgılanır. Sonuçta klinik olarak allerjik hastalıkların bulguları ortaya çıkar. Mast hücrelerinin sentezlediği tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), geç faz reaksiyonunda endotel üzerinde intrasellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olarak kandaki hücrelerin hedef organa ulaşmasını sağlar. Ayrıca IL-4 ve IL-13 salınımı ile B hücrelerinden IgE sentezlenir. IL-5 ve GM-CSF ise dolaşımdan dokuya eozinofil göçünde rol oynar. IL-4, IL-13 gibi sitokinler histamin ve triptaz gibi mediyatörler epitelyum değişimi ve ‘remodelling’ oluşumuna neden olur.²⁴ Allerjik enflamasyonda önemli rol oynayan mast hücreleri, fibroblastların göçünü ve çoğalmasını uyaran mediyatörlerin de ana kaynağıdır.²⁹

2.3.5. Bazofiller

Bazofiller geç faz yanıtta daha etkin olup eozinofillerle birlikte mediyatör salınımını gerçekleştirirler. Mast hücreleri gibi allerjenlere IgE/Fc ϵ RI ile bağlanırlar ve aktive olduklarında histamin, sLT’ler, prostoglandinler, kallikreinler, IL-4, IL-13 gibi sitokin ve mediyatörleri salgılar. İnsanlar üzerinde yapılan birçok çalışmada allerjenle indüklenen geç faz yanıtta burun ve bronş mukozasında bazofil infiltrasyonu gösterilmiştir.³¹

2.3.6. Nötrofiller

Nötrofiller konak savunmasında ve antijene karşı enflamatuvar yanıtta önemli hücrelerdir. Allerjik havayolu hastalıklarındaki rollerinin tam olarak bilinmemekle birlikte ciddi astımlı hastaların balgamında, az sayıda bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerinde ve bronş biyopsilerinde saptanmıştır.³² Nötrofillerin steroide dirençli olduğunun gösterilmesinden dolayı bu hastalardaki nötrofil artışı steroide zayıf yanıt ile açıklanabilir.³³ Nötrofiller astım patogeneğinde etkin olup bronkokonstrüksiyon, doku hasarı ve kronik enflamasyona neden olan birçok proenflamatuvar mediyatörleri, proteazları ve sitotoksik bileşimlerin sentezini ve salınımını gerçekleştirir. Son yıllarda astımlı hastaların nötrofillerinde yüksek afiniteli IgE reseptörünün eksprese edildiğinin gösterilmesi ile allerjik hastalıklarda nötrofillerin rolü desteklenmiştir.³⁴ Böylece

nötrofillerin allerjik enflamasyonda IgE-bağımlı mekanizma yoluyla etkili olduğu düşünülmektedir.

2.3.7. Makrofajlar

Astımda havayollarına göç eden makrofajlar, kandaki monositlerden farklılaşır ve FcεRII'ye allerjen bağlanması ile aktive olurlar. Lökotrien D4, makrofajlardan TNF-α ve nitrik oksid gibi enflamatuvar ürünlerin salınımını uyarır. Makrofajların salgıladığı bir çok farklı sitokin allerjik enflamasyonda hücrelerin koordinasyonunu sağlar. Makrofajlar farklı immünolojik yanıtların oluşması için değişik özellikte sitokin salgılama kapasitesine sahiptir. Mevcut uyarıya bağlı olarak enflamasyonun şiddetini azaltıp çoğaltabilirler. Makrofajlar oynadıkları antienflamatuvar rolle allerjik enflamasyonun gelişimini engellemektedirler. Alveolar makrofajlar normalde lenfosit fonksiyonları üzerine baskılayıcı etkileri olmakla beraber astımda muhtemelen allerjen maruziyeti sonrası bu etkide bir yetersizlik gelişmektedir. Makrofajlardan salınan enflamatuvar protein olan IL-10'un sekresyonu astımlı hastalarda azalmıştır. Sağlıklı insanlardaki makrofajlar, muhtemelen IL-12 salınımı ile T lenfositlerde salgılanan IL-5 sekresyonunu baskılamaktadır. Ancak bu baskılanma da allerjik astımlı hastalarda bozulmuştur.³⁵

Makrofajlar ayrıca T lenfositler için allerjeni işleyip antijen sunan hücre gibi davranırlar. Ancak bu etki alveolar makrofajlarda çok daha az işlevseldir. Allerjik hastalıklarda makrofajların alt tipleri değişik tip enflamatuvar, antienflamatuvar ve fagositik rol üstlenirler.³⁵

2.3.8. T lenfositler

T lenfositler allerjik hava yolu enflamasyonunda antijene karşı immün sistemin adaptasyon ve koordinasyonunda kilit rol oynar. Yüzeylerindeki belirteçlere göre T lenfositler iki ayrı gruba ayrılırlar ve farklı görevler üstlenirler. CD4+ yüzey antijeni olan T lenfositler humoral immünite ile ilişkili olup yardımcı T hücreleri olarak adlandırılırlar. Bunun yanında sitotoksik T hücreler yüzeylerinde CD8+ antijeni taşırlar ve hücre aracılı yanıtta görev alırlar. CD4+ lenfositler, antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki MHCII ile yabancı antijenleri tanırlar. Böylece antijen spesifik enflamatuvar yanıtı ve immünoglobulin yapımını düzenledikleri için astım ve allerjik

rinitin patogeneğinde önemli yer tutarlar.²⁹

Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda, CD4⁺ T hücre klonlarının yaptığı sitokinler incelendiğinde, farklı klonların ya IL-2, interferon gama (IFN- γ), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) veya IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ve IL-9 salgıladığı görülmüştür. Birinci klonun oluşturduğu yanıt Th 1, ikincisi ise Th2 tipi yanıt şeklinde adlandırılmıştır.¹⁰ CD4⁺ T lenfositlerin antijenik uyarı ile Th1 ve Th2 alt tipine farklılaştığı düşünülmekte ancak bu dönüşümün nasıl olduğu halen açıklanamamaktadır. Ortaya konan bazı mekanizmalar ise şu şekildedir;²⁴

a) Allerjenin miktarı; Allerjen miktarı az ise Th2 yanıtı, fazla ise Th1 yanıtı oluştuğu gösterilmiştir.

b) Allerjenle karşılaşma zamanı ve süresi

c) Ortamda mevcut olan sitokinler; IFN- γ ile IL-12 ve IL-18 ortamda mevcutsa bu sitokinler Th1 tipi sitokin profiline neden olur. Eğer ortamda IL-4 varsa Th2 tipi sitokin profili gözlenir.

d) Allerjenin yapısal özelliği; Bakteriyel antijenlerdeki mevcut ‘sitidin fosfat guanozin’ (CpG) dizilimi Th1 cevabına neden olurken, paraziter etkenler Th2 cevabı oluşturur.

e) Yeni tanımlanmış bir transkripsiyon faktörü olan T-bet, Th1 cevabı oluştururken, c-maf, GATA-3’ün yanısıra PGE2 ve nitrik oksid (NO)de Th2 cevabına neden olur.

2.3.8.1. Th1 Hücreler

Th1 hücreleri IL-3, TNF- α , yüksek miktarda IFN- γ üretirler. IFN- γ patojenin intrasellüler proliferasyonunu engeller ve fagosit içindeki intrasellüler patojenleri öldürür. Ayrıca sitotoksik CD8⁺ hücrelerinin gelişimini desteklerler.

2.3.8.2. Th2 Hücreler

Th2 hücreleri IFN- γ haricinde IL-4, IL-5, IL-9, ve IL-13 üretirler. Bu sitokinler mast hücrelerini, eozinofil, makrofaj ve epitel hücrelerini etkileyerek allerjik enflamasyona dahil ederler. Yardımcı T hücrelerinin farklılaşmasında en önemli etken antijenle etkileşim sonrası mikro çevrede salınan sitokin çeşididir. CD4⁺ T hücresinin antijenle ilk karşılaşması sırasında ortamda IL-12 veya IFN- γ ’nın baskın olması Th1

hücresine farklılaşmaya, IL-4 ve IL-13'ün baskınlığı ise Th2 hücresine farklılaşmaya neden olur.³⁶

Hayatın erken döneminde geçirilen enfeksiyonların Th1 ilişkili yanıtın baskın hale gelmesine neden olduğu, bununla birlikte çocukluk çağında enfeksiyon geçirmeme veya temiz bir çevrede bulunmanın ise Th2 hücre yanıtını baskın hale getirdiği ve atopiye zemin hazırladığına dair kanıtlar mevcuttur.^{9,30}

2.3.8.3. T regülatuar Hücreler

Th1 ve Th2 hücrelerinin oluşturduğu immün yanıt mekanizması CD4+ regülatuar T hücrelerince (Tr) düzenlenir. Regülatör (düzenleyici) T hücreleri, sitotoksik ve T yardımcı hücre etkinliğini baskılayarak immün reaksiyonları düzenlerler. Geç duyarlılık reaksiyonlarını ve antikör yapımını inhibe ederler. Bu hücreler, immün toleransın devamında ve otoimmünitenin önlenmesinde önemli rol oynarlar. Tr hücreleri; Treg, Tr1 ve Th3 hücreleri şeklinde tanımlanmış olup IL-10, TGF- β gibi inhibitör sitokinlerin salınımı ile Th1 yanıtını baskılamaktadır. Fare modellerinde Treg hücrelerinin timusta geliştiği ve muhtemelen organa özgü otoimmünitenin gelişmesini engellediği düşünülmektedir Tr1 hücreleri ise genellikle akciğer lenf nodlarındaki doğal T hücresinden farklılaşmakta ve salgıladığı IL-10 ile efektör Th hücrelerini baskılamaktadır. Tr hücrelerinin üçüncüsü olan Th3 hücreleri tümör büyüme faktör beta (TGF- β) üretmektedir. Th3 hücreleri bağırsaktaki lenf dokularında gelişmekte olup oral toleransın sağlanması ile ilişkilidir.³⁷

Hücre içi bakterilerce aktif hale getirilen makrofajlar tarafından IL-12 üretilir. Hücre içi organizmalar aynı zamanda Naturel Killer (NK) hücrelerinden IFN- γ salgılamasını doğrudan veya IL- 12'nin NK hücresini uyaran etkisi ile artırır. IFN- γ CD4+ hücrelerinde Th1 hücrelerine değişimi sağlar. Sonuç olarak hücre içi mikroorganizmalar Th1 baskın cevabı oluşturur.

Atopik hastalık öyküsü olmayan hastalardan izole edilen paraziter hastalıklara spesifik yardımcı T hücre klonlarının çoğunu Th2 hücre profili oluşturmaktadır. Yüksek düzeyde IL-4 ve düşük düzeyde IL-2 ve IFN- γ salgılayıp güçlü IgE yanıtına neden olur. Diğer taraftan atopik hastalardan elde edilen allerjen spesifik CD4+ T hücre klonları Th2 lenfokin profiline sahiptir ve IgE sentezine neden olur. Buna karşın aynı hastalarda veya atopik olmayan hastalardan elde edilen allerjik olmayan antijenlere spesifik T

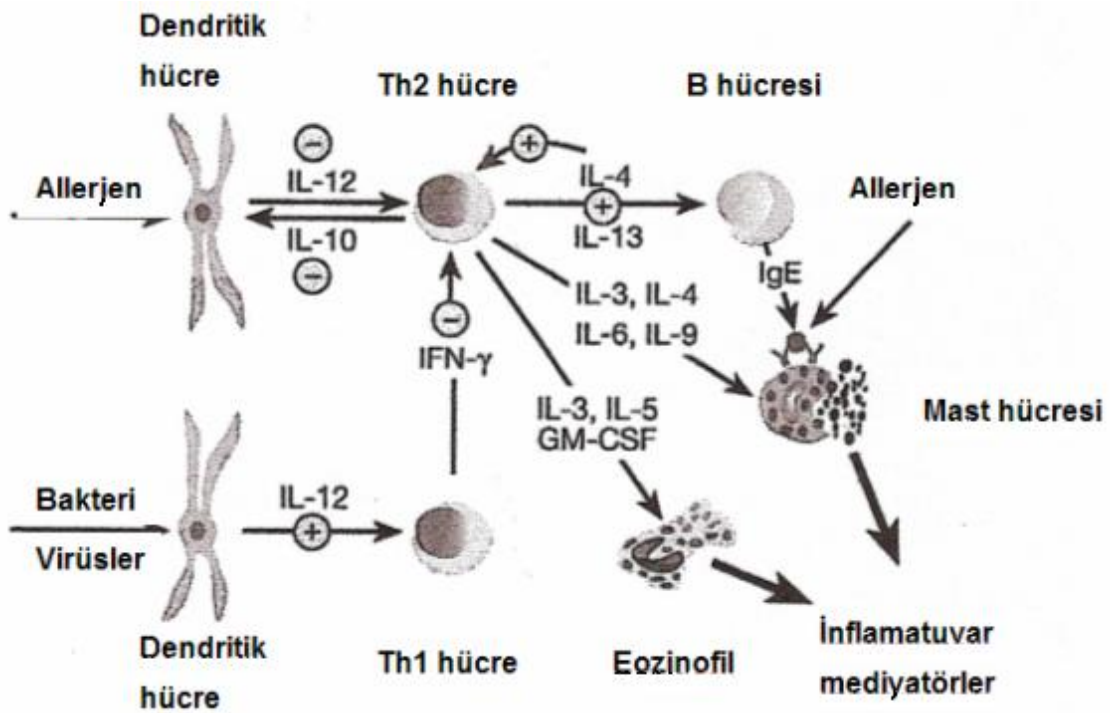
hücre klonları Th1 lenfokin profiline sahiptir. Dolayısıyla parazitler tarafından salınan antijenlerin genetik yatkınlık olmaksızın Th2/IgE yanıtına neden olabileceği gösterilmiştir. Ancak genetik yatkınlığın allerjenlere karşı gösterilen Th2/IgE yanıtının oluşmasında kritik etken olduğu görülmektedir.³⁸ Paraziter enfeksiyonlar lenfositlerden, mast hücrelerinden veya diğer non-B, non- T hücrelerden (bazofil ve mast hücre serisi) IL-4 salgısını uyarır ve böylece parazite özgün CD4+ T lenfositlerin Th2 tipine dönüşüp IgE ve eozinofillere bağlı reaksiyonlarla parazitin uzaklaştırılmasını sağlar.

Helmintlere karşı reaksiyon gösteren Th2 hücreleri, IFN- γ haricinde IL-4, IL-5, IL-9, ve IL-13 üretirler. Helmint enfeksiyonları, eozinofili (IL-5 aracılığıyla) ve IL-4 aracılığıyla B hücreleri tarafından üretilen IgG4 ve IgE oluşumunu destekleyen helmint-spesifik Th2 hücrelerinin gelişimiyle ilişkilidir. İlginç olarak helmint enfeksiyonları Th2 hücrelerinin lokal infiltrasyonu ile karakterize olup Th1 hücreleri gibi Th2 hücreleri de enfeksiyon bölgesine göç edebilmektedir. Asıl olarak allerjik astımın patogenezi, allerjik astımla ilişkili havayolu allerjenlerine karşı gelişen havayolu yanıtında Th2 hücrelerinin benzer lokal aktivitesine dayanmaktadır.³⁹

Allerjik hastalıklarda immün cevabın başlangıç evresinde doğal T hücrelerinden Th1 ve Th2 hücre gruplarına dönüşümü sağlayan sitokinler başlıca makrofajlar, mast hücreleri ve NK hücreleri tarafından salgılanır. Antijen uyarımı ile antijen sunan dendritik hücrelerden IL-12 salınımı artar ve doğal T hücreler Th1 efektör hücrelere dönüşür. Antijen miktarının az olması durumunda gerekli uyarı sinyalleri oluşamaz ve böylece Th1 yanıtından ziyade Th2 yanıtı baskın hale gelir. Farklılaşan T hücrelerinin salgıladığı sitokinler de seçilen Th klonunun devam eden farklılaşma ve klonal genişlemesini düzenler. Th2 hücreleri tarafından salgılanan IL-4 ve IL-10 makrofajlardan IL-12 salgılanmasını önler. IL-4 ayrıca IFN- γ üretimini inhibe eder. Böylece Th1 klonunun gelişmesi engellenir. Th 1 hücresinin salgıladığı IFN- γ ise makrofajları uyardığı gibi Th1 farklılaşması arttırır ve herhangi bir Th2 hücre çoğalmasını da baskılar (Şekil 4).⁴⁰ Bunun yanında Th2 farklılaşmasına neden olduğu gösterilen yeni tanımlanmış bir faktör ise timik stromal lenfopoetin olup astımlı hastaların periferik dokularda epitel hücrelerinden salındığı ve dendritik hücrelere reseptörleri aracılığıyla bağlanıp T hücrelerinin Th2 yönünde farklılaşmasına yol açtığı gösterilmiştir.⁴¹

Bazı kişilerde neden antijenlere karşı Th2 tipi sitokin üretilip alerji geliştirdiği,

diğerlerinin de aynı antijene karşı Th1 yanıtının baskın veya karışık T hücre cevabını verdiği tam olarak anlaşılamamıştır. Allelrik ve non-allerjik ailelerdeki IgE düzeyi ile kromozom 5q31 üzerinde yerleşmiş bir veya daha fazla polimorfik gen arasındaki ilişki gösterilmiştir.⁴² Beşinci kromozomdaki bu bölgede IL-13, IL-4, IL-5, interferon düzenleyici faktör-1, koloni sitümüle edici faktör-2 (GM-CSF) genlerini de saptanmıştır. IL-9 geni de aynı bölgede bulunması şaşırtıcıdır.



Şekil 4. Allerjik hastalıklarda T hücre sitokin salınımı. Patterson's Allergic Diseases 2004' den alınmıştır

2.4. Allerjik Enflamasyonda Sitokin Fonksiyonu

Sitokinler küçük glikolizasyona uğramış protein parçaları olup hücreler arası sinyalizasyonu sağlayarak büyüme, proliferasyon, hücrelerin dönüşümü ve immünglobulinlerin alt tiplerinin oluşumu gibi bir çok farklı fonksiyonları mevcuttur. Sitokinler, lenfositlerden salgılandıkları zaman lenfokinler, monosit ve makrofajlar tarafından salgılandığında monokinler, lökositler tarafından salgılandıkları zaman ise interlökin olarak adlandırılmaktadır Son yıllarda allerji üzerine yapılan çalışmalarda, enflamatuvar yanıtın düzenlenmesi, sürdürülmesi ve etkisinin arttırılmasında

sitokinlerin kritik rol üstlendiği saptanmıştır.³⁷ Bazı enflamatuvar ve sitotoksik fonksiyonları düzenlemek için, Th1 hücreleri, makrofajların ve NK hücrelerinin beraber etkileşimi gereklidir. Th1 hücreler; IFN- γ , TNF- β ve TNF- α , makrofajlar; TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-13 ve NK hücreleri de IFN- γ ve IL-12 salgılar. Bu sitokinler özellikle virüs ile enfekte olan hücrenin etkili bir biçimde sitolizinde beraber çalışırlar. Aynı sitokinler makrofaj ve granülositlerin öldürme fonksiyonlarını arttırırlar.

IFN- γ en önemli makrofaj aktive edici faktör olup aktive makrofajların tarafından IL-12 salgılanımını sağlar. IFN- γ NK hücreleri, Th 1 ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonu ve sitokin sekresyonları için kuvvetli bir uyarıcıdır.²⁹

Plazma hücrelerinin uygun uyarı sonrası B hücrelerine dönüşmesi sonucunda IgE sentezlenir. B hücrelerinde IgE yapımı için gerekli en önemli sitokin IL-4'tür. IL-4 aslen B hücrelerinin uygun antijenik uyarımı sonrası salınan B hücre büyüme faktörü olarak tanımlanmıştır. Th lenfositlere ek olarak NK hücreleri, doğal T hücreleri, eozinofiller, bazofiller ve muhtemelen de mast hücrelerince de sekrete edilir. Mast hücreleri ve eozinofillerde IL-4, aktif olmayan formda bulunur ve allerjik enflamatuvar yanıtta hızlıca ortama salınır. IL-4 B hücre aracılığıyla MHC class II antijen, B7,1 (CD80), B7,2 (CD86), CD40, yüzey IgM ve düşük afiniteli IgE reseptör (CD23) ekspresyonunu uyarır. Ayrıca ϵ -germline ağır zincir transkripsiyonunu başlatarak immünglobulin alt tiplerinin IgM'den IgE'ye kaymasına neden olur. Endotelde VCAM-1 ifadesini arttırır ve eozinofillere özgü kemokinlerin endotel hücresinde salınımını uyarabilir. Diğer B hücrelerini aktive eden sitokinler (IL-2, -5, -6, -9) IL-4 ile beraber IgE sekresyonunu arttırır. Anti IL-4 antikorları verilen veya genetik olarak IL-4 veya IL-4 reseptör defekti sağlanan veya IL-4 sinyal proteini olan STAT-6 eksikliği geliştirilen farelerde IgE'nin olmadığı veya salınımının azaldığı saptanmıştır. Transgenetik fare modellerinde, artmış IL-4 seviyelerinin havayollarında mukus birikimine neden olduğu saptanmıştır.²⁰

IL-3, IL-4, IL-9 ve IL-10 farede mast hücre büyüme faktörü olarak görev görürler ve IL-13, IL-4 ile birlikte astımda havayolu aşırı duyarlılığını, mukus hipersekresyonunu ve havayolunda eozinofiliyi sağlarlar. IL-13 eotaksin üretimini arttırarak endotelial hücrelerde VCAM-1 ekspresyonunu sağlar. Bunun yanında eozinofil apoptozisini engeller. IgE ve IgG₄ üretimini, tek ve spesifik reseptörü ile bağımsız olarak gerçekleştirir. IL-4'e kıyasla Th2 hücre dönüşümüne katkısı yoktur.

İmmünize olmayan farelere günlük IL-13 verilmesiyle havayolu aşırı duyarlılığı, pulmoner eozinofili, total serum IgE seviyelerinde yükselme ve havayollarında mukus sekresyonunun arttığı görülmüştür.

IL-5 eozinofiliye neden olmakla birlikte astımlı hastaların BAL sıvılarında artmış miktarda saptanmıştır. Fare, domuz ve maymunlarda oluşturulan astım modelinde IL-5 antikorları uygulanım sonrasında BAL sıvısında ve havayolu dokusunda eozinofillerin sayısında azalma saptanmıştır.²⁰

IL-9 astım patogeneğinde önemli bir sitokindir. Th2 ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu ve aktivitesini arttırlar. Ayrıca eozinofillerin ayrışmasını, aktivasyonunu ve havayollarında toplanmasını düzenler. B hücrelerini IgG ve IgE salgılaması için uyarır, Th2 hücrelerinin apoptozunu engeller. Mast hücrelerinin ayrışmasını, proteaz üretimini ve IgE reseptör ekspresyonunu sağlar. IL-9 gen lokusu, atopi, artmış serum IgE seviyesi ve havayolu aşırı duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir.⁴³

Th2 sitokini olan IL-10 un astımdaki rolü halen aydınlatılmamıştır. Astımlı hastaların allerjenle uyarılması sonucu alınan BAL sıvılarında IL-10 seviyelerinde artış saptanmıştır. IL-10 mast hücrelerinin ve bazofillerin proliferasyonuna, ayrışmasına ve degranülasyonuna neden olur.²⁰

Th 2 hücre yanıtının sitokin paterni sonucunda artan mast hücresi ve eozinofiller IgE'yi bağlayıp yüzey reseptörü şeklinde kullanır ve antijenle bu şekilde bağ oluşturup değişik mediyatörler salgırlar. IL-4 Th2 hücrelerinin farklılaşmalarını arttırırken Th1 hücrelerine farklılaşmayı engeller. Ancak Th1 hücrelerde IFN- γ yapımıyla IL-4'e bağlı IgE sentezini baskılar, eozinofil ve mast hücre aktivasyonunu durdurur, Th2 proliferasyonunu azaltır.³⁵

2.5. T hücre Fonksiyonları ve Enflamasyondaki Etkileri

T hücreleri astımda sitokin salgılamasında, eozinofillerin enflamatuvar yanıtın koordinasyonunda, eozinofillerin toplanmasında ve mast hücrelerinin hava yollarında kalmasında önemli rol oynar. Doğal T hücrelerinden dönüşen Th1 ve Th2 hücrelerinin farklı fonksiyonları mevcuttur. Hücresel immünitenin temel hücreleri Th 1 hücreleridir. Th1 yanıt ile hücre içi bakterileri ve virüsleri ortadan kaldırmayı sağlar.⁴⁴ IFN- γ ise makrofajları aktive edip, mikrobisidal etkilerini güçlendirir ve fagositozu arttırır. Ayrıca insan monositinde IL-12 nin p35 transkripsiyonunu arttırarak, IL-10'u inhibe ederek ve

CD40 ekspresyonunu arttırarak IL-12 seviyesinde yükselmeye neden olduğu saptanmıştır. Farelerde yapılan çalışmalarda IFN- γ , fagositlerdeki Fc reseptörüne bağlanarak, klasik kompleman yolunu aktive eden IgG2a izotip üretimini arttırır. IFN- γ , TNF- α ile beraber CD95 (Fas) ekspresyonunu arttırır ve eozinofillerin Fas ligand-aracılı apoptozunu sağlar.²⁰ Th 1 hücreleri, B hücrelerinde ise yalnızca sadece IgM, IgG2a antikörlerinin sentezini uyarır. Sonuç olarak bu antikorla opsonize edilen bakteriler fagositlerce ortamdan temizlenir. IFN- γ ve IL-2 CD8+ sitotoksik hücrelerin farklılaşmasına ve aktivasyonuna neden olur.

Allerjik enflamasyonda önemli rol oynayan Th2 hücrelerinin esas fonksiyonu ise IgE ve eozinofillere bağlı immün reaksiyonların başlatılmasıdır. Th2 hücreleri, B hücreleriyle IgM, IgG1, IgA ve IgE yapımı için ilişki kurar.⁴⁵ IgE aracılı allerjik hastalıklarda, özellikle allerjik astımda başlıca Th2 lenfositler etkindir.⁴⁶ Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki ilişki ortama salınan sitokin türüne göre değişiklik gösterir. Th1 yanıtı daha çok enfeksiyöz olaylarda ön planda iken Th2 yanıtı daha çok allerjik hastalıkların patogeneğinde etkin rol oynar.

2.6. Th1 Yanıtını Etkileyen Faktörler

Bakteriyel antijenler ve hücre içi parazitler Th1 immün yanıtı uyarırlar. Th1 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler sarkoidoz, lepra, tüberküloz gibi granümatöz hastalıklarda gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna yol açar. Bunun yanında mikobakteri, Salmonella gibi hücre içi mikroorganizmalar, Hepatit B'ye karşı gelişen immün yanıttan, otoimmünite gelişiminden, allograft rejeksiyonu ve gebeliğin erken sonlanmasından Th1 immün yanıtı sorumludur. Allerjik hastalıkların patogeneğinde Th1/Th2 dengesi önemli rol oynamaktadır. Son 10 yılda gelişmiş ülkelerde atopik allerji prevalansındaki belirgin artış, kısmen çocukluk çağında (hava yolu allerjenleri ile duyarlanma periyodu) ve Th2 gelişimini engelleyen sitokin artışına yol açan enfeksiyonlarda, özellikle tüberküloz enfeksiyonlarındaki belirgin azalma ile paralellik göstermektedir.⁶ Allerjik hastalıkların gelişmesinde, enfeksiyonların öne sürülen inhibe edici etkisi mikroorganizmaların, Th 1 sitokinlerinin salınımını indüklemesi sonucu allerjenlere verilecek yanıtı, mikro çevredeki bu sitokinler aracılığıyla Th 1'e çevirmesi olarak açıklanabilir.⁹ Hayvanlarda yapılan bir çok çalışmada BCG'nin ve diğer mikobakteriyel enfeksiyonların Th1 yanıtını indükleyerek alerji gelişimini engellediğini

göstermiştir.

2.7. BCG ve Astım İlişkisi

BCG ile aşılamanın astım, allerjik rinit ve atopik dermatit prevelansındaki rolü tam olarak anlaşılmış değildir. Son dönemde Batı toplumunda astım prevelansındaki artışı açıklamaya çalışan hijyen hipotezi, astım ve allerjik hastalıkların prevelansı ile aseptik çevre arasındaki ters ilişkiyi vurgulamıştır. Bu hipotezi üreten yayınlardan birinde Shirakawa ve arkadaşları, Japon okul çağı çocuklarında mikobakterilere maruzuyet, tuberkülin yanıt miktarı ile atopi arasındaki ters ilişkiyi gösterlerdir.³ Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise atopik hastalıklar ile tuberkülin yanıtları arasındaki ilişki araştırılmış ancak BCG ile aşılanan çocuklarda hayatın ileri döneminde gelişebilecek atopik durumla tuberkülin yanıtları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.⁴⁷ Fare deneyleri, sağlıklı ve astımlı yetişkinlerde ve okul çağı çocuklarında yapılan çalışmalarda, BCG ile aşılanmanın Th1 yanıtında ve düzenleyici fonksiyonlarında artışa neden olduğu, buna karşın Avustralya gibi Orta ve Kuzey Avrupa da yapılan epidemiyolojik çalışmalarda BCG aşılmasının erken yaşta yapıldığında astım veya atopi prevelansı üzerine etkisinin olmadığı saptanmasına rağmen farklı etnik gruplarında bu çalışmalar yapıldığında araştırmacılar BCG aşılmasının Batılı ülkelerde bazı göçmen gruplarında ve gelişmekte olan ülkelere koruma sağlayabileceğini göstermiştir.⁴⁸ L. Garcia-Marcos ve ark. doğumda yapılan BCG aşısının homojen popülasyonlu İspanyol okul çağı çocuklarında atopik hastalıkların gelişimine etkisini araştırmışlar ve BCG aşılmasının astım ve allerjik rinit üzerine zayıf ancak anlamlı etkisinin olduğunu saptamışlardır.⁴⁸

Batılı ülkelere BCG aşılmasının koruyucu etkisinin olduğunu gösteren tek çalışma Almanya da Gruber ve ark. tarafından yapılmış ve bu aşılanmanın astım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ancak zayıf koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.⁴⁹ Ancak bu etki allerjik rinit ve atopik dermatitte saptanmamıştır. Bu çalışmada Doğu ve Batı Almanya'dan BCG aşısını rutin kullanan ve kullanmayan merkezlerden alınan 6 ve 7 yaş okul çağı çocukları değerlendirilmiştir. Lojistik regresyon analizi ile Doğu-Batı arasındaki etkinin kontrolü saptanmaya çalışılsa da yaşam tarzı etkisi ile BCG etkisi arasındaki farkı saptamanın zor olduğu sonucuna varılmıştır.

Son dönemde yapılan çalışmalar Th2 hücrelerinin allerjik hastalıklarda kronik enflamasyonun yöneticisi olduğunu göstermiştir. Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 üretirler. Buna karşın Th1 hücreleri IL-2, IFN- γ ve TNF- β sekrete ederler. Th1 ve Th2 yanıtlarının belli derecede antagonist çalışmalarından dolayı bazı enfeksiyonların başlıca Th1 yanıtını arttırdığı ve allerjik Th2 yanıtını kısıtlandığı düşünülebilir. İmmunosupresif fonksiyonları ve sitokin profili olarak Th1 ve Th2 hücrelerinden farklı olan T regülatuar hücreleri allerjik Th2 hücre yanıtını baskılayabilmekte ve allerjen-spesifik immünoterapide ana rol oynamaktadır. Mikobakteriler Th1 yanıtını güçlü şekilde uyarırlar, Bunun yanında mikobakterilerin bazı komponentleri T regülatuar hücrelerini tetikleyebilirler. Mikobakteriyel lipoproteinler dendritik hücrelere ve Makrofaj bağlı Toll-like-reseptörlerine (TRL) bağlanırlar ve IL-12 sentezini sağlarlar, bu da Th1 yanıtını sağlar. Bir çok faktör T hücrelerinin Th1 ve Th2 hücrelerine dönüşümü sağlarken mikobakteri enfeksiyonları veya aşılama Th1 yanıtının oluşmasına neden olur. Batı Afrikada, Guinea-Bissau’da hayatın erken döneminde yapılan BCG ile aşılamanın , ileri yaşlarda hava kaynaklı allerjenler için yapılan deri testlerinde atopide bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada en fazla atopi sıklığında azalmanın yaşamın ilk haftasında aşılananlarda olduğu saptanmıştır.⁵⁰ Bundan sonra yapılan çalışmada erken BCG aşılmasının hırıltı, atopik duyarlanma ve allerjik rinit semptomlarında hayatın ilk 24 ayına kadar koruma sağladığı ancak sonraki dönemde etkili olmadığı görülmüştür.⁵¹ Doğumda yapılan BCG aşısının 2 ve 5 yaşlarında atopi, astım ve allerjik hastalıkların gelişiminin değerlendirilmesi için skin-prick testi kullanılarak yapılan uluslararası prospektif bir çalışmada, BCG aşısının çocuklarda allerjik semptomların gelişmesi üzerine koruyucu etkisinin olduğu ancak Türkiye ve Tayland gibi hala rutin aşılama yapılan ülkelerde IgE ile duyarlanmaya etkisinin olmadığı saptanmıştır.⁵²

İsveç’te yapılan retrospektif bir çalışmada İsveç’te doğan çocuklarda BCG ile ilişkili atopik hastalıkların sıklığında azalma görülmemiş olup çoğunluğu Asya ve kuzey Amerika da göç eden ailelerin çocuklarında atopik hastalıkların sıklığında azalma saptanmıştır. Bu da etnik kimliğin aşının immünomodülatör etkisine yakınlıkla ilişkili olabileceğinin düşündürmektedir.^{53,54} BCG aşılması ile tüberküloz enfeksiyonu arasındaki ayırımı çok önemlidir. Avrupadaki bazı ülkeleri, Amerika, Avustralya, Kanada ve Yeni Zelanda’yı da içeren 23 ülkede 85 merkezli çalışmada tüberküloz

sıklığı ile astım, allerjik rinokonjuktivit ve atopik egzema semptomlarının sıklığı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sonuçta tüberküloz bildirim oranı ile hayat boyu olan hırıltı ve astım arasında anlamlı olarak ters ilişki saptanmıştır. Tüberküloz oranında 100.000 de 25 artış hırıltı prevelansında %4.7 düşüşe neden olduğu görülmüştür.^{54,55}

Alerji ve astım modeli oluşturulan hayvanlarda Bacillus Calmette –Gue´rin ve diğer mikobakterilerin antijenlerin altta yatan mekanizmalarının IgE ile duyarlanması ve astım üzerine etkisi araştırılmıştır. Bir çalışmada IgE ye yüksek derecede yanıt veren Balb-c fare, ovalbuminle duyarlandırılmadan 14 gün önce BCG ile enfekte edilmiştir. BCG ile aşılama anlamlı olarak IgE/IgG1 antikor yanıtını , splenositlerden IL-4 , IL-10 sekresyonunu, havayolu aşırı duyarlılığını, havayoluna eozinofil göçünü ve BAL sıvısında IL-4 veIL-5 seviyelerinin artışını engellemiştir. Buna paralel olarak anti-ovalbumin spesifik IgG2a antikor ve splenositlerde IFN-γ üretiminde artış saptanmıştır.^{55,56}

Ovalbuminle hava yolu eozinofilisi oluşturulan fare modeli kullanılan başka bir çalışmada allerjenle duyarlanmadan 4 hafta önce intra nazal BCG verilen farelerde, BCG verilmeyen farelere göre akciğerlerdeki eozinofil sayısında %90-95 oranında azalma saptanmıştır. Bu durum lenf nodlarından gelen T hücreleri tarafından salınan IL-5 düzeyindeki azalma ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte BCG’nin neden olduğu havayolu eozinofilisi, IFN-γ reseptörü çıkarılmış farelerde güçlü bir şekilde azalmış olup intranazal IL-5 uygulaması sonrası kısmen geri dönüşümlü olduğu görülmüştür. BCG enfeksiyonunun allerjen özgü Th2 yanıtını baskılaması sadece akciğerlerle sınırlı kalmakta, kan eozinofil sayısını veya allerjen özgü IgG1 ve serum IgE seviyesini etkilememektedir. Ancak IFN-γ nın bu etkiyi nasıl düzenlediği halen bilinmemektedir.^{56,57} Mikobakterilerin özellikle TRL2’ye bağlanarak belirgin olarak IL-12 sentezine yol açtığı ve böylece Th1 dönüşümünü ve IFN-γ ve TNF-α sekresyonunu sağladığı bilinmektedir.⁵⁷ Bu sitokinlerin invitro ve in vivo olarak Th2 immün mekanizmalarını baskıladığı gösterilmiştir.⁵⁸⁻⁶² Bu bağlamda TRL2’yi tetikleyen bir mikobakteriyal muramil-tripepdit analogunun IFN-γ, IL-12 ve ayrıca IL-10’u arttırıp Th2 sitokinlerini, IgE’yi ve akciğerde eozinofiliyi baskılamaktadır.⁶³ Mikobakteri ve atopi arasındaki ters ilişkiyi göstermek için yapılan diğer çalışmalardan elde edilen bilgilere göre mikobakterilere maruz kalımda belirgin Th2 kısıtlayıcı etki görülmektedir.^{55,56,64-66}

Allerjik hastalıklarda terapötik ajan olarak *Bacillus Calmette –Gue´rin* ve diğer mikobakterilerin araştırıldığı bir çalışmada, daha önceden ev tozu akarlarına alerjisi olan astımlı çocuklara uygulanan BCG serum IgE seviyelerinde düşüşe neden olmuş ancak periferik kandaki mononükleer hücrelerce üretilen IL-2, IL-4, IL-5 ve IFN- γ üzerine etkisi olmamıştır.⁶⁷ BCG aşılmasının astımlı insanlar üzerinde yapıldığı başka bir kontrollü randomize çalışmada, Th2 immün yanıt üzerine herhangi bir baskılayıcı etkinin görülmemesine karşın akciğer fonksiyonlarında ciddi düzelme olduğu ve astım tedavisine gereksinimin azaldığı tesbit edilmiştir.⁶⁸ Aynı grup tarafından yapılan sonraki bir çalışmada BCG ile tekrar aşılananlarda akciğer fonksiyonlarının daha fazla düzeldiği ve IFN- γ /IL-4 oranında belirgin artış olduğu görülmüştür.⁶⁹ İntradermal BCG aşısının atopik çocuklarda uygulandığı bir çalışmada daha önce ekspresyonu olmamasına karşın periferik kandaki mononükleer hücrelerde IFN- γ mRNA ekspresyonuna neden olduğu görülmüştür. Ayrıca atopik çocukların geç tip hipersensitivite yanıt gelişiminin azaldığı görüşüne zıt olarak tüm hastalarda aşıdan 8 hafta sonra uygun tüberkülin deri yanıtı geliştiği saptanmıştır.⁷⁰

İnsan ve hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda elde edilen bilgiler ışığında atopik hastalıklar üzerine BCG nin tedavi ve koruyucu etkisi arasındaki uyumsuzluk olduğu görülmüş ve aşılama zamanı, uygulanım yeri, genetik farklılık ve etnik durum, değişen derecede çevresel mikobakteri maruziyeti gibi faktörlerin buna neden olabileceği düşünülmüştür.⁷¹

İnsanlarda T regülatuar hücrelerinin duruma bağlı olarak allerjik bozuklukların baskılanmasında önemli rol oynadığına dair kanıtlar mevcuttur. Başarılı immünoterapi uygulanan hastalarda T regülatuar hücrelerinin IL-10 ve transforming growth faktör beta (TGF- β) üretimini artırarak allerjen-spesifik T hücre yanıtsızlığına neden olduğu gösterilmiştir. Allerjen spesifik immünoterapi aşısındaki adjuvanların allejen spesifik T regülatuar hücrelerinin üretimine neden olarak allerjen spesifik immünoterapinin başarısını arttırdığı ileri sürülmektedir. Bu görüşü destekleyici olarak , *M.vaccae*'nın CD4+CD45RB^{low} T_{reg} hücrelerinin IL-10 ve TGF- β sekresyonuna neden olduğu ve alerjiye yatkın fareleri havayolu enflamasyonundan koruduğu gösterilmiştir. *M.vaccae*, enflamasyonda IL-10, TGF- β ve TNF- α gibi immünomodülatuar sitokinlerin sekresyonu ile potansiyel regülatuar rol oynadığı gösterilen CD11c⁺ hücrelerini tetikler.⁷¹

Günümüze kadar olan kanıtların çoğu hayatın erken döneminde yapılan geliştirilmiş mikobakteriyal aşılara gereksinim duyulduğunu ileri sürmektedir. Th2 immün yanıtının baskılanıp Th1 yanıtının uyarılması, mikobakteriyel antijenlerin altta yatan etki mekanizmalarını açıklayamamasına karşın T_{reg} hücrelerinin BCG'yi de içeren diğer mikobakteri tipleri tarafından uyarılmasının araştırılması daha değerli olabilir.

Son zamanlarda hayvan deneylerinde astım modelinin kullanılması allerjik havayolu enflamasyonu ve havayolu hiperreaktivite mekanizmasının anlaşılmasında yeni bir bakış açısı sağlamıştır. Fare, tavşan, domuz, köpek ve insan olmayan primatlar gibi birkaç türün, farklı çeşitte allerjenle sensitizasyonu ve sonrasında spesifik allerjenle havayollarının uyarılması ile astımın karakteristik patolojik, immünolojik, fizyolojik özelliklerinin oluşması sağlanabilir. Hayvan modelleri insanların kompleks hastalıklarının patogenezinin araştırılmasında önemli yer teşkil eder. Zamanlama, uyarılma, konum ve allerjenle tetikleme tipi, hayvan modelindeki astımın oluşturulmasında önemli bileşenlerdir. Hayvanlarda geç-faz allerjen spesifik pulmoner hastalık oluşturulmasında ovalbumin (OVA) ve diğer allerjenlerin (örn. akar, polen, parazitik\ fungal proteinler) uygulanım protokolleri tanımlanmıştır. Fareler, insan reaktif havayolu hastalarına benzer olarak akciğer fizyolojisinde IgE aracılı allejik yanıtın ve metakolinin neden olduğu değişikliklerin oluşturulmasına uygundur.

Biz de bu tez çalışmasında BCG aşısının BALB/c farelere farklı dönemlerde (doğumdan sonra erken ve geç dönemde, ayrıca erişkin döneminde) yapılarak Th1 baskın yanıt oluşturup allerjik enflamasyon ve astım gelişiminin engellenebileceğinin gösterilmesi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi TIPDAM Etik Kurulundan 28.11.2007 tarih ve 4 numaralı karar ile onay almıştır.

Çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde Balb/c farelerle yapıldı. Hayvanların bakım ve izlemi TIPDAM bölümünde gerçekleştirildi.

3.1. Farelerin Takibi

Çalışmaya 4 aylık, gebe Balb/c fareler alındı. Gebe fareler oda ısısında (18-21°C), 12 saat aydınlık 12 saat karanlık siklus oluşturularak, %40-%70 rutubetli ortam sağlanarak izlendi. Beslenmeleri Pellet yemle (ad-libidum) sağlandı. Doğum sonrasında yavrular annelerin yanında bırakıldı. Kannibalizmi önlemek için görevli veteriner hekim tarafından gerekli önlemler alındı. Yavru fareler 1 aylık olunca olası çiftleşme ve gebeliği önlemek için cinsiyetleri belirlenip anneden ayrıldılar. Ayrı kafeslere konulan yavru fareler üç gruba ayrıldı. Hayvanlar kulak çentikleme ve kafeslerin etiketlenmesi ile kimliklendirildi.

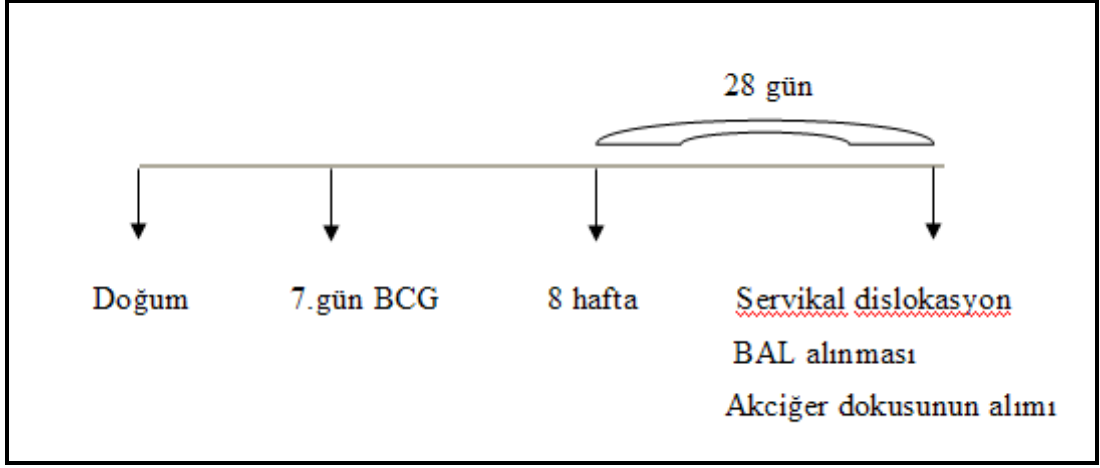
3.2. Denek Grupları

Deney hayvanları dört gruba ayrıldı.

Grup I; 7 günlük grup; Bu gruptaki yavru fareler BCG yapılan ve kontrol grubu olacak şekilde iki gruba ayrıldı.

Grup IA; Deney hayvanlarının 10 tanesine doğduktan bir hafta sonra intra dermal (ID) yolla BCG aşısı (5×10^4 CFU, Pasteur Merieux Serum & Vaccine) uygulandı. BCG aşısı yapılan farelerin kulakları çentiklendi. 1 ay sonra cinsiyetlerine göre ayırım yapıldı. 8 haftalıkken astım modeli oluşturuldu (Şekil 4). Astım modeli oluşturulduktan 28 gün sonra ketamin anestezisi ve servikal dislokasyon uygulandı. BAL sıvı örnekleri ve akciğer dokusu alındı.

Grup IB; Yavru farelerin 10 tanesine ise BCG aşısı yapılmadan 8 haftalıkken astım modeli oluşturuldu. 28 gün sonra ketamin anestezisi ve servikal dislokasyon uygulandı. BAL sıvı örnekleri ve akciğer dokusu alındı.



Şekil 5. 7 günlük yavru farelerde astım modelinin oluşturulması

Grup II; 14 günlük grup; Yavru fareler BCG yapılan ve kontrol grubu olacak şekilde iki gruba ayrıldı.

Grup IIA; Bu gruptaki farelerin 10 tanesine doğumdan sonra 14 günlükken BCG aşısı yapıp kulakları çentiklendi. 8 haftalık olduklarında atopi modeli oluşturulan farelere 28 gün sonra ketamin anestezisi ve servikal dislokasyon uygulandı. BAL sıvı örnekleri ve akciğer dokusu alındı.

Grup IIB; Bu gruba 10 yavru fare alındı. 8 haftalıkken astım modeli oluşturulan farelere, 28 gün sonra ketamin anestezisi ve servikal dislokasyon uygulandı. BAL sıvı örnekleri ve akciğer dokusu alındı.

Grup III; Yetişkin grup; Bu grupta, 2 aylık fareler alındı. BCG yapılan ve BCG yapılmayan olarak 2 gruba ayrıldı.

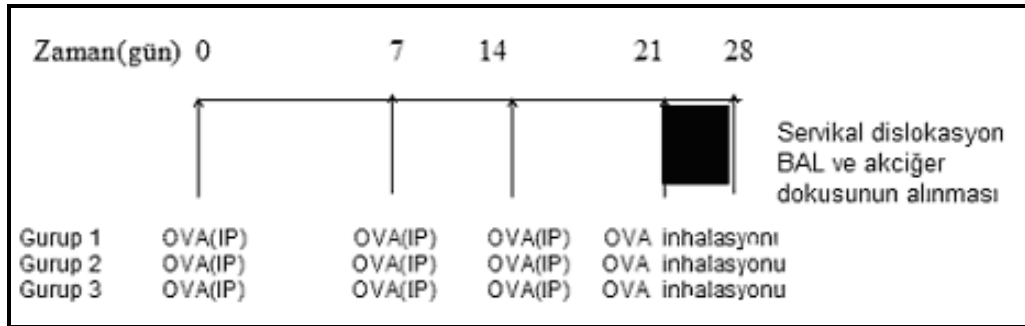
Grup IIIA; İntra dermal BCG yapılan 10 yetişkin fare gruba alındı. BCG yapılan gruptan 1 erkek ve 1 dişi fare saptayamadığımız nedenden dolayı exitus oldu. Deneklere astım modeli uygulandı. Astım modeli oluşturulduktan 28 gün sonra ketamin anestezisi ve servikal dislokasyon uygulanarak BAL sıvı örnekleri ve akciğer dokusu alındı.

Grup IIIB; Bu gruba BCG aşısı yapılmayan 10 yetişkin fare alındı. Astım modeli oluşturuldu. 28 gün sonra ketamin anestezisi ve servikal dislokasyon uygulandı. BAL sıvı örnekleri ve akciğer dokusu alındı

Grup IV; Kontrol grubu; Bu grupta rastgele seçilen 5 tane, üçü erkek ve ikisi dişi olan yetişkin fareler alındı. Ketamin anestezisi ve servikal dislokasyon uygulanan farelerin BAL sıvı örnekleri ve akciğer dokusu alındı.

3.3. Farede Astım Modelinin Oluşturulması

İlk üç gruptaki tüm farelere 8 haftalık olduklarında tek doz olarak birer hafta ara ile 3 kez Ovalbumin (OA) (Grade V, Sigma A-5503) 25 mikrogram/ml dozunda IP uygulandı (Şekil 4). OA, %0,9'luk NaCl içinde çözülüp adjuvan olarak 13 mg/ml olacak şekilde Aliminyum Hidroksid eklendi. Tüm enjeksiyonlarda 29GX1/2'lik (1cc=100 ünite, MEDSET) insülin enjektörü kullanıldı. Son enjeksiyondan bir hafta sonra inhalasyon yöntemi kullanılarak OVA ile challenge yapıldı. İnhalasyon %0,9 NaCl içinde %5 konsantrasyonda OVA olacak şekilde 5lt/dk nebulizatör (Sunrise Med. Model No; 4650U) ile 20 dakika süresince yapıldı. 20x15x10 cm. ebatlarında bir ucu nebulizatöre bağlı olan aerosolün dışarı çıkacağı deliklere sahip plastik kutu kullanıldı. OA inhalasyonunun diğer fareleri etkilememesi için ayrı bir oda kullanıldı. İnhalasyona bir hafta boyunca hergün devam edilerek astım modeli oluşturuldu.



Şekil 6. Deney hayvanlarına uygulanan işlemlerin zamansal gösterimi

3.4. BAL Alınması

Ketaminle sedatize edilip servikal dislokasyon uygulanan farelere boyun altından vertikal insizyon yapıldı. Trakea açığa çıkarılıp orta hatta sabitlendi. 24 G kateter ile trakeaya steril olarak girildi. 0.3 ml PBS ile 5 kez bronkoalveolar lavaj yapıldı. Alınan BAL sıvısı 4 °C de 10 dakika santrifüj edilerek hücre sayımı için ayrıldı. Süpernatant ise IL-4, IL-10, IL-12 ve IFN gama analizi için -80°C de saklandı.

3.5. Akciğer Dokusunun Alınması

Göğüs duvarı açıldıktan sonra aorta kesildi ve akciğerler sağ ventrikül yoluyla kansız berrak sıvı gelene kadar PBS ile perfuze edildi. Akciğerlerin 25 cmH₂O basınçla 15 dakika %10 formalin fosfatlı tamponla 24 G intratrakeal kateter kullanılarak inflasyonu sağlandı. Alınan akciğer dokuları formol içine konuldu ve 48 saat süreyle fiksasyon uygulanarak parafine gömüldü. Morfolojik ve histolojik analiz için seri mid sagital kesitler alındı. Akciğer dokusundan elde edilen preparatlar hematoksilin eozin boyasıyla boyandı. Patolojik incelemeler bu preparatlar üzerinden yapıldı.

3.6. Bal Sıvısında Hücre Sayımı

Alınan BAL sıvısı çökeltisinden Shandon Cytospin 4 ile ‘cytospin’ preparatlar hazırlanarak Papanikolau boyası ile boyandı. Preparatlar farklı iki kişi tarafından 40x büyütmede mikroskop altında incelendi. 200 hücre sayılıp makrofaj, lenfosit, polimorfonükleer lökosit, eozinofil ve bronş epiteli olarak kaydedildi. Sonuçların ortalaması alınarak kaydedildi.

3.7. Akciğer Dokusunun Değerlendirilmesi

Akciğer dokusundan alınan mid sagital kesitler hematoksilin eozinle boyandı. Mikroskop altında 20x büyütmede peribronşiyal inflamasyon derecesine göre değerlendirildi.

0; İnflamasyon yok

1+ Peribronşiyal İnflamasyon; Bronş etrafında lokal inflamatuvar hücre birikimi var.

2+ Peribronşiyal İnflamasyon; Bronş etrafında 5 den az hücre dizisinde mononükleer hücre birikimi.

3+ Peribronşiyal İnflamasyon; Bronş etrafında 5 den fazla hücre dizisinde mononükleer hücre birikimi.

Ayrıca akciğer dokusundan hazırlanan kesitler müsin boyası ile boyandıktan sonra müsin varlığına göre değerlendirildiler.

3.8. Fare Bal Sıvısında IL-4, IL-10, IL-12, IF- γ 'nın Eliza Yöntemi İle Değerlendirilmesi

Farelerden alınan BAL sıvısı ELIZA yöntemi ile çalışılmadan önce -80°C de saklandı. Oda ısısında eritilen BAL sıvısı IL-4 (BMS613, Bender MEDSystems Avusturya), IL-10 (BMS614, Bender MEDSystems Avusturya), IL-12 (BMS6004, Bender MEDSystems Avusturya) ve IFN- γ (BMS606, Bender MEDSystems Avusturya) hazır kitleri kullanılarak ELISA Plate Reader (Medispec ESR 200) aletinde çalışıldı. Yıkama işleminde ELISA Plate Washer (Medispec ESW 300) kullanıldı.

Eliza Basamakları;

1- Çalışma öncesi yıkama solusyonu, Assay Buffer, Fare IL4, IL10, IL-12, IFN- γ Standart solusyonu kitler için belirtilen talimatlara uygun olarak hazırlandı. Çalışmada 96 kuyuluk IL4, IL10, IL-12, IF- γ için ayrı ayrı monoklonal antikörle kaplı düz zemin plak kullanıldı.

2- Kuyucuklar yaklaşık 400 μ l yıkama solusyonu (Wash Buffer) ile 2 kez yıkandı. Son yıkama sonrasında kuyucuklardaki solüsyon boşaltıldı. Ancak kuyucuklar kurumadan çalışılmasına özen gösterildi.

3-Kuyucuklar plak üzerinde 8 adet çift kolon olacak şekilde dizildi. Kuyucuklar A₁, A₂, B₁, B₂, C₁, C₂, D₁, D₂, E₁, E₂, G₁, G₂, H₁, H₂ olarak adlandırıldı (Şekil 5). Her kuyucuğa 100 μ l örnek solüsyondan (Sample Diluent) pipetlendi. Son iki kuyucuk, H₁ ve H₂ kör kuyucuk olarak değerlendirildi. Hazırlanmış Standart solüsyon A₁ ve A₂ adı verilen kuyucuğa pipetlendi. A₁ ve A₂ den 100 μ l alınıp B₁ ve B₂ kuyucuğuna kondu. Bu işlem yedi kez tekrarlandı. En son kuyucuklar olan G₁ ve G₂ den 100 μ l alınıp dışarı atıldı.

4- Kör kuyucuklara 100 μ l örnek solüsyondan konuldu.

5- BAL sıvısının konacağı kuyucuklara 50 μ l örnek solüsyon konuldu.

6- Örnek kuyucuklara 50 μ l BAL sıvısı kondu.

7- Biyotin Konjugat solüsyonu hazırlandı.

8- Tüm kuyucuklara 50 μ l Biyotin Konjugat pipetlendi.

9- Kuyucuklar adeziv filmle kaplanıp oda ısısında (18-25°C) 200 rpm hızda sallayıcı içinde 2 saat inkübe edildi.

10- Streptavidin-HRP solüsyonu hazırlandı.

- 11- Adezif filmler çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez 300 µl yıkama solusyonu ile yıkandı.
- 12- Tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP solusyonu konuldu.
- 13- Kuyucuklar adezif filmle kaplanıp oda ısısında (18-25°C) 200 rpm hızda sallayıcı içinde 1 saat inkübe edildi.
- 14- Adezif filmler çıkarılıp kuyucuklar boşaltıldı. Kuyucuklar 3 kez 300 µl yıkama solusyonu ile yıkandı.
- 15- Tüm kuyucuklara Tetrametil-Benzidin Substrat solusyonundan 100 µl pipetlendi.
- 16- Kuyucuklar oda ısısında (18-25°C) 10 dakika inkübe edildi. Direkt yoğun ışığa maruz kalmamasına özen gösterildi.
- 17- Plak üzerindeki renk değişimi dikkatle takip edildi. En yüksek konsantrasyondaki standart (A_1 , A_2) koyu mavi rengi aldığı anda 100 µl Stop solusyonu kondu. Stop solusyonunun tüm kuyucuklarda eşit dağıldığı ve üniform olduğu görüldü.
- 18- Sonuçlar Stop solusyonu konduktan hemen sonra okundu.
- 19- Renk reaksiyonu primer dalga boyun 450 nm olan filtre ile okundu.
- 20- Standartların verdiği optik dansiteye göre absorbans- pg/ml grafiğinde eğri çizildi. Örneklerin verdiği optik dansite bu eğri üzerinden pg/ml cinsinden hesaplandı.

	1	2	3	4
A	Standard 1 (1000.0 pg/ml)	Standard 1 (1000.0 pg/ml)	Örnek 1	Örnek 1
B	Standard 2 (500.0 pg/ml)	Standard 2 (500.0 pg/ml)	Örnek 2	Örnek 2
C	Standard 3 (250.0 pg/ml)	Standard 3 (250.0 pg/ml)	Örnek 3	Örnek 3
D	Standard 4 (125.0 pg/ml)	Standard 4 (125.0 pg/ml)	Örnek 4	Örnek 4
E	Standard 5 (62.5 pg/ml)	Standard 5 (62.5 pg/ml)	Örnek 5	Örnek 5
F	Standard 6 (31.3 pg/ml)	Standard 6 (31.3 pg/ml)	Örnek 6	Örnek 6
G	Standard 7 (15.6 pg/ml)	Standard 7 (15.6 pg/ml)	Örnek 7	Örnek 7
H	Kör	Kör	Örnek 8	Örnek 8

Şekil 7. Kuyucukları plak üzerindeki dizilimi ve adlandırılması

3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS (Versiyon 11,0) paket programı ile yapıldı. Sayısal bulgular ortalaması $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Bulguların karşılaştırılmaları Kruskal-Wallis ve Man-Whitney U testleri kullanılarak yapıldı. Korelasyon analizi için ise Spearman testi kullanıldı. Testlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamıza ağırlığı 5 ile 30 gram arasında olan 65 tane Balb/c fare alındı. Çalışma sırasında yetişkin olup BCG yapılan gruptan 2 Balb/c fare bilinmeyen neden dolayı exitus oldu.

4.1. Gruplar

Çalışmaya alınan farelerin gruplar içerisindeki cinsiyetlerine göre dağılımı tablo 1’de gösterilmiştir. Grupların dağılımı;

Grup IA; 7 günlükken BCG yapılan ve 6. haftada OVA ile astım modeli oluşturulan grup.

Grup IB; 7 günlükken BCG yapılmayan ve 6. haftada OVA ile astım modeli oluşturulan grup.

Grup IIA; 14 günlükken BCG yapılan BCG yapılan ve 6. haftada OVA ile astım modeli oluşturulan grup.

Grup IIB; 14 günlükken BCG yapılmayan ve 6. haftada OVA ile astım modeli oluşturulan grup.

Grup IIIA; Yetişkin dönemde BCG yapılan ve 6. haftada OVA ile astım modeli oluşturulan grup.

Grup IIIB; Yetişkin dönemde BCG yapılmayan ve 6. haftada OVA ile astım modeli oluşturulan grup.

Grup IV; Herhangi bir işlem yapılmayan grup.

Tablo 1. Gruplardaki Fare Sayısının Dağılımı

Cins	Gruplar							Toplam (n)
	Grup I		Grup II		Grup III		Grup IV	
	A*	B*	A	B	A	B		
Erkek (n)	2	6	7	5	4	5	3	32
Kız (n)	8	4	3	5	4	5	2	31
Toplam (n)	10	10	10	10	8	10	5	63

A*; BCG yapılan grup.

B*; BCG yapılmayan grup.

4.2. BAL Bulguları

7 günlük BCG yapılan grupta (Grup IA) BAL sıvısı hücre sayımında eozinofil sayısı % $1,8 \pm 1,13$ (0-4), 7 günlükken BCG yapılmayan grupta (Grup IB) ise % $24,6 \pm 10,9$ (12-44) idi. 7 günlük BCG yapılan grupta, 7 günlükken BCG yapılmayan gruba göre eozinofil sayısı istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p=0,000$). 7 günlükken BCG yapılan grupla 14 günlükken BCG yapılan grup arasında eozinofil sayısındaki fark anlamlı değildi ($p=0,739$). Ancak erişkin dönemde BCG yapılan gruba göre eozinofil sayısı istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p=0,000$). 7 günlükken BCG yapılan grupla herhangi bir işlem yapılmayan grup arasında anlamlı fark yoktu ($p= 0,679$). Eozinofil sayılarının diğer gruplar arası karşılaştırılmaları tablo 3'te verilmiştir.

14 günlükken BCG yapılan grupta eozinofil sayısı % $1,7 \pm 1,05$ (0-78) iken, BCG yapılmayan kontrol grubunda % $34,6 \pm 6,1$ (22-40) idi. 14 günlükken BCG yapılan grup ile 14 günlükken BCG yapılmayan grup arasında eozinofil sayısı açısından anlamlı fark vardı ($p=0,000$). 14 günlükken BCG yapılan grup ile erişkin dönemde BCG yapılan ve yapılmayan grup arasında eozinofil sayıları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p=0,000$). Ancak herhangi bir işlem uygulanmayan grup ile 14 günlükken BCG yapılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,953$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan grupta eozinofil sayısı % $21 \pm 11,6$ (6-40) iken yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta % $29,2 \pm 9,5$ (14-40) idi. Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında eozinofil sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p= 0,173$).

Herhangi bir işlem uygulanmayan, rastgele seçilen erişkin grupta eozinofil sayısı % $1,4 \pm 0,89$ (0-2) olarak bulundu. Herhangi bir işlem uygulanmayan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılan ve yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup karşılaştırıldığında eozinofil sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,002$, $p=0,001$).

Grupların eozinofil sayıları ve istatistiksel olarak karşılaştırılması tablo 2 ve tablo 3'de gösterilmiştir. BAL sıvısında eozinofil hücreleri şekil 7'de gösterilmiştir.

Tablo 2. BAL Sıvısındaki Hücrelerin Dağılımı (%)

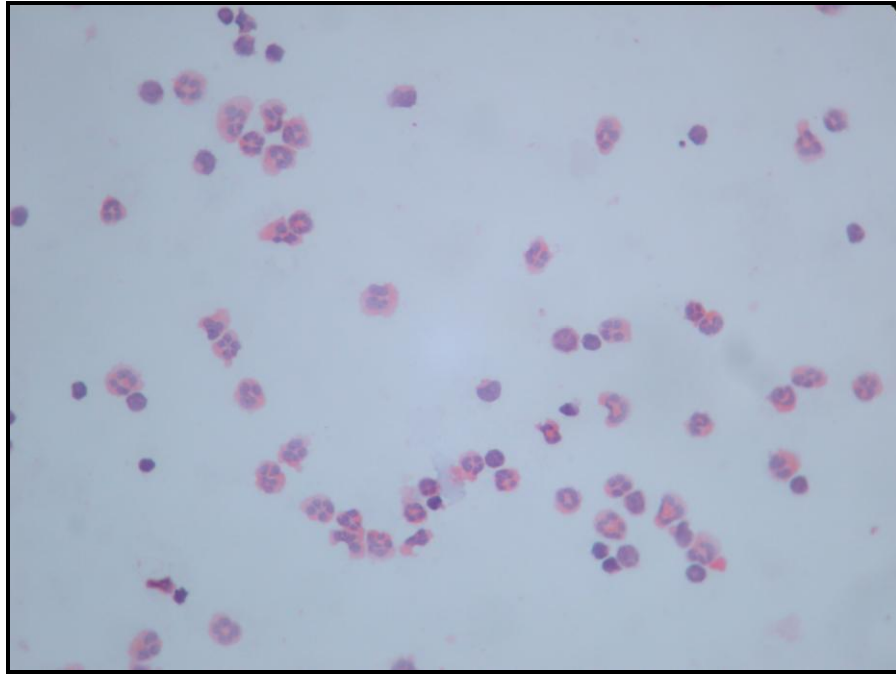
Gruplar	Eozinofil* (% ort.± SS)	Lenfosit (% ort.± SS)	Makrofaj (% ort.± SS)	Nötrofil (% ort. ± SS)
IA	1,8±1,13	32±16,1	51,9±22,6	13,2±12,5
IB	24,6±10,9	14,2±10,3	46,4±19,8	14,3±10,9
IIA	1,7±1,05	26,3±15,3	39,1±25,9	24,6±18,3
IIB	34,6±6,1	23,3±13,7	26,2±	22±9,9
IIIA	21±11,6	16,1±11,2	41,2±17,5	32±4,5
IIIB	29,2±9,5	26,1±12,4	31,7±12,5	34,6±12,8
IV	1,4±0,89	75±11,9	2±1,5	15,6±17,5

* 200 hücre içinde eozinofil yüzdesi.

Tablo 3. BAL Sıvısındaki Eozinofil Sayılarının Gruplar Arası Karşılaştırılması (p)

Gruplar	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
IA	-	0,000*	0,739	0,000*	0,000*	0,000*	0,679
IB	0,000*	-	0,000*	0,043*	0,633	0,315	0,001*
IIA	0,739	0,000*	-	0,000*	0,000*	0,000*	0,953
IIB	0,000*	0,043*	0,000*	-	0,012*	0,280	0,010*
IIIA	0,000*	0,633	0,000*	0,012*	-	0,173	0,002*
IIIB	0,000*	0,315	0,000*	0,280	0,173	-	0,001*
IV	0,679	0,001*	0,953	0,010*	0,002*	0,001*	-

*p<0,05 anlamlı.



Şekil 8. 7 günlükken BCG yapılmayan grubun BAL sıvısında eozinofil hücreleri (Papanikolau boyası ile boyanma, büyütme 40x)

4.3. Akciğer Biyopsi Bulguları

4.3.1. İnflamasyon Skoru

7 günlükken BCG yapılan grupta akciğer bulguları incelendiğinde 5 farede inflamasyon saptanmayıp diğer 5 farede ise 1+ inflamasyon saptandı. 7 günlükken BCG yapılan grup ile 14 günlükken BCG yapılan grup arasında inflamasyon skoru karşılaştırıldığında fark saptanmazken ($p=0,353$), diğer gruplarla karşılaştırıldığında inflamasyon skorunun düşük olduğu görüldü.

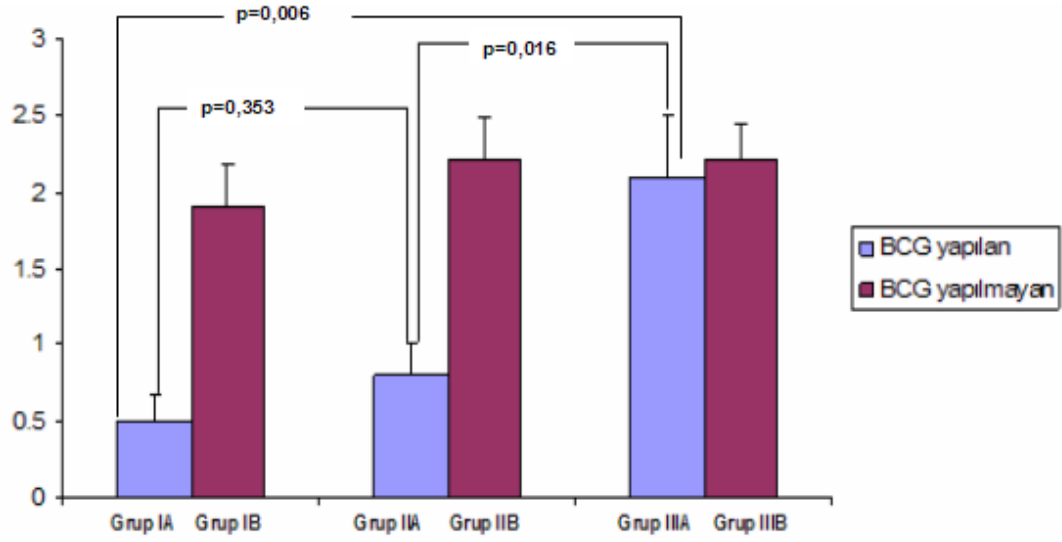
14 günlükken BCG yapılan grupta 3 farede inflamasyon saptanmadı. 6 farede 1+ inflamasyon, 1 farede ise 2+ inflamasyon saptandı. 14 günlükken BCG yapılan grup ile 7 günlük BCG yapılan grup ve herhangi bir işlem uygulanmayan grup hariç diğer gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan grupta 1 farede inflamasyon yokken, 1 farede 1+ inflamasyon, 2 farede 2+ inflamasyon ve 4 farede 3+ inflamasyon saptandı. Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,965$). Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile Herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0,006$).

Herhangi bir işlem uygulanmayan grupta 5 farede de inflamasyon yoktu. Grupların inflamasyon skor dağılımı tablo 4 ve şekil 8’de gösterilmiştir. İnflamasyon skorunun gruplar arası karşılaştırılması ise tablo 5’de gösterilmiştir. Akciğer biyopsisinde inflamasyon skoru şekil 9’da gösterilmiştir.

Tablo 4. Akciğer Biyopsisinde İnflamasyon Skoru

Gruplar	İnflamasyon Skoru (% ort.± SS)	Min.-Max
Grup IA	0,50±0,52	0-1
Grup IB	1,90±0,87	1-3
Grup IIA	0,80±0,63	0-2
Grup IIB	2,20±0,91	1-3
Grup IIIA	2,12±1,12	0-3
Grup IIIB	2,20±0,78	1-3
Grup IV	0	0

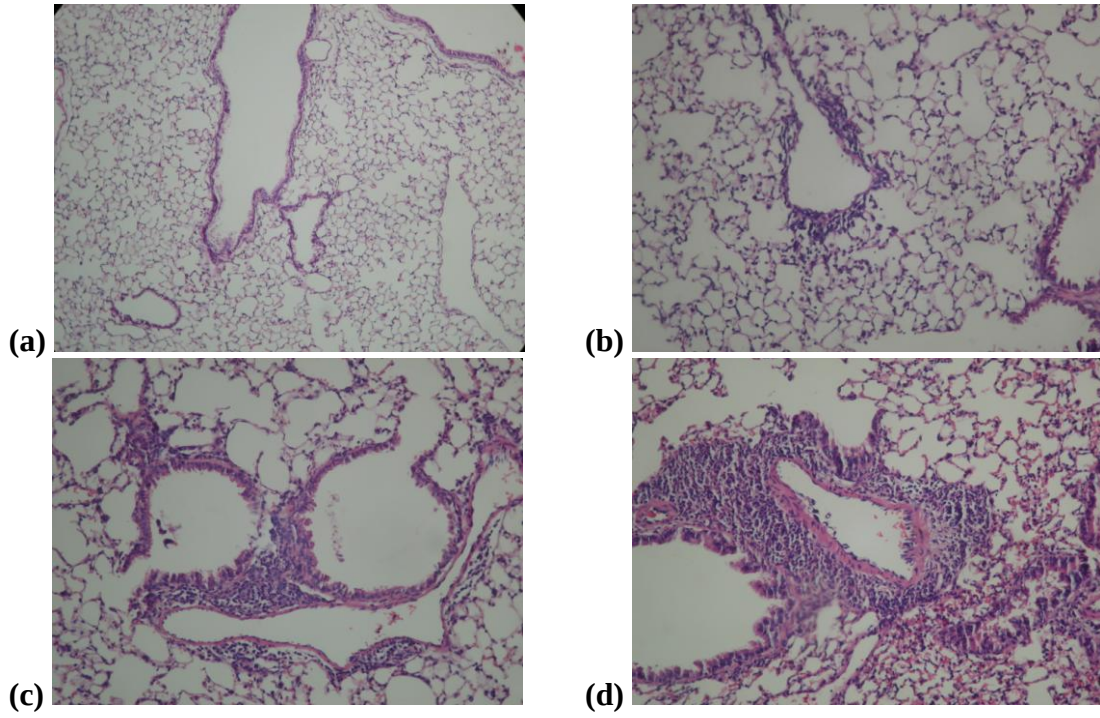


Şekil 9. Akciğer biyopsisinde inflamasyon skor dağılımının şematik gösterimi

Tablo 5. Akciğer Biyopsisinde İnflamasyon Skorunun Gruplar Arası Karşılaştırılması (p)

Gruplar	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
IA	-	0,002*	0,353	0,000*	0,006*	0,000*	0,129
IB	0,002*	-	0,011*	0,481	0,573	0,481	0,001**
IIA	0,353	0,011*	-	0,004*	0,016*	0,002*	0,028*
IIB	0,000*	0,481	0,004*	-	0,965	0,971	0,001*
IIIA	0,006*	0,573	0,016*	0,965	-	0,965	0,006*
IIIB	0,000*	0,481	0,002*	0,971	0,965	-	0,001*
IV	0,129	0,001*	0,028*	0,001*	0,006*	0,001*	-

* p<0,05 anlamlı



Şekil 10. Akciğer biyopsisinde peribronşiyal inflamasyon derecesine göre inflamasyon skorunun gösterimi. (a) Peribronşiyal inflamasyonun olmadığı normal akciğer dokusu (Grup IV), (b) bronş etrafında lokal inflamatuvar hücre birikiminin olduğu 1+ peribronşiyal inflamasyon (Grup IA), (c) bronş etrafında 5 den az hücre dizisinde mononükleer hücre birikiminin olduğu 2+ peribronşiyal inflamasyon (Grup IIA) ve bronş etrafında 5 den fazla hücre dizisinde mononükleer hücre birikiminin görüldüğü 3+ peribronşiyal inflamasyon (Grup IIIA) (hematoksilen eozinle boyanma, büyütme 20x).

4.3.2. Goblet Hücre Dağılımı.

Akciğer biyopsisinde goblet hücreleri dağılımında 7 günlükken BCG yapılan grupta 3 farede goblet hücresi mevcut olup 7 farede ise goblet hücresi görülmedi.

7 günlükken BCG yapılmayan grupta ise 4 farede goblet hücresi vardı. 6 farede ise goblet hücresi görülmedi.

14 günlükken BCG yapılan grupta 4 farede goblet hücre mevcut olup 6 farede goblet hücresi görülmedi

14 günlükken BCG yapılmayan grupta ise 6 farede goblet hücresi saptandı. 4 farede goblet hücresi saptanmadı.

Yetişkin dönemde BCG yapılan grupta 4 farede goblet hücresi saptanmış olup diğer 4 farede goblet hücresi yoktu.

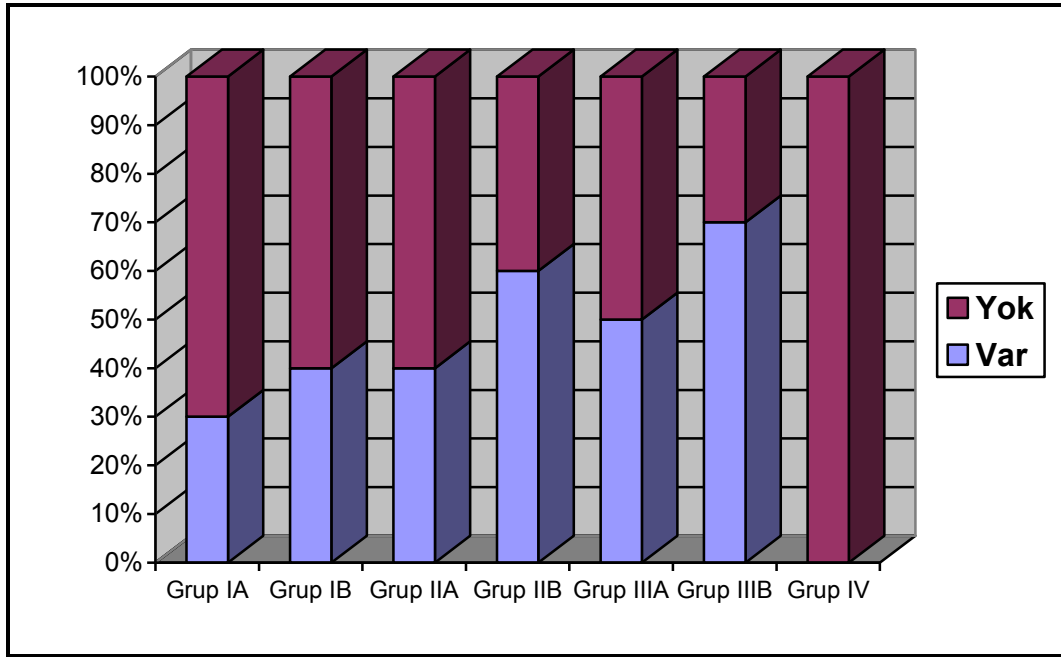
Yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta ise 7 farede goblet hücresi görüldü. 3 farede ise goblet hücresi yoktu.

Herhangi bir işlem uygulanmayan gruptaki 5 farede de goblet hücresi saptanmadı.

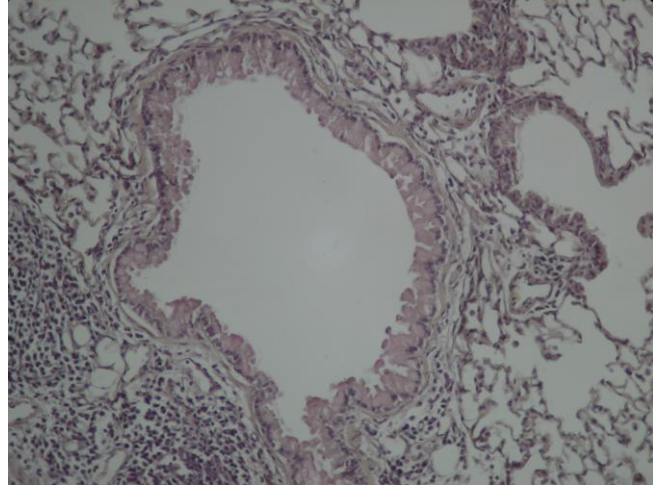
Akciğer biyopsisinde goblet hücre dağılımı tablo 6 ve şekil 10’da gösterilmiştir. Şekil 11’de ise akciğer dokusunda müsin boyası ile goblet hücreleri gösterilmiştir.

Tablo 6. Akciğer Biyopsisinde Goblet Hücre Dağılımı

Goblet Hücresi	Grup IA	Grup IB	Grup IIA	Grup IIB	Grup IIIA	Grup IIIB	Grup IV	Toplam (n)
Var	3	4	4	6	4	7	0	28
Yok	7	6	6	4	4	3	5	35
Toplam (n)	10	10	10	10	8	10	0	63



Şekil 11. Akciğer biyopsisinde goblet hücre dağılımı



Şekil 12. 7 günlükken BCG yapılmayan grubun akciğer dokusunda goblet hücreleri (müsin boyası ile boyanma, büyütme 20x)

4.4. BAL Sıvısında Sitokin Değerleri

4.4.1. İnterlökin-4

BAL sıvısında IL-4, IL-12, IL-10 ve IFN- γ düzeyleri ölçüldüğünde 7 günlükken BCG yapılan grupta IL-4 düzeyi $2,8 \pm 1,2$ pg/ml (0-4) idi. 7 günlükken BCG yapılmayan grupta ise IL-4 düzeyi $6,1 \pm 1,9$ pg/ml (2,5-8,1) olarak saptandı. IL-4 düzeyleri karşılaştırıldığında 7 günlükken BCG yapılan grup ile 7 günlükken BCG yapılmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,002$). 7 günlükken BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılan grup ve herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Ancak 7 günlükken BCG yapılan grup ile 14 günlükken BCG yapılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,063$).

14 günlükken BCG yapılan grupta IL-4 düzeyi $1,79 \pm 1,3$ pg/ml (0-3,6) olup 14 günlükken BCG yapılmayan grupta ise $6,12 \pm 4,79$ pg/ml (0-18) idi. 14 günlükken BCG yapılan grup ile 14 günlükken BCG yapılmayan grup, yetişkin dönemde BCG yapılan grup ve yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında IL-4 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,005$). 14 günlükken BCG yapılan grup ile herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,099$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan grupta IL-4 düzeyi $5,38 \pm 2,29$ pg/ml (2,64-8,1) idi. yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta ise IL-4 düzeyi $3,86 \pm 1,23$ pg/ml (2,1-

5,7) olarak bulundu. IL-4 düzeyleri karşılaştırıldığında yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,146$). Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,002$).

Herhangi bir işlem uygulanmayan grupta ise IL-4 düzeyi $0,59\pm0,83$ pg/ml (0-1,8) idi. Herhangi bir işlem uygulanmayan grup ile 7 günlükken BCG yapılmayan grup, 14 günlükken BCG yapılmayan grup, yetişkin dönemde BCG yapılan grup ve yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p<0,05$).

Gruplar arası IL-4 düzeyi ve karşılaştırılması tablo 7, tablo 8 ve şekil 12’de gösterilmiştir.

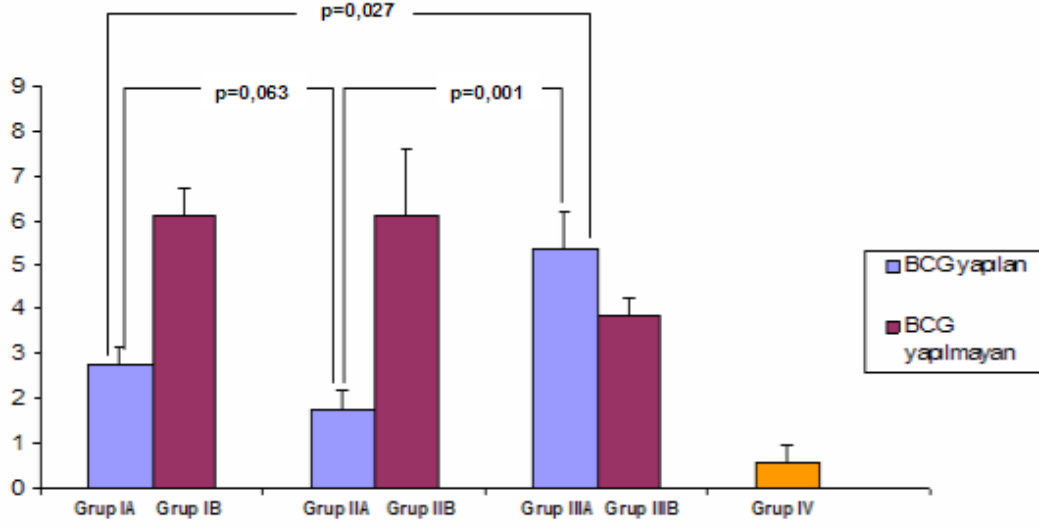
Tablo 7. BAL Sıvısında Sitokin Dağılımı (%)

Gruplar	İnterlökin 4 (pg/ml ort.± SS)	İnterlökin 12 (pg/ml ort.± SS)	İnterlökin 10 (pg/ml ort.± SS)	İnterferon gamma (pg/ml ort.± SS)
IA	2,8±1,2	88±67	59,6±28,6	48,2±26,3
IB	6,1±1,9	51,4±42,5	19,4±22,9	28,1±30,1
IIA	1,79±1,3	113,1±67,1	79,2±59,3	33,5±20,3
IIB	6,12±4,79	61,1±32,2	36,2±37,2	10,3±9,14
IIIA	5,38±2,29	50±44,5	9,12±14,6	17,7±12,7
IIIB	3,86±1,23	32,6±21,3	11,1±12,1	9,07±9,46
IV	0,59±0,83	21,6±17,9	4,4±9,83	1,48±2,03

Tablo 8. BAL Sıvısındaki İnterlökin-4 Değerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması (p)

Gruplar	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
IA	-	0,002*	0,063	0,011*	0,027*	0,165	0,005*
IB	0,002*	-	0,000*	0,579	0,633	0,011*	0,001*
IIA	0,063	0,000*	-	0,002*	0,001*	0,004*	0,099
IIB	0,011*	0,579	0,002*	-	0,829	0,123	0,005*
IIIA	0,027*	0,633	0,001*	0,829	-	0,146	0,002*
IIIB	0,165	0,011*	0,004*	0,123	0,146	-	0,001*
IV	0,005*	0,001*	0,099	0,005*	0,002*	0,001*	-

* $p<0,05$ anlamlı



Şekil 13. IL-4 değerlerinin şematik olarak gruplar arası karşılaştırılması

4.4.2. İnterlökin-12

Gruplar arası interlökin-12 düzeyi değerlendirildiğinde 7 günlükken BCG yapılan grupta IL-12 düzeyi 88 ± 67 pg/ml (20-265) ve 7 günlükken BCG yapılmayan grupta ise $51,4 \pm 42,5$ pg/ml (12-145) idi. IL-12 düzeyi gruplar arasında karşılaştırıldığında 7 günlükken BCG yapılan grup ile 7 günlükken BCG yapılmayan grup, 14 günlükken BCG yapılan grup, 14 günlükken BCG yapılmayan grup ve yetişkin dönemde BCG yapılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). 7 günlükken BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılmayan ve herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p = 0,003$).

14 günlükken BCG yapılan grupta IL-12 düzeyi $113,1 \pm 67,1$ pg/ml (42-270) olup 14 günlükken BCG yapılmayan grupta ise $61,1 \pm 32,2$ pg/ml (28-130) idi. 14 günlükken BCG yapılan grup ile 14 günlükken BCG yapılmayan grup arasında IL-12 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p = 0,019$). 14 günlükken BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılan grup, yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup ve herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan gruptaki IL-12 düzeyi $50 \pm 44,5$ pg/ml (0-142) idi. Yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta ise IL-12 düzeyi $32,6 \pm 21,3$ pg/ml (12-59) olarak bulundu. Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG

yapılmayan grup arasında IL-12 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,762$). Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,222$).

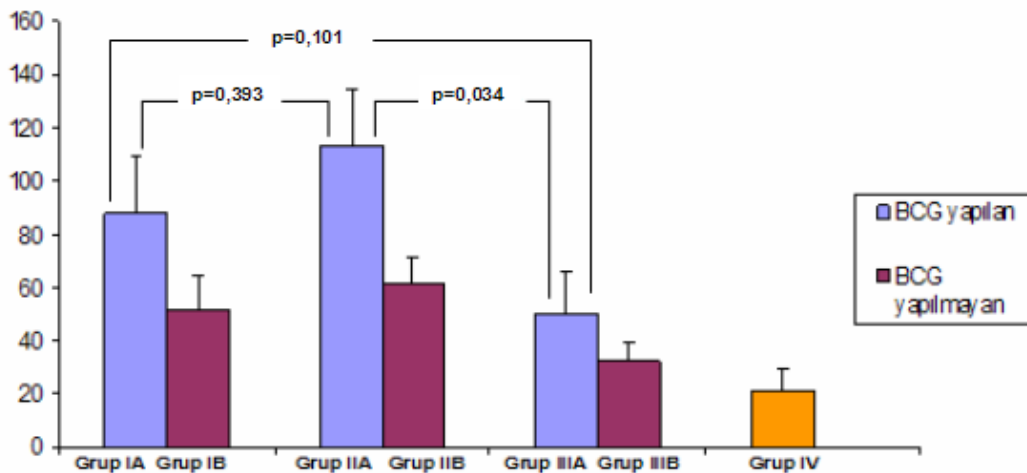
IL-12 düzeyi herhangi bir işlem uygulanmayan grupta $21,6 \pm 17,9$ pg/ml (9-52) olarak bulundu. Herhangi bir işlem uygulanmayan grup ile 7 günlükken BCG yapılmayan grup, yetişkin dönemde BCG yapılan grup ve yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında IL-12 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Gruplar arası IL-12 düzeyi ve karşılaştırılması tablo 7, tablo 9 ve şekil 13’da gösterilmiştir.

Tablo 9. BAL Sıvısındaki İnterlökin-12 Değerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması (p)

Gruplar	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
IA	-	0,063	0,393	0,123	0,101	0,003*	0,003*
IB	0,063	-	0,015*	0,280	0,829	0,393	0,055
IIA	0,393	0,015*	-	0,019*	0,034*	0,000*	0,001*
IIB	0,123	0,280	0,019*	-	0,360	0,043*	0,013*
IIIA	0,101	0,829	0,034*	0,360	-	0,762	0,222
IIIB	0,003*	0,393	0,000*	0,043*	0,762	-	0,129
IV	0,003*	0,055	0,001*	0,013*	0,222	0,129	-

* $p<0,05$ anlamlı



Şekil 14. IL-12 değerlerinin şematik olarak gruplar arası karşılaştırılması

4.4.3. İnterlökin-10

BAL sıvısında ölçülen IL-10 düzeyi 7 günlükken BCG yapılan grupta $59,6 \pm 28,6$ pg/ml (14-120), 7 günlükken BCG yapılmayan grupta ise $19,4 \pm 22,9$ pg/ml (0-82) idi. 7 günlükken BCG yapılan grup ile 7 günlükken BCG yapılmayan grup arasında IL-10 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,004$). 7 günlükken BCG yapılan grup ile 14 günlükken BCG yapılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,853$). 7 günlükken BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılan grup ve herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında IL-10 düzeyleri açısından anlamlı fark saptandı ($p=0,001$).

14 günlükken BCG yapılan grupta IL-10 düzeyi $79,2 \pm 59,3$ pg/ml (38-215) olup 14 günlükken BCG yapılmayan grupta ise $36,2 \pm 37,2$ pg/ml (0-110) idi. 14 günlükken BCG yapılan grup ile 14 günlükken BCG yapılmayan grup arasında IL-12 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0,035$). 14 günlükken BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılan grup ve herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan gruptaki IL-10 düzeyi $9,12 \pm 14,6$ pg/ml (0-33) idi. Yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta ise IL-10 düzeyi $11,1 \pm 12,1$ pg/ml (0-29) olarak bulundu. Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,829$). Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,622$).

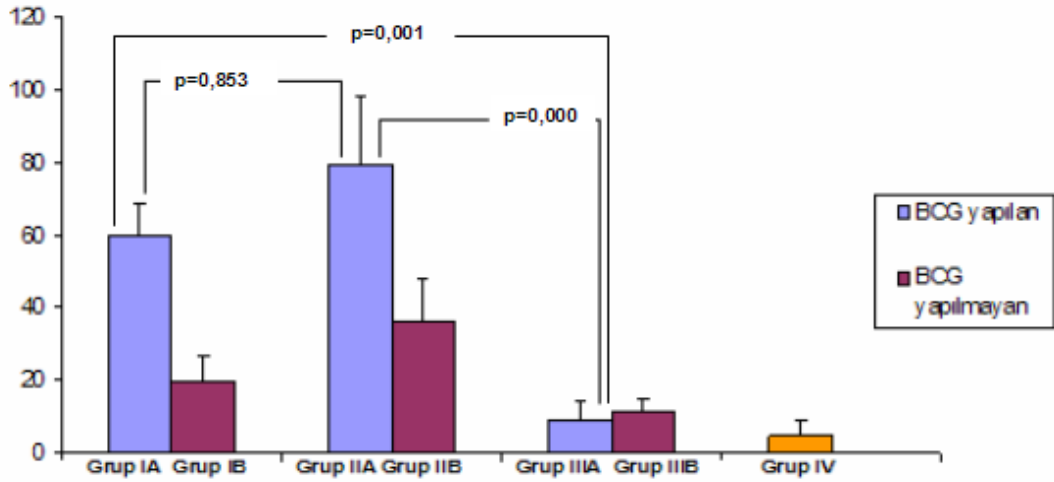
Herhangi bir işlem uygulanmayan grupta ölçülen IL-10 düzeyi $4,4 \pm 9,83$ pg/ml (0-22) idi. Herhangi bir işlem uygulanmayan grup ile 7 günlükken BCG yapılmayan grup, 14 günlükken BCG yapılmayan grup ve yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında IL-10 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Gruplar arası IL-10 düzeyi ve karşılaştırılması tablo 7, tablo 10 ve şekil 14’de gösterilmiştir.

Tablo 10. BAL Sıvısındaki İnterlökin-10 Değerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması (p)

Gruplar	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
IA	-	0,004*	0,853	0,247	0,001*	0,000*	0,001*
IB	0,004*	-	0,000*	0,247	0,101	0,529	0,075
IIA	0,853	0,000*	-	0,035*	0,000*	0,000*	0,001*
IIB	0,247	0,247	0,035*	-	0,173	0,105	0,055
IIIA	0,001*	0,101	0,000*	0,173	-	0,829	0,622
IIIB	0,000**	0,529	0,000*	0,105	0,829	-	0,440
IV	0,001*	0,075	0,001*	0,055	0,622	0,440	-

* p<0,05 anlamlı

**Şekil 15. IL-10 değerlerinin şematik olarak gruplar arası karşılaştırılması**

4.4.4. İnterferon Gamma

Gruplar arası interferon gamma düzeyi değerlendirildiğinde 7 günlükken BCG yapılan grupta IFN- γ düzeyi $48,2 \pm 26,3$ pg/ml (16-89) ve 7 günlükken BCG yapılmayan grupta ise $28,1 \pm 30,1$ pg/ml (0-82) idi. IFN- γ düzeyi gruplar arasında karşılaştırıldığında 7 günlükken BCG yapılan grup ile 7 günlükken BCG yapılmayan grup ve 14 günlükken BCG yapılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). 7 günlükken BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılan grup ve herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).

14 günlükken BCG yapılan grupta IFN- γ düzeyi $33,5 \pm 20,3$ pg/ml (14,2-82) olup 14 günlükken BCG yapılmayan grupta ise $10,3 \pm 9,14$ pg/ml (0-28) idi. 14 günlükken BCG yapılan grup ile 14 günlükken BCG yapılmayan grup arasında IFN- γ düzeyleri

açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,001$). 14 günlükken BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılan grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,101$). 14 günlükken BCG yapılan grup ile herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0,001$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan gruptaki IFN- γ düzeyi $17,7\pm 12,7$ pg/ml (0-35) idi. Yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta ise IFN- γ düzeyi $9,07\pm 9,46$ pg/ml (0-20,8) olarak bulundu. Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında IFN- γ düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,173$). Yetişkin dönemde BCG yapılan grup ile herhangi bir işlem uygulanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0,011$).

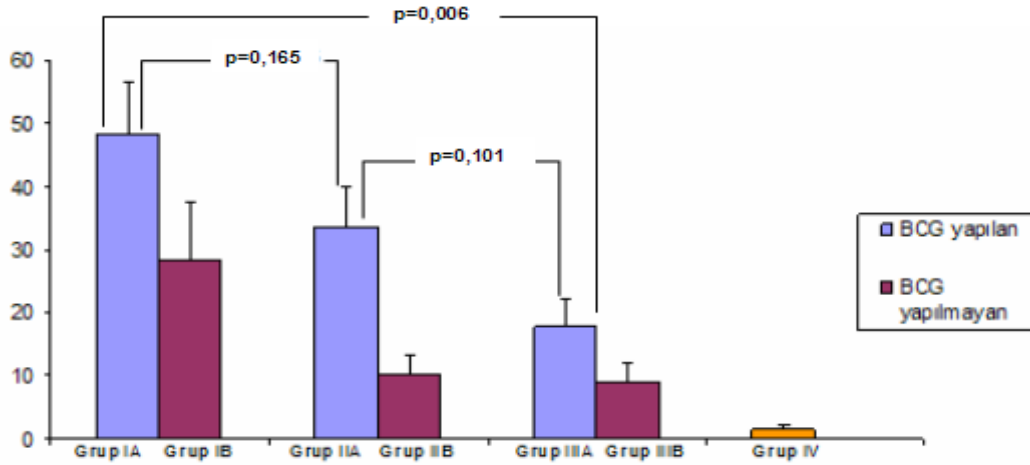
IFN- γ düzeyi herhangi bir işlem uygulanmayan grupta $1,48\pm 2,03$ pg/ml (0-4) olarak bulundu. Herhangi bir işlem uygulanmayan grupla 7 günlükken BCG yapılmayan grup ve yetişkin dönemde BCG yapılmayan grup arasında IFN- γ düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

Gruplar arası IFN- γ düzeyi ve karşılaştırılması tablo 7, tablo 11 ve şekil 15’de gösterilmiştir.

Tablo 11. BAL Sıvısındaki İnterferon Gamma Değerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması (p)

Gruplar	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV
IA	-	0,105	0,165	0,000*	0,006*	0,000*	0,001*
IB	0,105	-	0,393	0,315	0,696	0,218	0,075
IIA	0,165	0,393	-	0,001*	0,101	0,003*	0,001*
IIB	0,000*	0,315	0,001*	-	0,237	0,529	0,028*
IIIA	0,006*	0,696	0,101	0,237	-	0,173	0,011*
IIIB	0,000*	0,218	0,003*	0,529	0,173	-	0,165
IV	0,001*	0,075	0,001*	0,028*	0,011*	0,165	-

* $p<0,05$ anlamlı



Şekil 16. IFN- γ değerlerinin şematik olarak gruplar arası karşılaştırılması

4.5. Korelasyon

4.5.1. İnterlökin-4

7 günlükken BCG yapılan grupta inflamasyon skoru ile IL-4 değeri arasında pozitif bir korelasyon saptandı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,709$, $p=0,022$). IL-4 ile IL-12 arasında negatif korelasyon saptandı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=-0,702$, $p=0,023$). Benzer şekilde IL-4 ile IL-10 arasında negatif korelasyon saptandı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=-0,807$, $p=0,005$). 7 günlük BCG yapılan grupta korelasyonlar şekil 17’de gösterilmiştir.

7 günlükken BCG yapılmayan grupta ise inflamasyon skoru ile IL-4 değeri arasında pozitif bir korelasyon bulundu ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,863$, $p=0,001$). IL-4 ile IL-12 arasında ise negatif korelasyon saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,596$, $p=0,069$). Benzer şekilde IL-4 ile IL-10 arasında negatif korelasyon saptanırken istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,037$, $p=0,919$).

14 günlükken BCG yapılan grupta inflamasyon skoru ile IL-4 değeri arasında pozitif bir korelasyon vardı ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,709$, $p=0,022$). IL-4 ile IL-12 arasında da negatif korelasyon saptandı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=-0,706$, $p=0,023$). IL-4 ile IL-10 arasında ise negatif korelasyon saptanırken istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($r=-0,448$, $p=0,194$). 14 günlük BCG yapılan grupta korelasyonlar şekil 18’de gösterilmiştir.

14 günlükken BCG yapılmayan grupta inflamasyon skoru ile IL-4 değeri arasında pozitif bir korelasyon saptandı ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,842$, $p=0,002$). IL-4 ile IL-12 arasında ise negatif korelasyon bulunurken bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,600$, $p=0,067$). Benzer olarak IL-4 ile IL-10 arasında negatif korelasyon saptanırken bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,579$, $p=0,080$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan grupta ise inflamasyon skoru ile IL-4 değeri arasında pozitif bir korelasyon bulundu ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,843$, $p=0,009$). IL-4 ile IL-12 arasında ise negatif korelasyon saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,323$, $p=0,435$). IL-4 ile IL-10 arasında ise negatif korelasyon saptanırken istatistiksel olarak anlamlı değildi fark yoktu ($r=-0,518$, $p=0,188$).

Yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta inflamasyon skoru ile IL-4 değeri arasında pozitif bir korelasyon vardı ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,753$, $p=0,012$). IL-4 ile IL-12 arasında ise negatif korelasyon saptandı, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,062$, $p=0,864$). Benzer şekilde IL-4 ile IL-10 arasında negatif korelasyon saptanırken istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,104$, $p=0,775$).

Herhangi bir işlem uygulanmayan grupta IL-4 ile IL-12 arasında pozitif korelasyon saptandı ve bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,335$, $p=0,581$). IL-4 ile IL-10 arasında ise negatif korelasyon saptanırken bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,395$, $p=0,510$).

IL-4 ile ilgili korelasyonlar tablo-12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. İnterlökin-4 ile İlgili Korelasyonlar

Gruplar	Korelasyonlar							
	inf. skoru -IL-4		IL-4 - IL-12		IL-4 - IL-10		IL-4-Eozinofil	
	r	p	r	p	r	p	r	p
IA	0,709	0,022*	-0,702	0,023*	-0,807	0,005*	0,134	0,712
IB	0,863	0,001*	-0,596	0,069	-0,037	0,919	0,232	0,518
IIA	0,709	0,022*	-0,706	0,023*	-0,448	0,194	0,210	0,954
IIB	0,842	0,002*	-0,600	0,067*	-0,579	0,080	0,745	0,013*
IIIA	0,843	0,009*	-0,323	0,435	-0,518	0,188	0,771	0,025*
IIIB	0,753	0,012*	-0,062	0,864	-0,104	0,775	0,239	0,506
IV	-	-	0,335	0,581	-0,395	0,510	-	-

4.5.2. İnterlökin-10

7 günlükken BCG yapılan grupta IL-10 ile IL-12 arasında pozitif korelasyon saptanırken bu değer istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,698$, $p= 0,025$). IL-10 ile IFN- γ arasında ise pozitif korelasyon bulundu. Ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,255$, $p=0,476$).

7 günlükken BCG yapılmayan grupta IL-10 ile IL-12 arasında pozitif korelasyon saptanırken, bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,307$, $p= 0,389$). IL-10 ile IFN- γ arasında ise pozitif korelasyon bulundu, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,386$, $p=0,271$).

14 günlükken BCG yapılan grupta ise IL-10 ve IL-12 arasında pozitif korelasyon saptanırken bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,842$, $p= 0,002$). Benzer olarak IL-10 ile IFN- γ arasında pozitif korelasyon vardı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,697$, $p=0,025$).

14 günlükken BCG yapılmayan grupta IL-10 ile IL-12 arasında pozitif korelasyon saptanırken bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,252$, $p= 0,482$). IL-10 ile IFN- γ arasında ise korelasyon saptanmadı ve istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,231$, $p=0,520$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan grupta IL-10 ve IL-12 arasında negatif korelasyon saptanırken bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,302$, $p=0,467$). IL-10 ile IFN- γ arasında ise negatif korelasyon vardı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,329$, $p=0,323$).

Yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta ise IL-10 ile IL-12 arasında pozitif korelasyon saptanırken bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,507$, $p=0,135$). IL-10 ile IFN- γ arasında ise pozitif korelasyon saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,349$, $p=0,323$).

Herhangi bir işlem uygulanmayan grupta IL-10 ve IL-12 arasında pozitif korelasyon saptanırken bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,707$, $p=0,182$). IL-10 ile IFN- γ arasında ise negatif korelasyon vardı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=-0,395$, $p=0,510$).

IL-10 ile ilgili korelasyonlar tablo-13’de gösterilmiştir.

Tablo 13. İnterlökin-10 ile İlgili Korelasyonlar

Gruplar	Korelasyonlar					
	IL-10 - IL-12		IL-10 - IL-4		IL-10 - IFN- γ	
	r	p	r	p	r	p
IA	0,698	0,025	-0,807	0,005	0,255	0,476
IB	0,307	0,389	-0,037	0,919	0,386	0,271
IIA	0,842	0,002	-0,448	0,194	0,697	0,025
IIB	0,252	0,482	-0,579	0,080	0,231	0,520
IIIA	-0,302	0,467	-0,518	0,188	-0,329	0,426
IIIB	0,507	0,135	-0,104	0,775	0,349	0,323
IV	0,707	0,182	-0,395	0,510	-0,395	0,510

4.5.3. İnterlökin-12

7 günlükken BCG yapılan grupta IL-12 ile IFN- γ arasında pozitif korelasyon vardı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,796$, $p=0,006$).

7 günlükken BCG yapılmayan grupta ise IL-12 ile IFN- γ arasında pozitif korelasyon saptandı ($r=0,926$). Bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,000$).

14 günlükken BCG yapılan grupta IL-12 ve IFN- γ arasında pozitif korelasyon mevcut olup bu değer istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,867$, $p=0,001$).

14 günlükken BCG yapılmayan grupta IL-12 ile IFN- γ arasında pozitif korelasyon saptanırken bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,912$, $p=0,000$).

Yetişkin dönemde BCG yapılan grupta IL-12 ve IFN- γ arasında pozitif korelasyon mevcut olup istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,916$, $p=0,001$).

Yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta ise IL-12 ile IFN- γ arasında pozitif korelasyon vardı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,785$, $p=0,007$).

Herhangi bir işlem uygulanmayan grupta IL-12 ve IFN- γ arasında korelasyon saptanmadı ve istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r=0,224$, $p=0,718$).

IL-12 ile ilgili korelasyonlar tablo-14’de gösterilmiştir.

Tablo 14. İnterlökin-12 ile İlgili Korelasyonlar

Gruplar	Korelasyonlar					
	IL-12 - IL-10		IL-12 - IL-4		IL-12 - IFN- γ	
	r	p	r	P	r	p
IA	0,698	0,025	-0,702	0,023	0,796	0,006
IB	0,307	0,389	-0,596	0,069	0,926	0,000
IIA	0,842	0,002	-0,706	0,023	0,867	0,001
IIB	0,252	0,482	-0,600	0,067	0,912	0,000
IIIA	-0,302	0,467	-0,323	0,435	0,916	0,001
IIIB	0,507	0,135	-0,062	0,864	0,785	0,007
IV	0,707	0,182	0,335	0,581	0,224	0,718

4.5.4. Eozinofil ve İnflamasyon Skoru

Gruplar arası eozinofil sayısı ve inflamasyon skoru arasındaki korelasyonda, 7 günlükken BCG yapılan grupta eozinofil sayısı ve inflamasyon skoru arasında pozitif korelasyon saptandırken bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,801$, $p=0,005$).

7 günlükken BCG yapılmayan grupta eozinofil sayısı ve inflamasyon skoru arasında pozitif korelasyon bulunurken bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,930$, $p=0,000$).

14 günlükken BCG yapılan grupta eozinofil sayısı ile inflamasyon skoru arasında pozitif korelasyon vardı ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,671$, $p=0,034$).

14 günlükken BCG yapılmayan grupta ise eozinofil sayısı ve inflamasyon skoru arasında pozitif korelasyon saptanmış olup bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,832$, $p=0,003$).

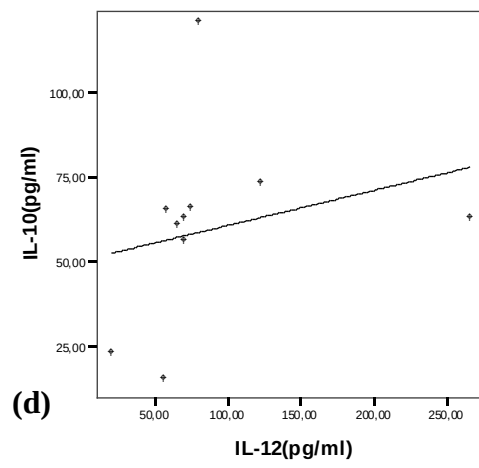
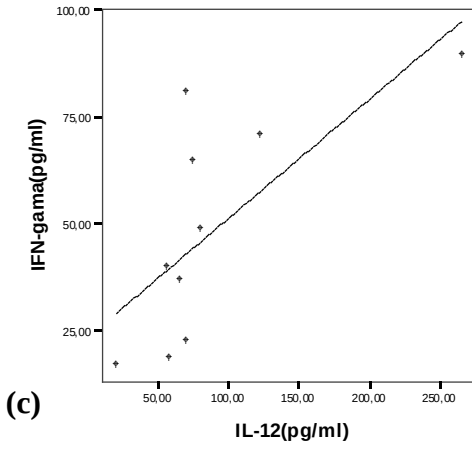
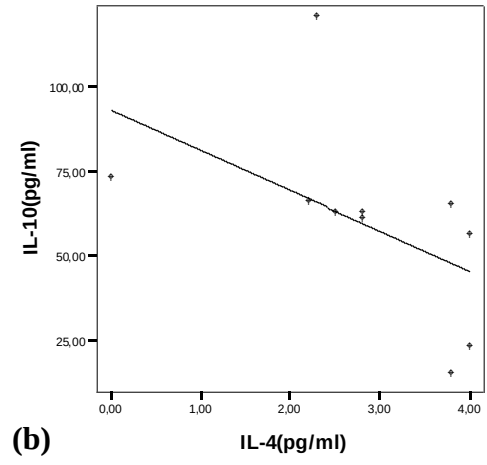
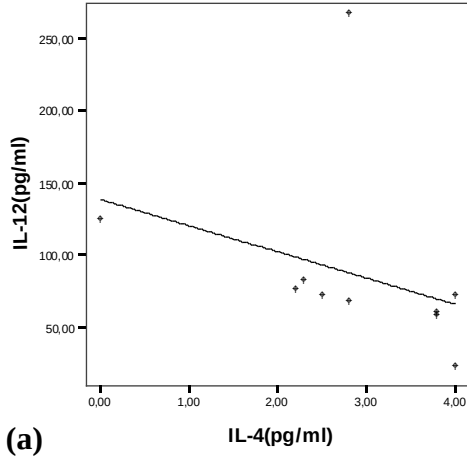
Yetişkin dönemde BCG yapılan grupta eozinofil sayısı ile inflamasyon skoru arasında pozitif korelasyon vardı ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,892$, $p=0,003$).

Yetişkin dönemde BCG yapılmayan grupta eozinofil sayısı ve inflamasyon skoru arasında pozitif korelasyon saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlıydı ($r=0,736$, $p=0,015$).

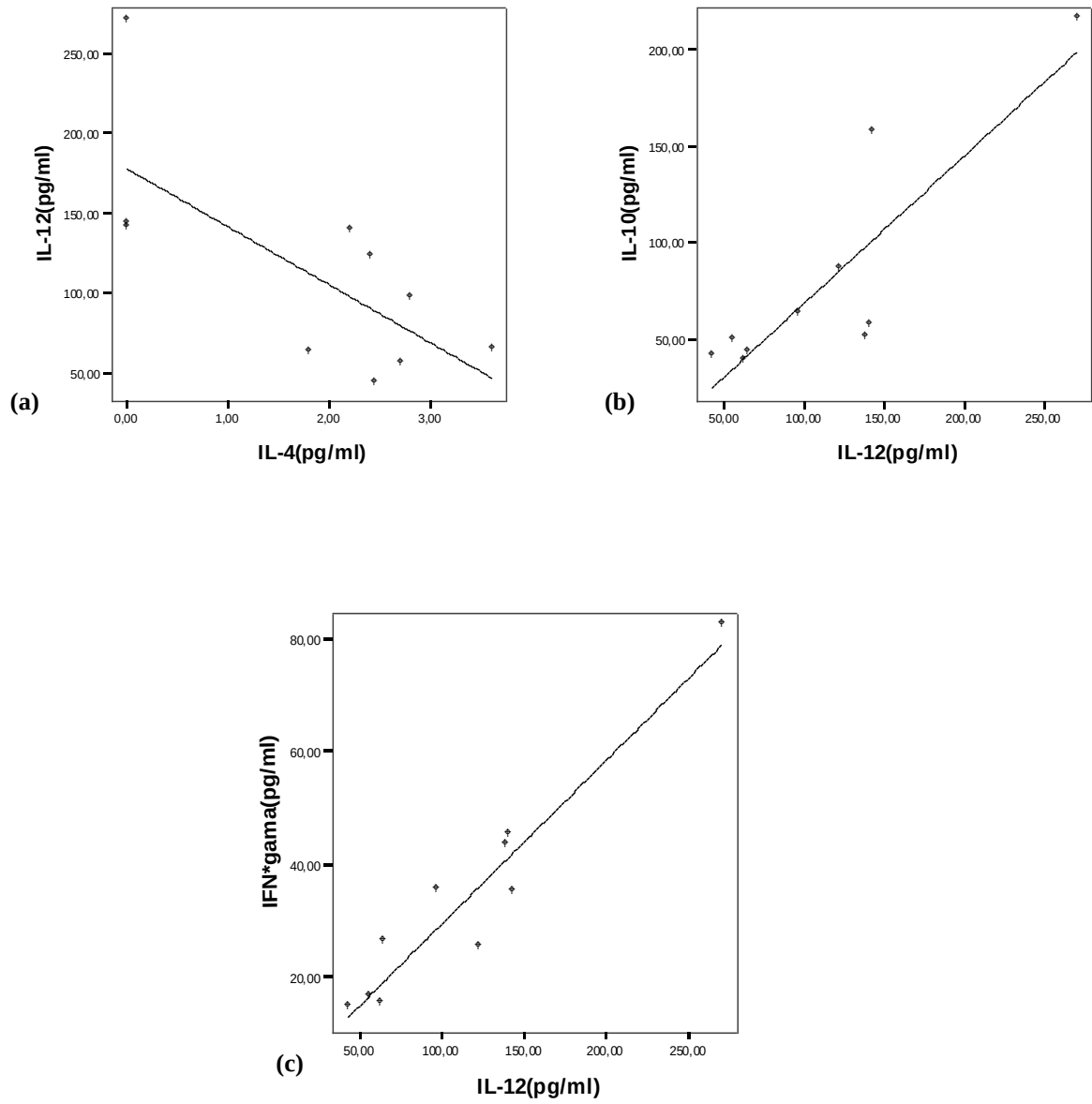
Eozinofil sayısı ve inflamasyon skoru arasındaki korelasyon tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 15. Eozinofil ve İnflamasyon Skoru Arasındaki Korelasyon

Korelasyon	Eozinofil-İnflamasyon skoru	
Gruplar	r	p
IA	0,801	0,005
IB	0,930	0,000
IIA	0,671	0,034
IIB	0,832	0,003
IIIA	0,892	0,003
IIIB	0,736	0,015



Şekil 17. 7 günlükken BCG yapılan grupta korelasyonların şematik gösterimi. (a) IL-4 ile IL-12 arasındaki korelasyon, (b) IL-4 ile IL-10 arasındaki korelasyon, (c) IL-12 ile IFN- γ arasındaki korelasyon, (d) IL-12 ile IL-10 arasındaki korelasyon.



Şekil 18. 14 günlükken BCG yapılan grupta korelasyonların şematik gösterimi. (a) IL-4 ile IL-12 arasındaki korelasyon, (b) IL-12 ile IL-10 arasındaki korelasyon, (c) korelasyon, (d) IL-12 ile IFN- γ arasındaki korelasyon

5. TARTIŞMA

Allerjik hastalıkların sıklığı gerek ülkemizde gerekse dünyanın birçok ülkesinde gittikçe artmakta ve bu artışın nedenleri hala kesin olarak bilinmemektedir. Gelişmekte olan ülkelerde batılı yaşam tarzı, allerjen maruziyetinin artışı, ailede birey sayısının azalmasının ve yaşam kalitesinin iyileşmesinin allerjik hastalıkların sıklığındaki bu artışta önemli rol oynadığı düşünülmektedir.¹

Son yıllarda yaşam tarzının iyileşmesi ve aşılama programlarının yaygınlaşması sonucunda bakteriyal ve viral enfeksiyonların azalmasının, atopik hastalıkların prevelansında artışa neden olduğunu savunan hipotezler geliştirilmiştir.⁴⁷ Strachan ve arkadaşlarının ortaya attığı ‘hijyen hipotezine’ göre; aile içi enfeksiyon sıklığında azalma atopik hastalıkların sıklığının artmasıyla sonuçlanmaktadır.³ Bu hipotezde kardeş sayısındaki artışın, dolayısıyla da enfeksiyon kaynağının artışının allerjik hastalıklara karşı koruyucu bir mekanizma oluşturduğu öne sürülmüştür. T hücrelerinin alt tipi olan doğal T hücreleri uyarı ile Th1 ve Th2’ye dönüşür. Th2 hücreleri allerjik hastalıkların gelişiminde önemli rol oynarlar.³ Hayatın erken döneminde mikrobiyal etki ile immün sistemin Th2 yanıtı Th1 yanıtı doğru kaydığı düşünülmüştür.⁸

Mikobakterin allerjik hastalıkların gelişimi üzerine birçok insan ve hayvan çalışmaları yapılmıştır. BCG aşısının insanlar üzerinde allerjik hastalıkları önlediği hipotezi tartışmalıdır. Ancak birçok fare çalışmasında BCG aşısının bu etkisi farklı immunolojik markerlarla desteklenerek gösterilmiştir.^{3-4,11} Maggi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PPD’nin spesifik T hücre klonlarında Th1 sitokin yapımını uyardığı gösterilmiştir.⁷³ Başka bir çalışmada ise Lin ve arkadaşları ölü oral BCG tedavisi ile astım hastalarında %80 oranında düzelme olduğunu görmüşlerdir.⁷⁴ Huygen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise canlı M.bovis ile enfekte yedi farklı fare türünde, mikobakteriyel 85A major antijen komponentine karşı Th1 benzeri sitokin salgılandığı görülmüştür.⁷⁵ Bunun yanında Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise atopik hastalıklar ile tüberkülin yanıtları arasındaki ilişki araştırılmış ancak BCG ile aşılamanın çocuklarda hayatın ileri döneminde gelişebilecek atopik durumla tüberkülin yanıtları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.⁴⁷ İsveç’te yapılan retrospektif bir çalışmada da İsveç’te doğan çocuklarda BCG ile ilişkili atopik hastalıkların sıklığında azalma

görülmemiş olup çoğunluğu Asya ve kuzey Amerika da göç eden ailelerin çocuklarında atopik hastalıkların sıklığında azalma saptanmıştır.^{53,54}

Bu çalışmamızda BCG aşısının allerjik inflamasyon üzerine etkisi konusundaki farklı sonuçlar nedeniyle M.bovis'in atopi ve astım gelişimi üzerine etkili olup olmadığını araştırmayı amaçladık ve buna yönelik olarak ovalbumin ile duyarlanmış BALB/c farelere BCG aşısı uygulayarak inflamasyon bulgularını değerlendirdik. Ayrıca BCG farklı zamanlarda uygulanarak uygulama zamanının astım gelişimine etkisi incelenmiş ve olası mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Astımlı hastaların havayolundaki eozinofil sayısı genel olarak astımın şiddeti ile doğru orantılıdır. Farelerde oluşturulan astım modellerinde antijenle duyarlılaştırıldıktan 18-24 saat sonra farelerin BAL sıvısında nötrofil, lenfosit, ve özellikle eozinofillerde belirgin artış olduğu görülmüştür.⁸⁵ Bizim çalışmamızda BCG yapılmayan ve OVA ile astım oluşturulan farelerde eozinofil sayısında artış saptanmıştır. 7 günlük ve 14 günlükken BCG yapılan farelerin BAL sıvısında eozinofil sayısının istatistiksel anlamlı düşük olduğu bulunmuştur. Erişkin dönemde BCG yapılan grupta eozinofil sayısında fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar BCG'nin erken dönemde eozinofil inflamasyonunu engellediğini düşündürmektedir. BCG'nin bu inflamasyona etkisini inceleyen çalışmalarda, farelerde oluşturulan astım modelinde allerjenle duyarlanma öncesi ve sonrasında BCG aşısının havayolu duyarlılığını baskıladığı görülmüştür. Koh ve ark. yaptıkları çalışmada OVA ile duyarlanmadan önce, duyarlanma sırasında, OVA ile provokasyondan önce ve provakasyon sırasında BCG uygulanan dört grup fare ve kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. OVA ile duyarlanmadan önce, duyarlanma sırasında ve provakasyon sırasında BCG uygulanan grubun BAL sıvısında eozinofil sayısı kontrol gruba göre azalma saptanmıştır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.⁹⁰ Bizim bulgularımıza benzer olarak Kim ve ark. allerjik rinit geliştirdikleri farelerde BCG'nin etkisini araştırmış ve BCG yapılmayan grubun BAL sıvısında makrofaj, eozinofil, lenfosit ve nötrofil sayısının BCG yapılan gruba göre daha fazla olduğu saptamışlardır.⁹¹ Diğer bir çalışmada ise Hopfenspirger ve ark. benzer olarak OVA ile duyarlanmış farelere intra nazal ve intra peritoneal yolla BCG ve M. Vaccea uygulamış ve havayolu hiperreaktivitesi, geç allerjik yanıt ve eozinofili değerlendirmişlerdir. M. Vaccea uygulanan grupta lenfositlerde anlamlı düşüş saptanmıştır. Sadece intra nazal olarak BCG ile enfekte edilen grubun akciğer

dokusunda ve BAL sıvısında eozinofilinin baskılandığı görülmüştür.⁸⁰ Barros ve arkadaşları bizim çalışmamızdaki bulgularla benzer sonuçlar saptamış olup bu çalışmada yüksek ve düşük antikor yanıtlarına göre genetik olarak seçilmiş fareler üzerinde çalışmışlar ve OVA ile duyarlılaştırılan yüksek ve düşük antikor yanıtlı farelerin BAL sıvısında kontrol grubuna göre eozinofil sayısında artış olduğunu görmüşlerdir. Bu artış yüksek ve düşük antikor yanıtı olan fareler arasında ise daha anlamlı bulunmuştur. Ayrıca OVA ile duyarlaştırma sonrasında akciğer dokusunda eozinofil sayısında artış saptanmıştır.⁶⁶ Yapılan diğer çalışmalarda BCG'nin akciğer dokusunda eozinofil sayısında azalmaya neden olmasının IL-10 ve TGF- β seviyesinde artışı sağlayarak IgE üretimini baskılaması olarak kaydedilmiştir.⁸⁶⁻⁸⁸

Ayrıca çalışmamızda farklı zamanlarda uygulanan BCG'nin farelerin akciğer dokusundaki enflamasyona etkisi değerlendirilmiştir. 7 ve 14 günlükken BCG yapılan farelerin akciğer biyopsilerinde daha az inflamasyon saptanmış ve BCG yapılmayan grupla aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak erişkin grupta BCG'nin inflamasyon derecesine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Akciğerlerde inflamasyon skorlarının değerlendirildiği bir çalışmada Başdemir ve ark. farelerin akciğerlerinde gelişen allerjik enflamasyon üzerine inhale budesonidin etkisi araştırmış ve akciğer biyopsileri peribronşiyal inflamasyon derecesine göre değerlendirmişlerdir. Kontrol grup, deksametazon verilen grup ve budesonid verilen grupla karşılaştırıldığında akciğer dokusunda en fazla inflamasyonun, öncesinde herhangi bir ilaç verilmeden OA ile duyarlılaştırılan farelerde olduğu gösterilmiştir.⁹² Çalışmamızda BCG yapılan tüm gruplarda Th2 tipi yanıtta salgılanan IL-4 ile inflamasyon derecesi arasında istatistiksel olarak anlam pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Ayrıca inflamasyon derecesi ile eozinofil sayısı arasında tüm BCG yapılan gruplarda anlamlı korelasyon saptanmıştır. Bu bulgular da erken dönemde BCG aşısının allerjik inflamasyonu baskıladığını göstermektedir.

Astımlı hastalarda meydana gelen havayollarındaki yapısal değişiklikler akciğer fonksiyonlarının bozulmasında önemli rol oynar. Epitel hücrelerinin yapısındaki bozulma, mukus bezleri, düz kas ve kan damarlarının hiperplazisi, kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks proteinlerinin subepitelyal depolanması sonucu havayollarında kalınlaşma gibi yapısal değişimler havayollarında 'remodelling' (yeniden yapılanma) şeklinde tanımlanmaktadır.²⁰ Ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanması olarak da

adlandırılan bu durum patolojik olarak bazal membranda kalınlaşma, düz kas hipertrofisi, yeni vasküler yapılar ve sinir yapılarının oluşması ve goblet hücre hiperplazisi ile karakterizedir. Çalışmamızda astım modeli oluşturulan tüm farelerin akciğer biyopsisinde goblet hücreleri saptandı. Ancak herhangi bir işlem uygulanmayan grupta goblet hücrelerinin olmadığını gördük. Bu bulgular BCG'nin goblet hücre gelişiminin baskılandığını düşündürmektedir. Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer bulgular saptanmış ve BCG yapılan, OVA ile duyarlanmış farelerde mukus içeren goblet hücrelerinde anlamlı düşüş, mukus sekresyonu ve bronşiyal epitel hiperplazi de azalma görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada BCG ile oluşturulan sistemik enfeksiyon, allerjen spesifik IgE oluşumunu, goblet hücre gelişimini ve OVA ile oluşturulan pulmoner eozinofiliyi baskıladığı saptanmıştır.¹¹ Bunun yanında goblet hücrelerinin baskılandığı 7 ve 14 günlük BCG yapılan farelerde eozinofil sayısı, inflamasyon skoru ve IL-4 seviyelerinde BCG yapılmayan gruba göre anlamlı düşüş saptanmıştır. Sonuç olarak BCG yapılan gruplarda astım gelişiminin engellenmesinin yanı sıra goblet hücre gelişiminin de baskılandığı bulunmuştur.

Mikobakteri ve atopi arasındaki ters ilişkiyi göstermek için yapılan diğer çalışmalardan elde edilen bilgilere göre mikobakterilere maruz kalımda belirgin Th2 kısıtlayıcı etki görülmektedir.^{64,84} Bunun yanında mikobakterilerin bazı komponentleri T regülatuar hücrelerini tetikleyebilirler. Mikobakteriyel lipoproteinler dendritik hücrelere ve makrofaj bağlı 'Toll-like' reseptörlerine bağlanırlar ve IL-12 sentezini sağlarlar. Bu olay Th1 yanıtını sağlar.⁷⁸ Bir çok hayvan çalışmasında BCG ve diğer mikobakteriyel enfeksiyonların Th1 veya Treg hücrelerin oluşturduğu immun yanıt mekanizması ile allerji ve astımı baskıladığı gösterilmiştir.^{56-55, 64, 72, 82}

BCG aşısının astım gelişimi üzerine etkisini inceleyen araştırmalarla mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır.^{4,47,48,50-55} Patojen mikroorganizmanın immun sistemdeki dendritik hücreler ve NK hücreleri ile karşılaşması sonrasında ortama TNF- α , IFN- γ ve β , IL-1, IL-6, IL-10 ve IL-12 gibi sitokinler salgılanır.⁸³ CD4+ T hücresinin antijenle ilk karşılaşması sırasında ortamda IL-12 veya IFN- γ 'nın baskın olması Th1 hücresine farklılaşmaya, IL-4 ve IL-13'ün baskınlığı ise Th2 hücresine farklılaşmaya neden olur.³⁶ IL-12 üretimi doğal T hücrelerinin Th1 hücrelerine dönüşümüne neden olur.³ Bir çok faktör T hücrelerinin Th1 ve Th2 hücrelerine dönüşümü sağlarken mikobakteri enfeksiyonları veya aşılama Th1 yanıtının oluşmasına neden olur.⁴⁷ Son

dönemde yapılan çalışmalar Th2 hücrelerinin alerjik hastalıklarda kronik enflamasyonun yöneticisi olduğunu göstermiştir.⁷⁶⁻⁷⁷ Alerjik enflamasyon da Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 üretirler. Buna karşın mikrobiyal enfeksiyon sonucu Th1 hücreleri IL-2, IFN- γ ve TNF- β sekrete ederler.⁷⁸ Yang ve arkadaşları, bakteriyel enfeksiyon gelişiminin alerjik reaksiyonu baskıladığını göstermiştir. Bu çalışmada OVA ile duyarlanmayı takiben BCG ile enfekte edilen farelerde Th1 yanıtının göstergesi olan IFN- γ düzeyinde artış ve IL-4 üretiminde ise azalma saptanmıştır. BCG ile enfekte edilen farelerde IL-12, IFN- γ ve IFN- γ /IL-4 oranında artış bulunmuştur ve bu da BCG ile oluşturulan enfeksiyonun alerjik reaksiyonu baskılandığını desteklemektedir.¹¹ Bizim çalışmamızda da benzer olarak Th2 tipi yanıtta salgılanan IL-4 düzeyi değerlendirildiğinde, hayatın erken döneminde BCG yapılan grupta (7 günlükken BCG yapılan ve 14 günlükken BCG yapılan) kontrol grubuna göre IL-4 düzeyinde anlamlı azalma saptandı. Erişkin dönemde ise belirgin azalma yoktu. IL-4 düzeyindeki bu düşüş hayatın erken döneminde BCG'nin Th2 tipi yanıtı baskıladığını göstermektedir. Bununla birlikte 7 günlük ve 14 günlükken BCG yapılan farelerde IL-4 ile IL-12 arasında anlamlı negatif korelasyon bulunması Th1 ve Th2 tipi yanıt arasındaki dengeyi göstermektedir ve IL-12 düzeyindeki bu yükseklik dengenin Th2 tipi yanıtıtan Th1 tipi yanıtı kaydığını düşündürmektedir. Ancak erişkin dönemde BCG yapılan grupta IL-4 ile IL-12 arasında negatif korelasyon saptanmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Erişkin dönemde BCG yapılan grupta IL-4 düzeyinde düşme olmaması ve bunun BCG yapılmayan gruba göre farklı olmaması, IL-12 düzeyinde de istatistiksel anlamlı değişiklik olmaması nedeniyle bu bulgular geç dönemde yapılan BCG'nin Th1/Th2 dengesini değiştirmedğini ve astım gelişimini engellemediğini göstermektedir. Bizim çalışmamızı destekler nitelikte olan Herz ve ark. yaptığı çalışmada OVA ile duyarlılaştırılan farelerde BCG aşısının etkisi araştırılmış ve dalak mononükleer hücrelerince üretilen IFN- γ miktarında artış, IL-4 üretiminde ise azalma saptanmıştır. BAL sıvısında ise IL-4 ve IL-5 düzeylerinde azalma olduğu bulunmuştur.⁵⁵

IL-12 ve IFN- γ 'nın düzeylerinin yüksek olması Th1 yanıtının etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda 7 ve 14 günlükken BCG yapılan farelerde IL-12 ve IFN- γ arasında pozitif ilişki bulunmuş ancak yetişkin dönemdeki bu pozitif ilişki anlamlı saptanmamıştır. Dolayısıyla BCG'nin erken ve geç dönemde etkisini Th1 tipi yanıtı

kullanarak gösterdiğini söyleyebiliriz. Erb ve ark. BCG'nin allerjik inflamasyona etkisinin mekanizmalarını açıklamaya çalıştıkları araştırmalarında BCG'nin havayolu eozinofilisini baskıladığını saptamıştır. OVA ile havayolu eozinofilisi oluşturulan farelerde intranazal BCG verilmiş ve havayolunda eozinofil sayısında azalmanın IL-5 ile korele olduğunu bulunmuştur. Ancak bu baskılanmanın IFN- γ reseptör defekti olan farelerde görölmediğini saptamışlar, dolayısıyla BCG'nin baskılayıcı etkisinin IFN- γ üzerinden olduğunu düşünmüşlerdir.⁵⁶ Başka bir çalışmada da Hylkema ve arkadaşları genetik olarak Th2 tip yanıt veren farelerde BCG etkisini araştırmış, astıma yatkın Brown Norway (BN) ve Sprague Dawley (SD) sıçanlar üzerinde çalışmışlardır. BCG'nin SD sıçanların akciğerlerinde eozinofil ve makrofaj sayısında azalmaya neden olduğu ancak BN sıçanlarının akciğerlerinde bu etkinin olmadığı görölümüştür. BN sıçanlarında ise total serum IgE seviyesinde azalma olduğu ancak SD sıçanlarda bu etkinin olmadığı bulunmuştur. Her iki sıçan grubunda, akciğerlerde IFN- γ ve IL-4 üreten hücrelerin sayısı üzerine BCG'nin etkisi olmamıştır. Kontrol grubuna göre BN ve SD sıçanlarda IFN- γ seviyesinde artış saptanmıştır. Ancak bu artış SD sıçanlarda daha anlamlı bulunmuştur. BCG'nin immunomodölasyon yollarındaki etkisinin ve derecesinin genetik olarak farklı her iki sıçan tipinde Th2 tipi yanıt geliştirmeye genetik olarak yatkınlığa bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.⁸¹ Bunun yanında bizim bulgularımızdan farklı olarak Hopfenspirger ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada OVA ile sensitize edilen BCG veya M. Vaccea uygulanmış farelerle sadece sensitize edilen fareler arasında serum IFN- γ düzeyleri arasında fark bulunamamıştır.⁸⁰ Ancak serum sitokin düzeylerinin havayolu inflamasyonunu tam olarak yansıtamayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Son yıllarda Th1 ilişkili otoimmün hastalıklarla ve Th2 ilişkili allerjik hastalıkların sıklığında paralel bir artışın olması Th1 ve Th2 arasında bir dengenin olduğunu belirten hipotezi tartışılır hale getirmiştir.⁹³ Doğumdan itibaren immün sistemin zararsız olarak kabul ettiği ve Treg hücrelerini güçlü bir şekilde uyaran saprofitik mikobakteriler, helmintler ve laktobasillere maruziyetin azalması Treg hücrelerin aktivasyonunda azalmaya neden olmaktadır. Bunun sonucunda IL-10 salınımı ile immün sistemde düzenleyici görev üstlenen Treg hücrelerin etkisinin azalmasıyla astım ve Crohn gibi allerjik ve otoimmün hastalıklar artmıştır.⁹⁴ Th1 yanıtını baskılayan IL-10 düzeyi değerlendirildiğinde hayatın erken döneminde BCG

yapılan grupta (7 günlükken BCG yapılan ve 14 günlükken BCG yapılan) kontrol grubuna göre IL-10 düzeyi yüksek saptanmıştır. Ancak erişkin dönemde BCG yapılan grupta IL-10 düzeyi kontrol grubuna göre yüksek saptanmasına rağmen bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ve bu BCG'nin hayatın erken evresinde Th1 tipi yanıtı daha baskın bir şekilde oluşturduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte IL-10 Treg hücrelerinin göstergesidir. 7 günlük ve 14 günlük BCG yapılan grupta IL-10 düzeyinin yüksek olması alerjik inflamasyonun baskılanmasında Treg hücrelerinin etkili olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca IL-10 ile IL-12 arasında erken dönemde BCG yapılan farelerde pozitif korelasyon bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. IL-10 düzeyi diğer inflamatuvar sitokinlerle karşılaştırıldığında 7 günlük BCG yapılan grupta IL-4 ile IL-10 ve IL-12 arasında ters yönde ilişki varken, 14 günlük BCG yapılan grupta sadece IL-4 ve IL-12 arasında ters yönde ilişki bulunmuştur. Bu da erken dönemde BCG aşısının Treg ve Th1 yolu ile etkili olduğunu düşündürmekte; daha geç dönemde yapılan BCG'nin daha çok IL-12 ve IFN- γ ile, yani Th1 aracılığıyla etkili olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla hayatın erken döneminde BCG'nin Th1 tipi immun yanıtı etkilemesinin yanı sıra Treg hücrelerden IL-10 salınımına neden olarak astım gelişimini engellediğini söyleyebiliriz. Çalışmamızı destekler nitelikte olan başka bir araştırmada da *M.vaccae*'nin havayolunda eozinofili gelişimi üzerine baskılayıcı etkisi, allerjen spesifik Treg hücrelerinin IL-10 ve TGF- β üretimi ile ilişkilendirilmiştir.⁸⁵ Ayrıca başka bir çalışmada OVA ile duyarlılaştırılmadan önce ısıyla öldürülmüş *M.vaccae* uygulanan farelerde havayolu enflamasyonuna karşı uzun dönem koruyucuk sağlandığı ve Treg hücrelerde artış olduğu görülmüştür.⁸⁹

BCG'nin uygulama zamanı kadar BCG aşısının farklı yollarla verilisinin de etkili olabileceği düşünülmüştür. Choi ve arkadaşları Balb/c farelerde astım reaksiyonunun BCG aşılması ile baskılanmasının, aşının verilış yolunu karşılaştırarak araştırmışlardır. Denek farelere cilt altı aşılanmanın astım reaksiyonlarını intra nazal yola göre anlamlı olarak daha fazla baskıladığı görülmüştür. Dalak hücrelerinin supernantında bakılan IFN- γ seviyesi ve IFN- γ /IL-5 oranı astım grubunda normal gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. Buna karşın BCG ile aşılanan grupta astım grubuna göre daha yüksek IFN- γ seviyesi ve IFN- γ /IL-5 oranı saptanmıştır.⁷⁹

Sonuç olarak biz çalışmamızda BCG aşısının hayvan modellerinde astım gelişimini etkilediğini gösterdik. Erken dönemde (7 ve 14 günlerde) BCG uygulanmasının allerjik inflamasyonu, goblet hücre gelişimini, eozinofil sayısını ve IL-4 üretimini azalttığı ancak erişkin dönemde etkili olmadığı gözlenmiştir. BCG'nin erken uygulanan grupta sadece IL-4 ve IL-12 arasındaki ters korelasyondan ve daha sonra aşılardan grupta sadece IL-4 ve IL-12 arasında ters korelasyondan dolayı bu etkinin erken dönemde Treg hücreleri ve Th1 hücreleri aracılığıyla, daha geç dönemde ise Th1 hücrelerinden IL-12 üretimi üzerinden olduğunu öne sürebiliriz. Ancak kesin mekanizmanın aydınlatılması için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır. Bunun yanında Treg hücrelerinin özellikle yaşamın erken döneminde astım gelişimi üzerine etkisi vardır. Treg hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi hem astım hem de diğer otoimmün hastalıkların gelişiminde ve tedavisinde ümit vaat eden yaklaşımlar olacaktır.

6. SONUÇLAR

1- Çalışmamızda 7 günlük BCG yapılan ve astım geliştirilen grup ve 14 günlükken BCG yapılan gruplarda BCG yapılmayan ve astım oluşturulan gruplara göre BAL sıvısında eozinofil sayısındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu.

2- 7 günlükken BCG yapılan grup ve 14 günlükken BCG yapılan gruplarda erişkin dönemde BCG yapılan gruba göre BAL sıvısında eozinofil sayısı istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu.

3- 7 günlükken BCG yapılan grup ve 14 günlükken BCG yapılan gruplarda BCG yapılmayan gruplara göre inflamasyon skoru istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu.

4- 7 günlükken BCG yapılan grup ve 14 günlükken BCG yapılan grup ile erişkin dönemde BCG yapılan grup inflamasyon skoru yönünden karşılaştırıldığında inflamasyon skorunu istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu.

5- Allerjik duyarlanma oluşturulan tüm farelerin akciğer biyopsisinde goblet hücreleri görüldü, ancak BCG yapılan grupta goblet hücre sıklığı daha az saptandı.

6- 7 günlükken BCG yapılan grup ve 14 günlükken BCG yapılan gruplar ile BCG yapılmayan gruplarda BAL IL-4 düzeyi yönünden karşılaştırıldığında, IL-4 düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu saptandı.

7- 7 günlükken BCG yapılan grup ve 14 günlükken BCG yapılan gruplarda BAL IL-4 düzeyi erişkin dönemde BCG yapılan gruba göre istatistiksel daha düşük bulundu.

8- 14 günlükken BCG yapılan grupta, 14 günlükken BCG yapılmayan gruba ve erişkin dönemde BCG yapılan gruba göre IL-12 düzeyi daha yüksek bulundu (Ancak 7 günlükken BCG yapılan grupla arasında herhangi bir fark yoktu.).

9- 7 günlükken BCG yapılan grup ve 14 günlükken BCG yapılan gruplarda, BCG yapılmayan gruplara göre BAL IL-10 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı.

10- 7 günlükken BCG yapılan grup ve 14 günlükken BCG yapılan grup ile erişkin dönemde BCG yapılan grup arasında IL-10 düzeyi karşılaştırıldığında IL-10 düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu saptandı.

11- 7 ve 14 günlükken BCG yapılan gruplarda BAL IFN- γ düzeyi BCG yapılmayan ve erişkin dönemde BCG yapılan gruba göre anlamlı yüksek bulundu.

12- 7 günlükken BCG yapılan ve astım oluşturulan grupta IL-4 ve IL-12, IL-4 ve IL-10 arasında istatistiksel anlamlı ters korelasyon bulundu.

13- 14 günlükken BCG yapılan ve astım oluşturulan grupta IL-4 ve IL-12 düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı ters korelasyon saptandı (Ancak IL-4 ile IL-10 arasında ters korelasyona karşın bu istatistiksel anlamlı değildi.).

14- 7 günlükken, 14 gnlkkenve erişkin dönemde BCG yapılan ve astım oluşturulan gruplarda IL-12 ve IFN- γ arasında istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon bulundu.

15- Hayatın erken döneminde yapılan BCG aşısının allerjik enflamasyon ve astım gelişimini önlediği saptandı.

16- 7 günlükken BCG yapılan grupta IL-4 ve IL10 ile IL-12 arasındaki ters korelasyondan dolayı erken dönemde BCG'nin etkisinin Treg hücreleri ve Th1 hücreleri aracılığıyla olduğunu düşündürmüştür.

17- 14 günlükken BCG yapılan grupta sadece IL-4 ve IL-12 arasında ters korelasyondan dolayı BCG'nin geç dönemde etkisinin Th1 hücrelerinden ve IL-12 retimi üzerinden olduğunu düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

- 1- **Strachan DP.** Hay fever, hygiene, and household size. *BJM* **1989**; 299:1259-1260.
- 2- **Wieringa MH, Vermeire PA, Brunekreef B, Weyler JJ.** Increased occurrence of asthma and allergy: Clinical appraisal of studies using allergic sensitization, bronchial hyper-responsiveness and lung function measurements. *Clin Exp Allergy* **2001**; 31:1553-63.
- 3- **Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM.** The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* **1997**; 275:77-79.
- 4- **Strannegard IL, Larson LO, Wennergren G, Strannegard O.** Prevalence of allergy in children in relation to prior BCG vaccination and infection with atypical mycobacteria. *Allergy* **1998**; 53:249-254.
- 5- **Andrae S, Axelson O, Björkstén B, Fredriksson M, Kjellman NI.** Symptoms of bronchial hyperreactivity and asthma in relation to environmental factors. *Arch Dis Child* **1988**; 63:473-478.
- 6- **Wegman TG, Lin H, Gilbert L, Mosmann TR.** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* **1993**; 14:353.
- 7- **Levy O.** Innate immunity of the newborn; basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* **2007**; 7:379-390.
- 8- **Kemp A, Björkstén B.** Immune deviation and the hygiene hypothesis; a review of the epidemiological evidence. *Pediatr Allergy Immunol* **2003**; 14:74-80.
- 9- **Mosmann TR, Sad S.** The expanding universe of T-cell subsets; Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **1996**; 17:138-146.
- 10- **Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **1986**; 136:2348-2357.
- 11- **Yang X, Wang S, Fan Y, Zim L.** Systemic mycobacterial infection inhibits antigen-specific immunoglobulin E production, bronchial mucus production and eosinophilic inflammation induced by allergen. *Immunology* **1999**; 98:329-337.
- 12- **Özdemir C, Akkoc T, Bahceciler NN, et al.** Impact of Mycobacterium vaccae immunization on lung histopathology in a murine model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy* **2003**; 33:266-270.
- 13- **Sim T, Grant A, Rich RR, Fleisher TA, Schwartz B, Shearer WT, Strober W.** Anaphylaxis In. *Clinical Immunology Principles and Practice*. 1st Ed Vol 1, St. Louis: Mosby **1996**; 863.
- 14- **Bennich H, Ishizaka K, Ishizaka T.** Comparative antigenic study of E globulin and myeloma IgND. *J Immunol* **1969**; 102:826.
- 15- **Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA.** Hypersensitivity Reactions. *Kuby Immunology*. 4th Ed. New York: W.H. Freeman Co. **2000**; 395-420.
- 16- **Kay AB.** Concepts of Allergy and Hypersensitivity. *Allergy and Allergic Diseases*. Oxford: Blackwell Science **1997**; 23-35.
- 17- **Kılıçturgay K.** Aşırı duyarlılık. *İmmünoloji*. 3. basım. Nobel ve Güneş Kitabevi **2003**; 339-357.

- 18- **Janeway, C.A, Travers, P.** *Immunobiology*. Current Biology Ltd. London **1996**.
- 19- **Gleick, E.** The agony of asthma. *TIME* **1997**; 150: 34-39.
- 20- **Henderson WR, Lodewick MJ.** Animal Models of Asthma. *Middleton's Allergy Principles and Practice, 6th Edition*, Philadelphia: Mosby **2008**.
- 21- **Vignola AM, Le Grutte S, Chioppora G, Benkeder A, Bellia V, Bonsigore G.** Cellular network in airways inflammation and remodelling. *Pediatric Respiratory Reviews* **2002**; 3:41-46.
- 22- **Larche M, Akdis CA, Valenta R.** Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2006**; 6:761-71.
- 23- **Kumar V, Cotran RS, Robbins SL.** *Basic Pathology*. W.B Saunders Company, Philadelphia **1992**.
- 24- **Mısırlıgil Z, Çelik G.E.** Allerjik İnflamasyon. *Allerjik Hastalıklar* **2004**.
- 25- **Mygind N, Dahl R, Pedersen S, Thestrup-Pedersen K.** Immunoglobulins. *Essential Allergy*, 2th Ed, Blackwell Science Ltd **1996**; 25-30.
- 26- **Saxon A, Sanchez DD, Zhang K.** The allergic response in host defence. In: **Rich RR, Fleisher TA, Schwartz B, Shearer Wt, Strober W.** *Clinical Immunology Principles and Practice*, 1st Ed Vol 1 St.Louis: Mosby **1996**:850.
- 27- **Max EE, Battey J, Ney R.** Duplication and deletion in the human immunoglobulin E genes. *Cell* **1982**; 29:691-693.
- 28- **Bieber T.** FcεRII/CD23 on epidermal Langerhans cell. *Res Immunol* **1992**; 143:445-451.
- 29- **Christodoulouopoulos P, Tulic MK, Kontolemos M, Hamid Q.** Immunopathology of Allergic Airway Inflammation. *Middleton's Allergy Principles and Practice, 6th Edition*, Philadelphia: Mosby **2008**.
- 30- **Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, et al.** Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* **2000**; 343:538.
- 31- **Guo CB, Liu MC, Galli SJ, et al.** Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1994**; 10:384.
- 32- **Lacoste JY, Bousquet P, Chanez P, et al.** Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* **1993**; 92:537.
- 33- **Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al.** Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**; 160:1001.
- 34- **Soussi-Gounni A, Lamkhioed B, Koussih L, et al:** Human neutrophils express the high-affinity receptor for IgE (FcεRI): role in asthma. *FASEB J* **2001**; 15:940.
- 35- **Barnes PJ.** Pathophysiology of Allergic Inflammation. *Middleton's Allergy Principles and Practice, 6th Edition*, Philadelphia: Mosby **2008**.
- 36- **McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, et al.** Effects of IL-12 on helper T cell dependent immune responses in vivo. *J Immunol* **1994**; 152:2172.

- 37- **Kapsenberg ML, Jansen HM.** Antigen Presentation and Immunoregulation. *Middleton's Allergy Principles and Practice*, 6th Edition, Philadelphia: Mosby **2008**.
- 38- **Cameron L, Vercelli D.** Synthesis and Regulation of Immunoglobulin E. *Middleton's Allergy Principles and Practice*, 6th Edition, Philadelphia: Mosby **2008**.
- 39- **Kapsenberg ML, Wierenga EA, Bos JD, et al.** Functional subsets of allergen-reactive human CD4⁺ T cells. *Immunol Today* **1991**; 12:392.
- 40- **Paul We, Seder RA, Plaut M.** Lymphokine and cytokine production by FcεRI⁺ cells. *Adv Immunol* **1993**; 53:1.
- 41- **Ito T, Wang YH, Duramad O, et al.** TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* **2005**; 202:1213-23.
- 42- **Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, et al.** Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* **1994**; 264:1152.
- 43- **Hultner L, et al.** Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur J Immunol* **1990**; 20:1413.
- 44- **Kaufmann SHE.** Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* **1993**; 11:129.
- 45- **Rommagnani S.** Lymphokine production by human T cells Disease States. *Ann Rev Immunol* **1994**; 12:227-257.
- 46- **Rommagnani S.** Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Cur Opin Immunol* **1994**; 6:838-846.
- 47- **Yilmaz M, Bingol G, Altıntaş D, Kendirli SG.** Correlation between atopic diseases and tuberculin responses. *Allergy* **2000**; 55: 664-667.
- 48- **Garcia-Marcos L. et al.** BCG Immunization at Birth and Atopic Diseases in a Homogeneous Population of Spanish Schoolchildren. *Int Arch Allergy Immunol* **2005**; 137:303-309.
- 49- **Gruber C, Meinschmidt G, Bergmann R, Wahn U, Stark K.** Is early BCG vaccination associated with less atopic disease? An epidemiological study in German preschool children with different ethnic backgrounds. *Pediatr Allergy Immunol* **2002**; 13:177-181.
- 50- **Aaby P, Shaheen SO, Heyes CB, et al.** Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy* **2000**; 30:644-650.
- 51- **Gruber C, Kulig M, Bergmann R, et al.** Delayed hypersensitivity to tuberculin, total immunoglobulin E, specific sensitization, and atopic manifestation in longitudinally followed early Bacille Calmette - Guerin-vaccinated and non-vaccinated children. *Pediatrics* **2001**; 107:E36.
- 52- **Townley RG, Barlan IB, Patino C, et al.** The effect of BCG vaccine at birth on the development of atopy or allergic disease in young children. *Ann Allergy Asthma Immunol* **2004**; 92:350-355.
- 53- **Alm JS, Lilja G, Pershagen G, Scheynius A.** BCG vaccination does not seem to prevent atopy in children with atopic heredity. *Allergy* **1998**; 53:537.
- 54- **Von Mutius E, Pearce N, Beasley R, et al.** International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. *Thorax* **2000**; 55:449-453.

- 55- **Herz U, Gerhold K, Gruber C, et al.** BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *J Allergy Clin Immunol* **1998**; 102:867-874.
- 56- **Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A, et al.** Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette –Gue rin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med* **1998**; 187:561–569.
- 57- **Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al.** Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **1999**; 285:732–736.
- 58- **Ria F, Penna G, Adorini L.** Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *Eur J Immunol* **1998**; 28:2003-2016.
- 59- **Parronchi P, De Carli M, Menetti R, et al.** IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* **1992**; 149:2977-2983.
- 60- **Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, et al.** Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol* **1999**; 162:2375-2383.
- 61- **Li XM, Chopra RK, Chou TY, et al.** Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. *J Immunol* **1996**; 157:3216-3219.
- 62- **Gavett SH, O’Hearn DJ, Li X, et al.** Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med* **1995**; 182:1527-1536.
- 63- **Akdis CA, Kussebi F, Pulendran B, et al.** Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides. *Eur J Immunol* **2003**; 33:2717-2726.
- 64- **Wang CC, Rook GA.** Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/c mice by killed Mycobacterium vaccae. *Immunology* **1998**; 93:307-313.
- 65- **Tükenmez F, Bahçeciler NN, Barlan IB, Başaran MM.** Effect of pre-immunization by killed Mycobacterium bovis and vaccae on immunoglobulin E response in ovalbumin sensitized newborn mice. *Pediatr Allergy Immunol* **1999**; 10:107-111.
- 66- **Barros MT, Acencio MMP, Garcia MLB, Soares MFM, Ibanez OM, Martins MA, Ribeiro OG, Kalil J, Perini A.** BCG modulation of anaphylactic antibody response, airway inflammation and lung hyperreactivity in genetically selected Mouse strains (Selection IV-A). *Life Sciences* **2005**;77: 1480-1492
- 67- **Barlan IB, Tükenmez F, Bahçeciler NN, Başaran MM.** The impact of in vivo Calmette–Gue´rin Bacillus administration on in vitro IgE secretion in atopic children. *J Asthma* **2002**; 39:239-246.
- 68- **Choi IS, Koh YI.** Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients; a randomized, controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol* **2002**;88:584-591.
- 69- **Choi IS, Koh YI.** Effects of BCG revaccination on asthma. *Allergy* **2003**; 58:1114-1116.
- 70- **Özer A, Tükenmez F, Biricik A, et al.** Effect of BCG vaccination on cytokine mRNA expression in atopic children with asthma. *Immunol Lett* **2003**; 86:29-35.
- 71- **Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M, Akdis CA.** Role of bacillus Calmette-Gue´rin as an immunomodulator for the prevention and treatment of allergy and asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **2005**; 5:552-557.

- 72- **Stanford JL, Stanford CA.** Immunotherapy of tuberculosis with Mycobacterium vaccea NCTC 11659. *Immunobiology* **1994**; 191(4-5):555-563.
- 73- **Maggi E, Parrnchi P.** Reiprocal regulatory effects of IFN-g and IL-4 on their vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* **1992**; 148:2142.
- 74- **Lin AY, Zhu SZ.** 301 cases of bronchial asthma treated by kahusu. *Chinese Journal of Integrated Traditional & Western Medicine* **1991**; 196:11(4):209-211.
- 75- **Huygen K, Lozes E, Giles B, Drowaet A, Parfliet K, Jurion F, Roland I, Art M, Dufaux M, Nyabenda J.** Mapping of Th1 helper T cells epitopes on major secreted mycobacterial antigen 85A in mice infected with live mycobacterium bovis BCG. *Infection Immunity* **1994**; 62:363-370.
- 76- **Yang X, Fan Y, Wang S et al.** Mycobacterial infection inhibits established allergic inflammatory responses via alteration of cytokine production and vasuler cell adhesion molecule-1 expression. *Immunology* **2002**; 105:336-43
- 77- **Major T, Wohlleben G, Reibetanz B et al.** Application of heat killed Mycobacterium bovis-BCG into the lung inhibits development of allergen-induced Th2 responses. *Vaccine* **2002**; 20:1532-40
- 78- **Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG et al.** Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **1993**; 177:1199-204.
- 79- **Choi IS, Lin XH, Koh YA, Cui Y.** Inoculation Route-Dependent and Allergen-Specific Suppressive Effects of Bacille Calmette-Guerin Vaccination on Astmatic Reactions in BALB/c Mice. *Lung* **2007**; 185: 179-186.
- 80- **Hopfenspirger M T, Agrawal D K.** Airway hyperresponsiveness, Late Allergic Response, and Eosinophilia Are Reversed with Mycobacterial Antigens in Ovalbumin-Presensitized Mice. *The Journal of Immunology* **2002**; 168:2516-2522.
- 81- **Hylkema MN, Timens W, Luinge M, Werf NVD, Hoekstra M.** The Effect of Bacillus Calmette-Guérin Immunization Depends on the Genetic Predisposition to Th2-Type Responsiveness. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **2002**; 27:244-249.
- 82- **Bach JF.** The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* **2002**; 347: 911-920.
- 83- **Borish L.** IL-10: evolving concepts. *J Allergy Clin Immunol* **1998**; 101:293-7.
- 84- **Smitt JJ , Van Loveren H, Hoekstra MO et al.** Mycobacterium vaccae administration during allergen sensitization or challenge suppresses asthmatic features. *Clin Exp Allergy* **2003**; 33:1083-9
- 85- **Dupuis R, Collins DS, Koh DD, Police M, Albertine KH, Fish JE, Peter SP.** Effect of antigen dose on the recruitment of inflammatory cells to the lung by segmental antigen challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **1992**; 89: 850-857.
- 86- **Zuani-Amorim C, Sawicka E, Manlius C et al.** Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nature Med* **2002**; 8:625-9
- 87- **Akdis CA, Blaser K, Akdis M.** Genes and Tolerance. *Allergy* **2004**; 59: 897-913.
- 88- **Walker C, Sawicka E, Rook GAW.** Immunotherapy with mycobacteria. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **2003**; 3: 481-486

- 89- **Zuani-Amorim C, Manlius C, Trifilieff A.** Long-term protective and antigen specific effect of heat killed *Mycobacterium vaccae* in murine model of allergic pulmonary inflammation. *Journal of Immunology* **2002**; 169: 1492-1499.
- 90- **Koh YI, Choi IS, Park SC, Kang KW.** BCG Infection during Pre-Sensitization or Even Post-Sensitization Inhibits Airway Sensitivity in an Animal Model of Allergic Asthma. *J Korean Med Sci* **2000**; 15: 265-72.
- 91- **Kim SW, Yeo SW.** The effect of Bacillus Calmette-Guerin in a mouse model of allergic rhinitis. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* **2007**;136:720-725.
- 92- **Başdemir D, Nuhoglu Y, Bahçeciler NN, Tükenmez F, Kotiloğlu E, Barlan IB, Başaran MM.** Acute Effect of Inhaled Budesonide on Bronchial Inflammation in Asthmatic Rats. *Journal of Asthma* **2001**; 38(6):461– 467.
- 93- **Stene LC, Nafstad P.** Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. *Lancet* **2001**;357:607.
- 94- **G. A. W. Rook , V. Adams, J. Hunt, R. Palmer, R. Martinelli, L. Rosa Brunet.** Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Semin Immun* **2004**; 25:237–255.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tugay TEPE
Doğum Tarihi ve Yeri : 1979/ Muş
Medeni Durumu : Evli
Adres : Mahfesiğmaz Mh. Adnan Kahveci Blv.
Cemil Kaya Apt. 13/26 Adana
Telefon : 232 43 56
Fax :
E-mail : drtugaytepe@yahoo.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi (2003)
Varsa Mezuniyet Derecesi:
Görev Yerleri :
Dernek Üyelikleri : Çukurova Üniversitesi Mezunlar Derneği
Alınan Burslar :
Yabancı Dil (ler) : İngilizce
Diğer Hususlar :