



Astım ve Alerjik Rinitli Çocuklarda Toll Like Reseptör 2 ve Toll Like Reseptör 4 Polimorfizmi

Toll Like Receptor 2 and Toll Like Receptor 4 Polymorphisms in Children with Asthma and Allergic Rhinitis

Figen Gülen¹, Hüseyin Köksoy¹, Remziye Tanaç¹, Afig Berdeli², Esen Demir¹, Dost Zeyrek¹, Serdar Altınöz¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Solunum Alerji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Moleküler Araştırma Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

ÖZET

Amaç: Son yıllarda özellikle endotoksinlere immün yanıt ve atopik hastalık arasında önemli bilgiler ortaya konmuştur. Toll like reseptör polimorfizmleri (TLRs) ve CD14'ün endotoksine yanıtla ilişkileri gösterilmiştir. Genetik farklılıkların farklı etkilere yol açması mümkün olmasına karşın, astım ve alerjik hastalıklarda TLRs ve endotoksin ilişkisi tartışmalıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Alerji ve Solunum Polikliniği'nde takip edilen 165 hasta ve atopisi olmayan 117 sağlıklı çocuk ve adolesandan oluşan kontrol grubunu içermektedir. Tam kan sayımları, eozinofil sayıları Ig G, A, M değerleri ve spIgE düzeyleri çalışıldıktan sonra spIgE pozitif saptanan olgulara deri testi uygulandı. Arg753Gln heterozigot, Gln753Gln homozigot, TLR2753 polimorfizmleri, Asp299Gly heterozigot, Gly299Gly homozigot, TLR4299 polimorfizmleri, Thr399Ile heterozigot, Ile399Ile homozigot ve TLR4399 polimorfizmleri tüm olgularda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çalışıldı.

Bulgular: Ailede atopi öyküsü, evde evcil hayvan besleme veya 6 aydan önce gündüz bakımevine verme gibi kriterler her 3 polimorfizm açısından da değerlendirme yapıldığında; normal genotip gösterenler ile polimorfizm saptananlar arasında farklılık gösterilemedi. Hem çalışma hem de kontrol grubunda her üç genotip açısından da genotip ve normal dağılım açısından farklılık saptanmadı (TLR2 75- p=0,9; TLR4 299 -p=0,65; TLR4 399 -p=0,72).

Sonuç: Bu çalışmada astım ve alerjik rinit gelişimi üzerine endotoksin reseptörlerinin (TLR2 ve TLR4) genetik varyasyonlarının etkisi gösterilememiştir. *The Journal of Pediatric Research 2014;1(1):13-21*

Anahtar Kelimeler: Astım, alerjik rinit, toll like reseptör, polimorfizm, çocuk

ABSTRACT

Aim: Specifically, endotoxin has raised important insight into the immune response and atopic diseases. It is possible that the immune dysregulation behind asthma (and endotoxin exposure) mostly occurs at the genetic level. Overall, it appears that a genetic predisposition to asthma exists and that fundamental mechanisms of the innate immune system may be involved. Polymorphisms of TLRs (Toll like receptors) and CD14 have been associated with response to endotoxin. Genetic variations may influence known effects or may create new associations. TLRs and endotoxin exposure and its association with asthma and allergies are controversial.

Materials and Methods: This study comprised 165 cases from Ege University Medical Faculty, Paediatric Allergy and Pulmonology Polyclinic, the control group was formed from 117 healthy children and adolescents not thought to have any atopic illness. Total blood and eosinophil counts, Ig, G, M, A, values, total and spIgE values were recorded from the children of both groups and those in the patient group were given a skin prick test after having had spIgE values taken. Arg753Gln heterozygote, Gln753Gln homozygote, TLR2753 polymorphisms, Asp299Gly heterozygote, Gly299Gly homozygote, TLR4299 polymorphisms, Thr399Ile heterozygote, Ile399Ile homozygote and TLR4399 polymorphisms were researched in all cases. Polymorphisms for the TLRs were detected by polymerase chain reaction.

Results: When evaluated from the angle of criteria such as atopic conditions in the family, household pets or attending a creche while under 6 months old, for each 3 genotypes there was no statistically significant difference between the cases showing a normal genotype and those showing polymorphism. In both the study and the control group no statistically significant difference was found between the genotype and normal distribution for each of the 3 genotypes (TLR2 75- p=0,9; TLR4 299 -p=0,65; TLR4 399 -p=0,72).

Conclusion: Our study results showed no relationship between the development of allergic rhinitis and asthma and the genetic variants of the signalling pathway of the endotoxin receptors TLR2 and TLR4. *The Journal of Pediatric Research 2014;1(1):13-21*

Key Words: Asthma, allergic rhinitis, toll like receptor, polymorphisms, children

Yazışma Adresi/ Address for Correspondence

Dr. Figen Gülen, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Solunum Alerji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye
Tel.: +90 232 390 11 99 E-posta: figen.gulen@ege.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 15.03.2013 Kabul tarihi/ Accepted: 04.04.2013

Giriş

Alerjik hastalıklarının prevalansının, son yıllarda değişen çevresel ve sosyoekonomik faktörlere bağlı olarak, özellikle batılı ve gelişmiş olan ülkelerde artmakta olduğu bildirilmektedir (1). Bu artışın nedenleri içerisinde, genetik yatkınlık, atopi, hava yolu hiperreaktivitesi, cinsiyet ve ırk gibi bireysel faktörlerin yanı sıra; mikrobiyal maruziyetteki değişiklikler, viral enfeksiyonlar, pasif sigara içiciliği, sosyoekonomik durum, diyet gibi çevresel faktörler de yer almaktadır (2).

Gr negatif bakterilerdeki bir endotoksin olan lipopolisakkarit (LPS) doğuştan immun sistemin potent bir uyarıcısıdır. LPS çevrede de yaygındır; ev ve işyeri ortamındaki tozlar, halılar, havalandırma sistemleri içinde de bulunur. LPS antijen sunan hücrelerden IL-12 yanıtını indükler. IL-12 naive Th hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasına aracılık eder.

Spesifik bir LPS reseptörü olan Toll-like reseptör-4 (TLR4), CD14 ve LBP ile bir kompleks oluşturarak immun yanıtları başlatır ve doğuştan immun sistemin önemli bir parçasıdır. LPS aracılı TLR4 sinyalizasyonu NFκB gibi transkripsiyon faktörlerinin oluşmasına ve TNF-α, IL-1,IL-5,IL-8,IL-10 ve IL-12 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine neden olur. IL-12 ve IFN-γ'nin etkisiyle naive T hücreleri Th1 hücrelerine farklılaşır. Immun yanıtın Th1 yönüne kaymasının Th2 aracılı alerjik hastalık gelişmesini önlediği bilinmektedir.

TLR4'de görülen Asp299Gly ve Thr399Ile gibi mutasyonların inhale LPS'lere yanıtı ile birlikte gösterilmiştir. TLR4'de görülen mutasyonlar sonucu LPS'lere yetersiz yanıt oluşmakta, sinyalizasyon kesintiye uğramakta ve Th1 yanıt oluşmaması sonucu zaten bebeklik döneminde baskın olan Th2 tipi yanıtlar sürmekte ve alerjik hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Bu da LPS reseptörlerindeki gen sekansı değişikliklerinin konağın mikrobiyal ajanlara yanıtını ve atopik hastalık gelişimini etkilediğini göstermektedir.

Hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler üzerinde bulunan lipoproteinlerin TLR-2 tarafından tanınması sonucunda hücreleri aktive ettiği gösterilmiş ve TLR-2'nin ağırlıklı olarak lipoproteinleri tanıyan reseptör olduğu düşünülmüştür. TLR2'nin de LPS'nin açıl zinciri farklı bazı varyantlarını tanıyabildiği, ancak TLR4 kadar spesifik bir LPS reseptörü olmadığı düşünülmektedir. TLR2'deki polimorfizmlerin PAMP maruziyetine bağlı olarak, özellikle çiftlik ortamında yaşayan çocuklarda azalmış atopi ile birlikte gösterdiği bildirilmiş ve alerjik hastalık gelişmesi üzerinde etkili olabileceği öne sürülmüştür (3-5).

Bu çalışmada; gen polimorfizmi-LPS azalmış immun yanıt birlikteliğinin mikrobiyal uyarılara karşı konağın immun yanıtını modifiye ederek alerjenlere yanıtı ve alerjik hastalık gelişimini etkileyebileceği görüşünden yola çıkılarak, TLR2 ve TLR4 polimorfizmi ile çocuklardaki astım ve alerjik rinit varlığı arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Solunum Alerji Bilim Dalı Polikliniği'nde, atopik astım tanısı

ile izlenen 56 olgu; alerjik rinit tanısı ile izlenen 57 olgu ve bronşiyal astım+alerjik rinit tanısı ile izlenen 44 olgu ve nonatopik astım tanısı ile izlenen 8 olgu olmak üzere toplam 165 olgu alındı. Bronşiyal astım tanısı "Global Initiative in Asthma (GINA)" kriterleri gözönüne alınarak konuldu (6). Alerjen splg E düzeyleri 0,35 ku/L üzerinde olanlar, deri prick testlerinde (DPT) de en azından bir aeroallerjene duyarlılık saptananlar atopik astım; splgE düzeyleri 0,35 kU/L altı olan, DPT'de spesifik alerjen yanıtı saptanmayanlar nonatopik astım olarak değerlendirildi.

1994'de yayınlanan "Uluslararası Konsensus Raporu" kriterleri doğrultusunda; enfeksiyonla ilişkisi olmayan, belirli alerjen maruziyetinden sonra burun akıntısı, kaşıntı, hapsirik, burun tıkanıklığı gibi temel semptomlardan iki veya daha fazlasını ard arda günlerde, günde bir saatten daha fazla devam eden klinik tablo olarak gösteren, spesifik IgE değeri 0,35 ku/L üzeri olan, DPT'de en az bir aeroallerjene duyarlılık saptanan olgulara alerjik rinit tanısı konuldu (7).

Atopik kalıtım açısından, en az bir ebeveynde yada kardeşte tipik atopik semptom veya hastalık (astım, alerjik rinit, atopik dermatit) varlığı olan olguların ailede atopi öyküsü pozitif kabul edildi. Olgular; alerjik hastalık gelişmesini etkileyebilecek kardeş sayısı, sık enfeksiyon geçirme, evde hayvan beslenmesi, yaşamın ilk 6 ayında kreşe gitme gibi çevresel faktörler açısından sorgulandı. Klinik olarak astım ve alerjik rinit bulguları olan, splgE değerleri pozitif ve DPT'de en az bir aeroallerjene pozitiflik olan olgular çalışma grubuna dahil edildi. Herhangi bir immün yetmezlik, kronik inflamatuvarromatolojik hastalık ve otoimmün hastalığı olanlar çalışmaya alınmadı. Kendisinde ve ailesinde atopik hastalık öyküsü olmayan, klinik olarak atopik hastalık bulgusu saptanmayan ve splgE sonuçları negatif olan 6-17 yaş arasında (ortalama 11,18±2,97 yıl) 117 çocuk kontrol grubu olarak alındı.

Her iki gruptaki çocukların tam kan ve eozinofil sayımı; Ig G, M, A değerleri; total ve spesifik E değerleri çalışıldı. Hasta grubundaki çocukların splgE değerleri pozitif olanlarına DPT uygulandı.

Hasta ve kontrol grubundaki tüm olgularda TLR2753, TLR4299 ve TLR4399 genotiplenmesi yapıldı. Laboratuvar incelemeleri için hastalardan tam kan sayımı, immünglobulin değerleri, total ve splgE ölçümü için kapalı düz tüpe 3-4 ml kan ve genetik analizlerin yapılabilmesi için de kapalı EDTA'lı tüpe 2 ml kan örneği alındı. EDTA'lı tüpdeki kanlar çalışma yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

Immünglobulin Değerlerinin Ölçülmesi

IgG, IgM ve IgA değerleri nefelometrik yöntem (Dade Behring BN2 Nephelometer 100 Analyzer) ile ölçüldü. Immünglobulin değerleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik İmmünoloji Bilim Dalı tarafından belirlenmiş olan Ege Bölgesi sağlıklı çocuklarının immünglobulin değerleri dikkate alınarak değerlendirildi.

Total ve Spesifik IgE Değerlerinin Ölçülmesi

Olguların serum total ve alerjen spesifik IgE ölçümleri CAP FEIA (Fluoro Enzyme Immuno Assay) yöntemiyle (Pharmacia, Uppsala, Sweden) yapıldı. 0,35 kU/L üzerindeki splgE değerleri pozitif olarak kabul edildi.

Deri Prick Testinin Yapılması ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Aeroallerjen duyarlılığını belirlemek amacıyla, hasta grubuna 1 mm standart delme sağlayan uçlarla (Stallerpoint, Paris, France) prick (delme) testi uygulandı. Deri testi için Allergopharma (Joachim Ganzer KG, Reinbeck, Germany) ve Stallergenes (Stallergenes SA, France) ticari allerjen solüsyonları kullanıldı. Olguların ön kol volar yüzüne; ev tozu akarları, çayır/çim, yabancı ot, çiçek ve ağaç polenleri, mantarlar, hayvan epitel ve deri döküntüleri ve insektlerden oluşan testler uygulandı. Pozitif kontrol olarak histamin (1 mg/L), negatif kontrol olarak serum fizyolojik kullanıldı. Test sonuçları yapıldıktan 20 dakika sonra değerlendirildi. Endürasyon çapı, pozitif kontrolün oluşturduğu endürasyonun çapının en az yarısı veya üzerinde olan ölçümler 1 ile 4 pozitif arasında değerlendirildi. İki pozitif ve üzerindeki değerler anlamlı kabul edildi.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Hasta ve kontrol grubunda PCR-RFLP tekniği kullanılarak genotiplendirme yapıldı. TLR2 ve TLR4'deki tek nükleotid değişimi (SNP) araştırıldı.

TLR2 reseptör proteinin intrasellüler TIR bölgesini kodlayan 3. ekzonunda Arg753Gln nokta mutasyonu araştırıldı. Bu mutasyon, TLR2'nin kodlandığı bölgede; aminoasit 753'te normalde Arg753Arg şeklinde olan yerleşiminde arginin ile glutamin yer değiştirmesi şeklinde bir mutasyondur.

TLR4'ün ekstrasellüler ligand bağlayan LRR bölgesini kodlayan genin 3. ekzonunda 2 nokta mutasyonu araştırıldı. Birinci mutasyon 299. aminoasitte normalde Asp299Asp şeklinde olan yerleşimin aspartik asidin yerine glisin değişikliği şeklinde sonuçlanan Asp299Gly, ikinci mutasyon 399. aminoasitin normalde Thr399Thr şeklinde olan yerleşiminin threonin yerine izolösin geçmesi şeklinde sonuçlanan Thr399Ile mutasyonu idi.

Genomik DNA Eldesi

Genomik DNA EDTA'lı periferik tam kandan, üretici firmanın önerileri doğrultusunda Qiagen Mini Blood pürifikasyon sistem kitleri (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak elde edildi. DNA

kantasyonu PicoGreen dsDNA quantitation kit (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) aracılığıyla spektrofotometrik olarak yapıldı ve DNA 100 ng/μl olacak şekilde dilüe edildi. TLR2 ve TLR4 polimorfizimleri aynı genomik DNA'dan çalışıldı.

TLR2 Genotiplendirmesi

Enzim kesimi sonucu 227 bp'deki alleller normal (Arg753Arg), 264 bp'deki alleller mutant (Gln753Gln), her iki bp'de görülen alleller ise heterozigot (Arg753Gln) olarak değerlendirildi.

TLR4 Genotiplendirmesi

Enzim kesimi sonucu Asp299Gly genotiplendirmesinde 249 bp'deki alleller normal, 226 bp'deki alleller mutant olarak değerlendirildi. Her iki bp'de görülen alleller ise heterozigot olarak kabul edildi. Thr399Ile genotiplendirmesinde 406 bp'deki alleller normal, 377 bp'deki alleller mutant olarak, her iki bp'de görülen alleller ise heterozigot olarak kabul edildi.

İstatistik Analizler

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 11.0 for Windows istatistik programı kullanıldı. Hasta ve kontrol grubu arasındaki demografik farklılıkları değerlendirmek için χ^2 testi kullanıldı. Genotipin etkilerini belirlemek amacıyla cinsiyet, ailede atopi olması, erken yaşta kreşe başlama, evde hayvan beslenmesi, sık enfeksiyon geçirme, kardeş sayısı gibi özellikler için lojistik regresyon modelleri kullanıldı. Kontrol ve hasta grubunda genotipik dağılım ve allel sıklığı χ^2 testi ile karşılaştırıldı. TLR2, TLR4299 ve TLR4399 gen polimorfizmlerinde spesifik allellerin astım ve alerjik rinit için duyarlılığı %95 güven aralığında Odds oranları (OR) ile saptandı. $P < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan 165 olgunun 56'sı atopik bronşiyal astım, 57'si Alerjik rinit, 44'ü Alerjik rinit + astım bronşiyale ve 8'i nonatopik astım tanısı aldı. Çalışma grubundaki olguların 108'i erkek, 57'si kız; kontrol grubunun ise 82'si erkek, 35'i kız olup cinsler arasında istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p=0,41$). Çalışma grubunda 100 olguda (%60,60) ailede

Tablo I. Çalışma ve kontrol grubunun demografik özellikleri ve total IgE değerleri				
	Hasta grubu n=165	Kontrol grubu n=117	OR (%95CI)	p
Tanı				
Atopik astım	56 (%33,94)			
Alerjik rinit	57 (%34,55)			
BA + AR	44 (%26,67)			
Non-atopik astım	8 (%4,84)			
Yaş (yıl), ortalama \pm SD	12,71 \pm 3,34	11,18 \pm 2,97	0,80-2,31	0,18
Cins (E/K)	108/57	82/35	0,81(0,47-1,39)	0,41
Ailede atopi	100 (%60,60)	-	-	-
Total IgE (kU/l), ortalama \pm SD	402,74 \pm 417,35	33,64 \pm 17,47		<0,001

atopi saptandı, kontrol grubunda ise ailede atopi yoktu. Hasta grubundaki çocuklarda kontrol grubundakilere göre total IgE düzeyleri anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,001$). İki grubun demografik özellikleri ve total IgE sonuçları Tablo I'de görülmektedir.

Kardeş sayısı, sık enfeksiyon geçirilmesi, yaşamın ilk 6 ayında kreşe devam etme gibi çevresel faktörler yönünden anlamlı fark saptanmadı. Evde hayvan beslenmesi açısından karşılaştırıldığında ise kontrol grubunda evde hayvan beslenme oranı anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,001$) (Tablo II).

Hasta ve kontrol grubunda TLR2753, TLR4299 ve TLR4399 genotipleri belirlendi. Çalışma grubundaki olguların TLR2 genotipinde Arg753Gln heterozigot polimorfizm oranı %9,09; TLR4299 genotipinde Asp299Gly heterozigot polimorfizm oranı %4,85; TLR4399 genotipinde Thr399Ile heterozigot polimorfizm oranı ise %3,64 olarak saptandı. TLR2 genotipinde homozigot (mutant) olgu saptanmazken, TLR4299 genotipinde 1 (%0,6) ve TLR4399 genotipinde bir (%0,6) homozigot olgu saptandı. Çalışma ve kontrol grubunun genotip ve allel dağılımları arasında her üç genotip için de istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Yine her üç genotip ile astım veya alerjik rinit gelişmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik saptanmadı (Tablo III).

Hastalık grupları kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında da genotip ve allel dağılımları arasında da anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo IV).

Cinsiyete göre genotip ve allel dağılımı değerlendirildiğinde her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Normal genotip gösteren olgular, heterozigot polimorfizm gösteren ve homozigot olan olguların toplamı ile karşılaştırıldığında polimorfizm ile DPT'deki duyarlanma

oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Hastaların DPT'leri alerjen duyarlılığı sayısı değerlendirildiğinde; tüm genotiplerde ağırlıklı olarak tek alerjen duyarlılığı olduğu (monosensitize) görüldü. Monosensitize olmakla polisensitize olmak açısından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

TLR2 genotipine göre olgular; ailede atopi, kardeş sayısı, evde hayvan beslenmesi, yaşamın ilk 6 ayında kreşe devam etme gibi kriterler açısından değerlendirildiğinde normal genotip gösteren olgularla polimorfizm gösteren olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Total IgE düzeyleri, periferik kanda eozinofili, DPT'de duyarlı olunan antijenler yönünden de genotipler arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Benzer özellikler yönünden, TLR4299 ve TLR4399 genotipleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Tartışma

Astımın multipl genlerin etkileyebileceği ve multipl çevresel faktörlerin de buna katkıda bulunabileceği kompleks bir genetik hastalık olduğu kabul edilmektedir (8). Ev içi ve dış ortamdaki kirlilikler, alerjen maruziyeti, sigara içimi, mikrobiyal ürünlerle temas ve enfeksiyonlara maruziyet gibi faktörler de astım ve diğer alerjik hastalıkların gelişmesine katkıda bulunabilmektedir (9). Son zamanlardaki çalışmalar genetik ve çevre etkileşimi konusunda yoğunlaşmıştır. Bu kompleks etkileşimler içerisinde, TLR4 ve TLR2 gibi doğuştan immünite genlerinin mikrobiyal ürünlerle etkileşimi ve bunun immun yanıtı dolayısıyla astım fenotiplerine olan etkisi ilgi odaklarından biri olmuştur. 1997 yılında TLR'lerin keşfi ile, bu

Tablo II. Grupların çevresel faktörler yönünden karşılaştırılması

	Hasta grubu n=165	Kontrol grubu n=117	OR (%95CI)	p
Kardeş sayısı				
Yok	52 (%31,51)	31 (%26,50)		
1	93 (%56,36)	69 (%59)	0,78 (0,45-1,37)	0,36*
2'den çok	20 (%12,13)	17 (%14,50)		
Sık enfeksiyon				
Yok	129 (%78,18)	91 (%77,78)		
Var	36 (%21,82)	26 (%22,22)	0,97 (0,55-1,72)	0,93
Evde hayvan				
Yok	161 (%97,58)	99 (%84,62)	0,13 (0,04-0,41)	<0,001
Var	4 (%2,42)	18 (%15,38)		
Kreş				
Yok	157 (%95,15)	105 (%89,74)		
Var	8 (%4,85)	12 (%10,26)	0,44 (0,17-1,12)	0,08

* : Hiç kardeş olmaması ile 2'den fazla kardeş olması karşılaştırılmıştır.

reseptörlerin immün yanıtların düzenlenmesindeki rolleri ve özellikle, LPS reseptörü olan TLR4'ün endotoksin yanıtındaki önemi üzerinde önemle durulmaya başlanmıştır. TLR4'ün endotoksin sinyalizasyon yolağındaki kritik rolü 1998 yılında açığa çıkmış, TLR4 mutant allel bulunmasının invitro olarak LPS'ye yanıtın belirgin olarak düşük olmasına neden olduğu, azalmış NF κ B aktivitesi ile kanıtlanmıştır (10). TLR2'de LPS'lere verilecek yanıtı aracılık edebilme yeteneğindedir (11). Transmembran kısmı olmaması nedeniyle sinyal iletiminde rolü olmayan CD14, TLR4 ile mikrobiyal ürünlerin etkileşimine katkıda bulunur. Farklı tip hücrelerdeki CD14/TLR aktivasyonu, IL-10, IL-12 gibi sitokinlerin salınımı ve regülatör T hücrelerinin aktivasyonu şeklinde sonuçlar doğurur. Bu mekanizmalar adaptif immün yanıtların düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir (3,12). TLR'ler; antijen sunan hücreler, regülatör T hücreleri gibi hücrelerin yüzeyinde bulunmakta

ve immün sistemin çevresel maruziyetlerle etkileşiminde çok önemli rol oynamaktadır (13). Bu nedenle; TLR'lerdeki polimorfizmlerin çevresel antijenlere verilecek immün yanıt paternleri üzerinde etkisi olduğu ve batılı yaşam tarzında mikrobiyal maruziyetin azalması ile birlikte bu mikrobiyal ajanlara verilecek yanıtı etkilediği böylece alerjik hastalık prevalansında görülen artışa katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir (14-17). Polimorfizm, toplumda bir gen veya kromozomun sık rastlanan iki veya daha fazla allotipinin bulunmasıdır. Toplumda %1'den fazla oranda saptanan nükleotid yer değişimleri tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak adlandırılmakta ve aminoasit değişimine yol açmaktadır. TLR4'ü kodlayan gendeki mutasyonların TLR4'ün mikrobiyal ürünleri tanınmasını ve sinyalizasyonunu kesintiye uğrattığı dolayısıyla Th1/Th2 hücre farklılaşmasını etkileyerek alerjik hastalık gelişmesini de etkileyebileceği öne sürülmektedir. Bununla birlikte; TLR4

Tablo III. Hasta ve kontrol grubunun TLR genotipleri ve allel sıklığı

	TLR2 Genotipi*			Allel Sıklığı**	
	Arg753Arg n (%)	Arg753Gln n (%)	Gln753Gln n (%)	Arg n (%)	Gln n (%)
Hasta n=165	150 (90,91)	15 (9,09)	0	315 (95,45)	15 (4,55)
Kontrol (n=117)	106 (90,60)	11 (9,40)	0	223 (95,30)	11 (4,70)
*OR (%95CI): 1,04 (0,43-2,51), p=0,9 **OR (%95CI): 1,04 (0,44-2,44), p=0,9					
	TLR4299 Genotipi*			Allel Sıklığı**	
	Asp299Asp n (%)	Asp299Gly n (%)	Gly299Gly n (%)	Asp n (%)	Gly n (%)
Hasta n=165	156 (94,55)	8 (4,85)	1 (0,60)	320 (96,97)	10 (3,03)
Kontrol (n=117)	112 (95,73)	4 (3,42)	1 (0,85)	228 (97,44)	6 (2,56)
*OR (%95CI): 0,77 (0,22-2,61), p=0,65 **OR (%95CI): 0,84 (0,27-2,56), p=0,74					
	TLR4 399 Genotipi*			Allel Sıklığı**	
	Thr399Thr n (%)	Thr399Ile n (%)	Ile399Ile n (%)	Thr n (%)	Ile n (%)
Hasta n=165	158 (95,76)	6 (3,64)	1 (0,60)	322 (97,58)	8 (2,42)
Kontrol (n=117)	111 (94,88)	5 (4,27)	1 (0,85)	227 (97)	7 (3)
*OR (%95CI): 1,22 (0,35-4,18), p=0,72 **OR (%95CI): 1,24 (0,40-3,83), p=0,67					

TLR2 genotipi değerlendirilmesinde; 753. aminoasitteki Arg753Arg yerleşimi normal genotip; Arg753Gln yerleşimi heterozigot polimorfizm gösteren genotip; Gln753Gln yerleşimi homozigot (mutant) olarak değerlendirilmektedir.

TLR3299 genotipi değerlendirilmesinde; 299. aminoasitteki Asp299Asp yerleşimi normal genotip; Asp299Gly yerleşimi heterozigot polimorfizm gösteren genotip; Gly299Gly yerleşimi homozigot (mutant) olarak değerlendirilmektedir.

TLR4399 genotipi değerlendirilmesinde; 399. aminoasitteki Thr399Thr yerleşimi normal genotip; Thr399Ile yerleşimi heterozigot polimorfizm gösteren genotip, Ile399Ile yerleşimi homozigot (mutant) genotip olarak değerlendirilmektedir.

OR ve p değerleri alınırken; normal genotip gösteren olgularla heterozigot polimorfizm gösteren ve mutant olguların toplamı karşılaştırılmıştır.

Tablo IV. Hastalık grupları ve kontrol grubunun genotip ve allel dağılımı

	TLR2 Genotipi (n %)			Allel Sıklığı (n %)		p* OR (%95CI)
	Arg753Arg	Arg753Gln	Gln753Gln	Arg	Gln	
AB (n=56)	51 (91,07)	5 (8,93)	0	107 (95,5)	5 (4,5)	=0,91 1,0 (0,3-3,7)
AR (n=57)	52 (91,20)	5 (8,78)	0	109 (95,6)	5 (4,4)	=0,89 1,0 (0,3-3,8)
AB + AR (n=44)	39 (88,6)	5 (11,4)	0	83 (94,3)	5 (5,7)	=0,71 0,8 (0,2-2,8)
Kontrol (n=117)	106 (90,60)	11 (9,40)	0	223 (95,3)	11 (4,7)	
	TLR4299 Genotipi (n %)			Allel Sıklığı (n %)		
	Asp299Asp	Asp299Gly	Gly299Gly	Asp	Gly	
AB (n=56)	54 (96,4)	1 (1,8)	1 (1,8)	109 (97,3)	3 (2,7)	=0,82 1,21(0,2-9,3)
AR (n=57)	56 (98,2)	1 (1,8)	0	113 (99,1)	1 (0,9)	=0,39 2,5(0,3-57,9)
AB + AR (n=44)	40 (91)	4 (9)	0	84 (95,4)	4 (4,5)	=,023 0,4(0,1-2,1)
Kontrol (n=117)	112 (95,7)	4 (3,4)	1 (0,8)	228 (97,4)	6 (2,6)	
	TLR4 399 Genotipi (n %)			Allel Sıklığı (n %)		
	Thr399Thr	Thr399Ile	Ile399Ile	Thr	Ile	
AB (n=56)	55 (98,2)	0	1 (1,8)	110 (98,2)	2 (1,8)	=0,29 2,9(0,3-67,1)
AR (n=57)	57 (100)	0	0	114 (100)	0	=0,08
AB + AR (n=44)	40 (91)	4 (9)	0	84 (97,4)	4 (2,5)	=0,35 0,5 (0,1-2,4)
Kontrol (n=117)	111 (94,8)	5 (4,2)	1 (0,8)	227 (97)	7 (3)	

Nonatopik astım grubu sayının azlığı nedeniyle karşılaştırmaya alınmamıştır.

*: Normal genotip gösteren olgularla heterozigot polimorfizm gösteren ve homozigot (mutant) olguların toplamı karşılaştırılmıştır.

gen varyantları ve astım veya astım fenotipleri arasındaki birliktelik konusundaki çalışmalar tartışmalı sonuçlar ortaya koymuştur.

TLR'lerin keşfinden önce, 1989 yılında Strachan birey sayısı fazla olan ailelerin çocuklarının AR ve egzema gelişmesi için daha düşük risk taşıdıklarını göstermiştir (18). Strachan, endotoksin gibi mikrobiyal ürünlerle temasın veya enfeksiyonların yaşamın erken dönemlerindeki immun yanıtları modifiye ettiğini ve ileride astım gelişme olasılığını etkilediği öne sürmüştür (19). Bu görüş hijyen hipotezi olarak bilinmektedir. Erken çocuklukta patojenlere maruziyetin yokluğu (artmış hijyen) immun sistem yanıtında dengesizliğe yol açarak olguların alerjenlere daha duyarlı olmasına neden olmakta ve bu durumda; Th2 sitokinleri artmakta, Th1 ile immunoregülatör sitokinler azalmaktadır. Hijyen hipotezini destekler şekilde, bebeklik döneminde kronik olarak düşük düzeyde endotoksin maruziyetinin atopi ve hatta astım gelişimi riskini azalttığını gösteren (20) ve çiftlik ortamında

yaşayan çocuklardaki astım ve alerji prevalansının yine kırsal kesimde yaşayıp da çiftlik ortamında bulunmayan çocuklara oranla daha düşük olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (21). Ayrıca daha fazla kardeşi olan çocuklarda ve evlerinde köpek beslenen çocuklarda da bu koruyucu etki gösterilmiştir (22).

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunun genotipleri karşılaştırıldığında; TLR2 Arg753Gln heterozigot genotipi çalışma grubunda %9,09, kontrol grubunda %9,40 oranında bulunmuş, literatürde popülasyonda %4,5-%6 olarak verilen orandan yüksek olarak saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Arg753Gln polimorfizm oranı astımlı olgularda %8,93, alerjik rinitli olgularda %8,78 oranında saptanmış, kontrol grubuyla anlamlı farklılık saptanmamıştır. Çalışma ve kontrol gruplarında Gln753Gln homozigot genotipi taşıyan olgu saptanmamıştır.

TLR4299 Asp299Gly heterozigot genotipi çalışma grubunda %4,85, kontrol grubunda %3,42 oranında saptanmış olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

fark saptanmamıştır. Polimorfizm oranlarımız, literatürde bu polimorfizmin toplumlarda %3-%6 arasında olduğu şeklindeki bilgiyle paralel şekildedir (23). Gly299Gly homozigot genotipi çalışma grubunda %0,60, kontrol grubunda %0,85 oranında saptanmış olup istatistiksel bir anlamı yoktur.

Asp299Gly polimorfizmi astım grubunda %1,78, alerjik rinit grubunda %1,80, olarak saptanmıştır. Astımlı Türk çocukları arasında yapılan bir çalışmada TLR4299 Asp299Gly polimorfizmi %5,1 oranında, Thr399Ile polimorfizmi de yine %5,1 oranında saptanmıştır (24). Polimorfizmlerdeki farklılığı bölgesel nedenlerden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kardeş sayısı, bebeklik döneminde sık enfeksiyon geçirilmesi, yaşamın ilk altı ayında kreşe gitme, evde hayvan beslenmesi ile polimorfizm arasında anlamlı bir birliktelik saptanmamıştır. Polimorfizmden bağımsız olarak değerlendirildiğinde, çalışma grubundaki olguların hiç kardeş olmama oranı kontrol grubundakilere göre daha yüksek; kardeş olma oranı da çalışma grubuna göre daha düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,36$). Bebeklik döneminde sık enfeksiyon geçirilme oranları her iki grupta da birbirine çok yakın oranlarda saptanmış olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yaşamın ilk 6 ayında kreşe devam etme açısından bakıldığında, hasta grubundaki olguların kreşe devam etme oranı kontrol grubuna göre daha düşük oranda bulunmuş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,08$). Polimorfizmden bağımsız olarak, hayvan epitelleri ve artıkları ile erken temasın alerjenik duyarlanmayı engelleyebileceği görüşüne paralel şekilde (25), evcil hayvan beslenme oranları kontrol grubunda çalışma grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Bu anlamlılık, ailelerin astım ve alerjik hastalıklardan korunma konusunda bilinçlendirilmiş olmalarından kaynaklanıyor olabilir.

Astım ve atopinin karakteristikleri ile TLR2 polimorfizmi arasındaki bağlantı açısından çalışmamız değerlendirildiğinde total serum IgE düzeyi, deri prick testi reaktivitesi, deri testindeki duyarlılık sayısı ve serum eozinofil düzeyleri açısından herhangi bir birliktelik saptanmamıştır. TLR4 ve TLR2 genlerindeki polimorfizmlerin çevresel faktörlerle etkileşerek alerjik hastalıklardan koruyucu etkiyi düzenlediği gösterilmiştir. Astım ve alerjik hastalık gelişmesinde gen ve çevre etkileşiminin önemini ortaya koyan bir çalışmada TLR2'deki polimorfizmlerin PAMP maruziyetine bağlı olarak, özellikle çiftlik ortamında yaşayan çocuklarda azalmış atopi ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (26). Avusturya ve Almanya'nın kırsal kesimlerinde yaşayan çocuklarda ALEX çalışması çerçevesinde yapılan bir çalışmada TLR2-16934 T alleli taşıyan çiftçi çocuklarında astım, alerjik rinit ve atopi prevalansı daha düşük bulunmuştur. Endotoksin maruziyetinin alerjenik duyarlanmayı etkilediğini destekleyen bir çalışma da Avusturya'da yapılmıştır. Bu çalışmada çiftçi çocuklarındaki pozitif DPT oranı %18,8 bulunurken, çiftlik ortamında yaşamayan çocuklardaki oran %32,7 bulunmuştur (27). Buna karşılık 137 Japon aileyi kapsayan bir çalışmada bu polimorfizm ile astım veya IgE düzeyi arasında herhangi bir birliktelik saptanmamıştır (28). Yüksek oranda endotoksin içeren ortamda yaşayan çiftçi çocuklarının periferik kan lökositlerinde, daha düşük endotoksin içeren ortamda yaşayan çocuklara oranla artmış düzeyde TLR2 ve CD14 ekspresyonu

gözlemlenmiş olması enfeksiyon olarak karşımıza çıkmasa da doğal immun yanıtların düzenlenmesinde TLR2'nin rolü olduğunun güçlü bir kanıtı olarak görülmektedir (29).

Bizim sonuçlarımızın atopi ve alerjik hastalık gelişmesinde TLR2'nin rolü olmadığını göstermesinin olgularımızın daha çok kentsel ortamda yaşıyor olmalarından ve mikrobiyal ürünlerle temaslarının kırsal kesime oranla daha az olmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

LPS reseptörlerindeki polimorfizmler ile astım veya diğer alerjik hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur. Çalışmamızda endotoksin düzeyi ölçülmemiş olup LPS reseptörü TLR4 ile astım ve atopik hastalık gelişmesi yanı sıra astım ve alerjik rinitteki total IgE, serum eozinofil düzeyi gibi laboratuvar bulguları yanı sıra deri prick testindeki duyarlanma ve duyarlanma sayısı da istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik saptanmamıştır. Yine bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Japonya'da astımlı 336 aile ve 179 kontrolden oluşan, endotoksin düzeyinin ölçülmediği bir çalışmada Yang ve ark. (30) Asp299Gly TLR4 alleleline sahip olmak ile astım arasında birliktelik saptanmamış, fakat bu polimorfizm ile yaşlı astımlılardaki şiddet skorlarının kötüleşmesi arasında birliktelik olduğunu göstermişlerdir. Yine Japonya'da 32'si astımlı 137 aile, 133 astımlı olgu ve 190 kontrolden oluşan bir çalışmada TLR2 ve TLR4 polimorfizmleri ile ne total IgE düzeyleri ne de astımın ortaya çıkması arasında herhangi bir birliktelik saptanmamış, çalışmamızda olduğu gibi astımlı olgular ve kontroller arasında genotipik dağılım arasında belirgin fark gözlenmemiştir (31).

Literatürde TLR polimorfizmleri ile atopik hastalıklar arasında birliktelik olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Arbour ve ark. (32) Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmi olan olgularda endotoksin inhalasyonu sonucu FEV-1'de belirgin düşme olduğunu göstermişler ve bu polimorfizmlerin fonksiyonel değişikliklere yol açtığını bildirmişlerdir. Werner ve ark. (33) 20-44 yaş arası 334 bireyi Asp299Gly ve Thr399Ile TLR4 mutasyonları açısından taramış, yanı sıra endotoksin maruziyeti yönünden de bireylerin oturma odalarından alınan toz örneklerinde ölçümler yapmışlardır. Asp299Gly ve Thr399Ile TLR4 alleli taşıyan yetişkinlerde; yaşanan ortamdaki daha yüksek endotoksin düzeyleri ile astım gelişme olasılığı ve yakın zamanda hisli görülmesi arasında birliktelik saptamışlardır.

TLR4 polimorfizminin fonksiyonel etkilerini ortaya koyan bir çalışma İsveç'te yapılmıştır. Bu araştırmacılar Asp299Gly varyant allel taşımanın astım riskini 4 kat, atopik astım riskini 7 kat arttırdığını bildirmişlerdir. Bunun nedeninin varyant allel taşıyan olguların periferik kan mononükleer hücrelerinin lipopolisakkaridle uyarılmaya daha düşük oranda IL-12 ve IL-10 yanıtı vermeleri olduğu öne sürülmüş ve endotoksinlere yetersiz yanıtın Th2 aracılı hastalıklar için yüksek risk faktörleri arasında yer aldığı sonucuna varmışlardır (34).

Sonuç olarak, bizim çalışmamız endotoksin reseptörleri olan TLR2 ve TLR4'ün sinyal yolundaki genetik varyantların astım ve alerjik rinit üzerinde etkisi olmadığı görüşünü desteklemektedir. Doğumdan itibaren yapılacak prospektif çalışmalar, bu sinyal yolundaki değişikliklerin daha iyi anlaşılması yanı sıra çevresel etkenler konusunda da değerli bilgiler verecektir. Bu konudaki prospektif çalışmalar,

endotoksin maruziyetinin atopi ve astımdan ya da her ikisinden koruyucu etkisi olup olmadığını belirleyecektir. Endotoksin duyarlılığını ve endotoksine yanıtı etkileyen genetik polimorfizmler ve mutasyonlar konusunda daha güçlü markırlara gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW, et al. International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* 1995; 8: 483-91.
2. Xuan W, Marks GB, Toelle BG, Belousova E, Peat JK, Berry G, Woolcock AJ. Risk factors for onset and remission of atopy, wheezy and airway hyperresponsiveness. *Thorax* 2002; 57: 104-9.
3. Sieling PA, Modlin RL. Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5:70-5.
4. Qian FH, Zhang Q, Zhou LF, Jin GF, Bai JL, Yin KS. Polymorphisms in the toll-like receptor 2 subfamily and risk of asthma: a case-control analysis in a Chinese population. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; 20: 340-6.
5. Güven B, Can M. Çeşitli Hastalıklarda Toll Benzeri Reseptörlerin Rolü. *Sakaryamj* 2012; 2: 1-10.
6. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NHLBI/WHO Workshop Report. National Institute of Health. Publication no:95-3659. 1995.
7. International Rhinitis Management Working Group. International consensus report on the diagnosis and management of rhinitis. *Allergy* 1994; 49(19 Suppl): 1-34.
8. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R; Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59: 469-78.
9. Upham JW, Holt PG. Environment and development of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:167-72.
10. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-8.
11. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immunol* 2001; 69: 1477-82.
12. Hussein YM, Awad HA, Shalaby SM, Ali AS, Alzahrani SS. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and susceptibility to asthma and allergic rhinitis: a case-control analysis. *Cell Immunol* 2012; 274: 34-8.
13. Caramalho I, Lopez-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003; 197: 403-11.
14. Fagerås Böttcher M, Hmani-Aifa M, Lindström A, Jenmalm MC, Mai XM, Nilsson L, Zdolsek HA, Björkstén B, Söderkvist P, Vaarala O. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 561-7.
15. Berdeli A, Celik HA, Ozyürek R, Dogrusoz B, Aydin HH. TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *J Mol Med (Berl)* 2005; 83: 535-41.
16. Kutukculer N, Yeniay BS, Aksu G, Berdeli A. Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor-2 gene in children with recurrent febrile infections. *Biochem Genet* 2007; 45: 507-14.
17. Pandey RC, Michel S, Tesse R, Binia A, Schedel M, Liang L, Klopp N, Franke A, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Laub O, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Illig T, Kabesch M. Genetic variation in the Toll-like receptor signaling pathway is associated with childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 602-5.
18. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-60.
19. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis." *Thorax* 2000; 55 Suppl 1:S2-10.
20. Calvani M Jr, Alessandri C, Bonci E. Fever episodes in early life and the development of atopy in children with asthma. *Eur Respir J* 2002; 20: 391-6.
21. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347:869-77.
22. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343: 538-43.
23. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-91.
24. Saçkesen C, Karaaslan C, Keskin O, Tokol N, Tahan F, Civelek E, Soyer OU, Adaloglu G, Tuncer A, Birben E, Oner C, Kalayci O. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 2005; 60: 1485-92.
25. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343: 538-43.
26. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD; ALEX Study Team. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 482-8.
27. Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M. Austrian children living on farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 194-200.
28. Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M, Arinami T. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 177-83.
29. Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufe A, Herz U, von Mutius E, Nowak D, Riedler J, Waser M, Sennhauser FH; ALEX study group. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 2002; 360: 465-6.
30. Yang IA, Barton SJ, Rorke S, Cakebread JA, Keith TP, Clough JB, Holgate ST, Holloway JW. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun* 2004; 5: 41-5.
31. Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M, Arinami T. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 177-83.

32. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-91.
33. Werner M, Topp R, Wimmer K, Richter K, Bischof W, Wjst M, Heinrich J. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 323-30.
34. Fagerås Böttcher M1, Hmani-Aifa M, Lindström A, Jenmalm MC, Mai XM, Nilsson L, Zdolsek HA, Björkstén B, Söderkvist P, Vaarala O. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced LPS-induced IL-12 responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 561-7.