T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

GEBE RATLARDA FOLİK ASİT SÜPLEMENTASYONU İLE YAVRULARDA ALLERJİK HAVA YOLU HASTALIĞI GELİŞİMİ ARASINDA İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Berna EROĞLU FİLİBELİ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2015

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

GEBE RATLARDA FOLİK ASİT SÜPLEMENTASYONU İLE YAVRULARDA ALLERJİK HAVA YOLU HASTALIĞI GELİŞİMİ ARASINDA İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Berna Eroğlu Filibeli
TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Abdullah Kumral

UZMANLIK TEZİ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **I**
TABLO DİZİNİ ..... **III**
ŞEKİL DİZİNİ ..... **IV**
RESİM DİZİNİ ..... **V**
KISALTMALAR ..... **VI**
ÖZET **1**
SUMMARY **2**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **3**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Astım tanımı ve sıklığı 4
2.2. Astım etiyolojisi 4
2.2.1. Biyolojik ve genetik risk faktörleri 5
2.2.2. Çevresel risk faktörleri 7
2.3 Astımın patogenezi 8
2.3.1. Astımda rol oynayan enflamatuvar hücreler 9
2.3.2. Astımda rol oynayan mediyatörler 12
2.3.3. Hava yollarının yapısal değişiklikleri ve yeniden yapılanma (Remodeling) 13
2.3.4. Hava yolu aşırı duyarlılığı 16
2.4. Astım tanısı 16
2.5. Astım Tedavisi 17
2.6. Folik Asit ve Astım 18
3. GEREÇ VE YÖNTEM **22**
3.1. Anne farelerin seçimi ve deney gruplarının oluşturulması 22
3.2. Çalışma grupları 22
3.3. Astım modelinin oluşturulması 23
3.4. Hayvan yaşamını sonlandırma zamanı ve yöntemi 24
3.5. Histolojik incelemeler 24
3.5.1. Işık Mikroskobik Doku Takip Protokolü 24
3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Metodu 25
3.5.3. Periodik asid-schiff Boyaması (PAS) 26
3.5.4. Toluidin Blue Boyası 27

3.5.5. Işık mikroskobik değerlendirme 27
3.5.6. İmmünohistokimyasal Yöntem 28
3.5.8. Semikantitatif Yöntem ile Skorlama 29
3.5.9. Verilerin istatistiksel analizi 29
4. BULGULAR 30
5. TARTIŞMA 50
6. SONUÇLAR 53
7. KAYNAKLAR 55
EK: ETİK KURUL ONAYI 60

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Deney grupları 23
Tablo 2. Işık Mikroskobik Doku Takip Protokolü 25
Tablo 3. Hematoksilen-Eozin boyama metodu 26
Tablo 4. PAS boyama metodu 27
Tablo 5. Tüm grupların ışık mikroskopi histolojik parametreleri 30
Tablo 6. Tüm grupların immünohistokimyasal parametreleri 32

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Astım gelişimindeki risk faktörleri 5
Şekil 2. Epigenetik düzenleme mekanizmaları 6
Şekil 3. Embriyogenezdeki metillenme 7
Şekil 4. Allerjik hastalıklarda T hücre sitokin salınımı 11
Şekil 5. Kronik astımda hava yolunda yeniden yapılanma (remodeling) 14
Şekil 6. Mast hücre aracılı yeniden yapılanmanın şematik görüntüsü 16
Şekil 7. Folatın ve folik asitin kimyasal yapısı 18
Şekil 8. Folat ve folik asit metabolizmasının özet şeması 19
Şekil 9. Modifiye neonatal astım modeli oluşturma protokolü 24

RESİM DİZİNİ

Resim 1. Kontrol grubunun akciğer kesitleri (H&E boyama) 34
Resim 2. Kontrol grubunun akciğer kesitleri (PAS boyama)..... 35
Resim 3. Kontrol grubunun akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama) 35
Resim 4. Grup 3'ün akciğer kesitleri (H&E boyama)..... 36
Resim 5. Grup 3'ün akciğer kesitleri (H&E boyama)..... 36
Resim 6. Grup 3'ün akciğer kesitleri (PAS boyama)..... 37
Resim 7. Grup 3'ün akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama)..... 37
Resim 8. Grup 2'nin akciğer kesitleri (H&E boyama 38
Resim 9. Grup 2'nin akciğer kesitleri (H&E boyama)..... 38
Resim 10. Grup 2'nin akciğer kesitleri (PAS boyama)..... 39
Resim 11. Grup 2'nin akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama). 39
Resim 12. Grup 1'in akciğer kesitleri (H&E boyama)..... 40
Resim 13. Grup 1'in akciğer kesitleri (H&E boyama)..... 40
Resim 14. Grup 1'in akciğer kesitleri (PAS boyama)..... 41
Resim 15. Grup 1'in akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama). 41
Resim 16. Kontrol grubunun Caspase-3 ile boyalı akciğer kesitleri..... 42
Resim 17. Grup 3'ün caspase-3 ile boyalı akciğer kesitleri 42
Resim 18. Grup 2'nin caspase-3 ile boyalı akciğer kesitleri..... 43
Resim 19. Grup 1'in caspase-3 ile boyalı akciğer kesitleri. 43
Resim 20. Kontrol grubunun TGF-β ile boyalı akciğer kesitleri 44
Resim 21. Grup 3'ün TGF-β ile boyalı akciğer kesitleri..... 44
Resim 22. Grup 2'nin TGF-β ile boyalı akciğer kesitleri 45
Resim 23. Grup 1'in TGF-β ile boyalı akciğer kesitleri. 45
Resim 24. Kontrol grubunun VEGF ile boyalı akciğer kesitleri..... 46
Resim 25. Grup 3'ün VEGF ile boyalı akciğer kesitleri 46
Resim 26. Grup 2'nin VEGF ile boyalı akciğer kesitleri. 47
Resim 27. Grup 1'in VEGF ile boyalı akciğer kesitleri..... 47
Resim 28. Kontrol grubunun MMP-9 ile boyalı akciğer kesitleri..... 48
Resim 29. Grup 3'ün MMP-9 ile boyalı akciğer kesitleri. 48
Resim 30. Grup 2'nin MMP-9 ile boyalı akciğer kesitleri. 49
Resim 31. Grup 1'in MMP-9 ile boyalı akciğer kesitleri..... 49

KISALTMALAR

Th1: T helper tip 1 hücre

Th2: T helper tip 2 hücre

Treg: Regulatuvar T hücre

IgE: Immunglobulin E

LT: Lökotrien

PG: Prostoglandin

TNF-α: Tümör nekrozis faktör alfa

IL: İnterlökin

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör

IFN- γ: İnterferon gama

BAL: Bronkoalveolar lavaj

TGF-β: Transforme edici büyüme faktörü

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü

FEV1: 1. Saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm

FVC: Zorlu vital kapasite

PABA: p-aminobenzoik asit

DHF: Dihidrofolat

DHFR: Dihidrofolat redüktaz

THF: Tetrahidrofolat

5-MTHF: 5-metiltetrahidrofolat

SAM: S-adenozil metiyonin

NTD: Nöral tüp defekti

Runx3: Runt-related trankripsiyon faktör 3

H&E: Hematoksilen ve eozin

PAS: Periodik asid-schiff

MMP-9: Matriks metalloproteinaz-9

ÖZET

GEBE RATLARDA FOLİK ASİT SÜPLEMENTASYONU İLE YAVRULARDA ALLERJİK HAVA YOLU HASTALIĞI GELİŞİMİ ARASINDA İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Giriş: Gebelikte folik asit kullanımı ile nöral tüp defektlerinde azalma yapılan çalışmalarla gösterildiğinden, intrauterin folik asit kullanımı dünya genelinde önemli ölçüde artmıştır. Folik asit, vücutta önemli pek çok biyokimyasal olayda metil vericisi olarak görev yapmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, metil dönüründen zengin diyetin DNA metilasyonu yolu ile epigenetik düzenlemeye yol açarak allerjik hava yolu hastalığı riskini arttırdığı gösterilmiştir. Maternal folik asit süplementasyonunun, yaşamda allerjik hava yolu hastalığı gelişimi üzerine etkisi ile ilgili kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmada, gebelikte folik asit kullanımı ile yavrularda allerjik hava yolu duyarlanmasının histopatolojik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Gebelikteki folik asit süplementasyonuna göre dişi BALB/c farelerden dört grup oluşturuldu; Grup 1 (Gebelik boyunca folik asit alan grup), Grup 2 (Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup), Grup 3 (Gebelikte folik asit almayan grup), Grup 4 (Kontrol grubu). Kontrol grubu haricindeki gruplardan doğan yavru fareler ovaalbumin ile duyarlaştırılarak astım modeli oluşturuldu. Yavru fareler son nebülize ovaalbumin uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edilerek, akciğer dokuları histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeye tabi tutuldu.

Bulgular: Gebeliklerinde folik asit alan gruplardaki epitel ve subepitelyal düz kas kalınlığı, VEGF ve MMP-9 ile pozitif immünoreaktivite gebelikte folik asit almayan gruba göre anlamlı şekilde artmıştır. Ayrıca, gebelik boyunca folik asit kullanımı (Grup 1), gebeliğin ilk haftası folik asit kullanıma (Grup 2) göre artmış epitel ve subepitelyal düz kas kalınlığı ile ilişkilidir.

Sonuç: Bu çalışma, gebelikte maternal folik asit süplementasyonunun yavru farelerde ovaalbümin kullanılarak oluşturulan allerjik cevabı arttırdığını göstermiştir. Ayrıca oluşan etki, maruziyet süresi ve kümülatif doz ile doğru orantılıdır.

Anahtar kelimeler: Folik asit, Maternal süplementasyon, Allerjik hava yolu hastalığı, Epigenetik

SUMMARY

EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN FOLIC ACID SUPPLEMENTATION IN PREGNANT MICE AND DEVELOPMENT OF ALLERGIC AIRWAY DISEASE IN OFFSPRING

Objective: The fact that reduction in neural tube defects by use of folic acid supplement during pregnancy has been noticed in many studies; the use of folic acid supplementation increased world wide. Folic acid functions as a methyl donor in many biochemical reactions of the body. Recent studies indicate that the diet rich of methyl donor increase the risk of allergic airway disease because of epigenetic regulation assisted by methylation of DNA. There is limited evidence with regard to maternal folic acid supplementation effects on the development of allergic airway disease in life. This study aimed to evaluate the relationship between folic acid supplementation during pregnancy and allergic airway disease in offspring.

Methods: Female BALB/c mice were randomized into four groups according to the folic acid supplementation in pregnancy; group 1 (whole pregnancy folic acid supplementation group), group 2 (first week of gestation folic acid supplementation group), group 3 (without folic acid supplementation group), group 4 (control group). Their offspring were sensitized and challenged with ovalbumin except the control group. Offspring were sacrificed after 24 hours of last nebulised ovalbumin administration for histological and immunohistochemical evaluation of lung tissues.

Results: Epithelial and subepithelial smooth muscle thickness, VEGF and MMP-9 positive immunoreactivity are increased significantly in the folic acid supplemented groups in spite of without folic acid supplemented group. Moreover, folic acid supplementation during whole pregnancy group (group 1) was associated with thicker epithelial and subepithelial smooth muscle layer than folic acid supplementation during the first week of pregnancy (group 2).

Conclusion: This study suggests that maternal folic acid supplementation during pregnancy increases allergic responses induced by ovalbumin challenge in offspring. Also the effect size increases as the duration and the cumulative dose increase.

Keywords: Folic acid, Maternal supplementation, Allergic airway disease, Epigenetics

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Folik asit kullanımı ile nöral tüp defektlerinde azalma, yapılan çalışmalarda gösterildiğinden son yıllarda gebe kadınlara folattan zengin gıda alımı yanında günlük 0.4 mg sentetik folik asit alımını önerilmektedir [1]. Folik asit kullanımının, fetal hayatta ve sonrasında ne gibi değişikliklere yol açtığı net bilinmemektedir.

Astım yönetimindeki iyileştirmelere ve astım tedavisindeki ilerlemelere rağmen, astım tüm dünyada giderek yaygınlaşma göstermektedir [2]. Çocukluk çağı astımın nedeni tam olarak bilinmese de genetik ve çevresel faktörlerin eşlik ettiği bir hastalık olduğu düşünülmektedir [2]. Son yıllarda astım ve genetik ilişkisinde 'epigenetik düzenlenme' oldukça ilgi görmekte olup bu konuda birçok çalışma yapılmaktadır. Epigenetik düzenleme DNA metillenmesi veya histon modifikasyonları ile meydana gelebilir ve intrauterin dönem bu değişikliklere en hassas dönemdir. Bu değişiklikler ile kromatin yapısının gevşek veya sıkı olması etkilenerek gen ifadesinde düzenleme yapılır [3].

Folik asit, folatın sentetik formudur [4]. Folat vücutta nükleotidlerin yapımında, DNA sentezinde, kararlılığında, bütünüğünde ve DNA onarımında önemli bir yere sahiptir [5]. Folik asit gibi tek karbon metabolizmasının kofaktörü olan besinlerin, gestasyon sırasında, fetal programlanmayı etkileyebildiği ve DNA metillenme kalıbında ve gen ifadesinde değişiklikler yapabildiği gösterilmiştir [6].

Toplum kaynaklı epidemiyolojik çalışmalarda, anneye yapılan folik asit süplementasyonu ile çocukluk çağı allerjik hastalıkları gelişimi arasındaki ilişki net olarak ortaya konulamamıştır. Deneysel çalışmalara ait veriler metil donörü olan folik asit ile allerjik hastalık gelişimi arasında ilişki olduğunu desteklemekle birlikte gebelikte yapılan süplementasyonun yavrulara olan etkisi değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda gebelik döneminde folik asit uygulanan ve uygulanmayan annelerin yavrularında geliştirilen deneysel modifiye neonatal astım modelinde hava yollarında oluşan histopatolojik değişikliklerin karşılaştırılarak folik asit süplementasyonu ile allerjik duyarlanma arasındaki ilişkiyi aydınlatmak hedeflenmiştir. Çalışmamız gebelikte folik asit alımının yavrularda allerjik duyarlanma üzerine histopatolojik etkilerini değerlendiren ilk çalışma olacaktır.

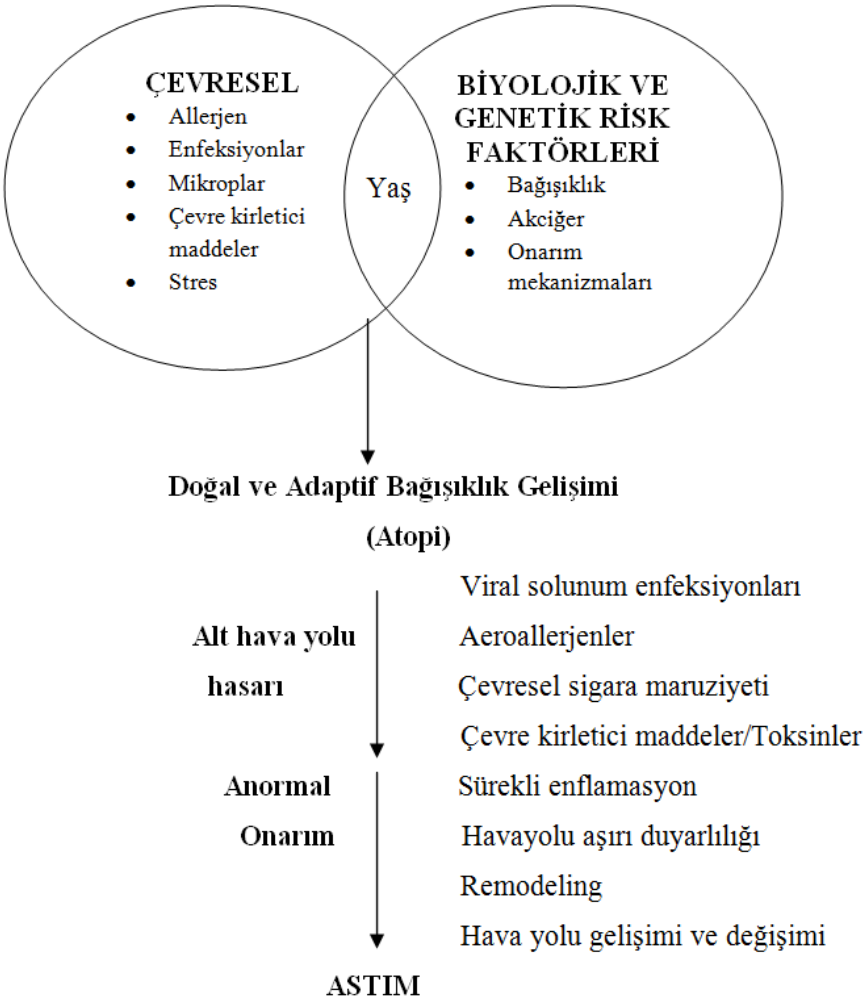
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Astım tanımı ve sıklığı

Astım akciğer hava yollarında epizodik hava yolu obstrüksiyonu ile sonuçlanan kronik enflamatuvar bir hastalıktır [2]. Astım çocukluk çağındaki kronik hastalıkların en sık görülen şeklidir [7]. Dünya çapında, çocukluk astımı yönetimdeki iyileştirmelere ve astım tedavisindeki önemli farmakolojik ilerlemelere rağmen, giderek yaygınlaşma göstermektedir [2]. Farklı ülkelerde yapılan çok sayıda çalışma, on yılda yaklaşık % 50 oranında astım prevalansında artış bildirmiştir [2]. Dünyadaki astım prevalansı %1 ile %18 arasında farklılık göstermektedir [7, 8]. Astım prevalansı, allerjik rinokonjunktivit ve atopik egzama yaygınlığı ile korelasyon göstermektedir [2]. Astım gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere göre daha sık görülmektedir [7, 8]. Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda, astım prevalansının %2,8-%14,5 arasında değiştiği gösterilmiştir [9, 10].

2.2 Astım etiyolojisi

Çocukluk çağı astım nedeni tam olarak tespit edilememiş olmasına rağmen, çağdaş araştırmalar astım etiyolojisinin çevresel maruziyet, kalıtsal biyolojik etkenler ve genetik faktörleri içerdiğini göstermektedir (Şekil 1) [2].

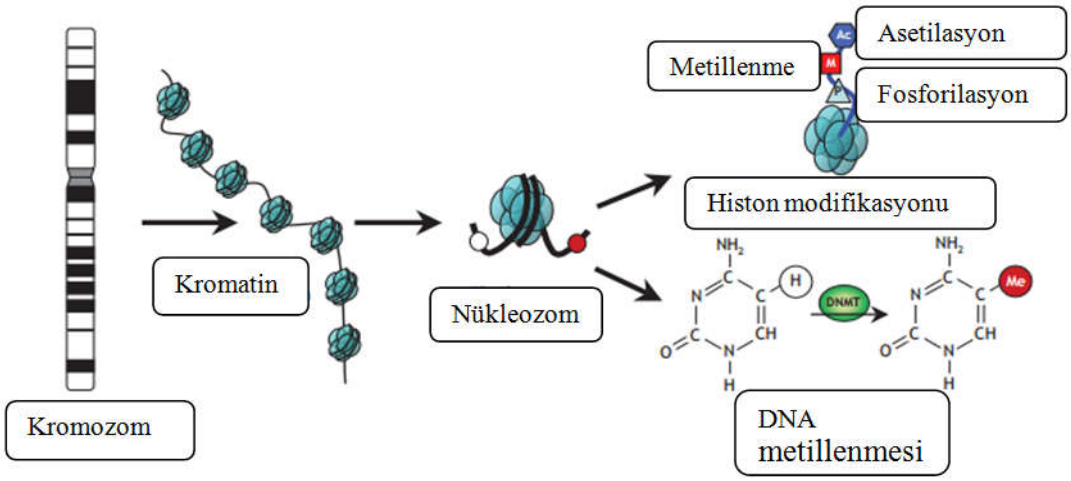


Şekil 1. Astım gelişimindeki risk faktörleri

2.2.1 Biyolojik ve genetik risk faktörleri

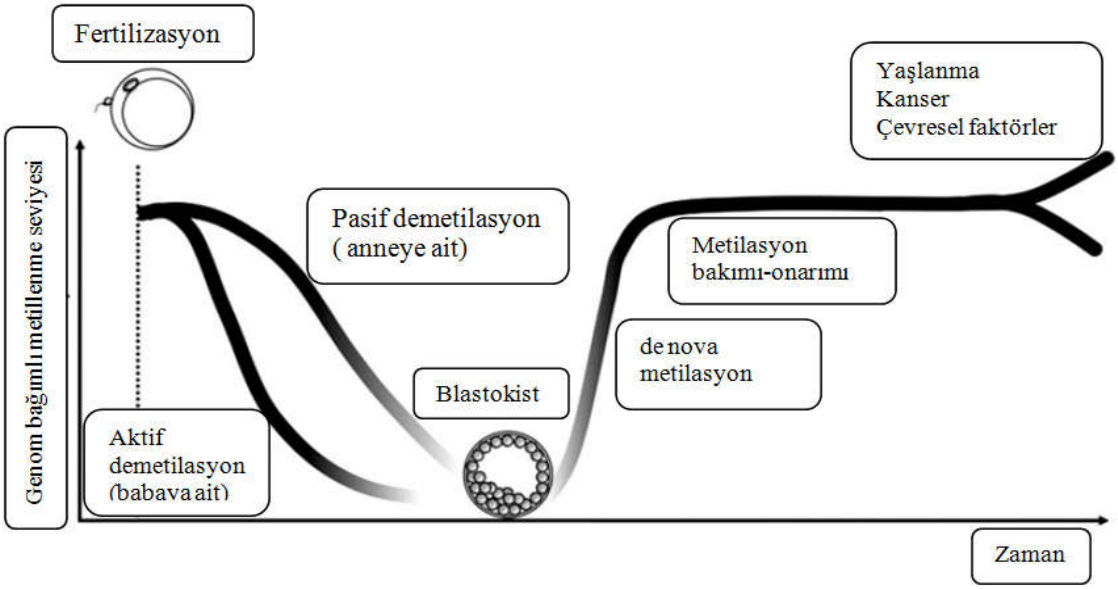
a. Genetik: Astımda genetik geçişin basit Mendeliyan tipte olmadığını, birden fazla kromozomun rol oynadığı poligenik bir geçişin söz konusu olduğunu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir [11]. 100'den fazla genetik lokus astımla bağlantılı bulunmuştur [2]. Ayrıca astıma yatkınlık yaratan genler dışında astım tedavisine yanıt ile ilişkili genler de tanımlanmıştır [12]. Son yıllarda astım ve genetik ilişkisinde 'epigenetik düzenlenme' oldukça ilgi görmektedir [13]. Epigenetik terimi ilk olarak 1950'lerde Conrad Waddington tarafından önerilmiştir [14]. Epigenetik, DNA dizisine bağlı kalarak gen transkripsiyonundaki değişikliklerin oluşturduğu kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanır. Epigenetik düzenlenme, canlıların embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde gözlemlenen, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişiklerde önemli rol oynamaktadır [13, 14]. Epigenetik alanı, gelişimsel ve çevresel epigenetik olarak ikiye ayrılır. Gelişimsel epigenetik doku spesifikliği, olgunlaşması ve gelişiminde rol oynayan gen ekspresyonunun

katı kalıplarının düzenlenmesi ve bakımı ile ilgilenir. Çevresel epigenetik ise hücrelerin çevresel maruziyetlere, kromatin yapı değişikliği mi yoksa küçük RNA ekspresyonu ile mi karşılık verdiklerini inceler [15]. Epigenetik düzenlenme DNA metillenmesi veya histon modifikasyonları ile meydana gelebilir. DNA metillenmesi DNA metil transferazlar tarafından CpG adacıklarında sitozinin beş numaralı karbonunda meydana getirilir. CpG adacıklarında görülen DNA metillenmesi, gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde, özellikle genlerin promotor bölgelerindeki metillenme, transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değişikler meydana getirir. Bu faktörlerin bağlanması engellenmekle birlikte gen ifadesi baskılanmış duruma getirilir. Böylece farklı dokularda farklı genlerin ifade olmasının temelinde bu düzenleme yatmaktadır. DNA'nın paketlenmesinde sorumlu olan histon proteinlerinin bazik amino-terminal uçları nükleozamdan çıkıntılar yaparak asetillenme veya metillenme yoluyla bir takım post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Histondaki bu değişiklik, kromatin yapısının gevşek veya sıkı olmasını etkileyerek gen ifadesinde düzenleyici bir rol oynar (Şekil 2) [3].



Şekil 2. Epigenetik düzenleme mekanizmaları

DNA metillenme kalıbı, fertilizasyondan sonra genom metilasyonu tarafından embriyogenez sırasında tekrar programlanır. Baba genomunun aktif demetilasyonu ve anne genomunun pasif demetilasyonu ile anne-baba DNA metilasyon kalıbının önemli kısımları silinir. İmplantasyondan sonra, blastokist formu oluşup yeni DNA metilasyon kalıbı de nova metilasyon ile kurulur. Sonraki yaşamda, yaşlanma, kanser ve çevresel maruziyetlerle metilasyon seviyesi arttırıp azaltılarak epigenetik farklılaşma görülebilir (Şekil 3) [4].



Şekil 3. Embriyogenezdeki metillenme

Gelişmekte olan çalışmalar epigenetik mekanizmaların, T helper 1 (Th1) [16-18], T helper 2 (Th2) [18-20] ve T regülatuvar (Treg) [21] hücrelerinin kökenini denetleyen transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesini etkilediğini göstermektedir. Örneğin T hücrelerinin az metillenmesi FoxP3 (Forkhead box P3) [21, 22] ve STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) [16-18] genlerinin ifadesini arttırarak T reg ve Th1 hücrelerinin genişlemesi ile sonuçlanır [23]. Kısacası hipometilasyon, Treg hücre popülasyonunu arttırıp Th1 hücre yönüne kayarak allerjik hava yolu hastalığından koruyabilir [23]. Allerji ve astım alanında allerjen maruziyeti, bakterilerin mikrobik içerikleri, obezite, stres, folik asit, B12 vitamini ve balık yağı gibi diyet faktörleri ile epigenetik düzenlenme oldukça ilgi çekip bu konuda birçok çalışma yapılmaktadır [13].

b. Obezite: Obezitenin de astım için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Normal kilolu hastalara göre akciğer fonksiyon testinin anormal olma riski aşırı kilolularda iki kat, obeziteli hastalarda ise üç kat artmış bulunmuştur [24]. Leptin benzeri mediyatörler solunum fonksiyonlarını etkileyebilmekte ve astım gelişme olasılığını arttırabilmektedir [25].

2.2.2 Çevresel risk faktörleri

a. Allerjenler ile temas: Polen veya mantar sporlarının yoğunluğu mevsimsel olarak değişebildiğinden hasta semptomları da allerjenin tipine, maruziyet süresine göre değişmektedir. Bazı hastalarda ise semptomlar tüm yıl boyunca sürebilmektedir. Böyle

durumlarda mitelar, hayvan tüyleri, hamam böceği ve mantar gibi ev içi maruziyet ön planda düşünebilir. Çocuğun yaşı da bir diğer önemli faktördür. İnfantlarda öncelikle inek sütü, fındık gibi besin allerjenleri sorumludur [2].

b. İnfeksiyonlar: Gebelik boyunca fetüs immünitesinden Th2 hücreler ağırlıklı olarak sorumludur ve bu olay erken çocuklukta da bu şekilde sürmektedir. Ancak erken çocuklukta geçirilen bazı infeksiyonlar, Th2 cevabını Th1'e dönüştürebilirler. Bu nedenle, Th1 cevabını uyaran infeksiyonların astım ve allerji gelişimini engelleyebilecekleri düşünülmektedir [26].

c. Hava kirliliği ve sigara: Hava kirliliği hava yolu aşırı duyarlılığına, solunum semptom ve bulgularına, astım alevlenmelerine ve akciğer fonksiyonlarında azalmaya neden olabilmektedir [27]. Sigara dumanı ile temas, oksidatif stresi artırır ve hava yolunda enflamasyonu stimüle eder. Yapılan bir çalışmada prenatal dönemde annenin sigara kullanımı, üç yaşından küçük çocuklarda persistan wheezing ile ilişkili bulunmuştur [28].

d. Diyet: Anne sütü ile beslenme astım ve allerjik hastalıklardan korunma için önerilmektedir.

2.3 Astımın patogenezi

Astımdaki hava yolu obstrüksiyonu çok sayıda patalojik sürecin sonucudur [2]. Hava yolu enflamasyonu astım için önemli karakteristik bir özelliktir. Astımda hava yolu enflamasyonu persistan olup, semptomlar epizodiktir [29]. Akciğerde birçok kompleks enflamatuvar süreç sonucunda hava yollarında ödem, aşırı mukus sekresyonu, lökosit infiltrasyonu ve hava yolu hiperreaktivitesi gelişir. Hava yolu enflamasyonu pek çok hücrenin birbiriyle kompleks etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Eozinofiller, T lenfositler, makrofajlar ve nötrofiller bu enflamasyonda önemli rol oynar. Bu hücreler dışında hava yolunun 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. Astımda temel patoloji geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonu ve bronşiyal düz kas aşırı duyarlılığıdır. Astımlı hastalarda meydana gelen hava yollarındaki 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 hava yollarında kalınlaşma gibi yapısal değişimler hava yollarında 'remodelling' (yeniden yapılanma) şeklinde tanımlanmaktadır [30]. Bu durum enflamasyonla oluşan doku hasarına tamir yanıtı

şeklinde gelişen aktif ve kompleks bir süreçtir. Astım patofizyolojisinde temel unsurların kronik enflamasyon ve hava yolu 'remodelling'i olduğu gösterilmiştir [30]. Astım yanıtı, allerjenlerle tetiklenir. Antijenin allerjen yapıda olabilmesi için öncelikle dendritik hücre, T ve B lenfosit aracılığıyla sensitizasyon gerçekleştirdikten sonra immunglobülin E (IgE) yanıtına neden olması gerekmektedir. Ayrıca aynı ve benzer antijene tekrar maruziyet sonrasında yeniden erken ile geç faz yanıtların ortaya çıkmasını sağlamalıdır. 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. Erken ve geç faz yanıtı, bronşiyal allerjenlerin IgE aracılığıyla hava yolu 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 üç ila sekiz saat sonra gelişir ve daha sonra hava yolu aşırı duyarlılığını arttıran ajanlarla tekrar gelişebilir. Geç faz, allerjenle tekrar karşılaşılmadan da gerçekleşebilir ve birkaç gün sürebilir. Allerjik hastalıklarda enflamatuvar yanıt uygunsuz bir biçimde tetiklenir ve şiddetli bir doku infiltrasyonuna ve epitelyal hasara neden olur. Sonuçta, doku tahribatı ile yarardan çok zarar verilir.

2.3.1. Astımda rol oynayan enflamatuvar hücreler

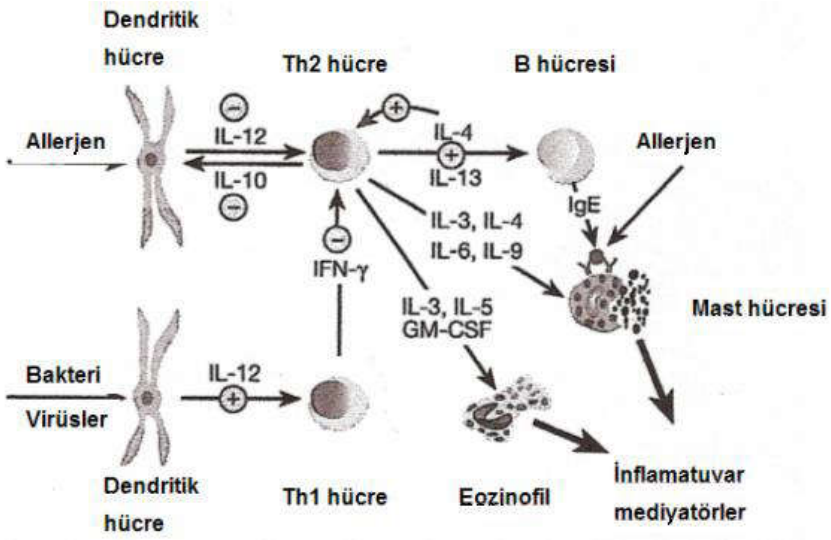
-Mast hücreleri: Önceden duyarlanmış kişilerde tekrar allerjenle karşılaşma sonrası allerjen, mast hücresi üzerinde önceden oluşturulmuş IgE molekülü ile birleşerek mast hücresini aktive eder ve allerjik enflamasyonun erken faz cevabını oluşturur. Hava yolunda iki tip mast hücresi bulunur. Bağ dokusu mast hücreleri, submukozada bulunurken mukozal mast hücreleri, epitelde bulunurlar ve farklı türde kimyasal madde salgılarlar. Allerjen maruziyeti sonrası bu iki tip mast hücresinin sayısında artış tespit edilmiştir. Mast hücresinin 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 ulaşması sağlanır. Ayrıca interlökin-4 (IL-4) ve interlökin-13 (IL-13) salınımı ile B hücrelerinden IgE sentezlenir. İnterlökin-5 (IL-5) ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ise

dolaşımdan dokuya eozinofil göçünde rol oynar. IL-4, IL-13 gibi sitokinler, histamin ve triptaz gibi mediyatörler epitelya değişimi ve remodelling oluşumuna neden olur. Allerjik enflamasyonda önemli rol oynayan mast hücreleri, fibroblastların göçünü ve çoğalmasını uyaran mediyatörlerin de ana kaynağıdır [31].

-Eozinofiller: Eozinofiller, allerjik havayolu hastalıklarında epitelyal hasar, deskuamasyon, subepitelyal fibrozis ve hava yolu aşırı duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir. Hava yolundaki eozinofil sayısı genel olarak astımın şiddeti ile doğru orantılıdır. Eozinofillerin yarı ömrü 24 saatten az olup interlökin-3 (IL-3), IL-5 ve GM-CSF varlığında enflamasyon alanına göç ederler. Eozinofiller içerdikleri toksik ürünler nedeniyle allerjik enflamasyonun geç fazının effektör hücresi gibidir. İçerdikleri majör basic protein (MBP), eozinofilik katyonik protein (ECP), eozinofil peroksidaz (EPO) ve eozinofil kökenli nörotoksin solunum yollarında epitelyal hasara neden olur [2].

-T lenfositler: Hava yollarında artmış sayıda bulunurlar. İnterlökin (IL) 4, 5, 9, 13 gibi spesifik sitokinlerin salınımına neden olarak eozinofilik inflamasyonu kontrol eder ve B lenfositlerden IgE yapımına neden olurlar [31]. T lenfositler allerjik hava yolu enflamasyonunda antijene karşı immün sistemin adaptasyon ve koordinasyonunda kilit rol oynar (Şekil 4). 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 adlandırılır. 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 tanır. Böylece antijen spesifik enflamatuvar yanıtı ve immünglobulin yapımını düzenledikleri için astım ve allerjik rinitin patogenezinde önemli yer tutarlar [31]. Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda, CD4+ T hücre klonlarının yaptığı sitokinler incelendiğinde, farklı klonların ya IL-2, interferon gama (IFN- γ), TNF- α veya IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ve IL-9 salgıladığı görülmüştür. Birinci klonun oluşturduğu yanıt Th1, ikincisi ise Th2 tipi yanıt şeklinde adlandırılmıştır. CD4+ T lenfositlerin antijenik uyarı ile Th1 ve Th2 alt tipine farklılaştığı düşünülmekte ancak bu dönüşümün nasıl olduğu halen açıklanamamaktadır [32]. Allerjen ile karşılaşma zamanı ve süresi, allerjen miktarı, ortamdaki sitokinlerin CD4+ T lenfositlerin farklılaşmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Th1 hücreleri IL-3, TNF- α, yüksek miktarda interferon gama (IFN- γ) üretirler. IFN- γ patojenin intrasellüler proliferasyonunu engeller ve fagosit içindeki intrasellüler patojenleri öldürür. Ayrıca sitotoksik CD8+ hücrelerin gelişimini desteklerler.

Th2 hücreleri IFN- γ haricinde IL-4, IL-5, IL-9, ve IL-13 üretirler. Bu sitokinler mast hücreleri, eozinofil, makrofaj ve epitel hücrelerini etkileyerek allerjik enflamasyona dahil ederler. Yardımcı T hücrelerinin farklılaşmasında en önemli etken antijenle etkileşim sonrası mikro çevrede salınan sitokinin çeşididir. CD4+ T hücresinin antijenle ilk karşılaşması sırasında ortamda IL-I2 veya IFN-γ'nın baskın olması Th1 hücresine farklılaşmaya, IL-4 ve IL-13'ün baskınlığı ise Th2 hücresine farklılaşmaya neden olur [33]. Hayatın erken döneminde geçirilen enfeksiyonların Th1 ilişkili yanıtın baskın olmasına 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 [34, 35]. Th1 ve Th2 hücrelerinin oluşturduğu immün yanıt mekanizması CD4+ Treg hücrelerince düzenlenir. T reg hücreleri, sitotoksik ve T yardımcı hücre etkinliğini baskılayarak immün reaksiyonları düzenlerler. Geç duyarlılık reaksiyonlarını ve antikor yapımını inhibe ederler. Bu hücreler, immün toleransın devamında ve otoimmünitenin önlenmesinde önemli rol oynarlar.



Şekil 4. Allerjik hastalıklarda T hücre sitokin salınımı

-Makrofajlar: Hava yolunda artmış sayıda bulunurlar düşük affiniteli IgE reseptörleri aracılığı ile allerjenler tarafından aktive edilirler. Makrofajların salgıladığı birçok 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. Makrofajlardan

salınan enflamatuvar protein olan IL-10'un sekresyonu astımlı hastalarda azalmıştır. Sağlıklı insanlarda makrofajlar, muhtemelen IL-12 salınımı ile T lenfositlerden salgılanan IL-5 sekresyonunu baskılamaktadır. Ancak bu baskılanma allerjik astımlı hastalarda bozulmuştur. Makrofajlar ayrıca T lenfositler için allerjeni işleyip antijen sunan hücre gibi davranırlar. Allerjik hastalıklarda makrofajların alt tipleri değişik tip enflamatuvar, antienflamatuvar ve fagositik rol üstlenirler [36].

-Nötrofiller: Ağır ve sigara içen astımlı hastaların hava yolu ve balgamlarında artmış olarak bulunur. Nötrofilin, allerjik hava yolu hastalıklarındaki rolleri tam olarak bilinmemekle birlikte ciddi astımlı hastaların balgamında, bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerinde ve bronş biyopsilerinde saptanmıştır. Nötrofiller konak savunmasında ve antijene karşı enflamatuvar yanıtta önemli hücrelerdir [36].

2.3.2. Astımda rol oynayan mediyatörler

Astım ile ilişkili 100'den fazla farklı mediyatör bulunduğu ve hava yollarındaki kompleks enflamatuvar yanıtı oluşturdukları gösterilmiştir.

-Kemokinler: Enflamatuvar hücrelerin hava yoluna taşınmasında önem taşırlar ve başlıca hava yolu epitel hücreleri tarafından salınırlar. Eotaksin, eozinofiller için relatif olarak seçicidir, bununla birlikte timus ve aktivasyonun regüle ettiği kemokinler (TARC) ve makrofaj kökenli kemokinler Th2 hücre göçüne yol açar [37].

-Sisteinil lökotrienler: Mast hücreleri ve eozinofillerden köken alan güçlü bronkokonstrüktör ve proinflamatuvar mediyatörlerdir [38].

-Sitokinler: Sitokinler, astımdaki enflamatuvar yanıtı ve ağırlığı belirlemede ana rol oynarlar. Son yıllarda allerji üzerine yapılan çalışmalarda, enflamatuvar yanıtın düzenlenmesi, sürdürülmesi ve etkisinin arttırılmasında sitokinlerin kritik rol üstlendiği saptanmıştır. Th2 kökenli sitokinler; eozinofil farklılaşması ve yaşamı için gerekli olan IL-5, Th2 hücre farklılaşması için önemli olan IL-4 ve Ig E yapımı için gerekli olan IL- 13'tür [36]. IFN-γ en önemli makrofaj aktive edici faktör olup aktive makrofajların tarafından IL-12 salınımını sağlar. 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 [30]. 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 [30]. 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 [36].

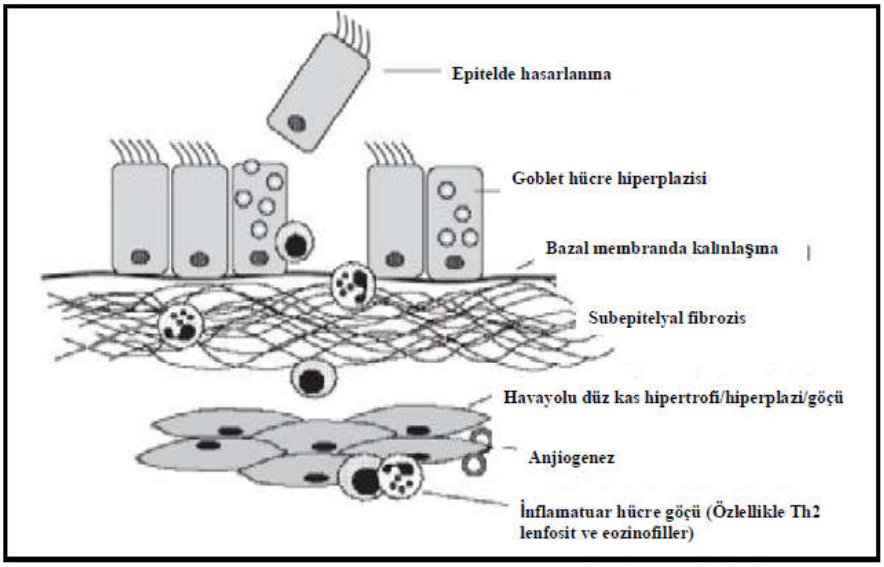
-Histamin: Histamin mast hücrelerinden salınır. Bronkokonstrüksiyona ve enflamatuvar yanıt oluşumuna katkıda bulunur.

-Nitrik oksit: Hava yolu epitel hücrelerindeki nitrik oksit sentazın aktivasyonu ile oluşan potent bir vazodilatördür [39].

-Prostaglandin D2: Başlıca mast hücrelerinden köken alan bir bronkokonstrüktördür ve hava yoluna Th2 hücre göçünde rol oynar.

2.3.3. Hava yollarının yapısal değişiklikleri ve yeniden yapılanma (Remodeling)

Astımda havayollarında kronik enflamasyon nedeni ile hasar görmüş epitelde bir tamir süreci başlamaktadır. Hava yolu 'remodeling'i astımlı hastaların hava yolundaki kronik, muhtemelen geri dönüşümsüz olan bu değişikliklerin genel adıdır. Bu değişiklikler düz kas hipertrofisi, anjiogenezis, artmış vaskülarite, goblet hücre hiperplazisi, kronik enflamatuvar hücre infiltrasyonu, kollajen depolanması, bazal membran kalınlaşması ve hava yolu duvar elastisitesinin azalmasıdır (Şekil 5) [40].



Şekil 5. Kronik astımda hava yolunda yeniden yapılanma (remodeling)

a. Epitel hasarlanması ve tamiri

Epitel, organizmayı dış hasarlardan koruyan önemli bir bariyerdir. Epitel hücrelerinden salınan birçok enflamatuvar mediyatör mevcuttur. Astımlı hastalarda epitel hasarlanması çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve mediyatörlerin etkisi ile gerçekleşir. Yeniden yapılanmaya direk etkisi olan faktörler arasında; transforming büyüme faktörü (TGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, basit fibroblast büyüme faktörü, endotelin 1 ve heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü sayılabilir. Bu faktörlerin fibroblast proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks oluşumunu etkileyerek hava yolundaki yeniden yapılanmaya katkıda bulundukları bilinmektedir [40].

b. Subepitelyal fibrozis

Astımın karakteristik bir özelliği de histolojik olarak bazal membran kalınlaşmasıdır. Epitel bazal membranı, bazal lamina ve lamina retikularis olmak üzere iki tabakadan oluşur. Elektron mikroskopi ile hava yollarında görülen bazal membran kalınlaşması daha çok lamina retükularisin hemen altındaki alanın kalınlaşmasından kaynaklanmaktadır. Subepitelyal mesafedeki kalınlaşma, kollajen I, III, V ve ekstrasellüler matriks (Fibronektin, laminin, tenaskin) birikimi ile oluşmaktadır [41]. Epitel hücreleri, makrofajlar, eozinofiller, lenfositler ve fibroblastlar tarafından sentezlenen TGF-β**,** ekstrasellüler matriks oluşumunu stimule eder. Bu sitokinin ekspresyonu subepitelyal fibrozisin derecesi ile direk olarak ilişkili bulunmuştur [42].

c. Goblet hücre hiperplazisi

Havayolu yeniden yapılanmasının bir bulgusu da hava yolu epitelindeki goblet hücresi sayısında ve submukozal bez boyutundaki artışa bağlı olarak aşırı mukus yapımıdır. IL-9 ve IL-13 mukus yapımını indükleyebilir. Mukus aşırı yapımı hava yolu obstruksiyonuna neden olur [43].

d. Hava yolu düz kas kalınlığının artması

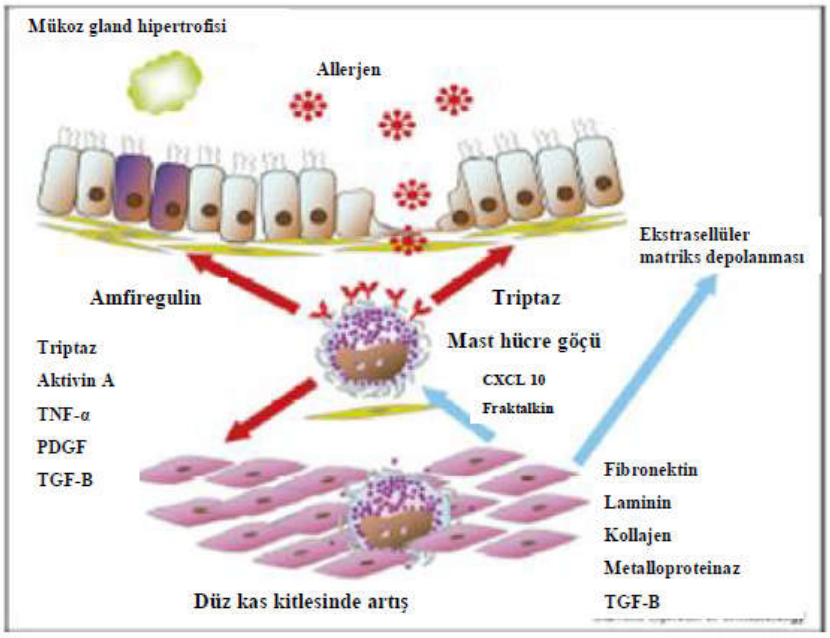
Hava yolu düz kas kitlesinde hem hipertrofi hem de hiperplazi yeniden yapılanmanın en önemli özelliğidir. Yapılan bir çalışmada astımlı hastaların düz kas hiperplazisi sadece santral havayollarında, hipertrofi ise bronşiyoller dahil tüm hava yolunda mevcut olduğunu gösterilmiştir [44]. Düz kas hücrelerinin hava yolundaki yeniden yapılanmayı çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri veya matriks proteinleri salgılayarak ve adezyon molekülleri eksprese ederek gerçekleştirmektedir.

e. Enflamatuvar hücre infiltrasyonu

Hava yolu düz kas hücreleri değişik sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri salgılayarak enflamatuvar hücreleri uyarır, dolayısı ile hava yolu enflamasyonu ve yeniden yapılanmasında rol oynarlar. Bu hücrelerin eotaksin, IL-8, monosit kemotaktik faktör 1-3 ve GM-CSF salgıladıkları ve eozinofil salınımı ve ömrünün uzamasında etkili oldukları bilinmektedir [40].

f. Mast hücre infiltrasyonu

Mast hücrelerinin, geç faz inflamasyon oluşumunda ve hava yollarındaki yeniden yapılanmada önemli rolleri vardır [45]. Mast hücre degranülasyonu ve aktivasyonu; triptaz, sisteinil lökotrienler ve PGD2 gibi düz kas remodelingi oluşmasında etkin olabilecek çeşitli mediyatörlerin salınımına yol açar. Degranüle olan triptaz, fibroblast ve miyositlerin proliferasyonuna ve tip I kollajen oluşumuna neden olur [40, 46]. Hava yolundaki mast hücre miktarındaki artış, bronşiyal hiperreaktivite ve astımın ağırlığı ile ilgili en önemli faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir [45]. Mast hücrelerinin hava yolu yeniden yapılanmadaki rolü Şekil 6'da şematik olarak görülmektedir.



Şekil 6. Mast hücre aracılı yeniden yapılanmanın şematik görüntüsü

g. Bronşiyal neovaskülarizasyon

Anjiogenez ve mikrovasküler düzeyde yeniden yapılanma birçok faktörün etkisi ile oluşur ve artmış vaskülarite başta vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi bir takım proanjiojenik moleküllerin etkisi ile gelişebilir [40].

2.3.4 Hava yolu aşırı duyarlılığı

Normal bir kişide zararsız olan uyarı ile astımlı bir hastada hava yolunda daralma görülmesi "hava yolu aşırı duyarlılığı" olarak tanımlanır ve astımdaki karakteristik, fonksiyonel anomaliyi gösterir. Bu hava yolu daralması değişken hava akımı kısıtlılığına ve aralıklı semptomlara neden olur. Hava yolu aşırı duyarlılığı, hem inflamasyona hem de hava yolundaki tamire bağlı olarak gelişir ve tedavi ile kısmen geri dönüşümlüdür**.** Mekanizması tam olarak bilinmemektedir [47].

2.4. Astım tanısı

Astım tanısı için genellikle anamnez, fizik muayene ve spirometrik testler yeterli olmaktadır. Tanı çoğu zaman tekrarlayan solunum sıkıntısı, öksürük atakları ve hışıltı yakınmalarının varlığında konur. Semptomların değişkenliği nedeni ile astımlı hastanın akciğer dinleme bulguları normal olabilir. En sık saptanan muayene bulgusu akciğer oskültasyonunda sibilan ronküs duyulmasıdır. Solunum fonksiyon testinde normal erişkinlerde 1.saniyedeki zorlu ekspiratuvar volümün (FEV1) zorlu vital kapasiyete (FVC) oranı %80'den, çocuklarda ise

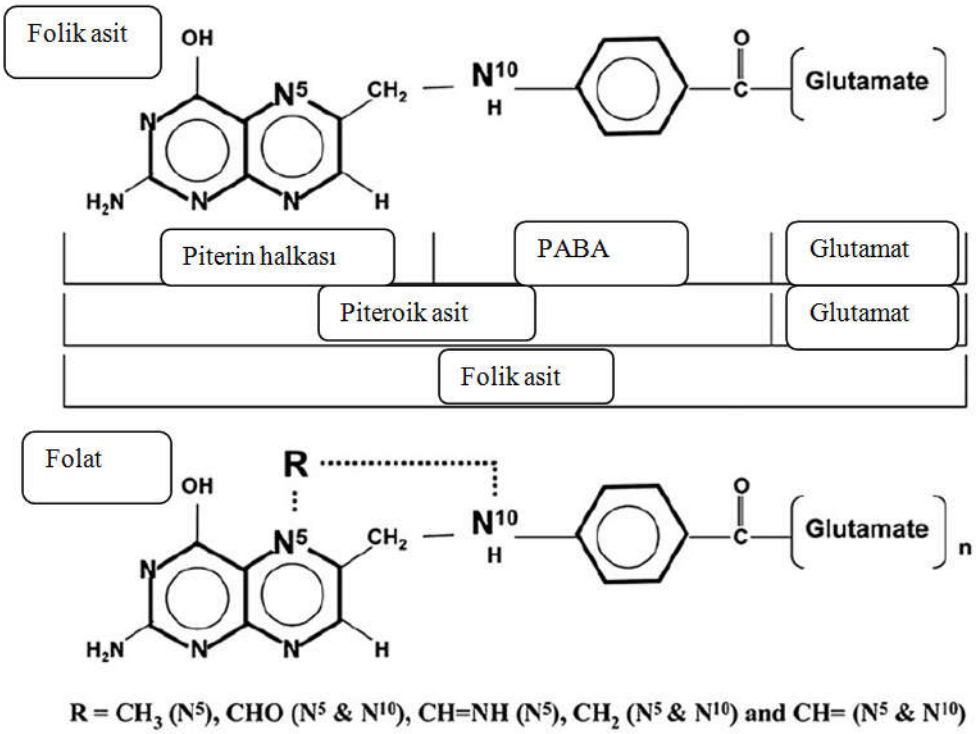
%90'dan yüksek olmalıdır. Bu değerlerin altındaki sonuçlar hava akımındaki azalmayı düşündürmektedir. FEV1'de spontan olarak veya bronkodilatör inhalasyonu sonrasında en azından %12'lik bir düzelme olması astım tanısını desteklemektedir [48]. Hafif-orta şiddette yakınmaları olup, fizik muayene bulguları ve solunum fonksiyon testleri normal olan olgularda astım tanısı konulmasında bronş provokasyon testlerinden yararlanılır [49].

2.5. Astım Tedavisi

Kronik astım tedavisinin amacı klinik kontrolü sağlamak ve devam ettirmektir. Tedavide kullanılan ilaçlar akut bronkospazmı düzelten rahatlatıcılar ve uzun dönemde enflamasyonu kontrol altına alıp astım atakları ve hastane yatışlarını azaltan kontrol edici ilaçlar olarak iki gruptur. İnhale kortikosteroidler en etkili kontrol edici ilaçlardır. Aynı zamanda astım tedavisinde en güçlü antiinflamatuvar etkiye sahiptir. İnhale steroidlerle tedavi, astım semptomlarını kontrol etmekte, alevlenme sıklığını azaltmakta ve yaşam kalitesini, solunum fonksiyonlarını, bronş aşırı duyarlılığını, egzersizin indüklediği bronkokonstruksiyonu düzeltmektedir. Vasküler geçirgenliği artırarak mukus yapımını uyaran ve bronkospazma neden olan sisteinil lökotrienlerini inhibe eden lökotrien antagonistleri sıklıkla tedavide kullanılır. Salmeterol ve formoterol uzun etkili beta 2 agonisttir ve güçlü bronkodilatasyon yaparlar. Uzun etkili beta 2 agonistin inhale kortikosteroid ile kullanımının, inhale kortikosteroid dozunun iki katına çıkarılmasından daha etkili olduğu gösterilmiştir [50]. Kromolin sodyum ve nedokromil sodyum, kronik astım tedavisinde benzer özellikleri olan yan etkileri oldukça az iki farklı antienflamatuvar ilaçtır. Mast hücresini stabilize eder ve hem erken hem de geç faz reaksiyonu önlerler. Teofilin, metilksantin grubundan hafif antiinflamatuvar etkisi olan bronkodilatatör bir ilaçtır. Çocuklar ve erişkinlerde yavaş salınımlı teofilin preparatları kontrol edici ilaç olarak kullanılabilmektedir. Oral steroidlerin kullanımı, uzun dönemde görülen yan etkilerinden dolayı sadece akut astım atakları ve ağır astımlılarda sınırlandırılmıştır. Anti IgE (omalizumab) sadece yüksek serum IgE düzeyi olan hastalar için kullanılabilen bir tedavi seçeneğidir. İnhale steroidler ile kontrol altına alınamayan ağır alerjik astımlı hastalarda kullanılabilir [51]. Astımda immunoterapi, astım semptomlarına primer bir allerjenin yol açtığı ve deri testi ile allerjen varlığı kanıtlanmış olgulara uygulanabilmektedir. Th1 immun yanıta dönüşüm allerjen immunoterapisinin en önemli amacıdır [52].

2.6. Folik Asit ve Astım

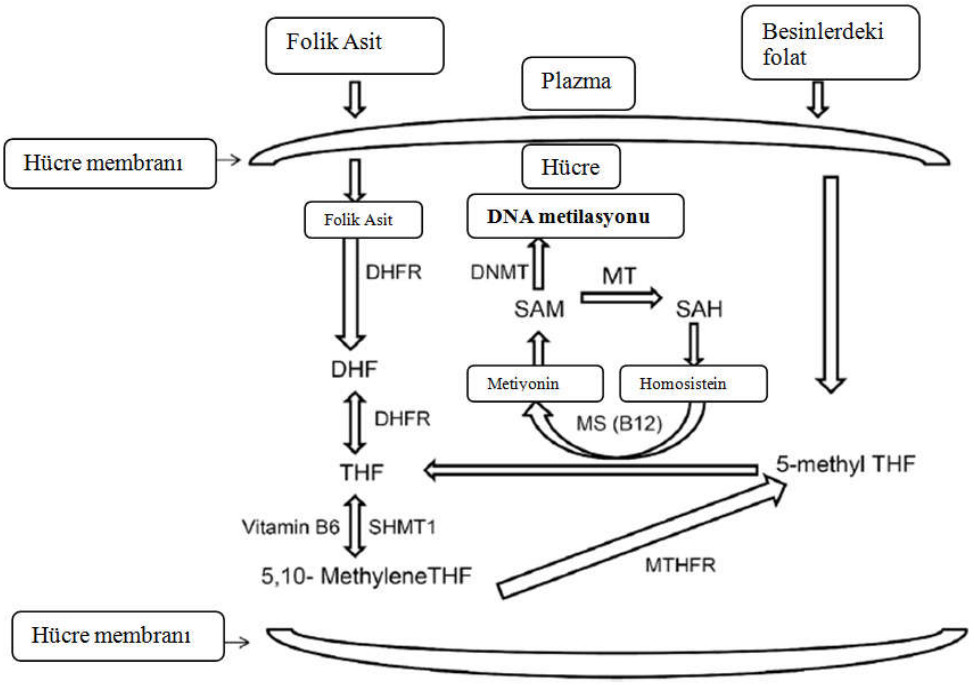
Folat yeşil yapraklı sebzelerde, narenciye meyvelerde, kuru bakliyatlarda ve tahıllar gibi birçok yiyecekte doğal olarak bulunan suda çözünen bir B vitaminidir. Folik asit, ticari vitaminler ve işlenmiş gıdalarda bulunan folatın monoglutamil ile okside edilmiş formudur [4]. Folik asit, pteroilmonoglutamik asittir; pteroik asit kısmı, birbirine metilen köprüsü ile bağlı bir pteridin halka sistemi ve p-aminobenzoik asitten (PABA) ibarettir (Şekil 7) [4].



Şekil 7. Folatın ve folik asitin kimyasal yapısı

Folat doğası gereği oldukça kararsız olup gıdalarda aktifliğini kaybeder ve düşük pH'da okside olur [1]. Folik asit doğal besinlerde ve in vivo ortamlarda çok az bulunan, ama buna karşılık en stabil form olduğu için ilaç veya gıda takviyesi olarak tercih edilen esas türevdir. Folatın biyoaktivitesi gıdanın hasatı, depolanması, işlemi ve hazırlanması esnasında yaklaşık %50-75 oranında kaybedilir. Folik asit ise folat ile kıyaslandığında aylar hatta yıllar boyunca aktifliğini korur [1]. Folik asit doğada bulunmaz. Folik asit ve monoglutamil folatlar başlıca jejenumdan enerji bağımlı transport mekanizması ile absorbe edilir [53]. Vücuda ilk girdiğinde dihidrofolata (DHF), DHF redüktaz (DHFR) ile tetrahidrofolata (THF) dönüşür. THF folat döngüsüne girmeden önce karaciğerde metil grubu eklenerek 5-metiltetrahidrofolata (5-MTHF) dönüşür [4]. Plazmada büyük kısmı metiltetrahidrofolat halinde ve albumine zayıf bağlanarak taşınır. 5-MTHF fizyolojik olarak folatın aktif

formudur. Folatı indirgenme kapasitesi sınırlı olduğundan, yüksek doz folik asit alımlarında dolaşımında indirgenmemiş folik asit görülebilir. Folat nükleotid biyosentezi, metiyonin döngüsü ve metilasyon reaksiyonlarına katılan tek karbon ünitelerinin transferinde rol oynar. Nükleotidlerin de nova sentezinde gerekli bir kofaktör olan folat DNA sentezinde, kararlılığında, bütünüğünde ve DNA onarımında önemlidir [5]. Metiyonin döngüsünde, metiyonin sentezlenmesi için, 5-MTHF, metiyonin sentetaz tarafından katalize edilen homosisteine metil grubu taşır [54]. Bu olay, birçok metilasyon reaksiyonunun başlıca metil grubu donörü olan S-adenozil metiyonini (SAM) sağlar [55]. Metil grubu aktarıldıktan sonra 5-MTHF önce THF'a ve ardından serin hidroksimetiltransferaz ile 5,10-metilentetrahidrofolata dönüşür [56]. Folat metabolizmasında anahtar substrat olan 5,10-metilentetrahidrofolat ise metiyonin yenilenmesine veya nükleotid biyosentezine yönlenebilir [57]. Folat ve folik asit metabolizmanın şematik görünümü Şekil 8'de görülmektedir [58].



Şekil 8. Folat ve folik asit metabolizmasının özet şeması

Folat, insan sağlığında ve hastalıklarında önemli rol oynar. Folat eksikliği gelişimsel gerilik, nöropsikiyatrik hastalıklar, kongenital hastalıklar, nörol tüp defektleri, kardiyovasküler hastalıklar ve anemi gelişimi ile bağlantılı bulunmuştur [1]. Ek olarak önemli epidemiyolojik kanıtlar, folat seviyelerinin akciğer, orafarenks, özefagus, mide, rektum, pankreas, serviks,

over, prostat ve meme gibi birçok malignite riski ile ters orantılı olduğunu belirtmektedir [59-61].

Nöral tüp defektleri (NTD) konsepsiyondan sonraki 21. ve 28. günler arasında beyin ve spinal kordda ortaya çıkan sık rastlanılan multifaktöriyel kompleks bir hastalıktır [62]. Coğrafik bölümlere ve etnik gruplara dayanılarak tüm dünya genelinde, NTD prevelansı her 1000 doğumda veya saptanan gebelikte bir ile on arasındadır [63]. Toplum kökenli çalışmalara dayanılarak, NTD'nin bir vitamin eksikliği olduğu gösterilmiştir ve yavrulardaki NTD riskinin eksojen perikonsepsiyonel folik asit alımı ile azaltılabileceği önerilmektedir [64]. Son on yılı kapsayan çalışmalarda, folik asit eksikliğinin NTD için bir risk faktörü olduğu söylenmektedir ancak NTD'nin etyolojisinin folat metillenme metabolizması ile de ilişkili olduğu öne sürülmektedir [65]. NTD'lerin riskinin folik asit alımı ile azaldığı randomize kontrollü çalışmalarda gösterildiğinden, pek çok sağlık organizasyonu kadınlara folattan zengin gıda alımı yanında günlük 0.4 mg sentetik folik asit alımını önermektedir [1].

Folik asit gibi besin takviyelerinin, insan genomu üzerine uzun sürebilecek olası etkileri olabilir. B6 vitamini, B12 vitamini ve folat gibi tek karbon metabolizması ile ilgili pekçok gıda takviyesi kullanımı histon modifikasyonunda ve DNA metillenmesinde değişikliklere yol açabilir [58]. Folik asit gibi gestasyon sırasında tek karbon metabolizmasının kofaktörü olan besinlerin fetal programlanmayı etkileyebildiği ve DNA metillenme kalıbında ve gen ifadesinde değişiklikler yapabildiği belirtilmektedir [6]. Astımın hem genetik hem de çevresel risk faktörleri sonucu geliştiği düşünüldüğünde çocukluk çağı astım gelişimi ve maternal folik asit süplementasyonu arasındaki nedensel ilişki oldukça dikkat çekmeye başlamıştır. Folik asitin epigenetik etkisi *agouti* farelerinde çalışılmıştır. Waterland ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, diyetle alınan folik asitin, anne *agouti* farelerdeki metilasyonda bir değişiklik göstermezken doğan yavrularda fenotipte ve metilasyonda etkilenme açıkça görülmüştür [66]. Hollingsworth ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, annenin prenatal dönemde metil donörü alımının yavru farelerde allerjik havayolu hastalığı için risk faktörü olduğunu ve bu etkinin epigenetik düzenleme ile ortaya çıktığını raporlamışlardır [23].

Gebelikte artmış folik asit kullanımının, çocuklarda solunumsal problemlere yol açabildiği epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir [67, 68]. Norveç'te Haberg ve arkadaşları, 2000-2005 yılları arasında 32,007 çocukta yaptıkları geniş çalışmada, gebelikte ilk trimesterda folik asit alan annelerden doğan çocukların 18 aya kadar takiplerinde hava yolu enfeksiyonu geçirme ve wheezing riskinde artış olduğunu raporlamıştır [68]. Baker ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada ise maternal folik asit kullanımı 1 yaşta wheezing ile ilişkili bulunurken, 1-8 yaş arasında astım semptomları, wheezing, alt solunum yolu enfeksiyonu, egzama ile

ilişkili bulunmamıştır [69]. Başka bir çalışmada ise, maternal folik asit alımının çocuklardaki atopi, astım, wheezing riskinde artış ile ilişkili olmadığı, farklı olarak maternal intrasellüler folik asit düzeyleri ile 6-7 yaş astım sıklığı arasında ters bir ilişki olduğu bildirilmiştir [70]. Gebelikte folik asit kullanımı ile astım arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını belirten çalışmalar da yayınlanmıştır [70-72]. Yapılan çalışmalara bakıldığında bu ilişki net değildir. Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda yüksek metil donörü içeren diyetle beslenen farelerde artmış allerjik hastalık gelişim riski gösterilmekle birlikte çalışmamızda farklı olarak anneye verilen folik asitin yavrularında allerjik hastalık gelişim yatkınlığını nasıl etkilediği ilk kez çalışılacaktır. Çalışmamızın ana hipotezi fare modelinde in utero metil donörü olan folik asit süplementasyonuyla artmış hava yolu duyarlılığının histolojik olarak ortaya konulmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 09.10.2013 tarih ve 80/2013 protokol numaralı karar ile onay almıştır.

3.1. Anne farelerin seçimi ve deney gruplarının oluşturulması

6-8 haftalık 18-20 gr ağırlığındaki ad libitum olarak beslenen BALB/c cinsi 12 adet dişi fare çalışmaya alındı. Her bir grupta üç adet dişi fare olacak şekilde hayvanlar dört gruba ayrıldı. Çalışma için kullanılan fareler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuarı'ndan temin edildi. Fareler klimalı odalarda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda önceden dezenfekte edilmiş plastik tabanlı, zemine talaş serili metal korumalı fare kafeslerinde 20-25 °C ısı, %50 nem standart besin ve su ile beslenerek muhafaza edildi. Gebelik için vajinal smearda östrus dönemi saptanan dişi fareler katıma bırakıldı. Katım günü gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi. Birinci gruptaki üç gebe fareye tüm gebelik boyunca, ikinci gruptaki üç gebe fareye gebeliğin ilk haftası boyunca folik asit, farelerin günlük aldığı su miktarı hesaplanarak içme sularına eklendi. Normal bir gebe kadının gebelikte 400 mikrogram folik asit kullanması önerilmektedir [1]. Normal bir gebe kadın, 60 kilogram kabul edilirse, gram başına ihtiyaç duyulan folik asit dozu 0,0066 mikrogramdır. Farelere uygulanan folik asit dozu 0,0066 mcg/gr olacak şekilde gebe kadının ihtiyacı olan miktara dayanarak hesaplanmıştır. Tüm yavruların hesaplanan miktardaki folik asiti, içme sularıyla standart olarak alması sağlandı. Üçüncü gruptaki ve dördüncü gruptaki üç gebe fareye folik asit süplementasyonu yapılmadı. Deney için her bir gruptaki annelerin 14 günlük yavru fareleri alınarak aşağıdaki gibi tekrar gruplandırıldı.

3.2. Çalışma Grupları

BALB/c cinsi yenidoğan fareler, antenatal dönemde folik asit uygulanmasına göre gruplanarak dört gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=7): Tüm gebelik boyunca folik asit uygulanan anne fareden doğan astım modeli oluşturulan yenidoğan grup

Grup 2 (n=9): Gebeliğin ilk bir haftasında folik asit uygulanan anne fareden doğan astım modeli oluşturulan yenidoğan grup

Grup 3 (n=8): Gebeliğinde folik asit uygulanmayan anne fareden doğan astım modeli oluşturulan yenidoğan grup

Grup 4 (n=9): Gebeliğinde folik asit uygulanmayan anne fareden doğan astım modeli uygulanmayıp intraperitoneal ve inhalasyon yoluyla salin uygulanan kontrol grubu
Gruplar tablo 1'de gösterilmiştir.

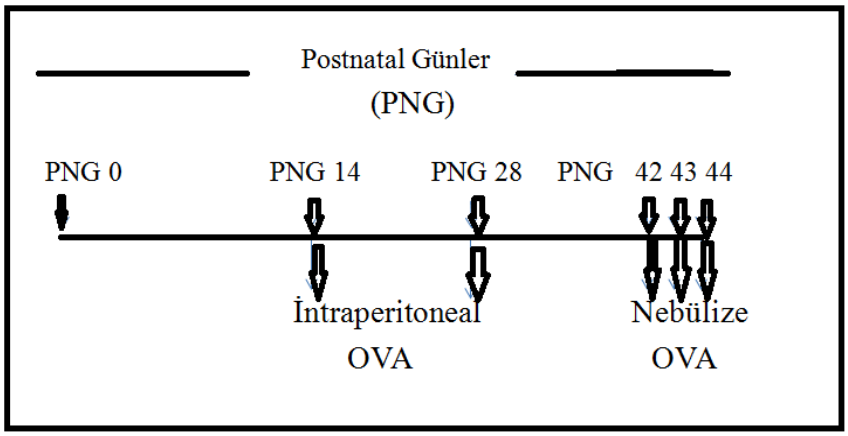
Tablo 1.Deney grupları

Gruplar	**Grup sayısı (n)**	**Antenatal durum(Folik asit kullanımı)**	**Postnatal durum**
Grup 1: Gebelik boyunca folik asit alan grup	7	Tüm gebelik boyunca	Neonatal astım modeli
Grup 2: Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup	9	Gebeliğin ilk bir haftası	Neonatal astım modeli
Grup 3: Gebelikte folik asit almayan grup	8	Yok	Neonatal astım modeli
Grup 4: Kontrol Grubu	9	Yok	İntraperitoneal ve inhalasyon salin uygulaması

3.3. Astım modelinin oluşturulması

In-Sik Shin ve arkadaşları tarafından tanımlanan neonatal astım modeli modifiye edilerek kullanıldı [73]. Gruplardaki fareler postnatal 14 günlüktü. Kontrol grubu (Grup 4) dışında diğer gruplardaki farelere, 10μg intraperitoneal tavuk yumurta ovalbumin (OVA; Grade V, Sigma, St Louis, MO, USA) 14 gün ara ile iki kez uygulanarak duyarlılaştırıldı. Kontrol grubundaki farelere aynı yol ve miktarda salin solüsyonu uygulandı. Duyarlılaştırılan farelere son immunizasyondan 14 gün sonra (postnatal 42. günde) başlamak üzere, günde 30 dakika süre ile üç gün boyunca steril salin içindeki %1'lik ovalbumin solüsyonundan oluşan aerol inhale ettirildi. İnhalasyon uygulamaları, jet nebülizatör ile bağlı 40x30x20 cm ebatlarındaki

cam odacığın içine fareler gruplar halinde koyularak tüm vücut inhalasyon sistemi ile yapıldı. Bu nebülizatör sistemi ile verilen aerosol ≤4µm çapında ≥%80 partikül ayrışmasına olanak sağladı. Partikül konsantrasyonu 10-20mg/m3 idi. Kontrol grubundaki farelere (Grup 4) aynı sistem ile salin inhalasyonu yapıldı. Şekil 1'de modifiye neonatal astım modeli oluşturma protokolü verilmiştir.



Şekil 9. Modifiye neonatal astım modeli oluşturma protokolü

3.4. Hayvan yaşamını sonlandırma zamanı ve yöntemi

Fareler son tedavinin uygulanmasından 24 saat sonra 35 mg/kg ketamin ve 5mg/kg ksilazinin intraperitoneal olarak verilmesi ile sakrifiye edildi.

3.5. Histolojik incelemeler

Tüm farelerin sol akciğer orta zonundan alınan doku örnekleri tedavi gruplarını bilmeyen iki histolog tarafından yapısal değişiklikler açısından incelendi.

3.5.1.Işık Mikroskobik Doku Takip Protokolü

%10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatiflerin uzaklaştırılması amacıyla bir gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika dört değişim aseton solüsyonlarından geçirildikten sonra iki değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60˚C'lik etüv içerisinde iki değişim parafin uygulanıp birer saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 2). Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik kesitler alındı.

Tablo 2. Işık Mikroskobik Doku Takip Protokolü

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	20 dk
	% 80 etil alkol	20 dk
	% 95 etil alkol	20 dk
	Aseton (4 değişim)	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dk
	Ksilol	30 dk
Emdirme %60 C etüv	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

3.5.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Metodu

Mikrotom aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60˚C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'ar dakika üç değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler on dakika akarsu altında yıkandı. On dakika hematoksilen ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için on dakika akarsuda yıkanan kesitler, iki dakika eozin boyası ile boyandı. Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim de tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3). Hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyanan akciğer doku örneklerinin genel histolojik özellikleri incelendi. Her deneğe ait preparatlardan beşer alanda epitel kalınlığı, subepiteliyal düz kas kalınlığı ölçüldü.

Tablo 3. Hematoksilen-Eozin boyama metodu

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60˚C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	(3 değişim)	20 dk
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	(3 değişim)	20 dk
Kapama	Entellan	

3.5.3.Periodik asid-schiff Boyaması (PAS)

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60˚C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki bir saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için iki değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 3-5 dakika periyodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 1-2 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 20-25 dakika schiff boyası ile boyandı. Boyamadan sonra 5 dakika akarsuda tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve iki seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 4). PAS ile boyanan kesitlerde goblet hücreleri sayıldı.

Tablo 4. PAS boyama metodu

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60˚C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	1 (Etüvde)	1 Saat
Deparafinizasyon	2-3 (Oda Isısında)	30 Dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Boyama	Periodik Asit	3-5 Dakika
Yıkama	Akarsu	1 Dakika
Boyama	Schiff	20-25 Dakika
Yıkama	Akar su	1-2 Dakika
Boyama	Hematoksilen	2 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Dehidratasyon	% 60–70–80–96-100'lük Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1–2–3	20'şer Dakika
Kapama	Entellan	

3.5.4.Toluidin Blue Boyası

Deparafinize edilen doku kesitleri 30 dk toludin blue boyasında bekletildi. Ardından ksilen serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobu ile mast hücre sayısı değerlendirildi.

3.5.5.Işık mikroskobik değerlendirme

Epitel ve subepitelyal düz kas tabakalarının değerlendirilmesi amacıyla, ölçümler her hava yolunun dört noktasından yapılmıştır. Her bölümün yaklaşık iki ya da üç hava yolu içerdiği göz önüne alındığında, her fare için yaklaşık 20 yada daha fazla hava yolu değerlendirildi. Fotomikrografikler Olympus DP70 modeli mikroskop (Olympus Optical, Tokyo, Japonya) üzerine uyarlanmış Olympus DP71 kamera (Japonya) tarafından alınmıştır. Ölçümler

Windows Sürümü 3.00 yazılımı UTHSCSA Görüntü Aracı ile yapılmıştır. Birbirini takip eden on bölüm toluidin mavisi ve diğer on bölüm PAS ile boyandı. Fotomikrograflar, toluidin mavisi ile boyanan her bölümün beş alanından rastgele alındı. Mast hücre sayımı için, 16,400 μm^2 bir alanı temsil eden standart bir şeffaf sayma çerçevesi elle kullanıldı ve her fotoğrafın sekiz alanı her bir fare için incelendi. PAS ile boyanmış goblet hücreleri, her farenin on bölümünde numaralandırıldı. Her bölümde, rastgele seçilmiş üç ila beş hava yolu fotoğraflandı. Tüm hava yollarının çevresi ölçüldü ve bu alanlardaki goblet hücre sayıları kaydedildi. Standardizasyon için 100 mikrometre uzunluktaki goblet hücre sayısı, toplam goblet hücre sayısının, hava yolu çevresinin toplam uzunluğuna bölünüp, sonucu yüz ile çarpılarak analiz edilmiştir.

3.5.6.İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohohistokimyasal inceleme için primer antikor olarak vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) (Bs-1313R, Bioss), matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) (bs-0397R, Bioss) TGF-β (SAB 21701) ve Caspase-3 (AB3623, Milipore) antikorları kullanıldı. 60ºC lik etüvde bir gece ve ksilolde üç değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra on dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Caspase-3 için yüksek ısıda beş dakika 10 mM sitrat bufferda tutulan dokular 20 dakika soğumaya bırakıldı. Diğer antikorlar için Tripsin (00-3008, Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA) solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitler yıkandı. Tüm antikorlar için doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla on dakika %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. Üç defa beşer dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler bir saat oda ısısında bloklama solüsyonu (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile inkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan primer antikorlar ile bir gece +4^oC'de bekletildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile üç defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 30 dakika muamele edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için diaminobenzidin (DAB) boyası (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işlemine tabi tutulup sonra entellan ile kapatıldı [74].

3.5.8.Semikantitatif Yöntem ile Skorlama

Her deneğe ait kesitlerden beşer alanda skorlama yapılıp ortalamaları alındı. Skorlamada 0: boyanma yok, 1: az boyanma, 2: orta boyanma, 3: şiddetli boyanma olarak değerlendirildi.

3.5.9.Verilerin istatistiksel analizi

Çalışma sürecinde elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama ve standart sapmalar belirlendi. Gruplar arası farklılık Kruskal Wallis, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Tüm sonuçlarda $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Her gruptan toplam 33 fare çalışmayı tamamladı. Gebelik boyunca folik asit alan grup (Grup 1), gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup (Grup 2), gebelikte folik asit almayan grup (Grup 3) ve kontrol gruplarının (Grup 4) epitel kalınlığı, subepitelyal düz kas kalınlığı, mast ve goblet hücre sayılarını içeren histolojik verileri Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Tüm grupların ışık mikroskopi histolojik parametreleri

	Epitel Kalınlığı (μm)*	Subepitel düz kas kalınlığı (μm)*	Goblet Hücre sayısı/100 (μm)*	Mast Hücre sayısı/16400 (μm²)*
Grup 1 Gebelik boyunca folik asit alan grup	50,9 (41,5-63)	10,6 (8-15,9)	4 (0-12)	0 (0-2)
Grup 2 Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup	31,3 (25,1-44,6)	9,7 (6,2-13,5)	4,5 (0,75-6,5)	1 (0-1,25)
Grup 3 Gebelikte folik asit almayan grup	26,5 (23,7-38,2)	6,8 (5,6-8,6)	3 (0-9)	0 (0-1,25)
Grup 4 Kontrol Grubu	20,2 (17,6-22,9)	4 (3,4-5)	0 (0-1)	0 (0-0,75)
***p* değeri [1]**				

Grup 1-2	<0,001**	0,017**	0,695	0,973
Grup 1-3	<0,001**	<0,001**	0,505	0,198
Grup 1-4	<0,001**	<0,001**	<0,001**	0,002**
Grup 2-3	0,015**	0,002**	0,937	0,139
Grup 2-4	<0,001**	<0,001**	<0,001**	<0,001**
Grup 3-4	<0,001**	<0,001**	<0,001**	0,01**

*Değerler ortanca (IQR 25-75%) olarak ifade edilmiştir. IQR: çeyrekler arası açıklık

[1] Mann Whitney U test, ** p<0,05

Gebelik boyunca folik asit alan grup (Grup 1) ve gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2), ışık mikroskopisi histolojik verileri karşılaştırıldığında; gebelik boyunca folik asit alan grupta (Grup 1) epitel kalınlığı (p: <0,001) ve subepitelyal düz kalınlığının (p: 0,017) anlamlı şekilde artmış olduğu gösterildi. Mast (p: 0,695) ve goblet hücre sayıları (p: 0,973) için iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 5).

Gebelik boyunca folik asit alan grup (Grup 1) ve gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) ışık mikroskopisi histolojik verileri karşılaştırıldığında; gebelik boyunca folik asit alan grupta (Grup 1) epitel kalınlığı (p: <0,001) ve subepitelyal düz kas kalınlıklarının (p: <0,001) anlamlı şekilde artmış olduğu gösterildi. Mast (p: 0,505) ve goblet hücre sayılarında (p: 0,198) istatiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 5).

Gebelik boyunca folik asit alan grup (Grup 1) ve kontrol grubunun (Grup 4) ışık mikroskopisi histolojik verileri karşılaştırıldığında; gebelik boyunca folik asit alan grupta (Grup 1) epitel kalınlıkları (p: <0,001), subepitelyal düz kas kalınlıkları (p: <0,001), mast hücre sayıları (p: <0,001) ve goblet hücre sayılarının (p: 0,002) anlamlı şekilde artmış olduğu gösterildi (Tablo 5).

Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup (Grup 2) ve gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) verileri karşılaştırıldığında; gebeliğin ilk haftası folik asit alan grupta (Grup 2) epitel kalınlıkları (p: 0,015) ve subepitelyal düz kas kalınlıklarının (p: 0,002) anlamlı şekilde artmış olduğu görüldü. Mast (p: 0,937) ve goblet hücre sayılarında (p: 0,139) istatiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 5).

Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup (Grup 2) ve kontrol grubunun (Grup 4) ışık mikroskopisi histolojik verileri karşılaştırıldığında; gebeliğin ilk haftası folik asit alan grupta (Grup 2) epitel kalınlıkları (p: <0,001), subepitelyal düz kas kalınlıkları (p: <0,001), mast hücre sayıları (p: <0,001) ve goblet hücre sayılarının (p: <0,001) anlamlı şekilde artmış olduğu gösterildi (Tablo 5).

Gebelikte folik asit almayan grup (Grup 3) ve kontrol grubunun (Grup 4) ışık mikroskopisi histolojik verileri karşılaştırıldığında; gebelikte folik asit almayan grupta (Grup 3) epitel kalınlıkları (p: <0,001), subepitelyal düz kas kalınlıkları (p: <0,001), mast hücre sayıları (p: <0,001) ve goblet hücre sayılarının (p: 0,01) anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar astım modelinin çalışma grubundaki farelerde başarı ile oluşturulduğunu göstermiştir (Tablo 5).

Gebelik boyunca folik asit alan grup (Grup 1), gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup (Grup 2), gebelikte folik asit almayan grup (Grup 3) ve kontrol gruplarının (Grup 4) immünohistokimyasal inceleme için VEGF, MMP-9, TGF-β, Caspase-3 antikorlarının semikantitatif yöntem ile skorlama sonuçları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Tüm grupların immünohistokimyasal parametreleri

	Caspase-3*	TGF-β*	VEGF*	MMP-9*
Grup 1 Gebelik boyunca folik asit alan grup	1 (0,75-2)	2 (1-2)	2 (1,75-2)	1,5 (1-2)
Grup 2 Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup	1 (0,5-2)	1 (1-2)	2 (1,25-2)	1 (1-1,25)
Grup 3 Gebelikte folik asit almayan grup	1 (1-2)	2 (1,25-2)	1 (1-1,5)	0,5 (0-1)
Grup 4 Kontrol Grubu	0 (0-1)	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)

***p* değeri[1]**				
1-2	0,89	0,41	0,71	0,08
1-3	0,6	0,74	0,025**	0,006**
1-4	0,009**	0,006**	0,001**	0,012**
2-3	0,48	0,21	0,035**	0,016**
2-4	0,008**	0,006**	<0,001**	0,022**
3-4	0,001**	0,002**	0,001**	0,95

*Değerler ortanca (IQR 25-75%) olarak ifade edilmiştir. IQR: çeyrekler arası açıklık
[1] Mann Whitney U test, ** $p<0,05$

Gebelik boyunca folik asit alan grup (Grup 1) ve gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) immünohistokimyasal verileri karşılaştırıldığında; caspase-3 (p: 0,89) ve TGF-β (p: 0,41), VEGF (p: 0,71) ve MMP-9 (p: 0,08) ile immünoreaktivite açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 6).

Gebelik boyunca folik asit alan grup (Grup 1) ile gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) akciğer dokuları immünohistokimyasal verileri karşılaştırıldığında caspase-3 (p: 0,6) ve TGF-β (p: 0,74) ile boyanma açısıdan iki grup arasında istatiksel olarak farklılık bulunmadı. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) akciğer dokuları, gebelikte folik asit almayan gruba (Grup 3) göre VEGF (p: 0,025) ve MMP-9 (p:0,006) ile anlamlı ölçüde daha fazla immünoreaktivite gösterdiği saptanmıştır (Tablo 6).

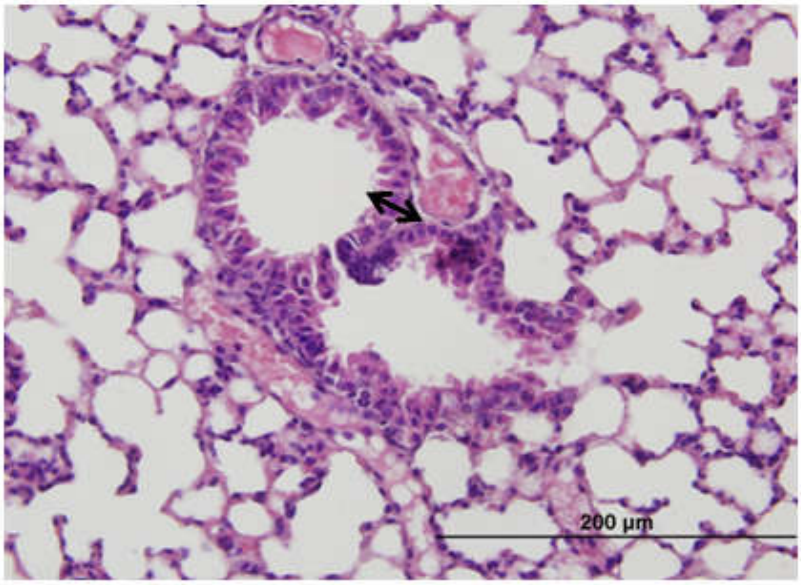
Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) akciğer dokuları, kontrol grubuna (Grup 4) göre caspase-3 (p:0,009), TGF-β (p:0,006), VEGF (p: 0,001) ve MMP-9 (p:0,012) ile istatiksel olarak anlamlı olarak daha fazla immünoreaktivite göstermiştir (Tablo 6).

Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) akciğer dokularında, gebelikte folik asit almayan gruba (Grup 3) göre caspase-3 (p:0,48) ve TGF-β (p:0,21) ile immünoreaktivite açısından farklılık bulunmamıştır. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) akciğer dokuları gebelikte folik asit almayan gruba (Grup 3) göre VEGF (p:0,035) ve MMP-9 (p:0,016) ile istatiksel olarak anlamlı daha fazla immünoreaktivite göstermiştir (Tablo 6).

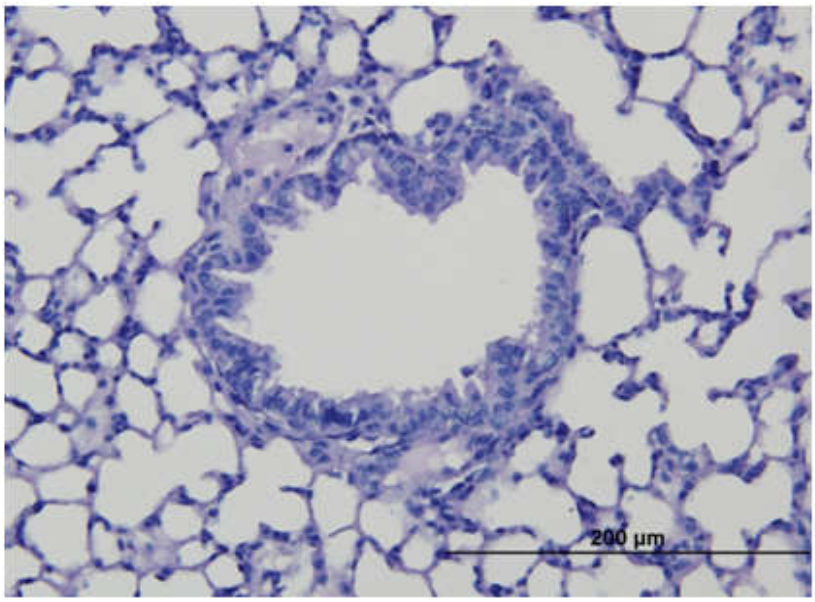
Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) akciğer dokuları kontrol grubuna (Grup 4) göre caspase-3 (p:0,008), TGF-β (p:0,006), VEGF (p:<0,001) ve MMP-9 (p: 0,022) ile istatiksel olarak anlamlı daha fazla immünoreaktivite göstermiştir (Tablo 6).

Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) akciğer dokuları kontrol grubuna (Grup 4) göre caspase-3 (p:0,001), TGF-β (p:0,002) ve VEGF (p:0,001) ile anlamlı ölçüde daha fazla immünoreaktivite göstermişken, MMP-9 (p:0,95) ile iki grubun arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır (Tablo 6).

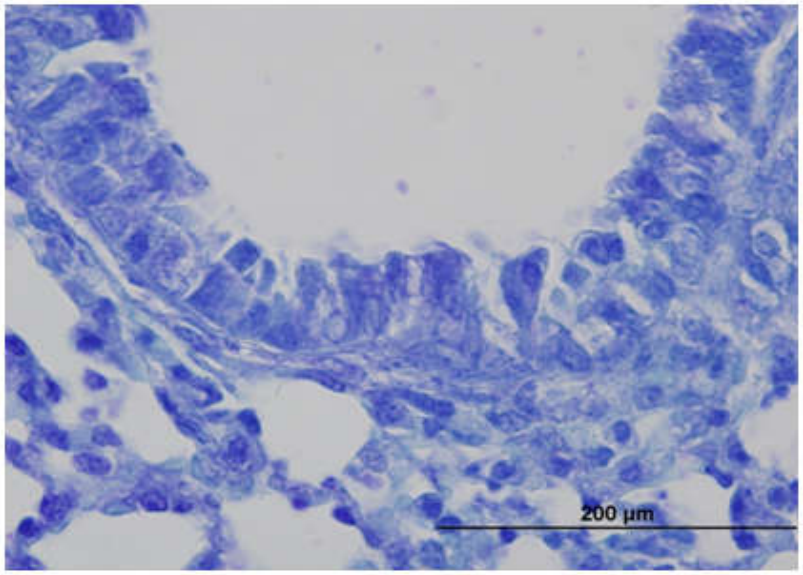
Tüm grupların ışık mikroskopik görünümleri aşağıda verilmiştir (Resim 1-15).
Işık mikroskopik çalışmalarda kontrol grubunda (Grup 4) histolojik bulgular normal saptanmıştır (Resim 1-3).



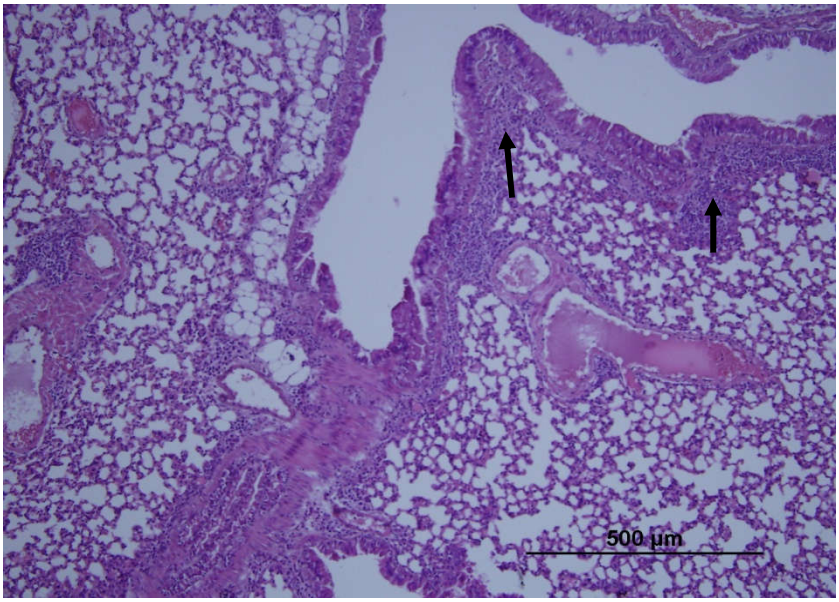
Resim 1. Kontrol grubunun (Grup 4) akciğer kesitleri (H&E boyama): Bronş, bronşiyol yapıları ve parankima olağan görünümdedir. Epitel yüksekliği normal, subepitelyal düz kas ince bir tabaka halinde gözlenmektedir (çift taraflı siyah ok)



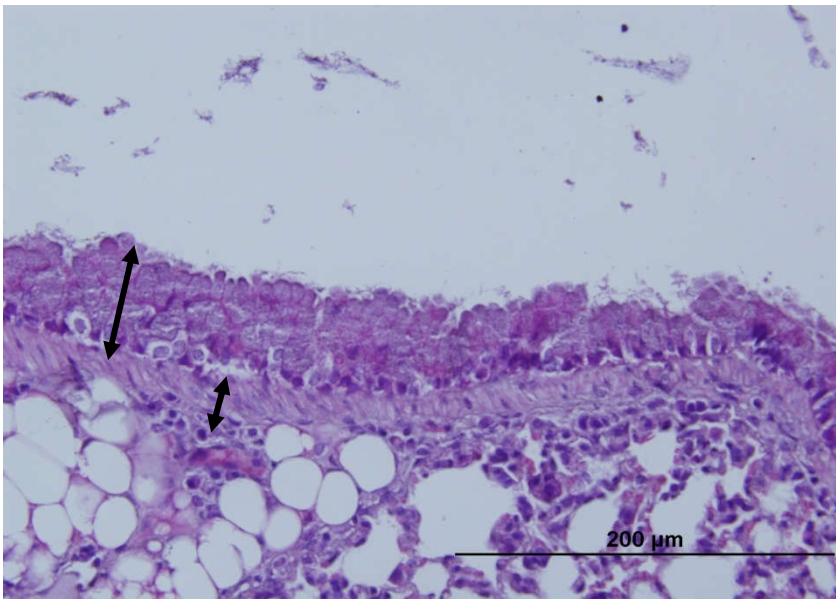
Resim 2. Kontrol grubunun (Grup 4) akciğer kesitleri (PAS boyama): Goblet hücre artışı gözlenmemektedir.



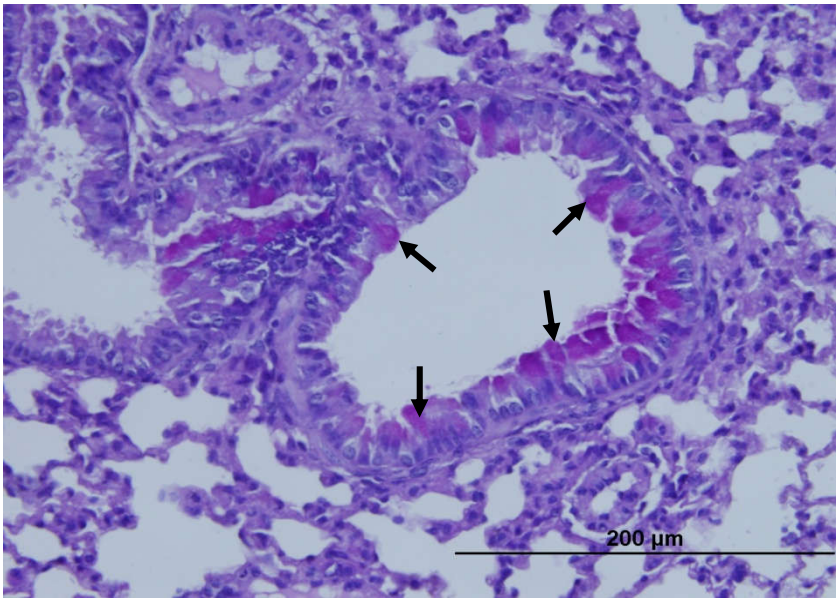
Resim 3. Kontrol grubunun (Grup 4) akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama): Akciğer parankiminde mast hücresi artışı izlenmemektedir.



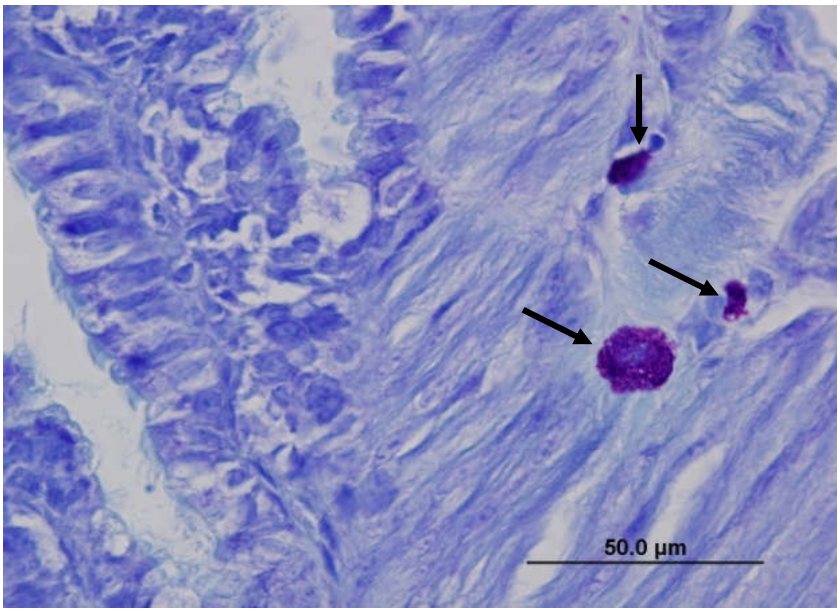
Resim 4. Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) akciğer kesitleri (H&E boyama): Peribronşiyoler alanlarda mononükleer infiltrasyon mevcuttur (siyah ok).



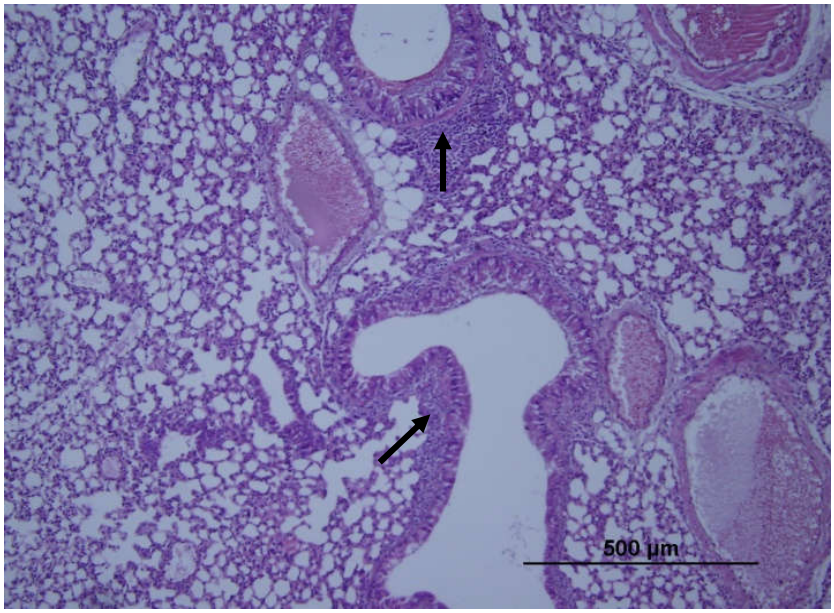
Resim 5. Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) akciğer kesitleri (H&E boyama): Epitel ve subepitelyal kalınlıklar (çift yönlü siyah ok) kontrol grubuna (Grup 4) göre artmış olarak gözlenmektedir.



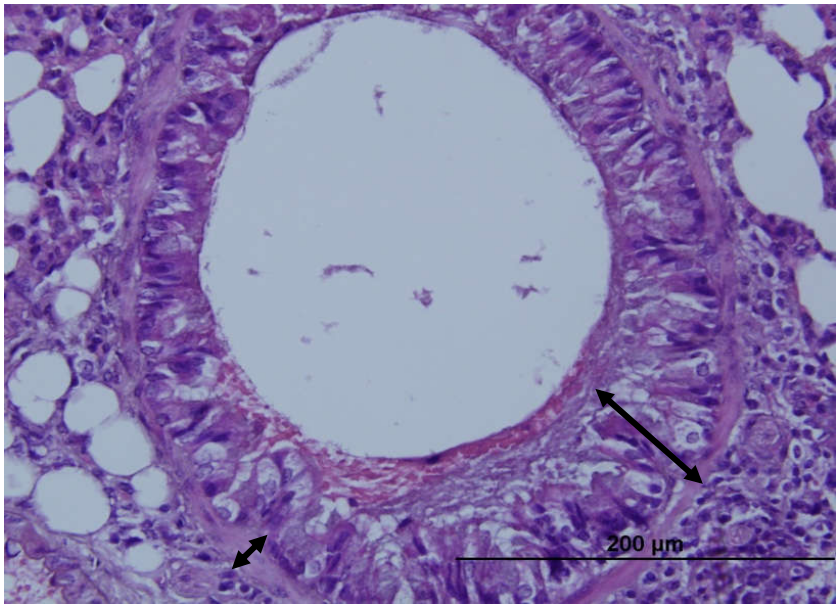
Resim 6. Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) akciğer kesitleri (PAS boyama): Epitelde artmış PAS pozitif goblet hücreleri ve PAS pozitif materyal gözlenmektedir (siyah ok).



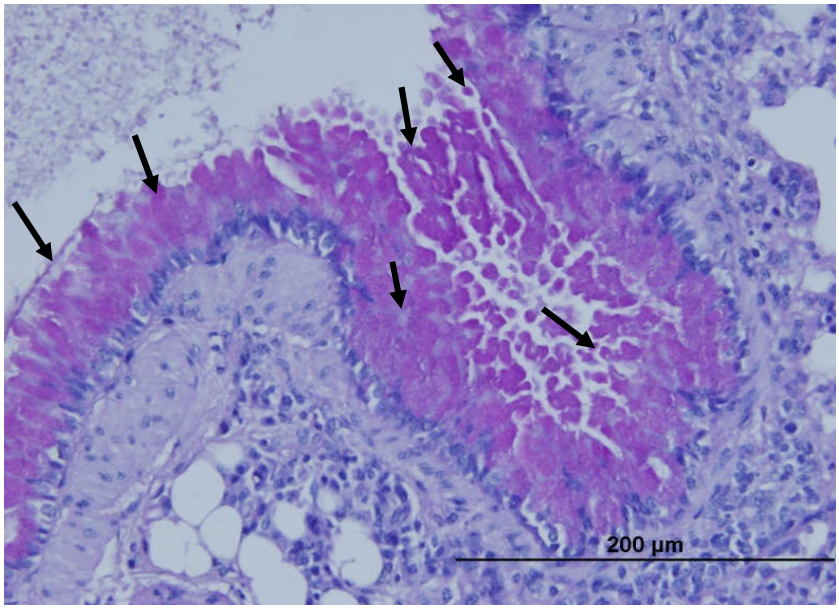
Resim 7. Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama): Akciğer parankiminde mast hücreleri (oklar) kontrol grubuna (Grup 4) göre artmış olarak izlenmektedir.



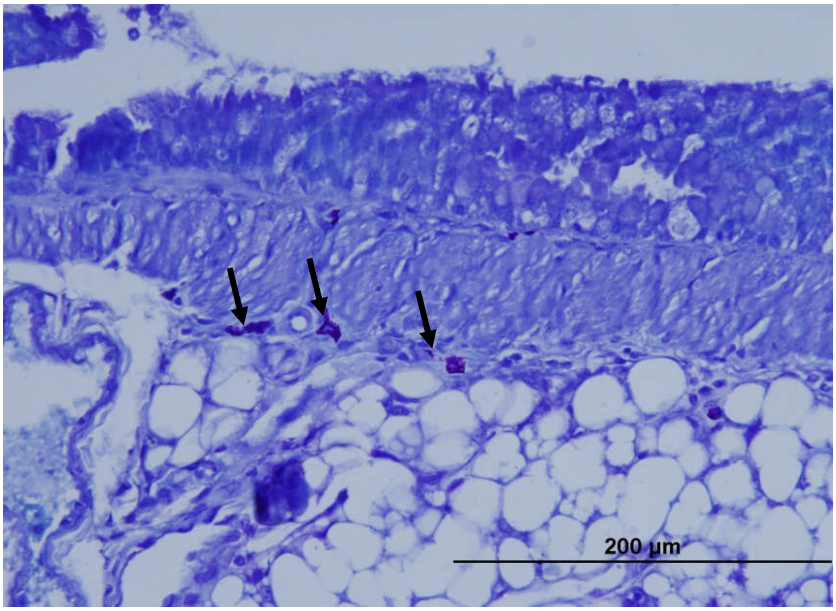
Resim 8. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) akciğer kesitleri (H&E boyama): Peribronşiyoler alanlarda mononükleer infiltrasyon gözlenmektedir (siyah ok).



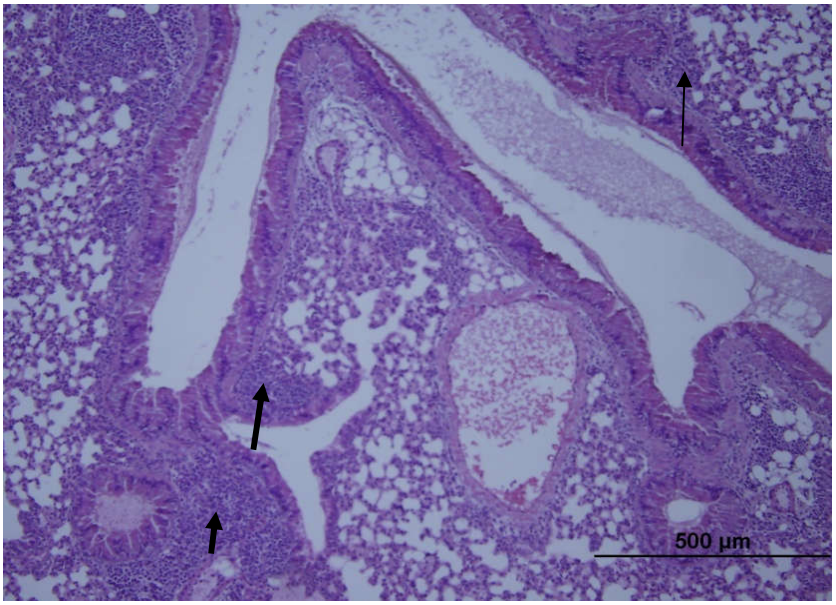
Resim 9. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) akciğer kesitleri (H&E boyama): Epitel ve subepitelyal kalınlıklarda (çift yönlü siyah ok) gebeliğinde folik asit almayan gruba (Grup 3) göre artmış görülmektedir.



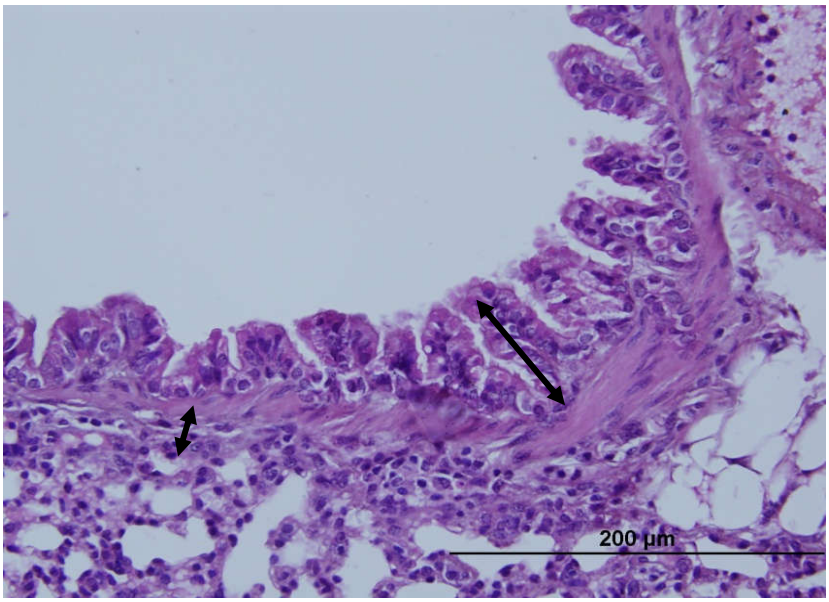
Resim 10. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) akciğer kesitleri (PAS boyama): Epitelde goblet hücrelerinde artış (siyah ok) izlenmektedir.



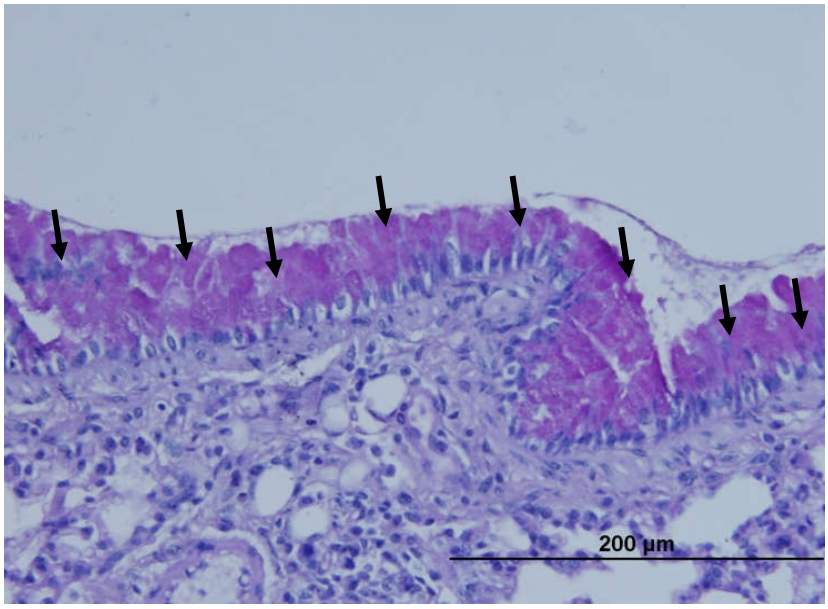
Resim 11. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama): Akciğer parankiminde mast hücreleri (oklar) artmış olarak izlenmektedir.



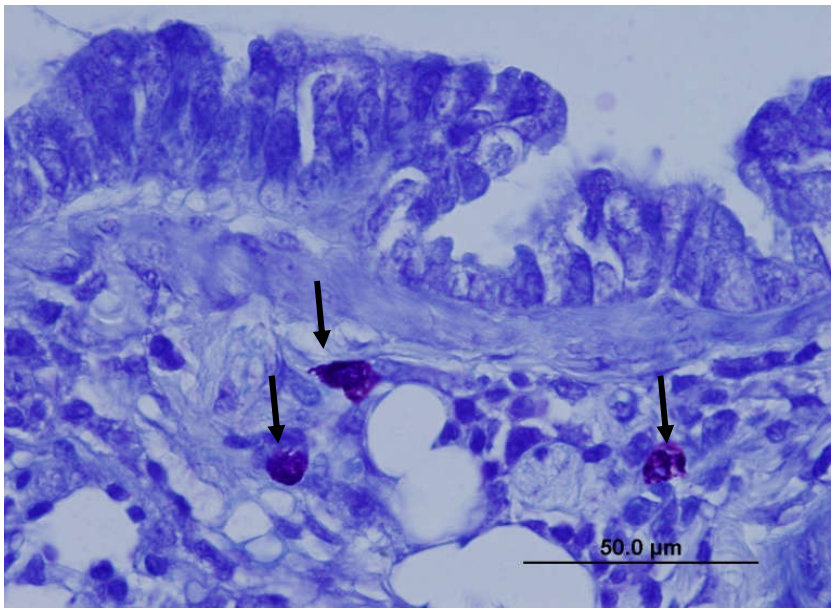
Resim 12. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) akciğer kesitleri (H&E boyama): Havayolunu çevreleyen epitel yer yer ayrılmalar nedeni ile düzensiz ve yüksek boylu olarak gözlenmekte, peribronşiyoler alanlarda yaygın mononükleer infiltrasyon izlenmektedir (siyah başlı ok).



Resim 13. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) akciğer kesitleri (H&E boyama): Epitel ve subepitelyal kalınlıklarda (çift yönlü sarı ok) diğer tüm gruplara göre artmış görülmektedir**.**

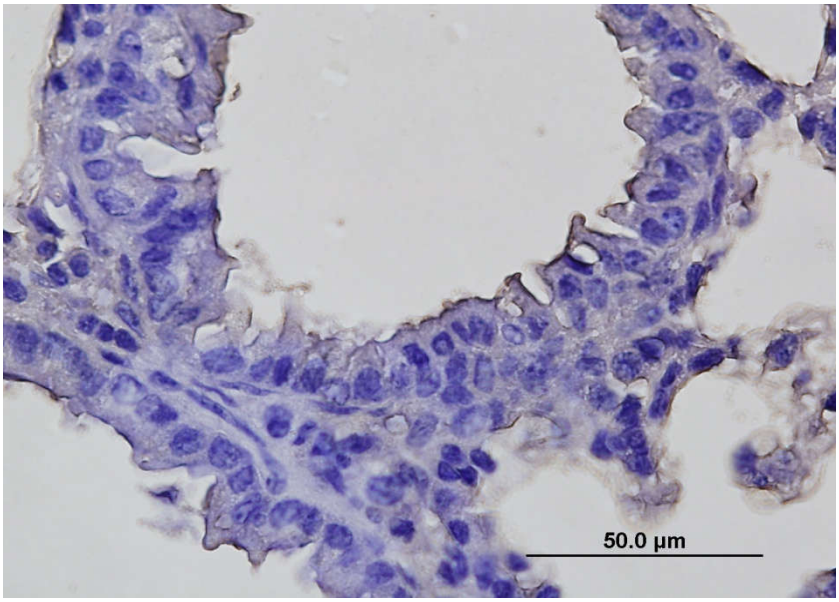


Resim 14. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) akciğer kesitleri (PAS boyama): Epitelde artmış goblet hücreleri (siyah ok) izlenmektedir. Gebeliğinde folik asit almayan grubla (Grup 3) goblet hücre sayısı açısından aralarında istatiksel farklılık bulunmamaktadır.

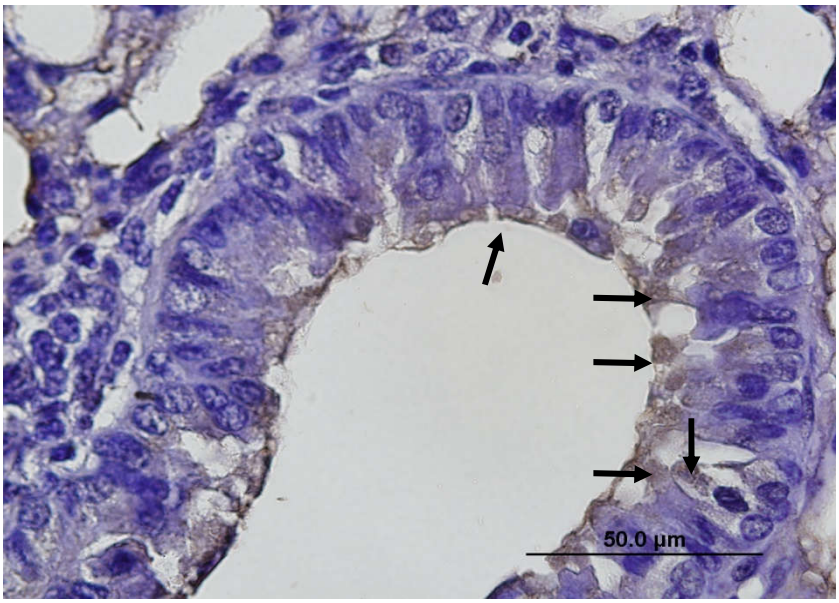


Resim 15. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) akciğer kesitleri (Toluidin blue boyama): Akciğer parankiminde mast hücreleri (oklar) artmış olarak izlenmektedir. Gebeliğinde folik asit almayan grubla (Grup 3) mast hücre sayısı açısından aralarında istatiksel farklılık bulunmamaktadır.

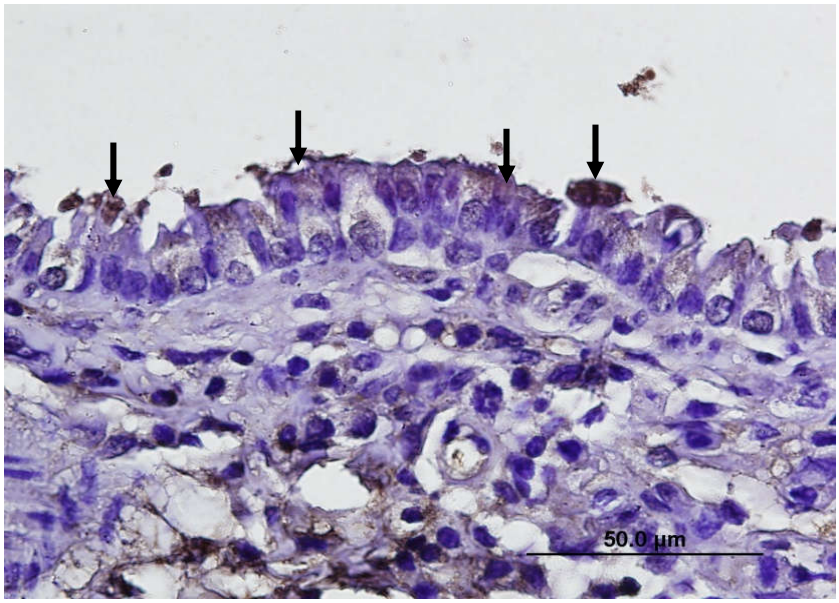
Tüm grupların immünohistokimyasal boyamalar sonucundaki mikroskopik görünümleri aşağıda verilmiştir (Resim 16-31).



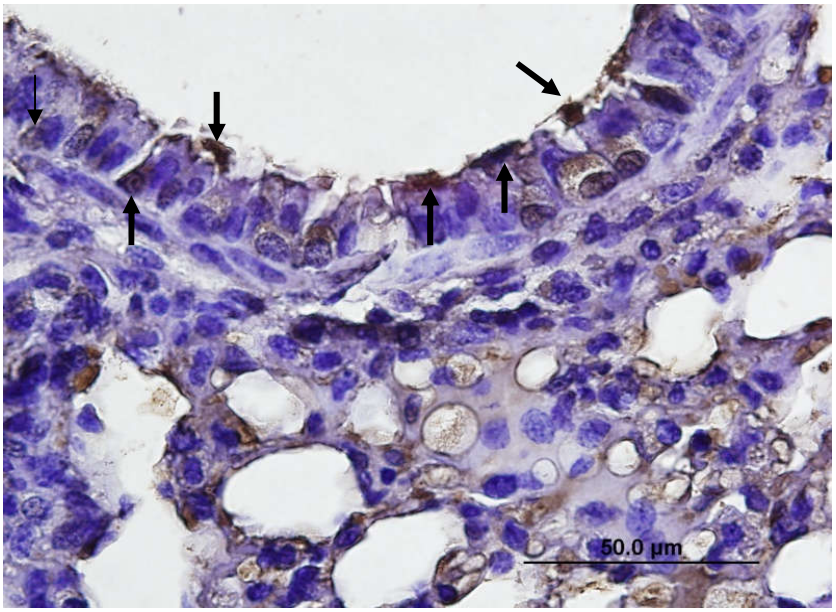
Resim 16. Kontrol grubunun (Grup 4) Caspase-3 ile boyalı akciğer kesitleri: Kontrol grubunun caspase-3 ile boyanmış resmi görülmektedir. Caspase-3 immünoreaktivitesinde artış gözlenmemiştir.



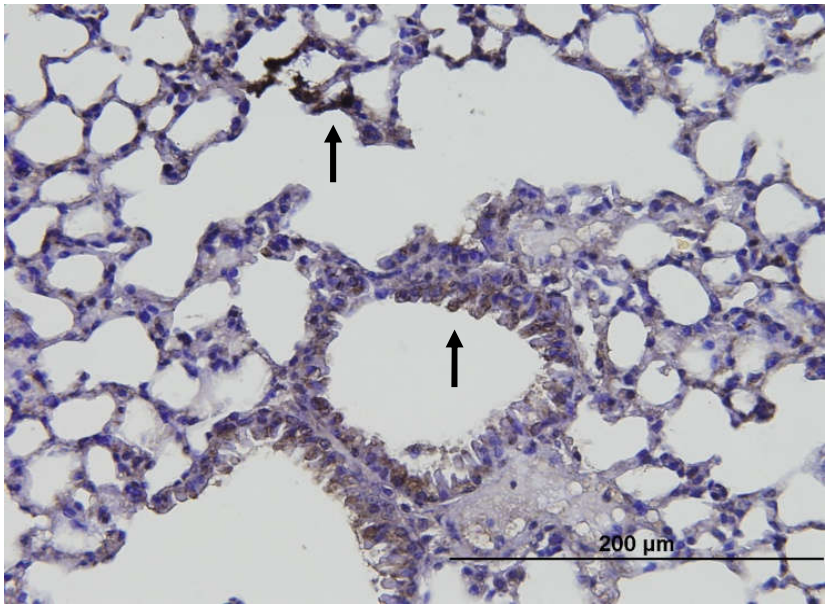
Resim 17. Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) caspase-3 ile boyalı akciğer kesitleri: Epiteliyal alanda kontrol grubuna (Grup 4) göre artmış caspase-3 immünoreaktivitesi gösteren hücreler (siyah ok) görülmektedir.



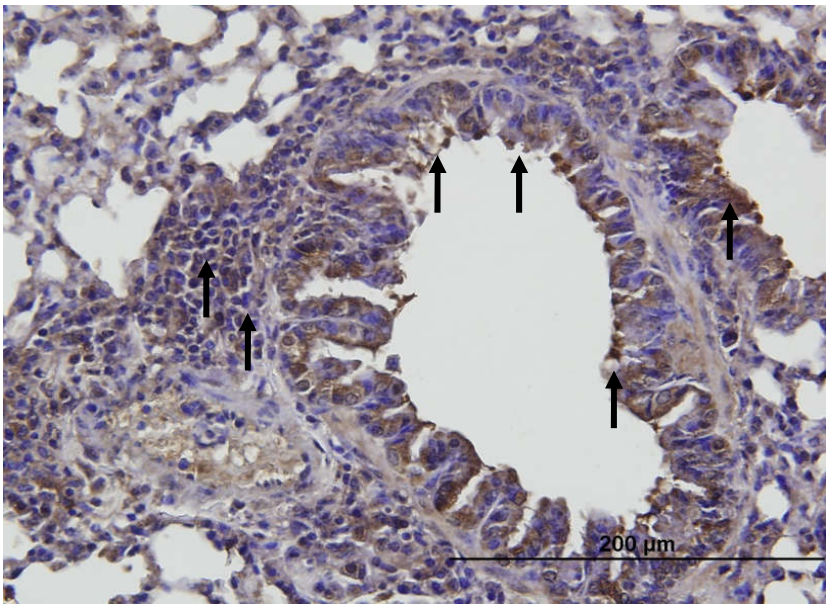
Resim 18. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) caspase-3 ile boyalı akciğer kesitleri: Bronş epiteli ve parankimada caspase-3 immünoreaktivitesi artmış hücreler (siyah ok) görülmektedir. Gebeliğinde folik asit almayan grupla (Grup 3) aralarında istatiksel farklılık bulunmamaktadır**.**



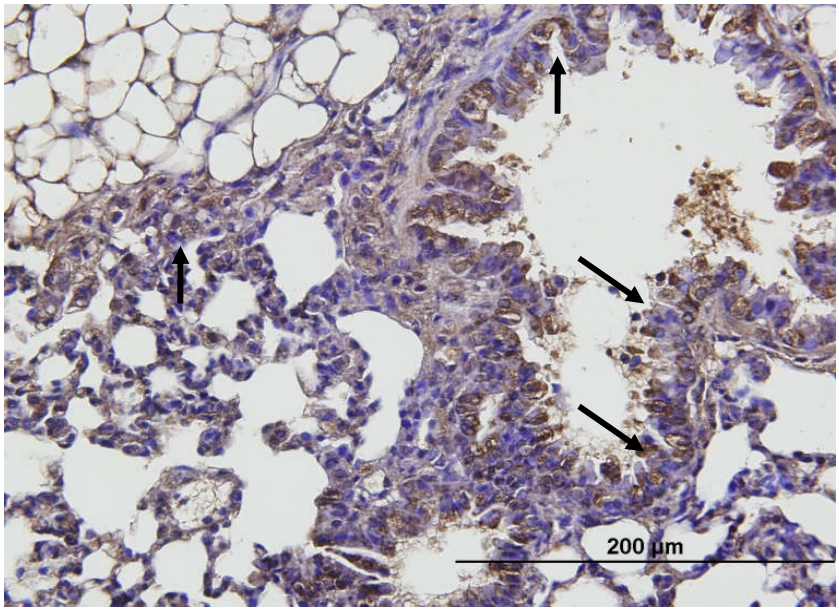
Resim 19. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) caspase-3 ile boyalı akciğer kesitleri: Bronş epiteli ve parankimada caspase-3 immünoreaktivitesi artmış hücreler (siyah ok) görülmektedir. Gebeliğinde folik asit almayan grupla (Grup 3) aralarında istatiksel farklılık bulunmamaktadır.



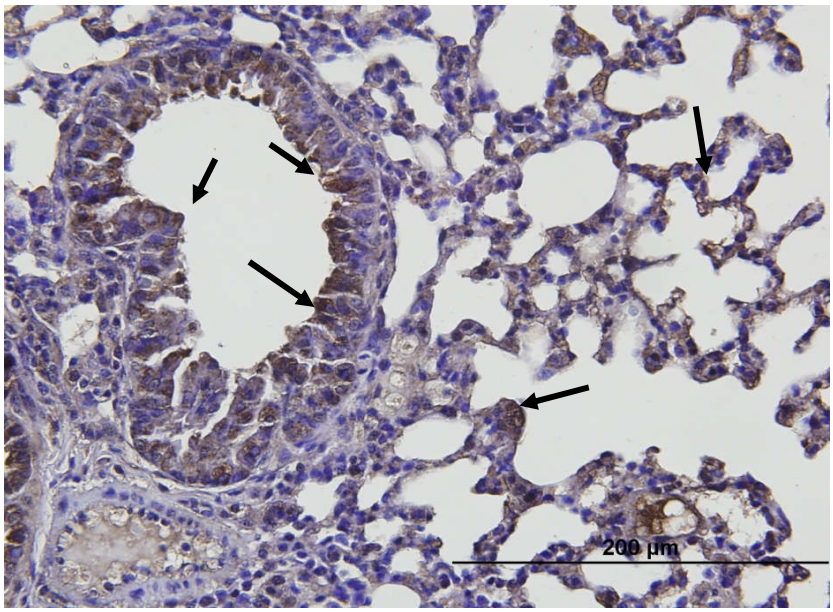
Resim 20. Kontrol grubunun (Grup 4) TGF-β ile boyalı akciğer kesitleri: Kontrol grubunun (Grup 4) akciğer parankiminin TGF-β ile boyanmış resmi görülmektedir.Hem parankimal hem de epiteliyal alanda az miktarda TGF-β immünoreaktivitesi gözlenmektedir.



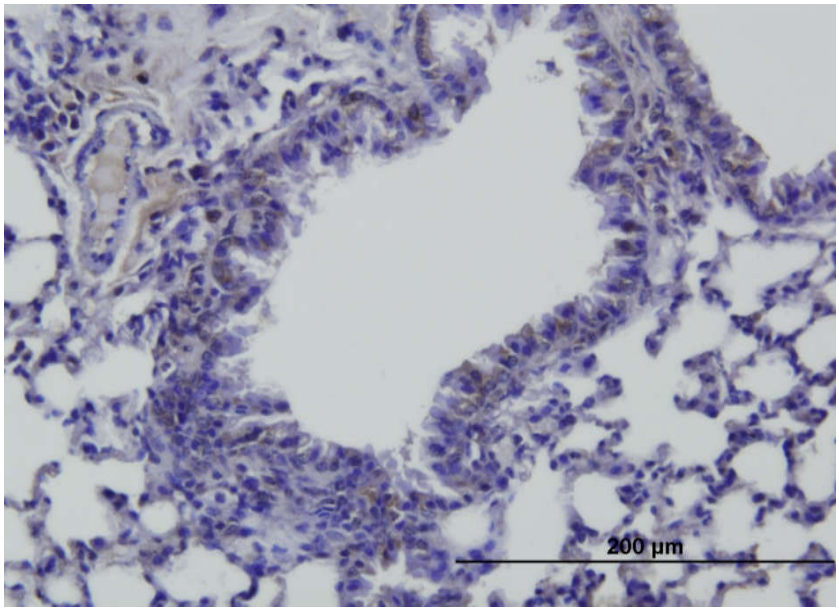
Resim 21. Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) TGF-β ile boyalı akciğer kesitleri: Hem parankimal hem de epiteliyal alanda kontrol grubuna (Grup 4) göre artmış TGF-β immünoreaktivitesi gözlenmektedir.



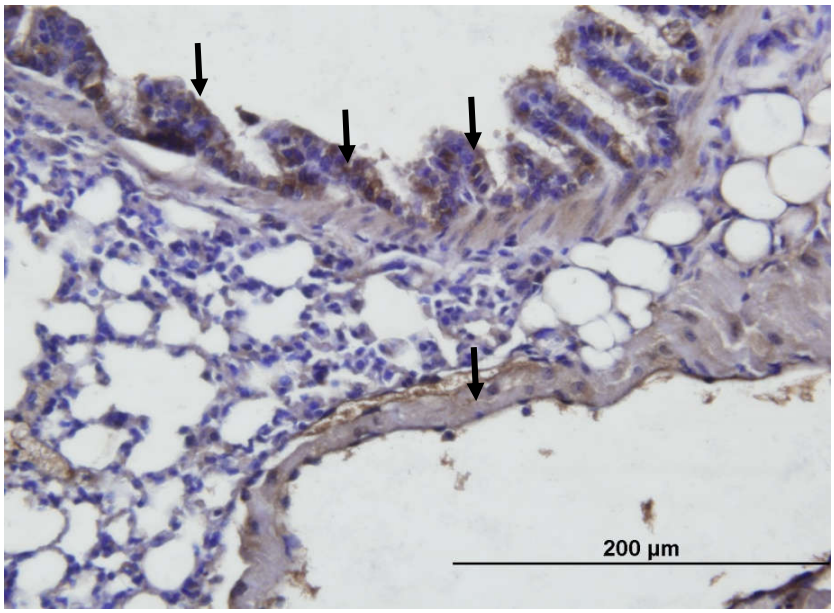
Resim 22. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) TGF-β ile boyalı akciğer kesitleri: Epitelde ve parankimada, gebeliğinde folik asit almayan grupla (Grup 3) TGF-β immünoreaktivitesi açısından istatiksel farklılık bulunmamaktadır.



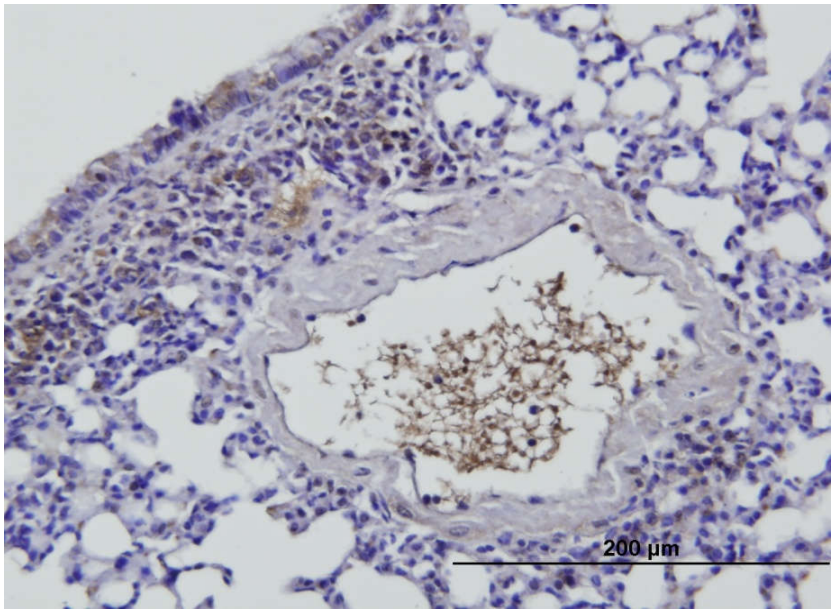
Resim 23. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) TGF-β ile boyalı akciğer kesitleri: Epitelde ve parankimada, gebeliğinde folik asit almayan grupla (Grup 3) TGF-β immünoreaktivitesi açısından istatiksel farklılık bulunmamaktadır.



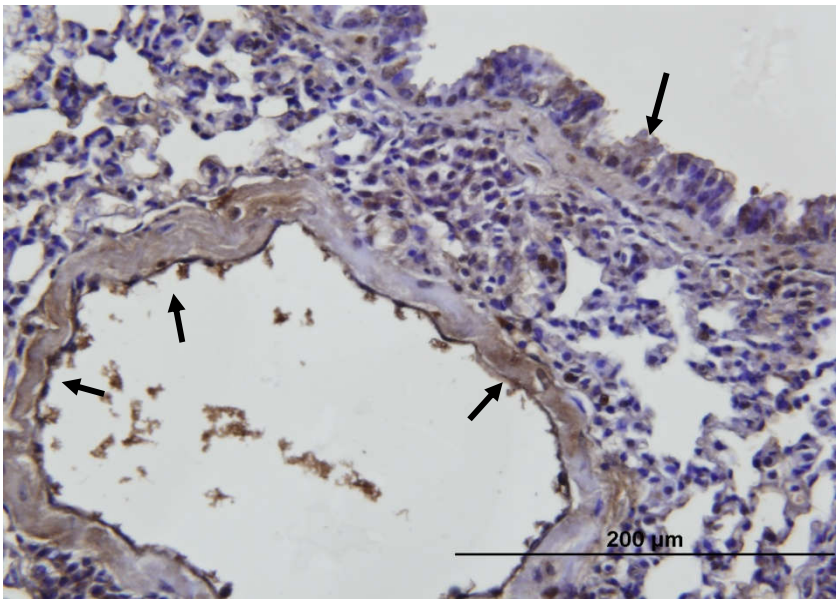
Resim 24. Kontrol grubunun (Grup 4) VEGF ile boyalı akciğer kesitleri: Kontrol grubunun (Grup 4) akciğer parankiminin VEGF ile boyanmış resmi görülmektedir. Zayıf VEGF immünoreaktivitesi gözlenmiştir.



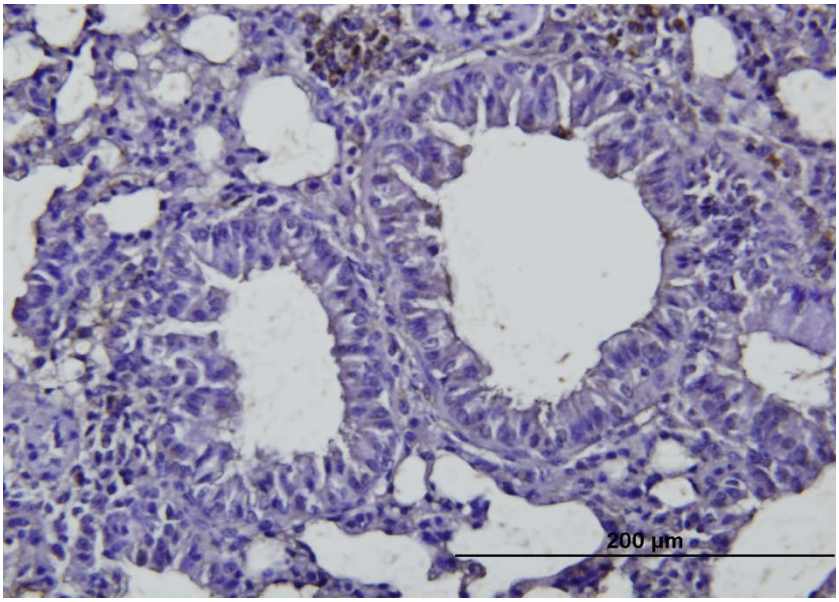
Resim 25. Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) VEGF ile boyalı akciğer kesitleri: Epitel ve damar duvarında VEGF ile pozitif boyanmalar (siyah ok) görülmektedir. Kontrol grubuna göre (Grup 4) VEGF ile artmış immünoreaktivite göstermektedir.



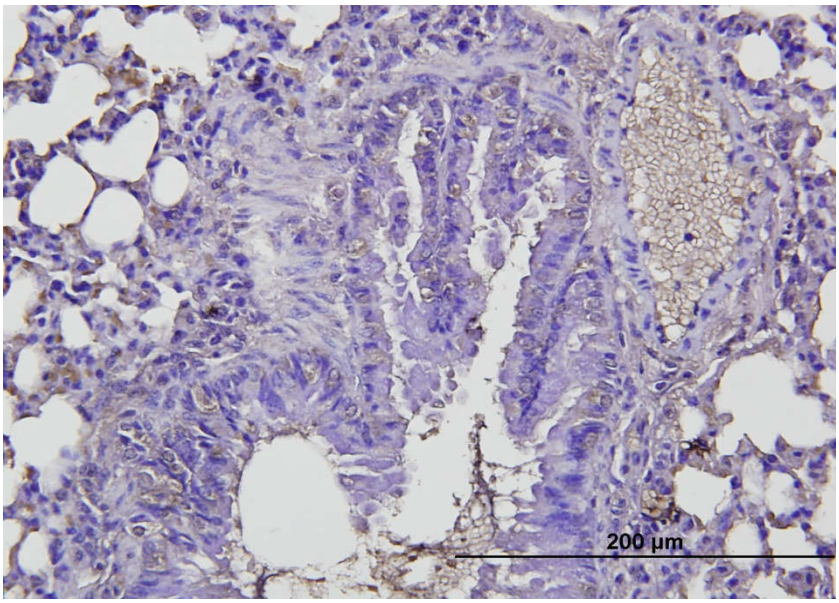
Resim 26. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) VEGF ile boyalı akciğer kesitleri: Akciğer parankimi VEGF ile gebeliğinde folik asit almayan gruba (Grup 3) göre artmış immünoreaktivite göstermektedir.



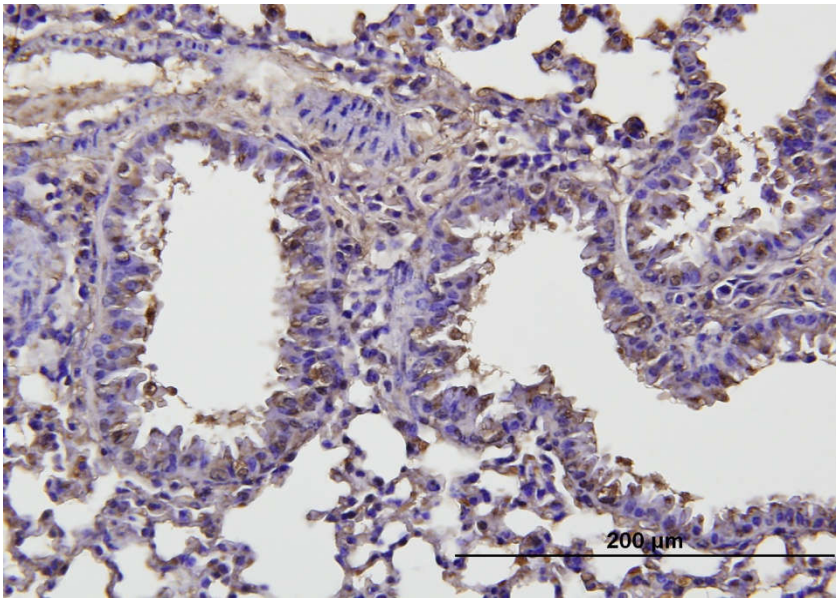
Resim 27. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) VEGF ile boyalı akciğer kesitleri: Akciğer parankimi, gebeliğinde folik asit almayan gruba (Grup 3) göre VEGF ile daha fazla immünoreaktivite göstermiştir. Damar duvarında VEGF ile pozitif boyanmalar (siyah ok) görülmektedir.



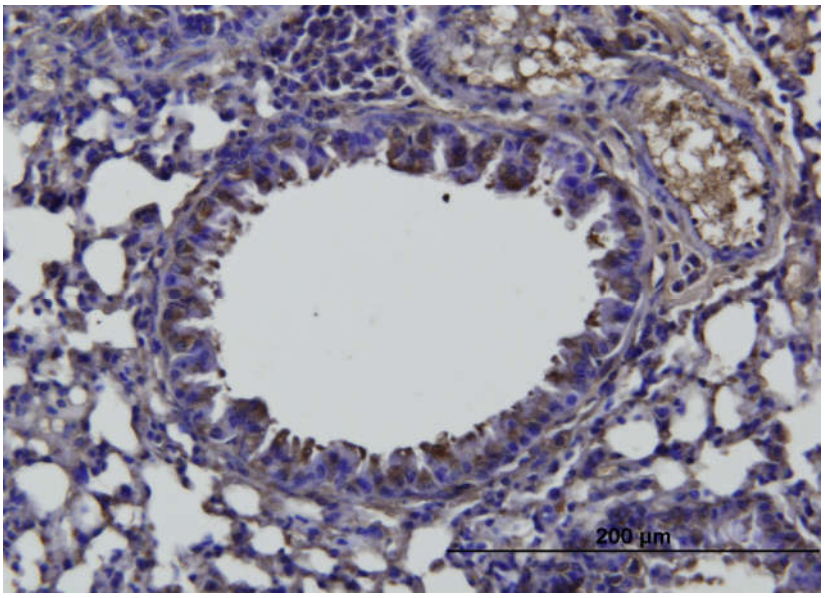
Resim 28. Kontrol grubunun (Grup 4) MMP-9 ile boyalı akciğer kesitleri: Kontrol grubunun akciğer parankiminin MMP-9 ile boyanmış resmi görülmektedir.



Resim 29. Gebelikte folik asit almayan grubun (Grup 3) MMP-9 ile boyalı akciğer kesitleri: Akciğer parankimini, kontrol grubuyla (Grup 4) MMP-9 ile immünoreaktivite açısından karşılaştırıldığında aralarında farklılık bulunmamaktadır.



Resim 30. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grubun (Grup 2) MMP-9 ile boyalı akciğer kesitleri: Akciğer parankimi gebelikte folik asit almayan gruba (Grup 3) göre MMP-9 ile daha fazla immünoreaktivite göstermiştir.



Resim 31. Gebelik boyunca folik asit alan grubun (Grup 1) MMP-9 ile boyalı akciğer kesitleri: Akciğer parankimi, gebelikte folik asit almayan gruba (Grup 3) göre MMP-9 ile daha fazla immünoreaktivite göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda gebelikte folik asit kullanımının, allerjik hava yolu hastalığının histolojik bulgularından olan epitel ve subepitelyal düz kas kalınlığını, VEGF ve MMP-9 ile pozitif immünoreaktiviteyi arttırdığını göstermiş bulunmaktayız.

Gebelikte ilk trimesterda major konjenital anomali riskini azaltmak için, özellikle konsepsiyondan bir veya üç ay öncesinden yeterli folat düzeyinin sağlanması önemlidir [75]. Nöral tüp defekt riskinin folik asit alımı ile azaldığı randomize kontrollü çalışmalarda gösterildiğinden, gebe kadınlara folattan zengin gıda alımı yanında günlük 0.4 mg sentetik folik asit alımı önerilmektedir [1]. Erken gebelik döneminde folat düzeyinin yeterli olması gerekliyken, folik asit takviyesinin insan sağlığı üzerine uzun süreli etkileri çok iyi anlaşılmamıştır. Son yıllarda, maternal folik asit alımı ile çocukluk çağı astım ve allerjik hastalık riski arasındaki ilişki, çelişkili sonuçlar içeren çok sayıda çalışmalar ile araştırılmıştır [76]. Çocuklardaki astım prevalansı, 1980-1995 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde %3.5' ten %7.5'e ve 1964-2004 yılları arasında İngiltere'de %4.1'den %28.4'e yükselmiştir [77]. Günümüzde halk sağlığı kuruluşları, beslenme, diyet, aşılama ve çevresel maruziyetler gibi allerji ile ilişkili durumları ve astım prevalansını azaltmaya odaklanmıştır [78, 79].

Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda yüksek metil donörü içeren diyetle beslenen farelerde artmış allerjik hastalık gelişim riski epigenetik mekanizmalar ile açıklanmaya çalışılmıştır. Araştırmamızda farklı olarak anneye verilen folik asitin, yavrularında allerjik hastalık gelişim yatkınlığını histopatolojik olarak nasıl etkilediği ilk kez çalışılmıştır. Gebelikte hem annenin allerjik fenotipi ve çevresel maruziyeti sonradan gelişebilecek allerjik hastalık riskini belirler. Hollingsworth ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, annenin prenatal dönemde metil donörü alımının yavru farelerde allerjik hava yolu hastalığı için risk faktörü olduğu ve bu etkinin epigenetik düzenleme ile ortaya çıktığı gösterilmiştir [23]. Laktasyonda veya erişkin dönemde, diyette metil dönor alımının farelerde allerjik hava yolu hastalığını önemli derecede etkilemediği gösterilmiştir. Bu bulgular duyarlanma penceresinin kritik döneminin gestasyon olduğunu desteklemektedir [23].

Astım hava yollarında enflamasyon, yeniden yapılanma ve solunum fonksiyonlarında düşüş ile karakterize kronik enflamatuvar bir hastalıktır [80]. Hava yolu enflamasyonu, patogenezdeki en önemli unsurlardan birisidir. Hava yollarında inflamasyonun önemli bir sonucu, hava yollarındaki yapısal hücrelerin ve ekstrasellüler matriks elemanlarının yapı, organizasyon ve fonksiyonlarının farklılaşması ile gerçekleşen ve remodeling diye

adlandırılan değişikliklerdir. Goblet hücre hiperplazisi, bazal membranda kalınlaşma, subepitelyal fibrozis, hava yolu düz kaslarında hipertrofi/hiperplazi ve anjiogenezis remodeling süresince oluşmaktadır [81].

İnsanlardaki remodeling sürecini taklit eden astım modelleri, hayvan çalışmalarında başarı ile oluşturulmuştur [82]. Çalışmamızda astım modeli olarak In-Sik Shin ve arkadaşları tarafından tanımlanan neonatal astım modelini modifiye ederek kullandık [73]. Çalışmamızda astımı destekleyen histolojik bulgulardan epitel kalınlığı, subepitelyal düz kas kalınlığı, goblet ve mast hücre sayısı parametrelerinde görülen belirgin değişiklikler, astımın neonatal hayvan modelinde başarı ile oluşturulduğunu desteklemiştir.

Hava yolu yeniden yapılanmasında hava yolu tonusunu belirleyen en önemli etkenlerden birisi de hava yolu düz kası olarak bilinmektedir. Solunum yolu düz kas kitlesinde artış astımda hava yolunu yeniden yapılanmasının en belirgin özelliğidir [40]. Goblet hücre hiperplazisi allerjen ile indüklenen astımın hava yolundaki erken bulgularından olup, uzun dönem 'remodeling'in önemli elemanlarından biridir ve deneysel fare modellerinde erken safhalarda rahatlıkla gözlemlenir [40]. Bizim çalışmamızda da, gebeliklerinde folik asit alan gruplarda, gebeliğinde folik asit almayıp astım modeli uygulanan gruba göre epitel kalınlığı, subepitelyal düz kas kalınlığı istatiksel olarak anlamlı şekilde artmış bulunmuştur. Mast ve goblet hücre sayısı folik asit alan gruplarda daha fazla olmakla beraber istatiksel anlamlılık bulunmamıştır. Bu bulgular bize folik asitin intrauterin maruziyetinin, histolojik olarak allerjik hava yolu hastalığı bulgularını arttırdığını göstermektedir.

Farelerin ortalama gebelik süresinin 21-23 gün olduğunu göz önüne alarak, çalışmamızda bir grup fareye bir hafta süreyle (ilk trimester) diğer gruba da tüm gebelik boyunca folik asit uygulaması yaptık. Avustralya'da Whitrow ve arkadaşları 1998-2005 yılları arasında çocukluk çağı astımı ve gebelikte folat kaynaklarının kullanımı, süresi ve zamanı ile ilgili yaptığı kohort araştırmasında, gebeliğin geç haftalarında (30-34 hafta) folik asit kullanımının 3,5 yaştaki astım riskinde ve 3,5-5,5 yaşları arasında persistan astım riskinde artış ile ilgili olduğunu göstermiştir [67]. Haberg ve arkadaşları bir diğer araştırmalarında, ikinci trimesterde yüksek maternal plazma folat düzeylerine (>17,84 nmol/l) sahip annelerin çocuklarında, 3 yaşta astım riskinde artış olduğunu bildirmiştir [83]. Folik asit dozu ile ilgili yapılan başka çalışmada ise maternal yüksek doz folik asit (5 mg/gün) kullanımı, çocukluktaki astım ilacı kullanım oranında artış ile ilgili bulunmuştur [84]. Yang ve arkadaşlarının incelemesinde, folik asit kullanımı ve infantil astım arasında ikili ilişkinin olduğunu belirtmiştir. Gebelikte yüksek doz folik asit kullanımı (0.4 mg/gün 6 ay süreyle veya 0.8 mg/gün 3 ay süreyle) infantil astım riskinde artış ile ilişkili bulunmakla beraber,

gebelikte düşük doz folik asit kullanımı (0.4 mg/gün 3 aya kadar) infantil astım riskinin azalması ile ilgili bulunmuştur [85].

Tüm gebelik boyunca folik asit alan ve neonatal astım modeli uyguladığımız gruptaki farelerin ışık mikroskopisinde mast ve goblet hücre sayısında istatiksel anlamlılık saptanmasa da, epitel kalınlığı ve subepitelyal düz kas kalınlığı istatiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Bu bulguların ışığında, gebelikte folik asite daha uzun süre maruziyetinin ve kümülatif dozun, allerjik hava yolu riskini arttırdığını düşünmekteyiz.

VEGF ve MMP-9 ile yaptığımız immünohistokimyasal incelemede gebeliklerinde folik asit alan gruplarda, gebeliğinde folik asit almayan gruba göre artmış immunoreaktivite saptanmıştır. Kronik ciddi astımda, hava yolunda anjiogenezis ve mikrovasküler remodeling görülebilir. Bu pekçok faktörle ilişkili olmakla beraber vasküleritenin artışından sorumlu en önemli mediyatörlerden biri vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGF). Dokularda kollejen depolanması, matriks metalloproteinazları (MMP) ve onun inhibitörlerinin dengesi ile kontrol edilir. Astımda bu gruptan en önemlisi MMP-9 olup, astım çalışmalarında bronkoalveolar lavaj sıvısında artışı bildirilmiştir [40]. Remodelig süreçlerinde yer alan ekstrasellüler matriks üretimini arttıran transforme edici büyüme faktör (TGF-β) ve astımda apopitoz göstergelerinden biri olan caspase-3 ile yaptığımız immünohistokimyasal çalışmalarda ise gebelikte folik asit alımının fark yaratmadığı saptanmıştır. Sonuçlarımızın literatürden olan farklılığı, yaş ve tür farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Gebeliğinde folik asit kullanılan yavrularda, TGF-β ve caspase-3 incelemesi ile immünoreaktivitede farklılık olmasa bile, VEGF ve MMP-9 antikorları ile yaptığımız incelemelerde folik asit kullanımının, allerjik hava yolu hastalığında anjiogenezisi ve kollojen depolanmasını arttırdığını söyleyebiliriz.

Bu çalışmamızın bazı kısıtlılıkları; çalışma az sayıda hayvanı kapsamaktadır ve hayvan çalışmalarında tespit edilen olumlu sonuçların direk olarak insan çalışmalarına uyarlayabilmek mümkün olamamaktadır.

Çalışmamız fare modelinde folik asitin gebelikte kullanımıyla, artmış hava yolu duyarlılığını, astımın histolojik özelliklerini inceleyen literatürdeki ilk araştırma olmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma; gebelikte maternal folik asit süplementasyonunun, ovaalbumin kullanılarak oluşturulan astım modelinde histolojik olarak allerjik cevabı arttırdığını göstermiştir. Gebelikte folik asit süplementasyonunun konjenital malformasyonları önlemekteki önemi göz önüne alındığında, folik asit alımının olası ters sonuçlarının değerlendirilmesi için yapılacak geniş çaplı kohort çalışmalarına ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. Gebeliğinde folik asit almayan ovaalbumin verilerek astım modeli oluşturulan grupta, epitel kalınlığı, subepitelyal düz kas kalınlığı, goblet ve mast hücre sayısı parametreleri kontrol gruptan anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu durum astımda remodeling ile ilişkili histolojik değişikliklerin neonatal hayvan modelinde başarı ile oluşturulduğunu desteklemektedir.
2. Gebelik boyunca folik asit alan grupta, epitel kalınlığı ve subepitelyal düz kalınlığının gebeliğin ilk haftası folik asit alan gruba göre anlamlı şekilde artmış olduğu gösterildi. Mast ve goblet hücre sayıları için iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.
3. Gebelik boyunca folik asit alan grupta, epitel kalınlığı ve subepitelyal düz kas kalınlıklarının gebelikte folik asit almayan gruba göre anlamlı şekilde artmış olduğu gösterildi. Mast ve goblet hücre sayılarında istatiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.
4. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grupta, epitel kalınlık ve subepitelyal düz kas kalınlıklarının gebelikte folik asit almayan gruba göre anlamlı şekilde artmış olduğu gösterildi. Mast ve goblet hücre sayılarında istatiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.
5. Gebelik boyunca folik asit alan grup ve gebeliğin ilk haftası folik asit alan grup karşılaştırıldığında, caspase-3, TGF-β, VEGF ve MMP-9 ile immünoreaktivite açısından aralarında anlamlı fark bulunmamıştır.
6. Gebelik boyunca folik asit alan grup ile gebelikte folik asit almayan grup caspase-3 ve TGF-β ile immünoreaktivite açısıdan aralarında istatiksel olarak farklılık saptanmadı. Gebelik boyunca folik asit alan grup VEGF ve MMP-9 ile anlamlı ölçüde daha fazla immünoreaktivite göstermiştir.
7. Gebeliğin ilk haftası folik asit alan grupta (Grup 2), gebelikte folik asit almayan gruba (Grup 3) göre immünoreaktivite açısıdan caspase-3 (p:0,48) ve TGF-β (p:0,21) ile farklılık bulunmazken, VEGF (p:0,035) ve MMP-9 (p:0,016) ile istatiksel olarak anlamlı fazla immünoreaktivite göstermiştir.
8. Gebelikte folik asit almayan grubun akciğer dokuları kontrol grubuna göre caspase-3, TGF-β ve VEGF ile anlamlı olarak daha fazla immünoreaktivite göstermişken, MMP-9 ile iki grup arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

9. Gebelikte maternal folik asit süplementasyonunun, ovaalbumin kullanılarak oluşturulan astım modelinde histolojik olarak allerjik cevabı arttırdığını gösterilmekle beraber yapılacak geniş çaplı kohort çalışmalarına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference I, its Panel on Folate OBV, Choline. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences. 1998.
2. Kliegman, Stanton, St. Geme, et al. Nelson Textbook of Pediatrics Nineteenth Edition,Saunders. 2011;764-802.
3. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. CMAJ : Canadian Medical Association Journal. 2006; 174: 341-8.
4. Ly A, Hoyt L, Crowell J, et al. Folate and DNA methylation. Antioxidants & Redox Signaling 2012; 17: 302-26.
5. Wagner C. Biochemical role of folate in cellular metabolism.Folate in Health and Disease, New York: Marcel Dekker Inc., 1995, 23–42.
6. Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. The Journal of Nutritional Biochemistry 2009; 20: 917-26.
7. Guilbert T, Krawiec M. Natural history of asthma. Pediatric Clinics of North America 2003; 50: 523-38.
8. Beasley R, Ellwood P, Asher I. International patterns of the prevalence of pediatric asthma the ISAAC program. Pediatric Clinics of North America 2003; 50: 539-53.
9. Saraclar Y, Kuyucu S, Tuncer A et al. Prevalence of asthmatic phenotypes and bronchial hyperresponsiveness in Turkish schoolchildren: an International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 2 study. Asthma, & Immunology 2003; 91: 477-84.
10. Demir AU, Karakaya G, Bozkurt B et al. Asthma and allergic diseases in schoolchildren: third cross-sectional survey in the same primary school in Ankara, Turkey. Pediatric Allergy and Immunology 2004; 15: 531-8.
11. Wiesch DG, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 1999; 104: 895-901.
12. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006; 117: 522-43.
13. Harb H, Renz H. Update on epigenetics in allergic disease. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 2015; 135: 15-24.
14. Murrell A, Rakyan VK, Beck S. From genome to epigenome. Human Molecular Genetics 2005; 14 Spec No 1: 3-10.
15. Lane RH. Fetal programming, epigenetics, and adult onset disease. Clinics in Perinatology 2014; 41: 815-31.
16. Fields PE, Kim ST, Flavell RA. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. Journal of Immunology 2002; 169: 647-50.
17. Lee GR, Kim ST, Spilianakis CG et al. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. Immunity 2006; 24: 369-79.
18. Shin HJ, Park HY, Jeong SJ et al. STAT4 expression in human T cells is regulated by DNA methylation but not by promoter polymorphism. Journal of Immunology 2005; 175: 7143-50.

19. Lee DU, Agarwal S, Rao A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. Immunity 2002; 16: 649-60.
20. Santangelo S, Cousins DJ, Winkelmann NE, et al. DNA methylation changes at human Th2 cytokine genes coincide with DNase I hypersensitive site formation during CD4(+) T cell differentiation. Journal of Immunology 2002; 169: 1893-903.
21. Kim HP, Leonard WJ. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. The Journal of Experimental Medicine 2007; 204: 1543-51.
22. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. European Journal of Immunology 2008; 38: 1654-63.
23. Hollingsworth JW, Maruoka S, Boon K et al. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. The Journal of Clinical Investigation 2008; 118: 3462-9.
24. Ciprandi G, Schiavetti I, Bellezza Fontana R et al. Overweight and obesity as risk factors for impaired lung function in patients with asthma: A real-life experience. Allergy and Asthma Proceedings 2014; 35: 62-71.
25. Beuther DA, Weiss ST, Sutherland ER. Obesity and asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2006; 174: 112-9.
26. Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. Lancet 1996; 347: 1792-6.
27. Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F et al. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. The New England Journal of Medicine 2004; 351: 1057-67.
28. Magnusson LL, Olesen AB, Wennborg H, et al. Wheezing, asthma, hayfever, and atopic eczema in childhood following exposure to tobacco smoke in fetal life. Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 2005; 35: 1550-6.
29. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. Annual Review of Immunology 2004; 22: 789-815.
30. Henderson WR, Lodewick MJ. Animal Models of Asthma. Middleton's Allergy Principles and Practice, 6th Edition, Philadelphia: Mosby 2003; 465-481.
31. Christodoulopoulos P, Tulic MK, Kontolemos M, et al. Immunopathology of Allergic Airway Inflammation. Middleton's Allergy Principles and Practice, 6th Edition, Philadelphia: Mosby 2003; 501-514.
32. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. Journal of Immunology 2005; 175: 5-14.
33. McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I et al. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. Journal of Immunology 1994; 152: 2172-9.
34. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today 1996; 17: 138-46.
35. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA et al. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. The New England Journal of Medicine 2000; 343: 538-43.
36. Barnes PJ. Pathophysiology of Allergic Inflammation. Immunological Rewiews 2011; 1: 31-50.
37. Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2004; 31: 3-7.
38. Leff AR. Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. Annual Review of Medicine 2001; 52: 1-14.

39. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. Physiological Reviews 2004; 84: 731-65.
40. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. Allergology International 2007; 56: 331-40.
41. Roche WR, Beasley R, Williams JH, et al. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. Lancet 1989; 1: 520-4.
42. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R et al. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 1990; 3: 507-11.
43. Kuperman DA, Huang X, Koth LL et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. Nature Medicine 2002; 8: 885-9.
44. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, et al. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. The American Review of Respiratory Disease 1993; 148: 720-6.
45. Okayama Y, Ra C, Saito H. Role of mast cells in airway remodeling. Current Opinion in Immunology 2007; 19: 687-93.
46. Akers IA, Parsons M, Hill MR et al. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology 2000; 278: 193-201.
47. Joos GF. The role of neuroeffector mechanisms in the pathogenesis of asthma. Current Allergy and Asthma Reports 2001; 1: 134-43.
48. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society. The American Review of Respiratory Disease 1991; 144: 1202-18.
49. O'Byrne P. Bronchial challenges by pharmacologic agents. Clark TJH, Godfrey S, Lee TH, Thomson NC, eds. Asthma, 4th edition. London: Arnold; 2000: 92-103.
50. Greening AP, Ind PW, Northfield M, et al. Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. Allen & Hanburys Limited UK Study Group. Lancet 1994; 344: 219-24.
51. Busse W, Corren J, Lanier BQ et al. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 2001; 108: 184-90.
52. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Injection allergen immunotherapy for asthma. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2010: Cd001186.
53. Wright AJ, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. The British Journal of Nutrition 2007; 98: 667-75.
54. Leclerc D, Wilson A, Dumas R et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998; 95: 3059-64.
55. Kim YI. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. The Journal of Nutrition 2005; 135: 2703-9.
56. Girgis S, Nasrallah IM, Suh JR et al. Molecular cloning, characterization and alternative splicing of the human cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase gene. Gene 1998; 210: 315-24.
57. Green JM, MacKenzie RE, Matthews RG. Substrate flux through methylenetetrahydrofolate dehydrogenase: predicted effects of the concentration of

methylenetetrahydrofolate on its partitioning into pathways leading to nucleotide biosynthesis or methionine regeneration. Biochemistry 1988; 27: 8014-22.
58. Barua S, Kuizon S, Junaid MA. Folic acid supplementation in pregnancy and implications in health and disease. Journal of Biomedical Science 2014; 21: 77.
59. Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. The Journal of Nutritional Biochemistry 1999; 10: 66-88.
60. Kim YI. Role of folate in colon cancer development and progression. The Journal of Nutrition 2003; 133: 3731-9.
61. Kim YI. Folic acid supplementation and cancer risk: point. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 2008; 17: 2220-5.
62. Pitkin RM. Folate and neural tube defects. The American Journal of Clinical Nutrition 2007; 85: 285-8.
63. Au KS, Ashley-Koch A, Northrup H. Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. Developmental Disabilities Research Reviews 2010; 16: 6-15.
64. De-Regil LM, Fernandez-Gaxiola AC, Dowswell T, et al. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2010: Cd007950.
65. Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. International Journal of Environmental Research and Public Health 2013; 10: 4352-89.
66. Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG. Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female. FASEB Journal 2007; 21: 3380-5.
67. Whitrow MJ, Moore VM, Rumbold AR, et al. Effect of supplemental folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study. American Journal of Epidemiology 2009; 170: 1486-93.
68. Haberg SE, London SJ, Stigum H et al. Folic acid supplements in pregnancy and early childhood respiratory health. Archives of Disease in Childhood 2009; 94: 180-4.
69. Bekkers MB, Elstgeest LE, Scholtens S et al. Maternal use of folic acid supplements during pregnancy, and childhood respiratory health and atopy. The European Respiratory Journal 2012; 39: 1468-74.
70. Magdelijns FJ, Mommers M, Penders J et al. Folic acid use in pregnancy and the development of atopy, asthma, and lung function in childhood. Pediatrics 2011; 128: 135-44.
71. Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, et al. Maternal B vitamin intake during pregnancy and wheeze and eczema in Japanese infants aged 16-24 months: the Osaka Maternal and Child Health Study. Pediatric Allergy and Immunology 2011; 22: 69-74.
72. Kiefte-de Jong JC, Timmermans S, Jaddoe VW et al. High circulating folate and vitamin B-12 concentrations in women during pregnancy are associated with increased prevalence of atopic dermatitis in their offspring. The Journal of Nutrition 2012; 142: 731-8.
73. Shin IS, Lee MY, Cho ES et al. Effects of maternal exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) during pregnancy on susceptibility to neonatal asthma. Toxicology and Applied Pharmacology 2014; 274: 402-7.
74. Micili SC, Goker A, Sayin O et al. The effect of lipoic acid on wound healing in a full thickness uterine injury model in rats. Journal of Molecular Histology 2013; 44: 339-45.
75. Wehby GL, Murray JC. The effects of prenatal use of folic acid and other dietary supplements on early child development. Maternal and Child Health Journal 2008; 12: 180-7.

76. Brown SB, Reeves KW, Bertone-Johnson ER. Maternal folate exposure in pregnancy and childhood asthma and allergy: a systematic review. Nutrition Reviews 2014; 72: 55-64.
77. Allan K, Devereux G. Diet and asthma: nutrition implications from prevention to treatment. Journal of the American Dietetic Association 2011; 111: 258-68.
78. Litonjua AA, Rifas-Shiman SL, Ly NP et al. Maternal antioxidant intake in pregnancy and wheezing illnesses in children at 2 y of age. The American Journal of Clinical Nutrition 2006; 84: 903-11.
79. Kim JH, Ellwood PE, Asher MI. Diet and asthma: looking back, moving forward. Respiratory Research 2009; 10: 49.
80. Hansel TT, Barnes PJ. Novel drugs for treating asthma. Current Allergy and Asthma Reports 2001; 1: 164-73.
81. James A. Airway remodeling in asthma. Current Opinion in Pulmonary Medicine 2005; 11: 1-6.
82. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP et al. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. Thorax 1998; 53: 849-56.
83. Haberg SE, London SJ, Nafstad P et al. Maternal folate levels in pregnancy and asthma in children at age 3 years. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 2011; 127: 262-4.
84. Zetstra-van der Woude PA, De Walle HE, Hoek A et al. Maternal high-dose folic acid during pregnancy and asthma medication in the offspring. Pharmacoepidemiology and Drug Safety 2014; 23: 1059-65.
85. Yang L, Jiang L, Bi M et al. High dose of maternal folic acid supplementation is associated to infant asthma. Food and Chemical Toxicology 2015; 75: 88-93.

EK:ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 05/19/2013
Toplantı Tarihi : 09 Ekim 2013

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanşığı'na

80/2013 Protokol No'lu; Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prod.Dr.Abdullah KUMRAL'ın yürütücüsü olduğu **"Gebe ratlarda folik asit süplementasyonu ile yavrularda alerjik hava yolu hastalığı gelişimi arasında ilişkinin değerlendirilmesi"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oybirliği ile karar verilmiştir. ELİSA testlerini yapacak araştırıcı isminin etik kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı (Araştırıcı)

Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye

Prof.Dr.Şermin GENÇ
Üye (Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye (Araştırıcı-Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye(Topl.Katılamadı)

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye (Topl.Katılamadı)

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Zehra KINAM
Üye (Topl.Katılamadı)

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır