



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI**

**EV TOZU AKARINA DUYARLI ASTIMLI ÇOCUKLARDA D VİTAMİNİ
KULLANIMININ İMMÜNOTERAPİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**DR. SAFA BARIŞ
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL, 2012



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ALLERJİ VE İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI**

**EV TOZU AKARINA DUYARLI ASTIMLI ÇOCUKLARDA D VİTAMİNİ
KULLANIMININ İMMÜNOTERAPİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**DR. SAFA BARIŞ
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Işıl Barlan**

Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komite'sinden **SAG-C-TUP-070211-0037**
protokol numarası ile desteklenmiştir.

İSTANBUL, 2012

ÖNSÖZ

Marmara Üniversitesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Uzmanlık eğitimi süresince her zaman desteğini hissettiğim, çalışma isteğini daima içinde barındıran ve bizleri bu yönde teşvik eden değerli hocam ve tez danışmanım, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Işıl Barlan'a,

Bilgi ve deneyimlerini paylaşarak hasta yaklaşımında ve bilimsel çalışmalarda farklı bakış açısı sunan ve bana bu yönde büyük faydası olan eksikliğini hissettiğim hocam Prof. Dr. Nerin Bahçeciler'e,

Eğitimim süresince çalışma disiplinini ve dürüstlüğüne örnek aldığım ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum hocam Doç. Dr. Cevdet Özdemir'e,

İmmünolojinin deneysel çalışmalarında, laboratuvar ortamının sağlanması ve çalışmaların yürütülmesinde katkılarından dolayı Doç. Dr. Tunç Akkoç'a,

Berber çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım; Dr. Elif Karakoç Aydın, Dr. Hasret Çağan, Dr. Ayça Kıyıkım, Dr. Hülya Sarıçoban ve Özlem Yiğit'e

Değerli dostum Dr. Ahmet Özen'e,

Tüm Çocuk İmmünoloji Labratuvarında çalışan mesai arkadaşlarıma,

Çalışmadaki immünoloji parametrelerinin değerlendirilmesinde emeği geçen Dr. Aysin

Tulunay'a,

Mesleki olarak gelişmemde büyük katkı sağlayan hastalarım,

Beni yetiştiren ve her zaman yanımda olan aileme

Teşekkür ederim.

Dr.Safa Barış

ÖZET:

Giriş: D vitamininin allerjik hastalıkların patogeneziindeki rolü son yıllarda ilgi çeken bir araştırma alanıdır. Çocuk çağı astımdaki rolüyle ilgili kısıtlı bilgiler olmasına rağmen allerjen immünoterapisinde henüz çalışılmamıştır. Bu çalışmada, ev tozu akarına duyarlı astımlı çocuklarda D vitamininin allerjen immünoterapisine ek olarak verilmesinin etkinlik, güvenilirlik ve T regulator hücre yanıtı üzerine etkisi çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ev tozu duyarlılığı olan 50 astımlı çocuk çalışmaya dahil edildi. Açık, kontrollü ve ileriye dönük olarak izlenen hastalar: Grup I (n=17): cilt altı immünoterapisi + günlük D vitamini, Grup II (n=15): sadece cilt altı immünoterapi, Grup III (n=18): sadece farmakoterapi alanlar olarak ayrıldı. Çalışma başlangıcında, 6. ve 12. ayda hastalardan semptom ve ilaç skorları kaydı alındı. Ek olarak hastalara görsel analog skalası uygulandı. Serum total IgE, ev tozu spesifik IgE, serum 25 (OH) D düzeyi belirlendi. Aynı zamanda allerjen cilt prik testi, solunum fonksiyon testi, bronş provokasyon testi yapıldı. Ayrıca, periferik kan mononükleer hücre kültüründe ev tozu spesifik uyarım sonucunda flow sitometride T regulator hücreler (CD4+CD25+Foxp3+) ayrılarak analiz edildi. Hücre içi FOXP3 ölçümü yapıldı. Periferik kan mononükleer hücre kültürü üst sıvısında TGF- β sitokin yanıtı çalışıldı.

Sonuçlar: İmmünoterapi'ye eklenen D vitamininin 6.aydan itibaren astım semptom skorlarını grup II ve III'e göre ve kortikosteroid kullanım miktarını ise grup III'e göre anlamlı olarak azalttığı görüldü. Benzer olarak astım görsel değerlendirme skalasının 6.aydan itibaren D vitamin alan grupta, grup III'e göre anlamlı olarak azaldığı saptandı. Bazal D vitamini düzeyine göre değerlendirildiğinde ise; D vitamini seviyesi ile yıllık geçirilen atak sayısı arasında anlamlı negatif korelasyon saptandı. Deri testi çaplarında 6. ve 12. ayda immünoterapi grubunda farmakoterapiye göre anlamlı küçülme gözlemlendi. Bazal D vitamin düzeyine göre değerlendirildiğinde, olguların %58'inde yetersizlik, %42'sinde normal vitamin D düzeyi saptandı. Spesifik IgE (DF) miktarının sadece D vitamini alan grupta düştüğü görüldü. Çalışma sonunda, en yüksek T regulator hücre oranı ve FOXP3 ekspresyonu D vitamini alan grupta gözlemlendi.

Sonuç: Astımlı çocuklarda allerjen immünoterapiye ek olarak verilen vitamin D hastalık kontrolünü daha erken dönemde sağlamış, inhale kortikosteroid dozunu azaltabilmiş ve klinikte sağlanan bu iyileşme, allerjen ile uyarılmış T regulator hücre yüzdesi ve hücre içi

FOXP3 gösteriminin artışı ile ilişkili bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar allerjen immünoterapisinde vitamin D'nin adjuvant olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *İmmünoterapi, allerji, astım, çocuklar, D vitamini.*

ABSTRACT:

Background: Recently, there is a growing interest about the role of vitamin D on pathogenesis of allergic diseases. The impact of vitamin D on allergen immunotherapy has not been studied, yet. We aimed to investigate the efficacy, safety and T regulatory cell response of vitamin D as an adjunct to allergen immunotherapy (IT) in children sensitized to house dust mite.

Methods: Fifty children with asthma sensitized to house dust mite were randomized to 3 groups as; I (n: 17): SCIT and vitamin D supplementation (650 U/day), II (n: 15): SCIT alone and III (n: 18): Asthma patients receiving pharmacotherapy alone. All the patients were evaluated at baseline, 6th and 12th of therapy for the symptom, medication and visual analog scorings, skin prick testing, levels of serum vitamin D, total IgE and specific IgE. Parameters of respiratory lung function and bronchial provocation were measured, as well. In addition, D. pteronyssinus (DP) induced CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cell, intracellular FOXP3 expression and peripheral blood mononuclear cell TGF- β responses were assessed at baseline, 6th and 12th of therapy.

Results: Use of vitamin D as an adjunct to IT was more efficient than all the other groups in reducing the asthma symptom scores and corticosteroid dosage compared to group III at 6 months of IT. In addition, asthma visual analog scoring was more significantly reduced at 6 months when compared to pharmacotherapy group. In all subjects, baseline vitamin D levels demonstrated negative correlation with the annual asthma attack numbers. The diameter of skin testing reduced statistically in all IT groups when compared to pharmacotherapy. According to the baseline vitamin D levels, 58% children diagnosed as insufficient and 42% (n: 21) as normal. Furthermore, serum specific IgE (DF) decreased only in vitamin D group. At the end of study, vitamin D supplemented subjects demonstrated a higher percentage of Derp-1 induced T reg cells and FOXP3 expression in lymphocytes.

Conclusion: Our study provided evidence that the addition of vitamin D to allergen specific IT enhances control of asthma and reduces the inhaled corticosteroid dosage at an earlier stage. This beneficial effect is accompanied by an increased percentage of Derp-1

induced T regulatory cell and expression of FOXP3 in lymphocyte of children with asthma. Our results suggest use of vitamin D as an adjunct for allergen immunotherapy in patients with allergy.

Key words: *Immunotherapy, allergy, asthma, children, vitamin D.*

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER	x
KISALTMALAR	xi
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Astımın tanımı	3
2.2. Patogenez	3
2.3. Astımda tanı	6
2.3.1. Anamnez	6
2.3.2. Fizik muayene	6
2.3.3. Tanıda yardımcı testler	7
2.3.3.1. Solunum Fonksiyon Testleri	7
2.3.3.2. Provokasyon testleri	7
2.3.3.4. Deri Testleri	8
2.3.3.5. Serum Total Ig E ve Allerjen Spesifik Ig E düzeyleri	8
2.4. Tedavi	8
2.4.1. Farmakoterapi	9
2.4.1.1. Semptom giderici ilaçlar	9
2.4.1.2. Kontrol edici ilaçlar	9
2.4.1.3. Astımlı hastalarda tedavinin izlemi	11
2.5. Allerjen özgü immünoterapi	14
2.5.1 Tanım ve tarihçe	14
2.5.2. Subkutan SİT	15

2.5.3. İmmünoterapi uygulama endikasyonları ve kontrendikasyonları	16
2.6. Allerjik hastalıklarda D vitamini ve önemi	17
2.6.1. D vitamini metabolizması	17
2.6.2. D vitamini ve immün sistem	17
2.6.3. D vitamini ve allerjik hastalıklar	20
III. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Gruplar ve izlem	22
3.2. Çalışmaya alınma kriterleri	22
3.3. Çalışmadan çıkarılma kriterleri	23
3.4. Semptom - Medikasyon Skorlaması	25
3.5. Görsel Değerlendirme Skorlaması	25
3.6. Prik Deri Testi	25
3.7. Solunum Fonksiyon Testi	26
3.8. Bronkodilatatörlü Solunum Fonksiyon Testi	26
3.9. Bronşial Provokasyon Testi	27
3.10. Serum Total IgE, Spesifik IgE ve 25 hidroksi D vitamini ölçümü	27
3.11. Periferik kandan lenfosit izolasyonu ve hücre kültürü	27
3.12. Allerjene Özgü İmmünoterapi	29
3.13. İstatistiksel Analizler	30
IV. BULGULAR	31
4.1. Klinik Verilerin Değerlendirilmesi	31
4.1.1. Semptom Skorlarının Değerlendirilmesi	33
4.1.2. Görsel Değerlendirme Sakalas (VAS)	35
4.1.3. Medikasyon Skorlarının Değerlendirilmesi	36
4.1.4. Farmakoterapi Grubuna Göre İyileşme Oranlarının Değerlendirilmesi	38
4.1.5. Kortikosteroid Kesme Oranları Değerlendirilmesi	39
4.1.4. Yıllık Atak Sayısı	39
4.1.7. Tedavi Sırasında Görülen İmmünoterapi Yan Etkileri	40
4.2. Laboratuvar Testlerinin Değerlendirilmesi	41
4.2.1. Solunum Fonksiyon Testi, Reversibilite, non-Spesifik Bronşiyal Reaktivite Parametreleri	41
4.2.2. Cilt Allerji Testi, Spesifik IgE ve Kanda Eozinofili Ölçümü	41
4.2.3. Bazal Vitamin D Düzeyinin Klinik ve Laboratuvar Bulgularla İlişkisi	42

4.2.4. Vitamin D Kullanımı Sırasında Görülen Yan Etkiler	42
4.3. İmmünolojik Çalışmalar	43
V.TARTIŞMA	47
VI. SONUÇLAR	52
VII. KAYNAKLAR	54
VIII. EKLER	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo-1	Astım Sınıflaması
Tablo-2	Astım Kontrol Seviyeleri
Tablo-3	Astımda Basamak Tedavisi
Tablo-4	Hastaların demografik özellikleri
Tablo-5	Tedavi gruplarının klinik verilerinin değerlendirilmesi
Tablo-6	Grupların laboratuvar testleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1	Çalışmanın özeti ve değerlendirilen parametreler
Şekil-2	İmmünoterapi verilme şeması ve 1 yıllık verilen major allerjen miktarları
Şekil-3	T regulatuar hücrelerin flow sitometride gösterilmesi
Şekil-4	SKIT + D vit., SKIT ve farmakoterapi grupları arasında total astım skoru
Şekil-5	SKIT + D vit., SKIT ve farmakoterapi gruplarında total semptom skoru
Şekil-6	VAS değerlerinin aylara göre dağılımı
Şekil-7	Gruplar arasında total medikasyon skorları
Şekil-8	Günlük kortikosteroid ihtiyacı
Şekil-9	Kortikosteroid kesilme yüzdeleri
Şekil-10	Bazal D vitamini düzeyi ile yıllık geçirilen atak sayısı
Şekil-11	Gruplar arası SPT çap değerlendirilmesi
Şekil-12	Gruplar arasında T regulatuar hücre yüzdeleri
Şekil-13	Gruplar arasında FOXP3 ekspresyon oranları
Şekil-14	Gruplar arasında Derp1 ile uyarılmış TGF- β sonuçları

KISALTMALAR

ASNPT	Allergen spesifik nazal provokasyon testi
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
BHR	Bronşial Hiperreaktivite
D.F.	<i>Dermatophagoides Farinae</i>
D.P.	<i>Dermatophagoides Pteronyssinus</i>
FT	Farmakoterapi
NKT	Doğal öldürücü T hücreler
RAST	‘Radioallergosorbent test’
SKIT	Subkutan İmmünoterapi
SIT	Spesifik immunoterapi
SLIT	Sublingual immunoterapi
SMS	Semptom ve medikasyon skoru
SPT	‘Skin prick test’ prick deri testi
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktör
Th	Yardımcı T Hücreleri
Treg	Regulator T hücreler
US	‘Unstimulated’ uyaransız
VAS	Görsel analog skalası
FOXP3	Forkhead box P3
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
25(OH)D	25 hidroksi D vitamini
1,25 (OH)₂ D	1, 25 hidroksi D vitamini
Derp 1	Rekombinant <i>Dermatophagoides Pteronyssinus</i> 1
ELİSA	Enzyme linked immunosorbent assay
PC20	FEV1’de %20 düşüşe neden olan provokatif konsantrasyon
PD20	FEV1’de %20 düşüşe neden olan provokatif konsantrasyon
RPMI	Roswell Park memorial Institute
TAS	Total astım skoru
TRS	Total rinit skoru
TSS	Total semptom skoru
TMS	Total medikasyon skoru
STAT	Signal transducer and activator of transcription

I.GİRİŞ ve AMAÇ

Allerjik hastalıklar çocukluk çağının en sık görülen kronik hastalıklardandır (1). Bu hastalıklar içinde en sık karşılaşılan astımın tedavisinde; öksürük, nefes almada zorlanma, hızlı nefes alma gibi bulguların kontrol altına alınması amaçlanır. Günümüzde astımda kullanılan en önemli ilaçlar antiinflamatuvar özelliğe sahip olan kortikosteroidler olup, özellikle çocukluk yaş grubunda ilk basamak tedavi olarak tercih edilmektedir. Ancak kortikosteroid kullanımının hastalığın doğal seyri üzerinde etkili olmadığı bilinmektedir (2). Öte yandan, immünoterapi allerjen duyarlı astım ve/veya rinit üzerinde etkinliği kanıtlanmış ve immünolojik olarak hastalık seyrini değiştirebileceği çalışmalarla gösterilmiş yegâne tedavi yöntemidir (3). İmmünoterapinin amacı, sorumlu allerjenin giderek artan dozlarda verilmesi ile allerjene spesifik T regulatuar-düzenleyici (Treg) hücrelerinin artırılmasıdır. Bu hücrelerin artışı ile klinikte semptomların baskılanması ve periferik toleransın gelişimi sağlanabilmektedir.

D vitamini ve allerjik hastalıklar arasında son yıllarda ilişki olabileceği çalışmalarda gösterilmekte ve astım sıklığının daha fazla olduğu batı ülkelerinde D vitamin düzeyinin düşük olması bu ilişki olasılığını güçlendirmektedir (4). Modern yaşam koşulları nedeniyle özellikle güneş ışınlarına maruziyetin azalması, fiziksel aktivitenin kısıtlanması ve günlük yaşamın çoğunun kapalı ortamda geçirilmesi, vücutta yetersiz 25 hidroksi D vitamini (25(OH)D) üretimi ile sonuçlanmaktadır (5). Ülkemizde yapılan çalışmalarda D vitamini eksikliğinin sıklığı %2-19 arasında değiştiği gösterilmiştir (6). Bu oranın ergenlik çağı ve düzensiz beslenme durumu ile arttığı saptanmıştır (7). Astım hastalığının sıklığı ve şiddeti ile 25(OH)D yetersizliğini ilişkilendiren çalışmaların (8, 9) yanı sıra, D vitamini yetersiz olan gebelerde vitamin desteğinin uygulanması ile çocuklarda hışıltı sıklığının anlamlı derecede azaldığı bildirilmiştir (4). Diğer taraftan gebelik sırasında yüksek D vitamini düzeyi bulunan gebelerin çocuklarında astım ve egzamanın daha fazla olduğu görülmüştür (10). Çalışmalardan ortaya çıkan sonuçlar göz önünde alındığında allerjik hastalıklar ile D vitamini arasındaki ilişkiyi gösterecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

D vitamininin atopi ve astım gelişimi üzerindeki etkisi çeşitli mekanizmalar ile açıklanmaya çalışılmıştır. Aktif 1, 25 hidroksi D (1,25 (OH)₂ D) vitamini ile uyarım sonrası insanlardan izole edilen monosit kaynaklı antijen sunan hücrelerin daha fazla tolerojenik olduğu ve IL-10 salgılanmasının artmasının yanında, allereaktif T hücrelerinin interferon- α (IFN- α) salgısının

azaldığı görülmüştür (11). Tolerogen antijen sunucu hücrelerin Treg hücre miktarını artırması D vitaminin bu yolla etki edebileceğini göstermektedir (12). Buradan yola çıkarak, allejen ile yapılan immünoterapide ek olarak D vitamini kullanımının yararlı olabileceğini düşündürebilir. Bu konuda yapılan tek bir çalışmada oral steroid ve immünoterapi alan astımlı çocuklarda steroid tedavisinin Treg üzerindeki negatif etkisinin D vitamini kullanımı ile engellendiği bulunmuştur (13). Ancak, immünoterapi tedavisinin etkinliğinin artırılması amacıyla D vitamini kullanımı ve immün düzenleyici fonksiyonu ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, Marmara Üniversitesi Çocuk Allerji ve İmmunoloji Bilim Dalı tarafından takip edilmekte olan ev tozu akarına duyarlı astımlı çocuklarda D vitamininin allerjen immünoterapisine ek olarak verilmesinin etkinlik, güvenilirlik ve T regulator hücre yanıtı üzerine etkisi çalışılmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. Astımın tanımı

Astım, çeşitli uyaranlara karşı artmış hava yolu duyarlılığı ve geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonu ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Hava yolundaki inflamasyon bronş mukozasında yapısal değişikliklere, dolayısı ile bronşial hiperreaktiviteye neden olur. Bunun sonucunda hışıltı, gece ve sabah erken saatlerde artan öksürük, solunum zorluğu, göğüs sıkışıklığı gibi klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bulguların şiddeti altta yatan infamasyona bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (2, 14).

2.2. Patogenez

Astım patogenezinde en önemli mekanizma hava yolu enflamasyonudur. Enflamatuvar süreç başlaması ile bronş duvarında hiperreaktivite, bronkokonstriksiyon, mukozal ödem ve mukus hipersekresyonu meydana gelmektedir. İnflamatuvar sürecin uzaması sonucu bronş epitel hücrelerinde hasar oluşmakta buna bağlı remodelling süreci başlamaktadır. Bu olaylar zincirinde immün sistem hücrelerinden efektör T hücreleri, B hücresi, antijen sunan hücreler, doğal öldürücü (NK) T hücreleri, Treg, epitelyum hücreleri ve üretilen sitokinler görev almaktadır (2).

Allerjik enflamasyon ilk fazda allerjen ile karşılaşan dendritik hücre antijeni hücre içine alır ve işlem sonrası MHC-II eşliğinde naiv CD4⁺ T hücre reseptörüne sunar. Sunum sonrası naiv CD4⁺ T hücresi, Th2 tipi efektör hücreye farklılaşır. Th2 hücresi, IL-4 ve IL-13 üreterek B lenfositlerde allerjene özgü IgE yapımına neden olur. Mast ve bazofil yüzeyinde yer alan yüksek afiniteli FcεRI reseptörüne bağlanarak sensitizasyonu sağlar. İkinci fazda olarak tanımlanır ve olguların tekrar aynı antijen ile karşılaşmaları durumunda özgül IgE mast hücresi üzerinde köprüleşme oluşturacak şekilde bağlanırsa (galektin-3 aracılığıyla) saniyeler içinde granüllerde hazır bulunan histamin, nötral proteazlar ve proteoglikanın ortama salınımı gerçekleşir (15). IL-1, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-8 için transkripsiyon başlatılır. Histamin salınımı ile vazodilatasyon ve bölgede hücrelerin çoğalmasıyla enflamasyon başlamış olur.

Dendritik hücreler (DH), allerjenin T hücrelere tanıtılmasında ve efektör hücrelerin allerjik enflamasyonu başlatmasında önemli rol oynar. Dendritik hücreler, cilt, mukoza, intestinal lamina propria ve akciğerlerde hava yolu epitelinin bazolateralinde antijenle karşılaşmadan

önce immatür halde bulunurlar. Bu immatür dendritik hücreler, antijeni Toll-like reseptör, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domain-like reseptör veya C-tipi lektin reseptörü aracılığıyla alır ve T hücrelerin zengin olduğu lenf nodlarına ortamda bulunan CCR7 ve CCR8 sayesinde göç ederler. Bu sırada fenotipik ve fonksiyonel birtakım değişikliklere uğrayarak; MHC-I ve MHC-II ve CD80 ve CD86 kostimülör moleküllerinin ekspresyonu artırır (15, 16). Bunun sonucunda T hücrelerine işlenmiş antijen sunulmasıyla inflamasyon başlamış olur. Akciğerlerde Th2 yönünde farklılaşmada plazmositoid tipte DH'ler görev alır. Bu hücreler aynı zamanda DH2 olarak adlandırılır. Th2 yönünde hücre oluşumunda, basofillerden IL-4, IL-13, NKT hücrelerinden IL-4, IL-13, IL-17 ve epitelium hücrelerinden IL-25, IL-33, granulosit-monosit koloni-stimulan faktör (GM-CSF) ve timik stromal lenfopoietininin (TSLP) salınımı katkıda bulunur (15).

Enflamasyonun ilerlemesiyle epitel hücrelerinden eotaxin, CCL11, RANTES/CCL5, MCP/CCL2 gibi mediatörler ve PDGF gibi büyüme faktörleri salgılanır. Bu mediatörlere ek olarak Th2 ve mast hücreleri tarafından salınan IL-3, IL-5 ve GM-CSF sayesinde ortamda eozinofil toplanması gerçekleşir. Aktifleşen eozinofillerin salgıladığı major basic protein (MBP), nörotaksin, peroksidaz, eozinofilik katyonik proteine bağlı olarak bronş duvarında hasar meydana gelir (17). Hasar sonucu daha fazla bazofil ve mast hücre aktivasyonu gerçekleşerek tetiklenmiş enflamasyonun uzamasına artışı sağlanır. Eozinofilleenden salgılanan önemli miktardaki TGF- β , hava yolunun yeniden yapılandırılmasında önemli rol oynayan faktörlerden biridir (15).

T lenfositler astım immünopatogenezinde önemli rol oynayan hücrelerdir. Antijen sunucu hücreler ortamda bulunan sitokinlerin yoğunluğu, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak naiv T (Th0) lenfositlerini çeşitli alt hücre tiplerine çevirir. Bunlar arasında astımlı ilişkili olabilecek olanlar, Th2, Th9, Th17'dir (15).

Th2 lenfositler allerjik enflamasyonda esas rolü oynayan hücrelerdir. Ortamda bulunan özellikle bazofil kaynaklı IL-4 varlığında, STAT-6 aktivasyonu, buna bağlı olarak GATA3 (trans-acting T-cell-specific transcription factor) transkripsiyon faktörü yapımı artar ve Th2 yönünde farklılaşma gerçekleşir (18). Th2 hücreleri, uyarıldıklarında IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 sitokin yapımı artar. IL-4 ve IL-13, B hücrede sınıf çevrimi ile IgE yapımına, IL-4, IL-9, IL-13 mast hücre toplanmasına, mukus sekresyonuna ve bronş hiperreaktivitesine, IL-5, eozinofil kemotaksisi ve maturasyonuna, IL-4 bazofil maturasyonuna neden olur (19, 20).

Th9 lenfositler yeni tanımlanmış hücre grubudur. Naive T lenfositlerden TGF- β ve IL-4 varlığında oluşabileceği gibi, TGF- β uyarımı ile Th2 hücre farklılaşmasıyla da oluşabilir (21). IL-9 mast hücre büyümesi, aktivasyonu, IgE yapımında görev alır. Astımlı olgularda IL-9 ve IL-9R'ünün akciğer dokusunda artığı gözlenmiş, aşırı IL-9 salgısı, mukus sekresyonu, bronşiyal hiperreaktiviteyle ilişkili bulunmuştur (15).

Th17 lenfositler, enflamatuvar hastalıklarda artmış olarak bulunan hücre tipidir (22). Özellikle enflamatuvar barsak hastalıkları, romatoid artrit, psöriasis gibi hastalıklarda IL-17'nin önemli rolü olduğu gözlenmiş, eksikliği yeni tanımlanmış otozomal dominant ve resesif Hiperimmünglobulin E sendromu ile ilişkili bulunmuştur (23). Th0 hücreleri IL-6 ve TGF- β varlığında STAT-3 yolağını kullanarak retinoid related orphan receptor (ROR) γ t transkripsiyon faktörüne bağlı olarak Th17 yönüne farklılaşır. Bu hücrelerden salgılanan IL-17A nötrofiller için önemli kemoatraktan olarak görev yaparak nötrofillerin özellikle nonatopik astımlı hastaların akciğer dokusunda toplanmasına aracılık eder. Yapılan yeni çalışmalarda IL-17 sitokin kaynağı olabilecek hücreler arasında NKT ve $\gamma\delta$ T de bulunmuş, bu hücrelerin de astımlı hastaların bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısında artığı görülmüştür (24).

Th lenfosit grubunda yer alan Th1 hücreleri allerjik hastalıkların oluşumuna karşıt hücreler olarak tanınır. Ortamda bulunan DH1 hücresi, IL-12 varlığında naive Th0 hücresini, STAT4 yolağını kullanarak T-bet transkripsiyon faktörüne bağlı olarak Th1 hücre grubuna dönüştürür (15). Otoimmün hastalıklar, geç tip allerjik reaksiyonların oluşumunda etkili olan Th1 hücreleri, hücre içi patojenlerin öldürülmesinde önemli rol oynar. IFN- γ sitokin salgısı yaparak allerjik enflamasyonu baskılayabilirler (25).

T regulatuar hücreler timus kökenli CD4+CD25+FoxP3+ T regulatuar hücreler (doğal Treg) ve antijenik maruziyet sonrası IL-10 salgılayan Tr1 (adaptif Treg) regulatuar T hücreler olarak 2'ye ayrılır. Oral yolla antijenin alınmasıyla gelişen ve TGF- β , IL-4 ve IL-10 salgılayan Th3 (indüklenebilen T reg) tipi hücreler de mevcuttur (26). Periferik dokuda (özellikle barsak sistemindeki lenfoid sistem) CD4+CD25+FoxP3- hücre grubu retinoik asit ve TGF- β varlığında, indolamin 2, 3 dioksigenaz enzimi sayesinde CD4+CD25+FoxP3+ tipi Th3 hücrelere dönüşme özelliğine sahiptir (27). CD4+CD25+ T hücre, supresif görevini, IL-10, TGF- β ve CTLA-4 (cytotoxic T- lymphocyte antigen - 4), PD-1 (programmed death-1), BTLA (B and T lymphocyte attenuator) gibi bazı yüzey molekülleri aracılığı ile

göstermektedir (28). Bu hücreler direkt hücre teması veya salgıladığı IL-10 ve TGF- β sitokinleriyle Th1, Th2, Th17 hücreleri baskılar (29). IL-10 ve TGF- β , IgE yapımını azaltırken blokan antikor yapımını indükler. IgG₄ ve IgA tipi bu antikorlar, allerjene bağlanmada, IgE ile yarışarak bazofil ve mast hücre aktivasyonunu engeller. Böylece proenflamatuvar mediatörlerin salınması önlenirken eozinofillerin aktivasyonu ve yaşam süreleri kısaltılır (28).

Treg hücreler dışında immün sistemi baskılayıcı özelliği olan ve IL-10 salgılayarak etki eden CD8+T hücre alt grupları, IL-10 üreten B hücreler, NK ve DH'ler, $\gamma\delta$ T, CD3+CD4-CD8- hücreleri tanımlanmıştır. Ancak bu hücrelerin astım immünopatogenezi üzerindeki etkileri tam anlaşılamamıştır (15, 29).

2.3. Astımda tanı

2.3.1. Anamnez

Öksürük, hışıltılı solunum, nefes darlığı ve göğüste sıkışma hissi astımlı hastalarda görülen temel semptomlardır. Bunların biri ya da birkaçı birlikte olabilir. Astımlı hastalarda bazı bulgular hastalığın tanısının konulmasında yardımcı olmaktadır. Bunların en önemlisi semptomların süregen olmamasıdır, hastaların tamamen normal olduğu dönemler vardır. Geceleri öksürük şikayetlerinin artması tipiktir (2).

2.3.2. Fizik muayene

Hastaların semptomlarının olmadığı zaman genellikle fizik muayene de normaldir. Semptomatik dönemlerde ise astımda tipik muayene bulgusu oskültasyonla duyulabilen hışıltı/vizing'dir. Wheezing astımda tipik bir semptom olmasına karşın çok ağır astımlılarda yoğun hava yolu obstrüksiyonuna rağmen duyulmayabilir (sessiz akciğer). Bu hastalarda bilinç bulanıklığı, nefes darlığı, takipne, siyanoz, taşikardi, yardımcı solunum kaslarının solunuma katılması ve interkostal, sukostal retraksiyonlar görülebilir (2).

2.3.3. Tanıda yardımcı testler

2.3.3.1. Solunum Fonksiyon Testleri

Astımın özelliği olan geriye dönüşümlü bronş duvarı daralmasının ve hiperrektivitenin gösterilmesinde önemli bir testtir (30). Beş yaş üzeri çocuklara uygulanabilen bu testin tekniği, uygulama öncesinde çok iyi anlatılmalı ve üç kez yaptırılarak en yüksek değer dikkate alınmalıdır. Bir spirometre cihazında astım tanı ve izleminde genellikle dört parametre kullanılır. FVC (maksimal bir inspirasyondan sonra zorlu bir ekspirasyonla çıkarılan hava hacmi), FEV1 (zorlu ekspiryumda ilk saniye içinde çıkarılan hava miktarı), PEF (ekspiratuar zirve akım hızı), %FEF25-75 (zorlu vital kapasitenin %25'i ile %75'i kadarki ortalama akım). PEF'in büyük bronşlar, FEV1'in büyük ve orta çaplı bronşlar, FEF 25-75'in ise orta ve küçük çaplı bronşlar hakkında fikir verdiği kabul edilmektedir. Havayolu darlığını göstermede en iyi ölçüm FEV1/FVC oranıdır. Bu oran sağlıklı çocuklarda genellikle >0,90, erişkinlerde ise >0,75-0,80'dir. Daha düşük değerler havayolu obstruksiyonuna işaret eder. Bir hastanın testinde obstruksiyon saptandığında bu obstruksiyonun bronkodilatör ile geri dönüşümlü olup olmadığının tespiti gerekir. Bronkodilatatörlü solunum fonksiyon testinde bazal solunum fonksiyon testi yapıldıktan sonra değerler alınır ve sonra hastaya bronkodilatatör verilir. 15 dakika sonra test tekrarlanır ve bazal değerler ile karşılaştırılır. Bu test sonucunda FEV1'de %12 veya 200 ml ve üzerinde artış olması astımın en önemli özelliklerinden olan reversibilitenin varlığını gösterir (31).

2.3.3.2. Provokasyon testleri

Provokasyon testleri allerjik hastalıklarda görülen hiperreaktiviteyi ölçmede kullanılan testlerdendir. Spesifik (ev tozu akarı, polen allerjisi) ve nonspesifik (metakolin, ADP, manitol) uyaranlara karşı hava yolundaki daralmayı gösterir. Hava yollarındaki aşırı duyarlılık astım akut ekzaserbasyonla artmakta, antienflamatuar tedavi ile azalmaktadır. Bronş hiperreaktivitesi, kistik fibroz, allerjik rinit, bronşiektazi, kronik obstruktif akciğer hastalığı, konjestif kalp yetersizliği gibi diğer hastalıklarda ve genel popülasyondaki asemptomatik kişilerde de görülebilir. Bu nedenlerden dolayı astım için duyarlılığı yüksek, ancak özgüllüğü sınırlı bir testtir. Havayollarının metakolin gibi direkt veya mannitol gibi indirekt uyaranlara karşı verdiği bronkokonstriktör cevap spirometre ile ölçülür. Sonuçlar başlangıç FEV1 değerini %20 düşüren provokatör ajanın dozu veya konsantrasyonu (PC20) olarak ifade edilir (32).

2.3.3.4. Deri Testleri

Uygulanması kolay olan ve erken faz Allerjen duyarlılığını gösteren bir testtir. Testin pozitif sonuç için ortamda spesifik bir allerjene karşı IgE antikor, mast hücrelerinden mediyatörlerin salınabilmesi, cildin histamine cevap verebilmesi ve allerjen varlığı gereklidir. Allerjenler (1/10-1/20 dilüsyonda) 2 cm aralıklarla, pozitif (histamin), negatif (salin) ile beraber uygulanarak 15-20 dakika sonra okuma ile sonuç alınabilmektedir. Negatif kontrole göre > 3 mm kabarıklık pozitif olarak değerlendirilir. Prik testi genel olarak güvenilir olup nadir de olsa sistemik allerjik reaksiyon bildirilmiştir (genel sıklık %0,5'in altında). Bu tür reaksiyonlar ticari olmayan allerjenlerin kullanımında daha sık görülmektedir (33).

2.3.3.5. Serum Total Ig E ve Allerjen Spesifik Ig E düzeyleri

Serum total IgE

Allerji tanısında sıklıkla kullanılan in vitro test yöntemidir. Allerjik hastalıklar dışında pek çok klinik tabloda da serum total IgE seviyeleri yükselebilir. Parazitolar, çeşitli immün yetersizlikler (Wiskott-Aldrich, Hiperimmünoglobulin E sendromu), bronkopulmoner aspergilloz, IgE miyelomu, pemfigoid gibi (34). Dolayısı ile her serum total IgE yüksekliği saptanan hastada allerji tanısı koymak mümkün değildir. Yapılan çalışmalarda allerjik olguların %25'inde serum total IgE değerinin normal olduğu saptanmıştır.

Serum spesifik IgE

Spesifik IgE RAST, ELİSA, CAP sistemleri ile ölçülebilmektedir. Allerjen duyarlanmayı göstermede yaygın olarak kullanılan güvenilir bir testtir. Maliyetinin yüksek olması nedeniyle deri testini tolere edemeyen, ağır dermografizm ve atopik dermatiti olan, antihistaminik ve B bloker tedavisi alanlarda tercih edilmelidir. Testin pozitif saptanması kişinin duyarlı olduğunu gösterir. Semptomlardan sorumlu olan allerjenin anamnez ve diğer provokasyon testler ile birlikte değerlendirmesi gereklidir (35).

2.4. Tedavi

Astımda tedavinin başarılı olabilmesi çevresel önlemlere ve ilaç tedavisine düzgün olarak uyulması gerekmektedir. Atopik hastalarda sorumlu allerjen saptandıktan sonra yeterli önlemlerin alınmasıyla semptomların kontrol altına alındığı birçok çalışmada gösterilmiştir (2, 15, 36).

2.4.1. Farmakoterapi

Hava yollarındaki inflamasyonu kontrol altına alan ilaçlar tedavinin temelini oluşturur. Hastalar ilaçları kullandıkları sürece inflamasyon baskılanır, buna bağlı olarak semptomlar kaybolur, solunum fonksiyonlarında ve bronş hiperreaktivitesinde düzelme sağlanır. Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar iki ana grupta toplanabilir. Bunlar semptomları giderici ve kontrol edici ilaçlardır.

2.4.1.1. Semptom giderici ilaçlar

Hızla etki ederek bronkokonstriksiyonu düzelten, semptomları gideren ve gerektiğinde kullanılan ilaçlardır.

Kısa etkili İnhaler β_2 - agonistler, Salbutamol (albuterol), terbutalin kısa etkili β_2 agonistleridir. Siklik AMP düzeyini artırarak düz kaslarda gevşeme sonucu bronkodilatasyon sağlarlar. Ayrıca mukosilier temizliği, mast hücrelerinden mediatör salgısını da engellediği çalışmalarda gösterilmiştir. Etileri hemen başlar ve 4-6 saat süreyle devam eder. Akut astım atağında ilk tercih edilecek ilaç grubu olmanın yanı sıra hızlı etki etmesinden dolayı egzersize bağlı tetiklenmiş bronkospazmdan korumak amacıyla egzersiz öncesi tedavide yararlıdır. Bu ilaçların en önemli yan etkileri taşıkardi, tremor, ajitasyon daha nadir olarak hiperglisemi ve hipokalemidir (2, 14).

Antikolinerjikler, Kısa etkili kullanılabilen tek antikolinerjik inhaler ipratropiyum bromürün, astımlı hastada semptom giderici etkisi inhaler beta2-agonistler kadar güçlü değildir. Akut astım atağında inhaler beta2-agonistle birlikte inhaler ipratropiyum bromürün kullanılması, akciğer fonksiyonlarında anlamlı bir ek düzelme ve hastaneye yatışta azalma oluşturmaktadır. İpratropiyum inhalasyonu ağızda kuruluk ya da acı bir tat oluşturabilir (37).

2.4.1.2. Kontrol edici ilaçlar

Esas olarak antiinflamatuvar etkileri yoluyla astımın kontrol altında tutulmasını sağlamak üzere her gün ve uzun süre kullanılan ilaçlardır.

İnhale Kortikosteroidler, günümüzde persistan astımın tedavisinde kullanılan en etkili antiinflamatuvar ilaçlardır (2). Serbest kortikosteroidler, hücre membranını geçerek

sitoplazmik glukokortikosteroid reseptörleri ile birleşir. Birleşme sonucu makrokortin aktivasyonu gerçekleşir ve buna bağlı olarak fosfolipaz A2 inhibe olarak lipid kaynaklı siklo ve lipooksigenaz yolağını inhibe ederler (38). Öte yandan, GM-CSF, IL-5 gibi sitokinlerin yapımını azaltmak yoluyla dolaşımdaki eozinofillerin sayısını, yaşam süresini, degranülasyonunu ve kemik iliğinde yapımını azaltırken eozinofil apoptozunu artırır. Bronş mukozasında bulunan mast hücre, dendritik hücre ve lenfosit sayısını azaltırlar. T lenfositlerden ve makrofajlardan enflamatuvar sitokin salınımını azaltırlar. Vazokortin isimli proteinin sentezini artırarak mikrovasküler permeabilityi önlerler. Çeşitli direkt ve indirekt etkilerle mukus sekresyonunu inhibe ederler (39). Astım semptomlarının, hava yolu aşırı duyarlılığının, hava yolu inflamasyonunun, atak sıklığının ve şiddetinin azaltılması, astıma bağlı mortalitenin azaltılması, yaşam kalitesinin, akciğer fonksiyonlarının artırılmasında etkilidir. Klinik etkinlik için steroid tedavisinin uzun süreli olması gerekmektedir (40). İnhaler steroidlerin lokal yan etkileri orofaringeal kandidiyazis, ses kısıklığı (disfoni) ve üst solunum yolu iritasyonuna bağlı oluşan öksürüktür. Ölçülü doz inhaler’lerde bu yan etkilerin sıklığı, hava haznesi (spacer) kullanılarak azaltılabilir (2). İnhaler steroidlerin yol açtığı sistemik istenmeyen etkiler, bu ilaçların dozuna, gücüne, uygulama için kullanılan cihaza, sistemik biyoyararlanımlarına, karaciğerdeki ilk geçiş metabolizmasına (inaktif metabolitlere dönüşme) bağlıdır (41, 42). Yüksek dozda uzun süre kullanılan inhaler steroidlerin sistemik yan etkileri ciltte incelme ve ekimoz, böbrek üstü bezlerinin baskılanması ve kemik mineral yoğunluğunun azalmasıdır (2, 41). Çocuklarda düşük ve orta doz 100-400 mcg budesonide eş değer steroid kullanımının ulaşılacak hedef boy üzerinde herhangi bir etki yaratmamaktadır. Ancak daha yüksek dozlarda büyüme geriliği yapacağından uzun süre yüksek doz alan olgularda alternatif tedavilerin göz önünde bulundurulması unutulmamalıdır (43).

Lökotrien modifiye edici ilaçlar, havayolundaki düz kas hücrelerinin kontraksiyonu için güçlü bir agonist olan lökotrienlerin sentezini veya etki etmesini engelleyen ilaç grubudur. 5-lipoksigenaz inhibitörü olan zileuton, lökotrien reseptör antagonistleri olan montelukast, zafirlukast yaygın olarak kullanılmaktadır. Lökotrien antagonistleri hafif astımda monoterapi olarak kullanılabilirle beraber düşük doz inhale kortikosteroid tedavisine göre daha az etkinliğe sahiptir. Allerjik rinokonjunktivitde de kullanılabilir (44). Bu ilaçlarla bildirilmiş önemli bir yan etki bulunmamaktadır.

Uzun etkili inhaler β 2 agonistler, siklik AMP üzerinden etki ederek düz kaslarda dilatasyon oluşturarak etki eden bu ilaçların çocuklarda 5 yaş üzerinde kullanımı önerilmektedir. Orta

doz steroid tedavisi alanlarda semptomları kontrol altına almak için kombine tedavide yeri vardır. Ayrıca ilk tercih olmasa da egzersiz öncesi bronkospazmı önlemek için kullanımı bulunmaktadır. Bu ilaçların en önemli yan etkileri taşikardi, tremor, ajitasyon daha nadir olarak hiperglisemi ve hipokalemidir (2, 14, 45).

Mast hücre duvarı stabilizatörleri, sodyum kromoglikat, nedokromil sodyum konjunktivada, üst hava yollarında ve alt hava yollarında allerjene bağlı erken ve geç faz enflamatuvar yanıtı baskılar. Mukozal mast hücrelerinin bulunduğu her yerde etkilidir. Çocuklarda hafif persistant astımda düşük doz steroid tedavisine alternatif olarak önerilmektedir (2, 14).

Fosfodiesteraz inhibitörleri: Astım tedavisinde önceki yıllarda sıklıkla kullanılan bir diğer ajan da fosfodiesteraz inhibitörüdür. Beş yaş üstü çocuklarda steroid tedavisine ek olarak verilmesi önerilmektedir. Teofilin, adenozin reseptör antagonistidir. En sık görülen yan etkileri, bulantı kusmadır. Onun dışında taşikardi, aritmi, konvülsiyon da görülebilir (2, 14).

Anti IgE Antikor (omalizumab), humanize rekombinant monoklonal anti-IgE antikorudur. Serbest IgE'ye bağlayarak FcεRI reseptörüne bağlanmayı engeller ve negatif feedback mekanizması ile yüksek afiniteli IgE reseptörlerinin azalmasına neden olarak etki etmektedir. Yüksek doz steroid kullanan olgularda subkutan tedavi olarak önerilmektedir. Astım dışında, otoimmün kronik ürtiker, atopik dermatitli hastalarda kullanılmış ve semptomları kontrol altına almada etkili olduğu görülmüştür (46, 47).

2.4.1.3. Astımlı hastalarda tedavinin izlemi

Çocukluk çağı astımının yaklaşık %70'inde semptomlar üç yaşından önce başlar ve tedavi edilmediği durumda akciğerlerdeki kalıcı hasarların çoğu 6 yaşına kadar oluşur (2, 14). Bu nedenle astım tedavisinin en kısa zamanda başlanması önerilmektedir. Bu tedavi ile amaçlanan, alevlenmelerinin önüne geçilebilmesi, gündüz semptomların önlenmesi (haftada ikiden az), gece semptomunun olmaması, acil servise başvuruların ve hastane yatışlarının en aza indirgenmesi, akciğer fonksiyonlarının normal veya normale en yakın düzeyde tutulması, kısa etkili inhale β_2 agonist kullanımının en aza indirgenmesidir.

Astım tedavisinin başlanması ve izleminde 'ağırlık derecesi' ve 'kontrol' kavramları kullanılır (Tablo 1-2). Hasta persistan astım olarak değerlendirilip, muayenede semptom saptanmamışsa basamak 2'den tedaviye başlanabilir, ancak ilk değerlendirmede semptomlar kontrolsüz olarak

düşünülürse tedaviye basamak 3'ten başlanabilir. Semptomlar kontrol altına alındıktan sonra 3 ay arayla basamak azaltmaya gidilmelidir. Kontrol sağlanmadığı durumlarda basamak artırılmalıdır. Gereğinde kombine ilaç tedavisi seçilmelidir. Semptom kontrolü sağlandıktan sonra kombine tedavide öncelikle steroid dozu %50 azaltılmalı, düşük doza ulaşıldığında kombinasyon tedavisi kesilip sadece inhale steroid ile devam edilmelidir. Her basamakta tedavide gerektiğinde rahatlatıcı ilaçlar kullanılabilir (Tablo 3). İlk viziten 1-3 ay sonra ve her 3 ayda bir hastalar görülmelidir. Akut ataktan 2 hafta-1 ay sonra hasta kontrol edilmelidir.

Tablo- 1 Astım Sınıflaması (14)

ASTIM SINIFLAMASI
İntermittan
- Gündüz semptom<1 /hafta - Gece semptom<2/ay - Normal aktivite - FEV1 veya PEF>%80 / PEF /FEV1 değişkenliği<%20
Hafif persistan
- Gündüz semptom, haftada 1'den fazla fakat günde 1'den az - Semptomlar, aktivite veya uykuyu etkiler - Gece semptom>2/ay - FEV1 veya PEF>%80 / PEF /FEV1 değişkenliği<%20-30
Orta persistan
- Semptomlar günlük - Semptomlar, aktivite veya uykuyu etkiler - Gece semptom>1/hafta - Günlük kısa etkili inhale β_2 agonist ihtiyacı - FEV1 veya PEF%60-80 / PEF /FEV1 değişkenliği>%30
Ağır persistan
- Semptomlar günlük - Sık nokturnal semptomlar - Fiziksel aktivite kısıtlı - FEV1 veya PEF%60 / PEF /FEV1 değişkenliği>%30

Tablo -2 Astım Kontrol Seviyeleri (2)

Özellikler	Kontrol Altında (aşağıdakilerin tümü)	Kısmen Kontrol Altında (birinin olması yeterli)	Kontrolsuz
Gün içi semptom	Yok (< 2 kez/hafta)	>2 kez/hafta	≥ kısmi kontrollü astım özelliği
Aktivitede kısıtlanma	Yok	Var	
Gece semtomu/uyanma	Yok (< 2 kez/hafta)	Var (> 2 kez/hafta)	
Kurtarıcı tedavi kullanımı	Yok (< 2 kez/hafta)	> 2 kez/hafta	
Solunum fonksiyon testleri	Normal	< %80	
Alevlenme	Yok	>1/yıl	

Tablo -3 Astımda Basamak Tedavisi (2, 14)

<u>1.basamak</u>	<u>2.basamak</u>	<u>3.basamak</u>	<u>4.basamak</u>	<u>5.basamak</u>	<u>6.basamak</u>
<i>Hasta Eğitimi ve Çevresel Kontrol</i>					
<i>İntermittan astım</i>	<i>Hafif persistan astım</i>	<i>Orta persistan Astım</i>	<i>Ağır persistan Astım</i>		
Gerektiğinde kısa etkili β2 agonist	Düşük doz IKS	Düşük doz IKS + LABA	Orta doz IKS + LABA	Yüksek doz IKS+ LABA	Yüksek doz IKS+ LABA+oral steroid
	LTRA	Orta doz IKS	Orta doz IKS +LTRA	Yüksek doz IKS +LTRA	Yüksek doz IKS +LTRA+oral steroid
	Kromalin Nedokromalin	Düşük doz IKS + LTRA	Orta doz IKS + Teofilin	Yüksek doz IKS + Teofilin	Yüksek doz IKS + Teofilin+oral steroid
	Teofilin	Düşük doz IKS + Teofilin		Anti-IgE tedavisi (12 yaş üzeri)	Anti-IgE tedavisi (12 yaş üzeri)

2.5. Allerjene özgü immünoterapi

2.5.1. Tanım ve tarihçe

Allejik hastalıklarda ilaç tedavisi ile semptomlar kontrol altına alınabilmesine rağmen doğal seyir üzerinde etkinliği gösterilememiştir (2). İlk defa 1911 yılında Noon ve Freeman, polenlere karşı subkutan yolla artan dozlarda aşı uygulamasıyla, allerjik rinit tedavisinde başarı elde etmişlerdir. Bu tedaviden yola çıkarak allerjene spesifik immünoterapi (SİT)'nin temeli oluşturulmuş ve allerjik hastalıkların doğal seyrini değiştirebilecek tedavi olarak düşünülmüştür (48). Bundan birkaç yıl sonra oral, lokal bronşiyal ve lokal nazal uygulamalar başlamıştır (49). 1980'li yıllarda oral uygulama ile ilgili birçok çalışmada çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bazı olgularda ciddi gastrointestinal yan etkilere neden olması nedeniyle oral yoldan allerjen spesifik immunoterapisinden vazgeçilmiştir. Allerji alanındaki ilerleme kaydedilmesiyle subkutan immünoterapi (SKIT) tedavisinin etkinliği birçok çalışmada gösterilmiş ve allerjik rinokonjonktivit, astım ve venom allerjisinde işe yaradığı gösterilmiştir (50, 51). Yine benzer şekilde, 3 yıllık düzenli SKIT uygulama ile tedavi sonrası rinokonjonktivit bulgularının 7 yıla kadar engellendiği ve rinitli olgularda astıma gidişi azalttığı saptanmıştır (52). Subkutan immünoterpinin yanı sıra 1986 yılında Scadding ve arkadaşları tarafından düşük doz ev tozu allerjen ile dilaltı immünoterapi (SLIT) ile nazal semptomların azaldığı saptanmış (53) ve bu tarihten itibaren 60 üzerindeki kontrollü çalışmada bu uygulama yönteminin etkinliği kanıtlanmıştır. World Health Organization (WHO), sekiz çift kör plasebo kontrollü randomize çalışmaya dayanarak erişkinlerde SLIT'in, SKIT'e alternatif olabileceğini bildirmiştir (54). Aynı yıl içerisinde, Avrupa Allerji, Astım ve Klinik İmmünoloji Derneği (EAACI)'de SLIT'in klinikte etkili ve güvenilir bir yöntem olduğunu rapor etmiştir. 2009 yılında World Allergy Organizasyonu (WAO) uzlaşısı raporunda SLIT'in etkinliği ve güvenirliliği 5 yaş üstü çocuklarda ve erişkinlerde onaylanmış ve önerilmiştir (55). Allerjene spesifik immünoterapi tedavisinin kullanımının artmasıyla bu tedaviye bağlı özellikle SKIT olgularında anafilaksi sıklığında artış görülmüş ve son yıllarda bu alandaki çalışmalar daha az yan etki oluşturan etkili tedavi yöntemlerine yönelmiştir. Bunlar arasında toll like reseptör (TLR) agonistleri kullanılması (56), rekombinant ve peptit allerjenlerin geliştirilmesi, SİT ile birlikte anti-IgE tedavisi bulunmaktadır (57). Tedavinin uzun sürmesi ve hasta uyumunun zaman içinde zorlaşması nedeniyle standart uygulama dışında daha az sürede bağışıklık geliştiren yöntemler denenmiş ve intranodal immünoterapi uygulama ile 3 yıllık tedavinin benzer klinik iyileşme sağladığı gösterilmiştir (58).

2.5.2. Subkutan SİT (SKIT)

Subkutan SİT günümüzde yaygın olarak kullanılan etkinliği kanıtlanmış tedavi yöntemidir. Allerjik astım ve rinokonjonktivit'te hastalığın seyrine etki edebilme potansiyeline sahiptir. Bu tedavi, astıma bağlı semptomlarda belirgin azalma ile birlikte yaşam kalitesini artırmakta ve hastalığın kontrolü için gerekli olan medikasyon ihtiyacını azaltmanın yanında bronş hiperreaktivitesinde de düzelmeye neden olmaktadır (59, 60). Subkutan immünoterapide belirli aralıklarla verilen allerjen sayesinde immün yanıtın allerjik yanıtıdan tolerojen yöne çevrilmesi amaçlanmaktadır (61). Subkutan uygulama ile DH'den IL-10 salgısına bağlı olarak Th0 hücreleri CD4+CD25+FOXP3+ T reg yönüne farklılaşmakta, buna bağlı olarak TGF- β ve IL-10 salgısı artmaktadır. Bütün immünolojik olayların temelinde doğal Treg'lerin hücre-hücre kontakt mekanizmasıyla Th2 hücrelerini baskılanması, salgılanan regülator sitokinler aracılığıyla B lenfositlerden allejen özgü IgA1, IgA2 ve IgG4 tipi blokan antikorların salgılanması bulunmaktadır (62). IgG4 antikorların özelliği, IgE ile allerjeni yakalamak için yarışması, bazofiller üzerindeki Fc γ IIa ve Fc γ IIb bağlanarak aktivasyonu önlemesi, bellek B hücrelerinden spesifik IgE yapımını azaltması ve histamin salgılanmasını inhibe etmesidir. Allerjen-IgE kompleks oluşumunun engellenmesi ile DH-T lenfosit etkileşimi önlenerek spesifik T yanıtı baskılanmaktadır (61, 63). İmmünoterapinin diğer etki mekanizmaları arasında Th2 yanıtın Th1 yanıtıya çevrilmesi ve artan IFN- γ 'a bağlı olarak B lenfositlerden IgG tipinde blokan antikorların salgılanması, IL-10 aracılığıyla eozinofillerin fonksiyonlarının baskılanması, OX40-OX40L bağlantısı ile Treg hücreleri tarafından mast hücrelerinden histamin salgısının azalması vardır (64, 65). Astım immünopatogenezindeki yeri yeni aydınlatılan Th17 hücrelerinin de Treg tarafından baskılandığı ileri sürülmektedir (66). Subkutan SIT tedavisi sonrası sitokin yanıtlarında çelişkili sonuçlar elde edilmiş olup, bazılarında allerjen uyarımı ile IL-4, IL-5 salınımının azalmış ve IFN- γ gösteriminin artmış olduğu saptanmış (67), diğer çalışmalarda ise IL-4 yapımının değişmediği ancak sadece IFN- γ üreten CD4 T hücrelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir (68, 69). Subkutan SIT ile lokal ve sistemik olarak IL-10 üreten CD4+CD25+FOXP3+T hücrelerin artması ile başlangıç tedavisinin sonunda IL-10 Tr1'lerin arttığı, 6.aydan itibaren allerjen özgü IgG4, IgA 'nin arttığı ve 1.yıl Th2/Th1 hücre oranının azaldığı gözlenmiştir (61). Tedavinin başlangıç evresinde klinik olarak semptomlarda düzelmeye ve allerjen deri testi yanıtında azalma görülürken, spesifik IgE düzeylerinde artış görülmektedir. Ancak bu artış idame tedavisine geçiş ile yıllar içinde düşmeye başlamaktadır (70).

Subkutan immünoterapi tedavisinin *etkinliğinin* değerlendirildiği çalışmalarda allerjik rinokonjunktivitteki etkinliği araştıran bir meta-analizde Ross ve arkadaşları prospektif, tek-kör veya çift-kör, plasebo kontrollü olarak yapılmış 16 araştırmanın sonuçlarını incelemiştir (59). On beş çalışmada SKIT'in allerjik rinit tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur. İmmünoterapinin allerjik rinitli hastalarda astım gelişimini önleyebildiği, dolayısıyla hastalığın doğal seyrinde etkili olduğu gösteren çalışmalar vardır. Çok merkezli yapılan PAT çalışmasında çimen ve/veya huş ağacı allerjisi olan rinokonjunktivitli çocuklara 3 yıllık düzenli SKIT uygulama ile tedavi sonrası rinokonjunktivit bulgularının 7 yıla kadar engellendiği ve rinitli olgularda astıma gidişi azalttığı saptanmıştır (52, 71). Des Roches ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ev tozu akarı duyarlı astımlı çocuklarda SKIT'in yeni sensitizasyon gelişimini önlediği bildirilmiştir (72). Subkutan immünoterapinin ayrıca deri sensitizasyon çapını azaltığına dair yayınlarda bulunmaktadır (73, 74).

İdeal immünoterapi süresinin araştırıldığı çalışmalarda 3 ve 5 yıllık tedavi arasında anlamlı fark olmadığı ve bu nedenle tedavi süresi olarak 3 yıllık uygulamanın yeterli olacağı belirtilmektedir (75). Ancak immünoterapinin ne zaman kesileceği hastaya göre belirlenmelidir (76).

Güvenirlilik ve yan etkilere bakıldığında, SKIT uygulanan hastalarda lokal deri reaksiyonlarından ciddi sistemik reaksiyonlara kadar değişik spektrumda yan etki görülebilmektedir. American Academy of Allergy Asthma and Immunology (AAAAI) tarafından yapılan çalışmalarda sistemik tipte reaksiyon oranı, 1000 enjeksiyonda 2, öldürücü tipte reaksiyon oranı ise 2 milyon enjeksiyonda bir olarak belirlenmiştir (77, 78). Bu reaksiyonlara yol açan nedenler, %62 olguda kontrolsüz astım, %53'ünde daha önceden sistemik reaksiyon geçirmek, %47'sinde polen zirve döneminde aşılama, %43'ünde geç adrenalin uygulama olarak bulunmuştur. Öldürücü tipte reaksiyonların %90-95'i ilk 30 dakika içinde meydana gelmektedir (77). Cochrane derlemesinde, benzer şekilde mevsimsel allerjik rinit hastalarında uygulanan SKIT sonrası yaklaşık 770 enjeksiyonda bir adrenalin kullanımı gerekliliği bulunmuştur (79). Venom immünoterapi alanlarda anjiyotensin dönüştürücü enzim kullanılması sistemik reaksiyonlarla ilişkili görülürken, β -bloker tedavisi aşı sonrası gelişecek anafilaksin tedavisini olumsuz yönde etkilemesi nedeniyle bu ilacı alan hastalarda dikkatli olunmalıdır (80).

2.5.3. İmmünoterapi uygulama endikasyonları ve kontrendikasyonları

İmmünoterapi tedavisi etkili olmasının yanında hasta seçimlerinin düzgün olarak yapılması gerek istenen sonuçların alınması ve gerekse yan etkinin azaltılması açısından son derece önemlidir. Bu bağlamda 2006 yılında ve daha sonra 2010 yılında revize edilmiş European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI)'nin immünoterapi grubu tarafından uygulama endikasyonları ve kontrendikasyonları yayınlanmıştır (81).

Allergen spesifik İmmünoterapi endikasyonları:

- 1-IgE aracılıklı allerjik hastalık varlığı
- 2-Sorumlu allejenle maruziyet sonrası klinik bulguların ortaya çıkması
- 3-İlaç tedavisine yeterli oranda yanıt vermeyen orta intermittant veya persistan allerjik rinokonjonktivit olması
- 4-uzun süre ilaç tedavisi almak istemeyen veya yan etkilerden kaçınan hastalarda
- 5-Allergen ile ilişkili astım öyküsü olan hastalarda, semptomlar kontrol altına alındıktan sonra ve FEV1 değeri >%70 olması durumunda SIT tedavisi verilebilir.

Allergen spesifik İmmünoterapi Kontrendikasyonları:

- 1-β-bloker kullanımı ve koroner arter hastalığı
- 2-İmmünolojik hastalıklar ve malignite varlığı
- 3-Hastaların uyum bozukluğu
- 4-Ağır astım (uygun tedaviye rağmen FEV1<%70 olması)
- 6-Beş yaş altı çocuklar (uyum problemi, idame doz bilinmemekte)
- 7-Gebelik
- 8-Ciddi psikolojik bozukluklar

2.6. Allerjik hastalıklarda D vitamini ve önemi

2.6.1. D vitamini metabolizması

Steroid yapısında bir ön hormon olan D vitamininin kolekalsiferol (vitamin D3) ve ergokalsiferol (vitamin D2) olmak üzere iki kaynağı vardır. Kolekalsiferol, 290-310 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınlarının etkisiyle %90-95 oranında 7-dehidroksikolesterolden deride sentezlenir. Bu insan için gerekli olan D vitamini ihtiyacının tamamına yakın olan kısmını karşılamaktadır (82). D vitamini önce karaciğerde sitokrom enzimi olan CYP27A1 sayesinde 25 hidroksi D vitaminine (25(OH)D), daha sonra böbreklerde 1α hidroksilaz enzimi (CYP27B1) sayesinde aktif form olan 1,25 hidroksi D ($1,25 (OH)_2 D$)'ye dönüşür. 25(OH)D'nin yarı ömrü yaklaşık olarak 20 gündür ve bu nedenle organizmadaki D vitamin durumunu en iyi yansıtan parametre olarak kabul edilmektedir. Aktif 1,25 hidroksi D ($1,25 (OH)_2$) paratiroid, barsak ve kemik üzerinde etkisini hücre çekirdeğinde yer alan vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak ve daha sonra retinoik asit X reseptörü ile kompleks oluşturarak gösterir. Hücre içinde etki gösterdikten sonra mitokondiral sitokrom enzimi olan CYP24A1 tarafından inaktif form olan 25, 24 hidroksi D ($1,25 (OH)_2$) dönüşerek in aktive olur. D vitamini özellikle kemik metabolizması üzerinde etkisi göstererek sağlıklı kemik yapısının ve kalsiyum dengesinin sağlanmasında ana görev olarak çalışır (82, 83).

Modern yaşam koşulları nedeniyle özellikle güneş ışınlarına maruziyetin azalması, fiziksel aktivitenin kısıtlanması ve günlük yaşamın çoğunun kapalı ortamda geçirilmesi, vücutta yetersiz 25(OH)D üretimi ile sonuçlanmaktadır (5). Ülkemizde yapılan çalışmalarda D vitamini eksikliği sıklığı %2-19 arasında değiştiği gösterilmiş ve bunun ergenlik çağı ve düzensiz beslenme durumu ile arttığı görülmüştür (6, 7). Önemli bir sağlık sorunu olan D vitamini yetersizliği durumu giderek daha fazla bildirilmekte ve kemik metabolizması üzerindeki etkisinin yanında, akciğer, beyin dokusu, meme, prostat gibi dokularda reseptör varlığı nedeniyle allerjik hastalıklar, immün sistem hastalıkları, kanser (prostat, meme, akciğer ve kolorektal), kardiyovasküler hastalıklar, multiple sklerozis, tip 1 ve 2 diabetes mellitus gibi durumlarla ilişkisi kurulmaya başlanmıştır (83, 84).

2.6.2. D vitamini ve immün sistem

D vitamini reseptörü aktive T lenfositler, makrofaj ve DH'ler de saptanmış ve D vitaminin aktif formunun, 1,25 hidroksi D ($1,25 (OH)_2$), oluşumu için gerekli olan 1α hidroksilaz enzimi

makrofajlar ve DH'lerde bulunmuştur (85). Antiproliferatif, antienflamatuvar özelliği nedeniyle D vitaminin immün sistem etkileri birçok çalışmada incelenmiştir (86-88). Tsoukas ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada, *in-vitro* ortamda aktif vitamin D uyarıcı olarak kullanımı sonrası IL-2 miktarının azaldığı ve buna bağlı lenfosit proliferasyonunun azaldığı gösterilmiştir (86). Bir diğer çalışmada ise fare modelinde IL-4 ve IL-12 uyarım sonucu elde edilen Th1 ve Th2 hücrelerinin 1,25 hidroksi D (1, 25 (OH)₂) uyarım sonrası proliferasyonunun azalmasının yanında, IL-2, IL-5 ve IFN- γ miktarının da azaldığını gösterilmiştir (87). Bu çalışmada Th2 proliferasyonu azaldığı halde IL-4 miktarında artış görülmüştür. Boonstra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, D vitamininin benzer olarak IFN- γ 'yı azalttığı, IL-4, IL-5 ve IL-10 düzeyini artırdığı görülmüştür (88). Sonuçlar değerlendirildiğinde D vitamini, Th1 yanıtını baskımlarken Th2 yanıtını artırabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmadan farklı olarak Th2 yanıtının azaltıldığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (83, 89). İnsan kord kanında izole edilen naive T lenfositler D vitamini ile kültür edildikten sonra, IL-4 ve IL-12 ile uyarılmış, çalışmanın sonucunda Th1 ve Th2 sitokin yanıtlarının baskımlandığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, D vitaminin Th2 yanıtı üzerine etkisi net olarak tanımlanmamıştır.

D vitamininin Th1 ve Th2 dışında T reg, Th17 hücrelerini üzerine etkisini gösteren insan ve hayvan çalışmaları bulunmaktadır (11, 90-93). Monosit kaynaklı DH'ler D vitamini uyarımı sonrası IL-10 salgısında artma, IL-12' de azalma, ko-stimlatör moleküllerden MHCII, CD80, CD86'nin azalma saptanmıştır (11). Urry Z. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IL-10 salgılayan Treg (Th1) miktarında artış D vitamini uyarım sonrası görülmüştür (90). Diğer bir çalışmada ise 1,25 (OH)₂ D ile CD4+CD25- hücrelerin uyarılması sonucu Forkhead box P3 (FOXP3) ve Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4)'un artışı saptanmıştır (91). Regulator sitokin görevi olan TGF- β 'nin multiple sklerozlu hastalarda 6 aylık tedavi sonrası serumda artışı gözlenmiştir (92). D vitaminin inflamasyonu tetikleyici sitokin olan IL-17 üzerinde de azaltıcı etkisi bulunmaktadır (83). Deneysel üveit modelinde CD4 hücrelerinden Th17 farklılaşmasının ve IL-17 sekresyonunun azaldığı gösterilmiştir (93). Treg hücrelerinin artırılması ve buna bağlı olarak Th1 ve Th2'nin baskılanması D vitaminin allerjik hastalılar üzerinde etkili olabileceği düşüncesini doğurmuştur.

Doğal bağışıklık sistemi üzerine olan etkileri incelendiğinde D vitamininin antimikrobiyal peptitleri artırmaktadır (94). Liu PT ve arkadaşları tarafından makrofajlarda Toll like reseptör 1 uyarımı sonrası D vitamini reseptörü için mRNA ekspresyonunun artışı, ek olarak aktif

hormon sentezine neden olan CYP24B1 ekspresyonunun da arttığı invitro ortamda gösterilmiştir. Uyarım sonrası antimikrobiyal peptitlerden katelisidin artışına bağlı *M. tuberculosis* ölümünü tetiklendiği saptanmıştır. Benzer olarak insanda katelisidin aktif formu olan LL-37, nötrofil, monosit, keratinosit, solunum yollarındaki epitel hücrelerinde D vitamini uyarımı sonrası artışı saptanmıştır (95). Diğer taraftan aktif D vitamini antinflamatuar sitokinlerden TNF- α ekspresyonunun azalttığı ve bu etkiyi monositlerde TLR-2 ve TLR-4 ekspresyonunu değiştirerek sağladığı gösterilmiştir (96). Doğal bağışıklığın D vitamini eksikliğinde baskılanmasına bağlı olarak bu hastalarda alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında artış görülmüştür (97). Viral enfeksiyonlardan influenza ve respiratuvar sinsityel virus (RSV) ile serum D vitamini düşüklüğü arasında pozitif korelasyon saptanmış ve D vitamini düşük yeni doğanlarda hayatın birinci yılında artmış RSV enfeksiyonu sayısı saptanmıştır (84).

2.6.3. D vitamini ve allerjik hastalıklar

Astım sıklığının fazla olduğu batı ülkelerinde D vitamin düzeyinin düşük olması bu sıklıkla ilişkili olabilir (4). Astım hastalığının sıklığı, şiddeti ile yüksek IgE düzeyi, yüksek eozinofil ve hastanede yatış sayısı ile 25(OH)D yetersizliğini ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır (8,9). D vitamini yetersiz olan gebelerde vitamin desteğinin uygulanması ile çocuklarda hışiltı sıklığının anlamlı derecede azaldığı gösteren çalışmaların yanında (4), gebelik sırasında yüksek D vitamini düzeyi bulunan gebelerin (> 75 nmol/L) çocuklarında astım ve egzamanın daha fazla olduğunu gösteren çalışmalarda yapılmıştır (10). Camargo ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada kord kanındaki 25(OH)D ile solunum yolları enfeksiyonları ve hışiltılı solunum ile arasında ters ilişki bulunmuş ancak astım gelişimi ile ilişki saptanmamıştır (98). Diğer bir çalışmada 5 yıllık izlenen çocuklarda maternal diet ile alınan D vitamini ile allerjik rinit ve astım arasında negatif ilişki görülmüş olup, gebelik sırasında annelerin diyetten aldıkları D vitamini ortalama 5,1 mcg olarak hesaplanmıştır. Bu oran Avrupa beslenme komitesi tarafından önerilen günlük 10 mcg altında bulunmuştur (99).

Atopik dermatit ve D vitamini arasındaki ilişkiye bakıldığında, VDR ekspresyonu keratinositlerde saptanmış olup, deride PDGF, TNF- α sentezini artırarak keratinositlerin farklılaşmasını artırdığı saptanmıştır. Deride IL-1, IL-6 ve RANTES miktarını azaltarak antiinflamatuar etkinlik gösterir (83). Atopik dermatiti olgularda antimikrobial peptit azalması nedeniyle D vitamini etkinliği araştırılmış ve dermatitli olgulara 21 gün süre ile 4000 Ü D vitamini verilmesiyle deride katelisidin miktarının artışı gösterilmiştir (100). *İn-vivo*

olarak D vitamini verilmesiyle antistafilokokal etkinliği olan AMP'lerin artığı ve T lenfositlerin deride yerleşmesini sağlayan kutanöz lenfosit ilişkili antijen salgısının azaldığı saptanmıştır (101).

D vitamininin ve *immünoterapi* üzerindeki etkinliğinin incelendiği fare modellerinde OVA duyarlı immünoterapide aktif D vitamini ilavesi ile akciğer eozinofili, IL-5 ve IL-13 miktarının kontrol grubuna göre azaldığı görölmüştür (102). Steroide dirençli astımlı olgulardan izole edilen periferik CD4+ T lenfositlerin D vitamini ile kültüre edilmesi sonucu daha fazla IL-10 salgılandığı, buna bağlı olarak steroid tedavisine dirençli olgularda D vitamini kullanımının işe yarayabileceği düşünölmüştür (103). Aktif 1,25 hidroksi D (1,25 (OH)₂ D) vitamini ile uyarım sonrası insanlardan izole edilen monosit kaynaklı antijen sunan hücrelerin daha fazla tolerojenik olduğu ve IL-10 salgılanmasının artmasının yanında, alloreaktif T hücrelerinin interferon- α (IFN- α) salgısının azaldığı görölmüştür (11). Tolerojen antijen sunucu hücrelerin Treg hücre miktarını artırması D vitaminin bu yolla etki edebileceğini düşöndürmektedir (12). Başka bir çalışmada ise 1,25 (OH)₂ D ile Treg hücrelerinin uyarılması sonucu FOXP3 ve CTLA-4'un artığı saptanmıştır (91). Oral steroid ve immünoterapi alan astımlı çocuklarda yapılan bir çalışmada steroid tedavisinin Treg üzerindeki negatif etkisinin D vitamini kullanımı ile engellendiği bulunmuştur (13). İmmünoterapi tedavisinin etkinliğinin artırılması amacıyla D vitamini kullanımı ile veri bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, ev tozu akarına duyarlı astımlı çocuklarda D vitamininin allerjen immünoterapisine ek olarak verilmesinin etkinlik, güvenilirlik ve T regülatuar hücre yanıtı üzerine etkisi çalışılmıştır.

III. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gruplar ve izlem

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Allerji ve İmmunoloji Bilim Dalı tarafından en az bir yıldır hafif-orta persistan astım ($\pm$ rinit) tanısı ile izlenmekte olan ve ev tozu akarları *Dermatophagoides Farinae* ve *Dermatophagoides Pteronyssinus*'a karşı duyarlılığı bulunan 5-15 yaş arasındaki 55 çocuk çalışmaya dahil edildi. Hastalar:

- **Grup I** (n=18): Cilt altı immünoterapisi (SKIT) + D vitamini (650 Ü/gün) + farmakoterapi alanlar
- **Grup II** (n=17): Cilt altı immünoterapisi (SKIT) + farmakoterapi alanlar
- **Grup III** (n=20): Sadece farmakoterapi (FT) alanlar

Olarak ayrıldı. Gruplar immünoterapinin başlangıcından itibaren aylık muayenelerle 1 yıl boyunca izlendi. D vitamini Amerikan Akademi Birliğinin önerdiği kriterler göre verildi (104). Buna göre süt çocukları, okul öncesi dönem ve ergenler ile serum 25(OH)D düzeyi < 50 nmol/L (20 ng/mL) olanlara günlük 400 Ü vitamin D önerilmektedir. Yapılan çalışmalarda D vitamini günlük olarak 400-2000 Ü aralığında alındığında toksik etki yaratmamaktadır. Çalışmamızda grup I'deki astımlı hastalara 1 yıl boyunca yaklaşık günlük 650 Ü D vitamini oral olarak verilmiştir.

3.2. Çalışmaya alınma kriterleri

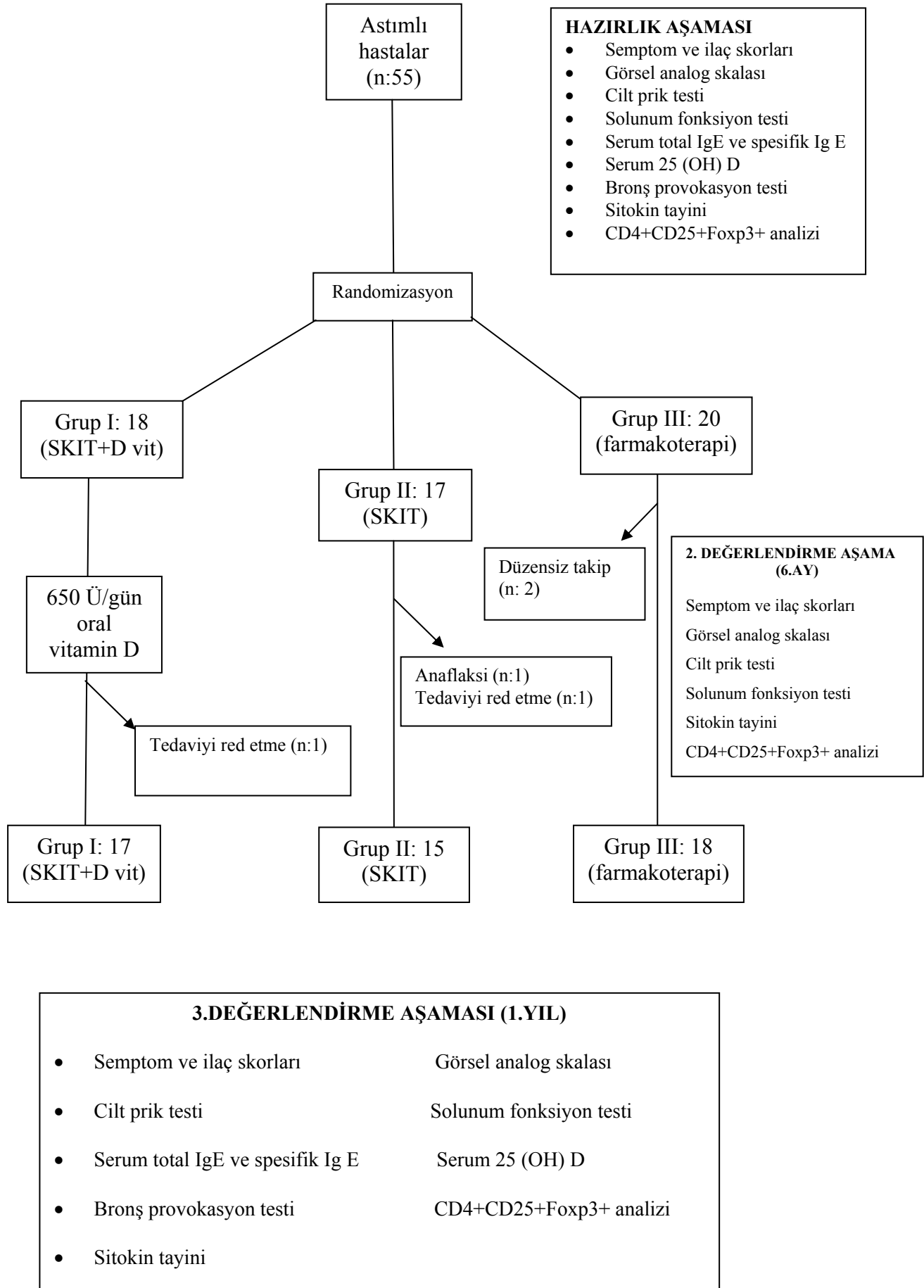
- Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Allerji ve İmmunoloji Bilim Dalı'nda en az 1 yıldır takipte olmak
- Prik deri testinde sadece ev tozu akarlarına (*Dermatophagoides pteronyssinus* ve/veya *Dermatophagoides farinae*) karşı duyarlılığın bulunması
- Beş yaşından büyük ve 15 yaşından küçük olmak
- Düzenli çevresel önlemlerin alınmasına ve uygun teknik, dozda inhaler anti-inflamatuvar tedaviye rağmen astım semptomlarının devam etmesi
- FEV1 değerinin %80'in üzerinde olması
- Çalışmaya katılmayı kabul ediyor olmak

3.3. Çalışmadan çıkarılma kriterleri

- Ağır derecede astımı varlığı (FEV1<%60)
- Eşlik eden kronik hastalık varlığı
- İmmün yetmezliğin eşlik etmesi

Çalışmaya alınan çocukların ebeveynlerinden onay alınmıştır (Ek-1). Çalışma protokolü, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırma Etik Kurulu tarafından **09.2010.0051** protokol numarası ile kabul edilmiştir (Ek-2). Çalışmanın bütçesi, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komite'sinden **SAG-C-TUP-070211-0037** protokol numarası ile desteklenmiştir.

Hastalar, 2 aylık izlem sonrası randomize edilerek 3 gruba ayrıldı. İleriye yönelik 1 yıl boyunca immünoterapi uygulanan hastalar aylık, sadece farmakoterapi alan hastalar ise 3 ay aralıklarla takip edildi. Her klinik vizitte, semptom ve ilaç skorları ayrıca görsel analog skalası (visual analog skala-VAS) değerleri hastalardan alındı. Başlangıçta cilt prik testi (SPT), solunum fonksiyon testi (SFT), metakolin ile nonspesifik bronş provokasyon testi (NSBPT) uygulandı. Ayrıca, serum total IgE düzeyi, *Dermatophagoides farinae* ve *Dermatophagoides pteronyssinus* spesifik Ig E düzeyi, serum 25 (OH) D düzeyi ölçüldü. Periferik kan Mononükleer hücre (PKMH) kültüründe allerjen spesifik uyarım sonucunda TGF- β ise ELİSA yöntemi ile ve flow sitometride ev tozu allerjeni ile uyarılan düzenleyici T hücre (CD4+CD25+Foxp3+) analiz edildi. Çalışmanın özeti Şekil-2'de gösterilmiştir.



Şekil-1: Çalışmanın özeti ve değerlendirilen parametreler

3.4. Semptom - Medikasyon Skorlaması

Hastalara günlük semptom ve ilaç kullanım puanlama cetveli verilerek semptom ve ilaç ihtiyaçları, 3 aylık olarak geri bildirimi istenerek 12 ay boyunca izlendi (Ek-3). Çizelgedeki solunum yolu şikayetleri, öksürük, hırıltı, nefes darlığı, sık soluma, gece öksürüğü olarak, nazal şikayetler ise burun akıntısı, tıkanıklığı, hapşırık ve burun kaşıntısı olarak sınıflanmış olup şikayetin derecesine göre semptom yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2, ağır ise 3 puan ile hesaplandı (61). Daha sonra astım (ASS) ve rinit (RSS) için semptom skorları ortalama değer olarak verildi. Total semptom skoru (TSS) ise ASS ve RSS'nin toplamı olarak alındı. İlaç miktarının değerlendirilmesinde ise benzer bir derecelendirilme sistemi kullanıldı. Buna göre, her bir kurtarıcı (β_2 agonist) veya antihistaminik ilaç kullanımı için: 1, intranazal steroid (İNS) ve inhale kortikosteroid (İKS) için: 2, oral kortikosteroid için: 3 puan verildi. Hastaların aldıkları ilaçların dozlarını belirtmeleri istendi. Skorların ortalaması alınarak, toplam medikasyon skoru (TMS) hesaplandı (61).

3.5. Görsel Değerlendirme Skorlaması

Hastalara haftalık olarak doldurulması istenen görsel değerlendirme skorlama formu (VAS) verildi (Ek-4). Bu formla hastaların şikayetleri 3 ana grupta 0 ile 10 arasında arasındaki bir değer ile puanlaması istenmiştir. Sıfır puan hiçbir şikayetin bulunmadığını, 10 puan ise olabilecek en kötü durumda bulunulduğunu ifade etmektedir. Aradaki puanlar, hafiften daha ciddiye kadar şikayetlerin ağırlığına göre seçilmektedir. Hastaların şikayetlerinin 3 ana grupta toplandığı astım ile ilgili şikayetler (öksürük, hırıltı, nefes darlığı), burun ile ilgili şikayetler (burun akıntısı, kaşıntısı, hapşırık), göz ile ilgili şikayetleri (gözde kaşıntı, kızarıklık, sulanma) olarak kategorize edildi. Değerlendirmeler rinit ve astım için ayrı olarak 3 aylık çizelgeler üzerinden yapıldı (61).

3.6. Prik Deri Testi

Prik deri testi en sık görülen 20 aeroallerjenle yapıldı. Bunlar *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Alternaria*, *Aspergillus* karışımı (*A.fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*), *Penicillium* karışımı (*P. digitatum*, *P. expansum*, *P. notatum*), *Candida albicans*, *Betulaceae* (kestane ağacı, huş ağacı, fındık ağacı, gürgen ağacı), *Aesculus ippa* (at kestanesi ağacı), *Olea Europea* (zeytin ağacı), 5'li çimen karışımı (parmak otu, delice otu, çayır kelp kuyruğu, çayır salkım otu, tatlı ilkbahar otu), yabancı otlardan *plantago* (sinir otu), *Artemisia*

vulgaris (pelin otu), *Parietaria officinalis* (yapışkan otu), *Secale cereale* (çavdar), *Triticum vulgare* (buğday), *Zea mays* (mısır), kümes hayvan tüy karışımı (tavuk, kaz, ördek), köpek tüyü, kedi tüyü, hamam böceğidir (ALK-Alello, Spain). Histamin ve salin pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Her allerjen ekstresinden birer damlanın önkolun iç yüzüne prik lansetleri kullanılarak cilde nüfuz etmesi sağlanmıştır. Uygulamadan 15 dakika sonra ölçüm yapıldı. Ciltteki kabartı ≥ 3 mm ve üzerinde ise testin pozitif olarak kabul edildi. Antihistaminik ve testi etkileyebilecek diğer ilaçların testten en az 7-10 gün önce bırakılması istendi. Test tüm hastalara çalışma öncesi, 6.ay ve 12.ayda tekrarlandı (35).

3.7. Solunum Fonksiyon Testi

Solunum fonksiyon testi ZAN 100 Flowhandy II (Germany) Spiromed adlı spirometre ile yapıldı. Laboratuvarda hastanın önce kimlik bilgileri, doğum tarihi, yaşı ve boyu spirometrenin bağlı olduğu bilgisayar programına girildi. Testin nasıl yapılacağı hakkında hastaya bilgi verildi. Test hastanın burnu özel sünger destekli mandalla kapatıldıktan sonra zorlu bir inspirasyon sonrası zorlu ekspirasyon manevrası ile spirometrenin okuyucu kısmına üflenerek uygulandı. Test üç kez tekrarlanıp elde edilen en yüksek değerler kaydedildi. Testin doğru sonuç vermesi için hastaların test günü kısa etkili β_2 agonist kullanmamış olmaları sağlandı. Test tüm hastalara çalışma öncesi, 6.ay ve 12.ayda tekrarlandı.

3.8. Bronkodilatatörlü Solunum Fonksiyon Testi

Basit solunum fonksiyon testin takiben hastalara aracı alet (chamber/volumatik) veya turbuhaller vasıtasıyla 100 μ g/dozluk salbutamol inhalerden iki püskürtme verildi. Bu uygulamadan 10 dakika sonra solunum fonksiyon testi tekrarlandı ve bilgisayar programı aracılığıyla % değişimler hesaplandı. %FEV1 değerlerinde başlangıca göre %12 ve üzeri değişimler reversibilite olarak kabul edildi. Testin doğru sonuç vermesi için hastaların test günü kısa ve uzun etkili β_2 agonist kullanmamış olmaları sağlandı. Test tüm hastalara çalışma öncesi ve 12.ayda tekrarlandı.

3.9. Bronşial Provokasyon Testi

Nonspesifik bronş hiperreaktivitesi metakolin provokasyon testi ile tidal soluma metodu kullanılarak değerlendirildi. Metakolin klorür toz formu (Sigma, katalog no: 2251) %0,9 luk NaCl ile, başlangıç ve son konsantrasyon sırası ile 0,0625 mg/mL ve 16 mg/mL olacak şekilde her seferinde katlanan konsantrasyonlarla dilue edildi. Test öncesi elde edilen en yüksek FEV1, başlangıç değeri olarak kabul edildi. Daha sonra %0,9'luk NaCl solüsyonu ve ardından 0,0625 mg/mL konsantrasyonlarından 3'er mL, 5'er dakika ara ile ZAN ProcAir II kompresörü (Germany), (partikül çapı 1-5 mikron, nebulizasyon hızı ayarı 0,13-15 mL/dk) ile hastaya otomatize tetikleyici aracılığıyla 2 dakika süre ile inhale ettirildi. Her inhalasyondan 2 dakika sonra hastanın FEV1 değeri ölçüldü. %FEV1 değerini başlangıç değerinden %20 veya daha fazla düşüren ilk konsantrasyonda test sonlandırıldı. Test sonucunda bilgisayar programından PC20 ve PD20 değerleri tespit edildi. Test, tüm hastalara çalışma öncesi ve 12.ayda tekrarlandı.

3.10. Serum Total IgE, Spesifik IgE ve 25 hidroksi D vitamini ölçümü

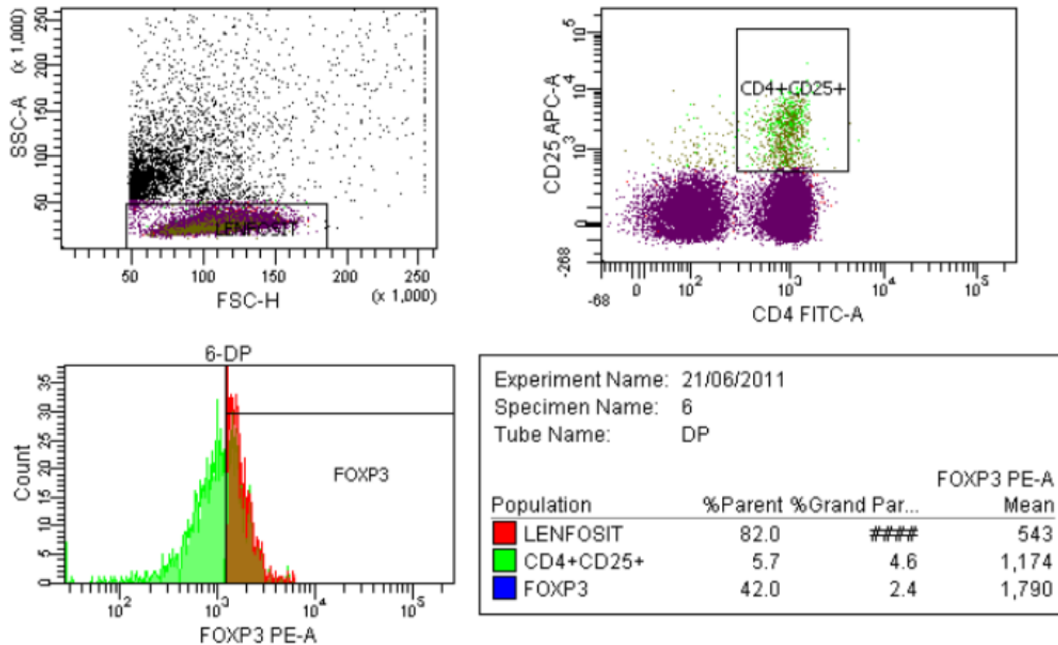
.Serum total IgE ve spesifik *Dermatophagoides pteronyssinus/ Dermatophagoides farinae* IgE ölçümleri Immulite® metodu ile, serum 25(OH)D vitamini Ultra Performans Sıvı Kromatografi yöntemi ile Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvar'ında çalışıldı. Testler, tüm hastalara çalışma başlangıcında ve 12.ayda tekrarlandı. Serum 25 (OH) D vitamini için referans aralığı aşağıdaki gibi kabul edildi (82).

- 15 ng/ml < : Eksiklik (rikets)
- 15-20 ng/ml: Yetersizlik
- 20-100 ng/ml: Normal
- >100 ng/ml: Fazlalık

3.11. Periferik kandan lenfosit izolasyonu ve hücre kültürü

Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu yapılacak olan deneklerden heparinli tüplere 4 cc venöz kan alındı ve 3 cc Fikol üzerine yayılarak 20 dakika 2040 rpm'de santrifüj edildikten sonra lenfositten zengin tabaka plastik pasteur pipeti yardımı ile alındı ve 3 kere fosfatlı tampon ile 1500 rpm'de 10 dakika yıkandı. Son yıkamadan sonra hücreler kültür mediumu karışımı (RPMI-1640, 2 mmol/L L-glutamine (Gibco, invitrogen NY, USA) ve 100

U/mL Penisilin/Streptomisin ve 56° derece 30 dakika inaktive edilmiş %1 FCS) ile 1 mL'ye sulandırıldı. 1 ml'deki canlı lenfosit sayısı tayini için lenfosit süspansiyonundan 10 µL alınarak 10 µL Tripan mavisini ile karıştırıldı. Daha sonra thoma lamında 9 büyük kare 40x'lık büyütme altında sayıldı. Çıkan sayı 2×10^4 ile çarpılarak 1 mL'deki lenfosit sayısı belirlendi. Lenfositler (1×10^6 /ml) ev tozu allerjisi Der p 1 (10 µg/ml, Indoor Biotechnologies Ltd, Cardiff, UK) ile uyarıldı. Kültür plakları %5'lik CO₂'li etüvde 5 gün inkübe edildi. Kültür süresi sonunda Der p 1 ile uyarılan kuyulardaki ve uyarısız kuyulardaki kültür toplandıktan sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. TGF-β düzeyi ELISA yöntemi ile ölçüldü (Invitrogen®, Camarillo, CA, USA). Ölçüm işlemleri üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Üst sıvı alındıktan sonra çökmüş olan hücre peletleri 2 ml fosfatlı sıvı ile yıkanarak 1500 rpm'de 5 dakika yıkama sonrası Monoklonal CD 4 ve CD25 antikorları ile hücreler işaretlendi. Karanlıkta 30 dakikalık bekleme sonrası, hücre membranını delici ve fiksator solüsyonu kullanılarak monoklonal antikorun bağlanması güçlendirildi. Son aşamada hücre içi boyama için FOXP3'e özgü monoklonal antikor kullanıldı. Daha sonra, flow cytometri cihazında (BD Biosciences, FACSCanto II, San Diego, CA, USA) uyarısız ve uyarılı ortamda T regülatur hücreler çalışıldı. Antikor kombinasyonu olarak, CD4-APC, CD25-FITC ve hücre içi FoxP3-PE boyası kullanıldı (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, Şekil 2).



Şekil 2: T regülatur hücrelerin flow sitometride gösterilmesi.

3.12.Allerjene Özgü İmmünoterapi

Dermatophagoides farinae (Der f 1) ve *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) karışımının 1:1 oranında olduğu alimünyum hidroksitli standard ekstraklarla (SKIT, ALUTARD® SQ, ALK-ABELLO, Madrid, Spain) immünoterapi verildi. İmmünoterapi uygulaması acil müdahale şartlarının bulunduğu bir odada hekim tarafından en düşük dozdan başlanarak haftalık enjeksiyonlar şeklinde subkutan olarak uygulandı. Dördüncü aydan itibaren idame dönemine geçilerek aylık olarak enjeksiyonlara devam edildi (Şekil 2). Tedaviye bağlı bölgesel ve sistemik belirtiler kaydedilerek WAO'nun önermiş olduğu derecelendirme sistemine göre kaydedildi (51). Buna göre, sınıf-0: Reaksiyon yok, sınıf-1: Hafif reaksiyon olarak lokalize ürtiker, rinit veya hafif astım atağı, sınıf-2: Orta sistemik reaksiyon olarak yavaş başlangıçlı (>15 dk) yaygın ürtiker, orta astım atağı, sınıf-3: Ağır sistemik reaksiyon olarak hızlı başlangıçlı (<15 dk) yaygın ürtiker, anjioödem, ağır astım atağı, sınıf-4: Anaflaktik şok olarak değerlendirildi.

Herhangi ciddi lokal reaksiyon (>7 cm lokalize şişlik) ya da astım atağı gibi sistemik belirtiler görüldüğünde doz %20-40 oranında azaltıldı. Ağır astım atağı ya da anaflaksi gözlenmesi halinde tedaviye son verildi. İmmünoterapi uygulama yöntemi ve dozları şekil-2'de verildi.

Faz		
Yükleme fazı (haftalık enjeksiyon)	Uygulama miktarı	Şişe 1 (100 SQ-U/ml): 0.2 , 0.4, 0.8 ml Şişe 2 (1000 SQ-U/ml): 0.2 , 0.4, 0.8 ml Şişe 3 (10.000 SQ-U/ml): 0.2 , 0.4, 0.8 ml Şişe 4 (100.000 SQ-U/ml): 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 ml
	Süre	15 hafta
	Toplam doz	Der f 1: 22,4 mcg Der p 1: 15,9 mcg 325.540 SQ-U
İdame fazı (aylık enjeksiyon)	Uygulama miktarı	Şişe 4 (100.000 SQ-U/ml): 1 ml
	Süre	37 hafta
	Toplam doz	Der f 1: 62,1 mcg Der p 1: 44,1 mcg 900.000 SQ-U

Şekil 3: İmmünoterapi verilme şeması ve 1 yıllık verilen major allerjen miktarları. SQ-U: Standard quality unit.

3.13. İstatistiksel Analizler

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (Release 16.0; SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) programı ile yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistiksel metotlar olarak frekans, yüzde, ortalama ve standart sapma'dan faydalanıldı. Çalışmamızda örneklem sayısının belirlenmesi, bir yılın sonunda ilaç kullanım dozunda en az %25'lik azalma sağlanmasına göre belirlendi. Buna göre, çalışma gücü %85, α : 0,05 olması durumunda %20 oranında kayıp göz önüne alınarak gerekli olan en düşük örneklem sayısı her bir grup için 15 idi. Normal dağılımın incelenmesi için Kolmogorov - Smirnov dağılım testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi uygulandı. İki grup arasındaki niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerde bağımsız örnekler (Independent samples) t testi, normal dağılım göstermeyen parametrelerde Mann Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında eşlenik örnekler (Paired samples) t testi, normal dağılım göstermeyen parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında Wilcoxon işaret testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren ve zaman içinde tekrarlanan parametrelerin grup karşılaştırmaları Tekrarlı Ölçüm Varyans Analizi (Repeated Measures Anova) testi ile, aynı özelliğe sahip ancak normal dağılım göstermeyen parametrelerin grup karşılaştırmaları da Friedman testi ile yapıldı. Korelasyon için Sperman testi kullanıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

IV. BULGULAR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı'nda takipli ev-tozu akarına duyarlı hafif-orta persistan astımlı ($\pm$ rinit) 50 hasta dahil edildi. Hastaların 29'u kız, 21'i erkek, ortalama yaş: $8,8 \pm 2,4$ yıl idi. Hastaların demografik özellikleri Tablo 4'de sunulmaktadır. Takip süresi $3,1 \pm 1,4$ yıl olarak saptandı. Elli hastanın 17'si SKIT + D vit., 15'i SKIT, 18'i ise farmakoterapi grubunda yer aldı. Bu hastaların klinik, laboratuvar ve immünolojik değerlendirilmesi yapıldı.

Tablo 4: Hastaların demografik özellikleri.

	SKIT + D vit. (n:17)	SKIT (n:15)	FT (n:18)	P*
Cinsiyet (K/E)	12/5	8/7	9/9	>0,05
Yaş	$9,2 \pm 2,6$	$8,8 \pm 1,1$	$7,9 \pm 2,6$	>0,05
Tanı yaşı (yıl)	$7,8 \pm 1,6$	$7,6 \pm 2,8$	$6,4 \pm 3,7$	>0,05
Sadece astımlı hastalar	11	9	11	>0,05
Astımlı ve rinitli hastalar	6	6	7	>0,05
Bazal vitamin D düzeyi (ng/ml)	19 ± 9	20 ± 12	16 ± 8	>0,05
Bazal inhaler steroid (mcg/gün)	428 ± 67	477 ± 128	442 ± 89	>0,05

*: Gruplar arasında değerlendirmeler tek yönlü ANOVA ve Ki-kare testleri ile yapılmıştır

4.1. Klinik verilerin değerlendirilmesi:

Çalışmaya alınan hastaların randomizasyon öncesi, tedavinin 6. ve 12. ayında klinik semptomlar, ilaç ihtiyaç durumları ve astım atak sayıları değerlendirildi. Tablo 5'te sonuçlar özetlenmiştir.

Tablo 5: Tedavi gruplarının klinik verilerinin değerlendirilmesi.

	SKIT+ D vit. (n:17)			SKIT (n:15)			FT (n:18)		
	Çalışma öncesi	6.ay	12.ay	Çalışma öncesi	6.ay	12.ay	Çalışma öncesi	6.ay	12.ay
VAS	6±2	3±1	2,1±2*	6±2	3±1	2±1*	6±2	4±2	5±3*
TAS	1±0,7 0,8 (0-3,1)	0,4±0,2** 0,3 (0-0,5)	0,2±0,4*** 0 (0-1)	1,5±1,3 1,4(0-4,9)	0,5±0,6 ' 0,4 (0-2,6)	0,3±0,3*** 0,2 (0-1,1)	1,5±1,3 1,2 (0-4,1)	1,2±1,1** 0,7 (0-3,2)	1,1±2,1*** 0,9 (0-3)
TRS	1,7±1 1,6 (0,4-3,8)	0,8±0,6 0,8 (0-1,8)	0,9±0,6† 0,4 (0-2,2)	1,6±0,9 1,5 (0,2-3,4)	0,8±0,6 0,8 (0,1-1,8)	0,5±0,5† 0,4 (0-1,6)	2,3±1,4 2,5 (0,5-4,5)	1,0±0,7 0,8 (0-2,7)	1,8±1,7† 1,0 (0,4-4,5)
TSS	2,7±1,3 2,4 (0,9-4,6)	1,1±0,6 1,0 (0-2,1)	1,1±0,9†† 1,0 (0-3,8)	3,2±1,9 2,8 (0,8-8,3)	1,3±0,9 1,2 (0,4-4,2)	0,8±0,7†† 0,6 (0-2,5)	3,8±2,3 3,3 (0,7-7,6)	2,1±1,7 1,6 (0-5,5)	2,6±2,2†† 1,5 (0,5-6,5)
TMS	3,8±0,8 3,7 (2,9-6,0)	1,1±0,6 1,0 (0-2,1)	0,9±0,8††† 1,0 (0-3,0)	3,7±1,6 3,5 (2,0-8,3)	1,3±0,7 1,0 (0,7-3,2)	1,0±0,9††† 1,0 (0-2,5)	3,7±0,7 3,7 (2,8-5,7)	2,3±1,5 2,0 (0,5-6,2)	2,9±0,9††† 3,0 (1-4)
KS (µg/gün) dozu	428±67	158±77	100±85 [▲]	477±128	193±58	114±76 [▲]	442±89	266±128 [‡]	383±50 [▲]
12.ayda KS kesme (n;%)			6 (%35)			3 (%20)			% 0 ^{‡‡}
Yıllık atak sayısı	1 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-3)	1 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-3)	1 (0-2) ^{‡‡‡}	1 (0-2) ^{‡‡‡}

VAS: Görsel değerlendirme skalası, **TAS:** Total astım semptom skoru, **TRS:** Total rinit semptom skoru, **TSS:** Toplam semptom skoru, **TMS:** Total medikasyon skoru, **KS:** Kortikosteroid.

* VAS: 12.ayda SKIT + D vit. ve FT (p= 0,001), SKIT ve FT grubu (p=0,001) arasında karşılaştırma (Independent samples T test).

** TAS: 6.ayda SKIT + D vit. ile FT grubu arasında değerlendirme (Mann Whitney-U testi), p=0,001.

*** TAS: 12.ayda SKIT + D vit. ve FT (p= 0,002), SKIT ve FT grubu (p=0,01) arasında karşılaştırma (Mann Whitney-U testi).

' TAS: 6.ayda SKIT + D vit. ile SKIT arasında değerlendirme (Mann Whitney-U testi), p=0,01.

† TRS: 12.ayda SKIT + D vit. ve FT (p= 0,03), SKIT ve FT grubu (p=0,003) arasında karşılaştırma (Mann Whitney-U testi).

†† TSS: 12.ayda SKIT + D vit. ve FT (p= 0,01), SKIT ve FT grubu (p=0,003) arasında değerlendirme (Mann Whitney-U testi).

††† TMS: 12.ayda SKIT + D vit. ve FT (p= 0,001), SKIT ve FT grubu (p=0,001) arasında karşılaştırma (Mann Whitney-U testi).

[▲] KS miktarı 12. ayda SKIT +D vit. ile FT (p=0.001), SKIT ile FT grubu (p=0.001) arasında karşılaştırma Independent samples T test.

[‡] KS miktarı: 6.ayda SKIT+Dvit ve FT arasında değerlendirme (Independent samples T test), p= 0,01.

^{‡‡} 12.ayda KS kesme oranları: SKIT+Dvit grubunda diğer 2 gruba göre anlamlı fark (Ki-kare testi), p=0,02.

^{‡‡‡} 6. ve 12.ayda SKIT + D vit. ve FT (p=0,001), SKIT ile FT grubu (p=0.001) arasında değerlendirme (Mann Whitney-U testi).

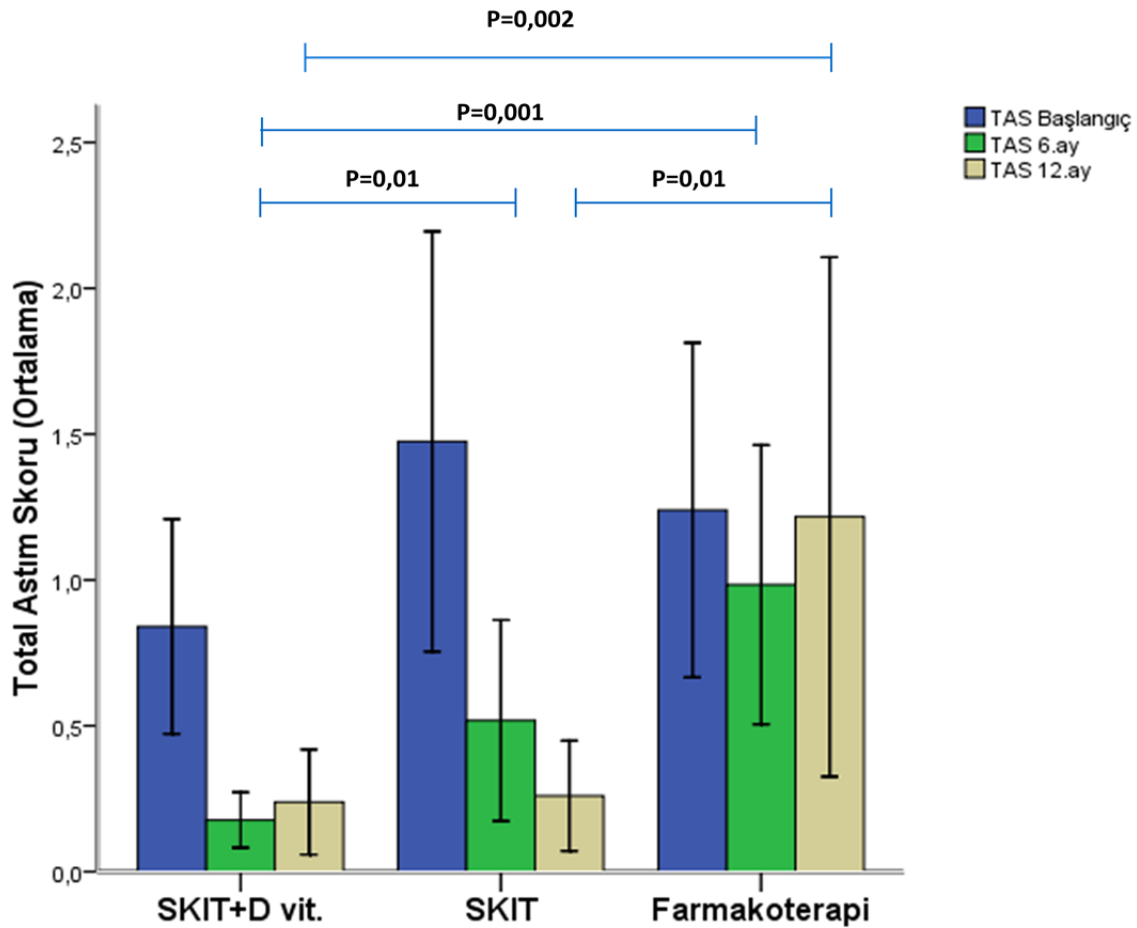
4.1.1. Semptom Skorlarının Değerlendirilmesi:

A) Total astım semptom skoru (TAS):

Çalışmanın 6. ayında SKIT + D vit. alan grupta TAS değerleri SKIT ve FT alan gruplara göre anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla, $p=0,01$, $p=0,001$). Bu fark SKIT ile FT grubu arasında gözlenmedi ($p=0,07$). Şekil 4’de gruplar arasında TAS değerlendirilmesi sunulmuştur.

12. ayda yapılan değerlendirmede, SKIT + D vit. ile SKIT gruplarında FT grubuna göre TAS açısından anlamlı azalma saptandı (sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,01$).

Ayrıca SKIT + D vit. ile SKIT gruplarında izlemin 6. ve 12. ayında bazale göre TAS’ unda anlamlı düşme gözlemlendi (SKIT + D vit. grubu: sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,005$, SKIT grubu: sırasıyla; $p=0,002$, $p=0,001$).



Şekil 4: SKIT + D vit., SKIT ve farmakoterapi grupları arasında total astım skoru

B) Total rinit semptom skoru (TRS):

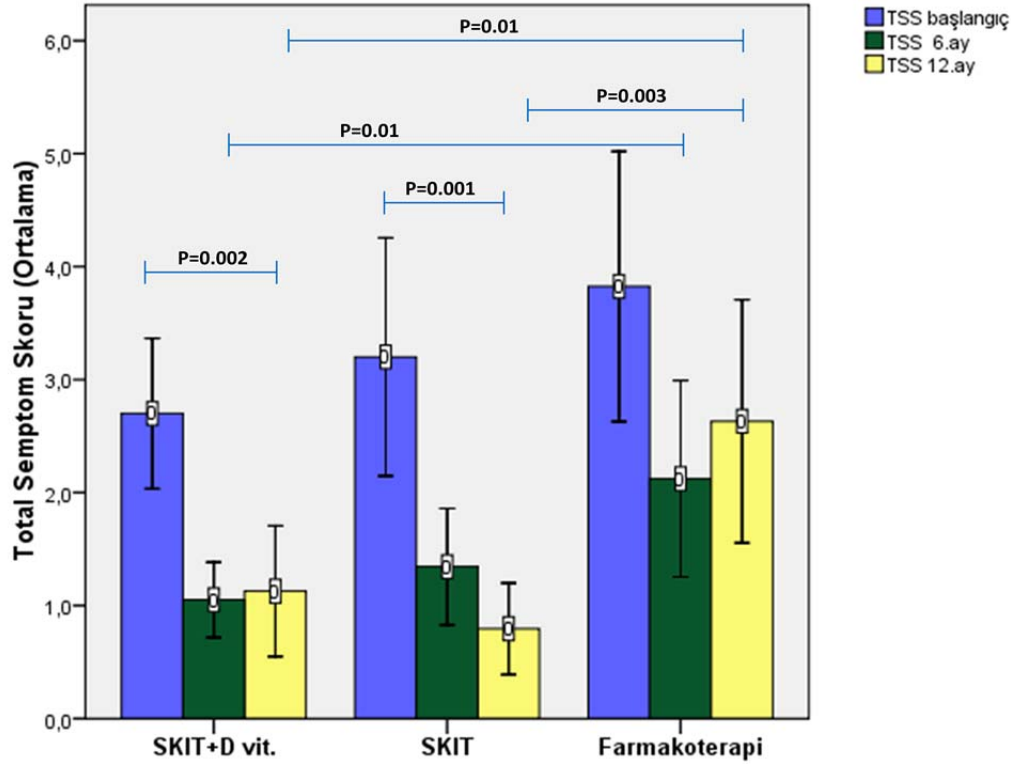
İzlemin 6. ayında gruplar arasında fark görülmedi. 12. aydaki değerlendirmede ise SKIT + D vit. ile SKIT gruplarında FT grubuna göre anlamlı azalma saptandı (sırasıyla; $p=0,03$, $p=0,003$).

Grup içi değerlendirmede; SKIT + D vit. ile SKIT gruplarında izlemin 6. ve 12. ayında bazale göre TRS değerlerinde anlamlı düşme gözlemlendi (SKIT + D vit. grubu: sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,007$, SKIT grubu: sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,002$).

C) Total semptom skoru (TSS):

Çalışmanın 6. ayında gruplar arasında fark görülmezken, 12. ayda TSS değerinde SKIT + D vit. grubunda FT'ye göre anlamlı azalma saptandı ($p=0,01$). Benzer fark SKIT alan grup ile FT grubu arasında da bulundu ($p=0,003$).

Grup içi değerlendirmede; SKIT + D vit. grubunda çalışma başlangıcına göre 12. ayda TSS'unda ($p=0,002$) istatistiksel azalma saptandı. Benzer azalma SKIT grubunda da görüldü ($p=0,001$). Farmokoterapi grubunda semptomlarda azalma görülmesine rağmen bu azalma anlamlılığa ulaşmadı. Şekil 5'de semptom skorları gösterilmektedir.



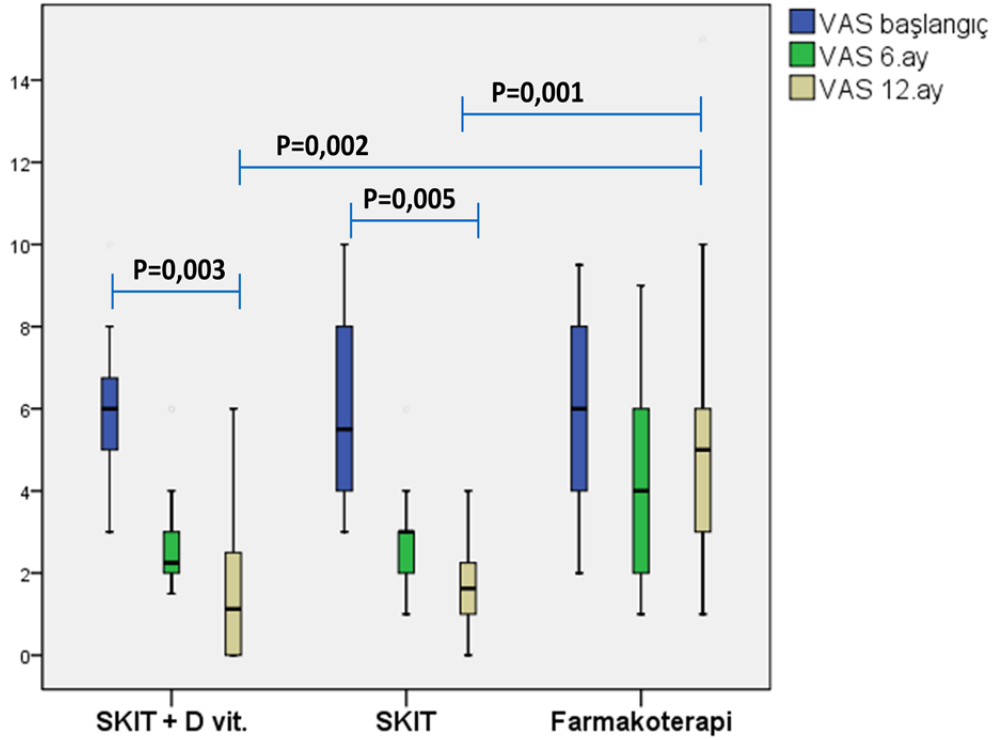
Şekil 5: SKIT + D vit., SKIT ve farmakoterapi gruplarında total semptom skoru

4.1.2. Görsel Değerlendirme Skalası (VAS):

Çalışmanın 6.ayda yapılan değerlendirmede immünoterapi grupları ile FT arasında fark saptanmadı. Çalışma sonunda ise, SKIT + D vit. ile FT grubu ($p=0,002$), SKIT ile FT grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı fark saptandı. Farmakoterapi grubunda VAS değerleri diğer iki gruba göre daha yüksekti. Her iki immünoterapi grup arasında takip sırasında fark görülmedi.

Grup içi değerlendirmede; her iki immünoterapi grubunda 6. ve 12. ayda VAS değerlerinde anlamlı azalma saptandı (D vitamini için: $p=0,001$, $p=0,003$, SKIT için: $p=0,001$, $p=0,005$). Şekil 6'de VAS değerlerinin aylara göre dağılımı sunulmaktadır.

Astım için VAS değerlendirmesi yapıldığında, 6. ayda SKIT + D vit. grubunda FT'ye göre anlamlı düşme görülürken ($p=0,01$), SKIT ve FT arasında bu fark görülmedi ($p=0,08$). SKIT + D vit. ile SKIT grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.



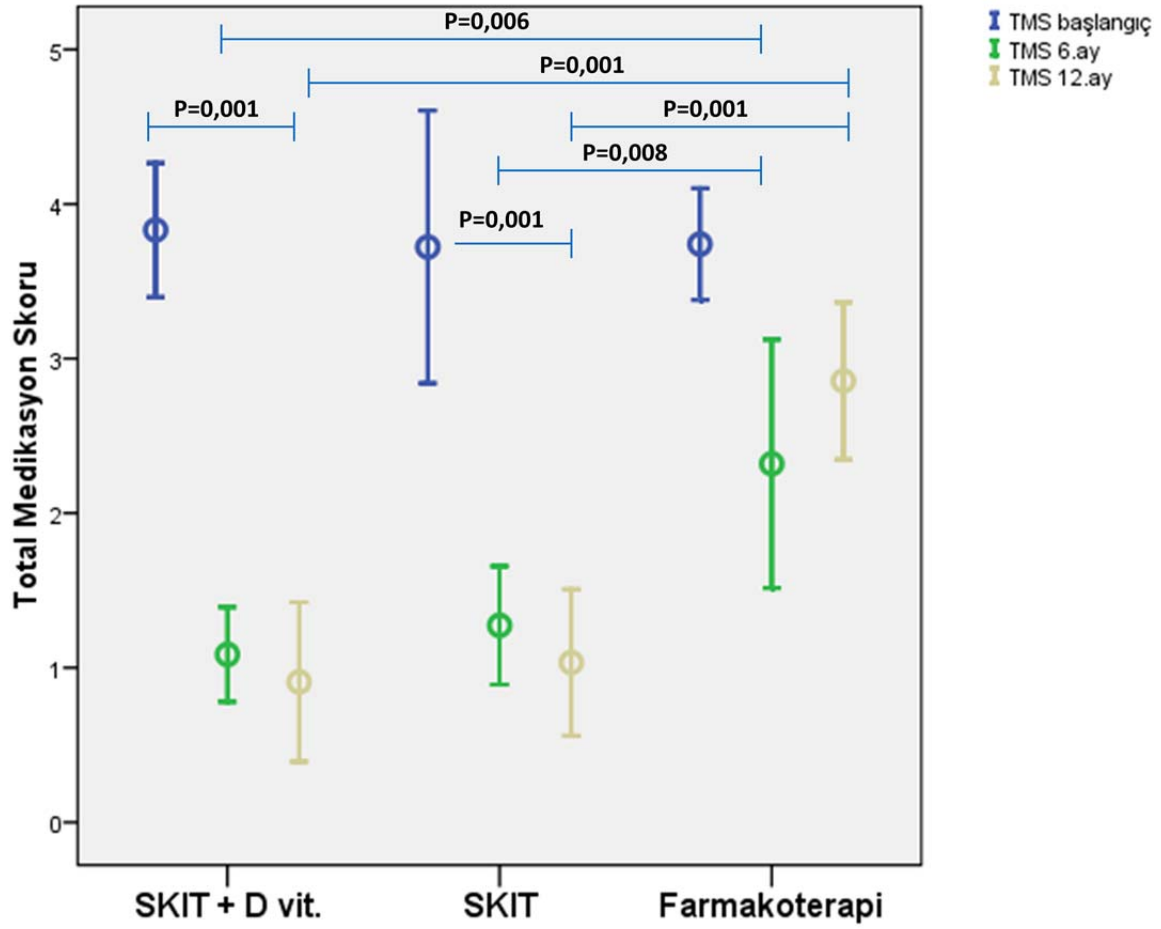
Şekil 6: VAS değerlerinin aylara göre dağılımı

4.1.3. Medikasyon skorlarının değerlendirilmesi:

A) Total Medikasyon Skoru (TMS):

SKIT+ D vit. ile farmakoterapi grupları arasında 6. ve 12.ayda anlamlı fark saptandı. Buna göre D vitamini alan grupta TMS istatistiksel olarak daha düşük bulundu (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,001$). SKIT ile farmakoterapi grubu karşılaştırıldığında da anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0,001$, $p=0,008$). Her iki IT grubu arasında fark bulunmadı.

Grup içi değerlendirmede; SKIT + D vit. ve SKIT grubunda başlangıca göre 6. ve 12.aylarda TMS’da anlamlı düşüş görüldü (SKIT + D vit. için sırasıyla $p=0,001$, $p=0,001$, SKIT için sırasıyla, $p=0,002$, $p=0,001$). Öte yandan, farmakoterapi grubunda ise anlamlı fark görülmedi. Şekil 7’de TMS sonuçları gösterilmiştir.



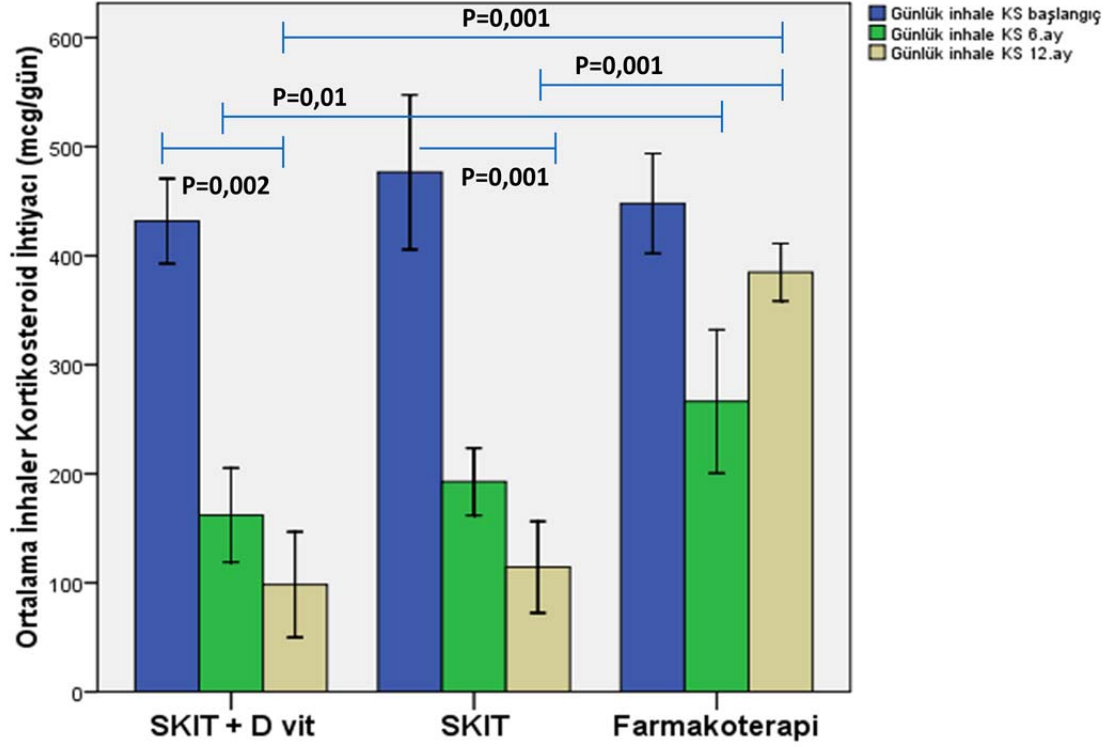
Şekil 7: Gruplar arasında total medikasyon skorları

B) İnhaler Kortikosteroid Dozu:

Çalışma grupları Kortikosteroid dozu açısından 6.ayda değerlendirildiğinde, gruplar arasında en düşük miktarın SKIT + D vit. grubunda olduğu saptandı (158 ± 77 mcg/gün). Farmakoterapi (266 ± 128 mcg/gün) alan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptandı ($p=0,01$). SKIT grubu ($192,7 \pm 55,5$) ile FT arasında sınırda anlamlılık gözlemlendi ($p=0,05$). SKIT + D vit. ile SKIT grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

12. ayda ise SKIT + D vit. (100 ± 85 mcg/gün) ve SKIT gruplarının (114 ± 76 mcg/gün) inhaler kortikosteroid ihtiyaçlarının farmakoterapiye (383 ± 50 mcg/gün) göre istatistiksel olarak daha az olduğu gözlemlendi (sırasıyla; $p=0,001$, $p=0,001$).

Grup içi değerlendirmede; SKIT + D vit. ile SKIT grubunda başlangıca göre 6. ve 12. ayda inhale steroid ihtiyacının anlamlı olarak azaldığı saptandı (SKIT + D vit. için: $p=0,005$, $p=0,002$, SKIT için: $p=0,006$, $p=0,002$). Şekil 8’de günlük kortikosteroid ihtiyacı özetlenmektedir.



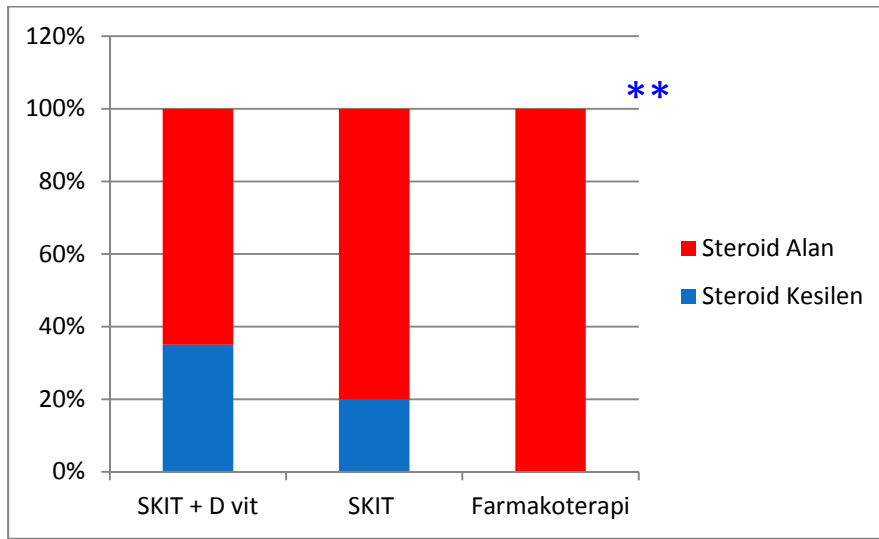
Şekil 8: Günlük kortikosteroid ihtiyacı

4.1.4. Farmakoterapi Grubuna Göre İyileşme Oranlarının Değerlendirilmesi:

Çalışmanın sonunda farmakoterapi grubunun median değerlerine göre vitamin D alan grupta iyileşme oranları sırasıyla; **TAS:** %80, **TRS:** %60, **TSS:** %100, **TMS:** %100 olarak saptandı. SKIT grubunda ise farmakoterapi’ye göre iyileşme oranları; **TAS:** %70, **TRS:** %60, **TSS:** %86, **TMS:** %100 olarak gözlemlendi. D vitamini astım semptomlarını ve total semptom skorlarını yüzde olarak SKIT’e göre daha iyi düşürmekte idi.

4.1.5. Kortikosteroid Kesme Oranlarının Değerlendirilmesi:

Çalışmanın sonunda kortikosteroid tedavisinin kesildiği hastalar göz önünde alındığında, tedavinin en fazla kesildiği grubun D vitamini alan grup olduğu görüldü (n=6). Diğer gruplarda bu oran daha az olup, SKIT grubunda 3 hastada steroid kesilirken, farmakoterapi grubunda ise hiçbir hastanın tedavisi kesilemedi. Bu açıdan, SKIT + D vit. grubunda diğer 2 gruba göre anlamlı fark saptandı (p=0.02). Şekil 9’da kortikosteroid kesilme yüzdeleri gösterilmektedir.



** Ki-kare testi (p=0,02)

Şekil 9 Kortikosteroid kesilme yüzdeleri

4.1.6. Yıllık Atak Sayısı:

Bazal D vitamini düzeyine göre değerlendirildiğinde; tüm hastalarda D vitamini düzeyi artıkça astım atak sayısının anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (p=0,03, r= - 0,32, Şekil 10).

En düşük atak sayısı D vitamini alan grupta saptandı ($1,6 \pm 1,3$). Gruplar arası karşılaştırmada ise SKIT + Dvit. ile FT ve SKIT ($2,1 \pm 1,3$) ile FT ($3,3 \pm 1,6$) grubu arasında yıllık atak sayısı açısından anlamlı fark gözlemlendi. Bu fark farmakoterapi grubunda daha fazla atak görülmesi şeklindeydi (sırasıyla, p=0,001, p=0,001).

4.2. Laboratuvar Testlerinin Değerlendirilmesi:

4.2.1. Solunum Fonksiyon testi, Reversibilite, non-spesifik Bronşiyal Reaktivite

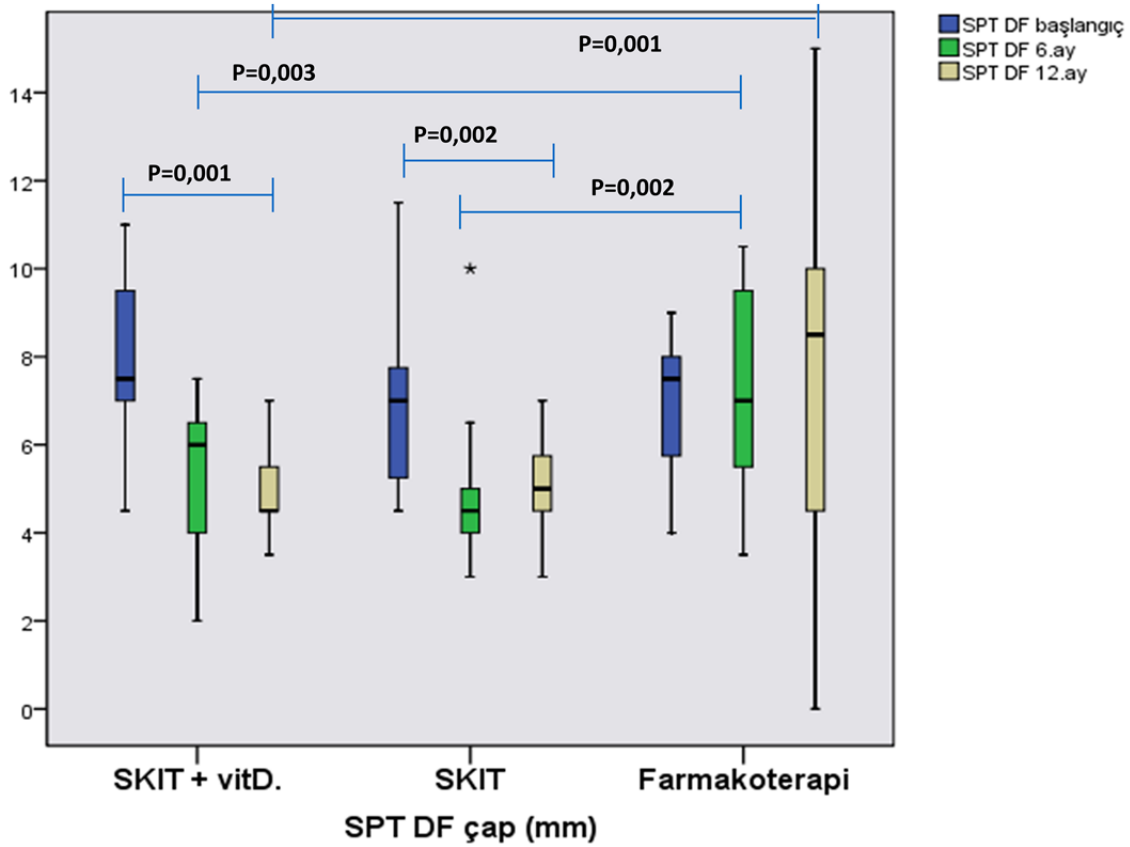
Parametreleri:

Çalışma başlangıcında, 6.ayda ve 12.ayda solunum fonksiyon test parametrelerinde %FVC ($p=0,5$), %FEV1 ($p=0,7$), %PEF ($p=0,9$), %FEF25-75 ($p=0,9$) değerlerinde 3 grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Her üç grupta bu değerlerin %80 predikte değerinin üzerinde olduğu görüldü. Çalışma grupları arasında başlangıçta ve çalışma sonunda %FEV1'de reversibilite değerlerinde anlamlı bir fark saptanmadı. Nonspesifik metakolin bronşiyal reaktivitede provokasyon konsantrasyonları bakımından fark görülmedi. Tablo 6'da solunum fonksiyon parametreleri sunulmuştur.

4.2.2. Cilt Allerji Testi, Spesifik IgE ve Kanda Eozinofil Ölçümü:

Tüm hastaların cilt testlerinde, *D.Farinae* (DF) ve *D.Pteronyssinus* (DP) çapları çalışma başlangıcı, 6.ay ve 12. ayda ölçüldü. Çalışma başlangıcında gerek DF gerekse DP çapları açısından üç grup arasında anlamlı fark yokken (sırasıyla; $p=0,8$, $p=0,3$), 12. ayda immünoterapi gruplarında anlamlı azalma görüldü (DF için sırasıyla $p=0,001$, $p=0,002$, DP için $p=0,0001$, $p=0,002$). Öte yandan, farmakoterapi grubunda çap ölçümlerinde anlamlı değişiklik saptanmadı. Şekil 11 ve Tablo 6'da grupların değerleri gösterilmektedir.

SKIT + D vit. grubunda, başlangıca göre 12. ayda spesifik IgE (DF) değerinde anlamlı düşüş görüldü ($p=0,03$), eozinofil sayısı ve total IgE değerlerinde bir değişiklik gözlenmedi. Diğer 2 grupta ise spesifik IgE, eozinofil sayısı ve total IgE değerlerinde anlamlı bir azalma görülmedi. Çalışma boyunca yeni allerjen duyarlılığı saptanmadı.



Şekil 11: Gruplar arası SPT çap değerlendirilmesi

4.2.3. Bazal Vitamin D Düzeyinin Klinik ve Laboratuvar Bulgularla İlişkisi:

Çalışmamızın önemli amaçlarından biri astımlı çocuklarda D vitamin düzeyinin durumunun değerlendirilmesi ve klinik, laboratuvar bulgularla ilişkisini ortaya koymaktı. Buna göre, tüm hastalar bazal D vitamin düzeyine göre değerlendirildiğinde, %58 olguda düşük, %42 olguda ise normal düzey saptandı. Başlangıçta 3 tedavi grubu arasında D vitamini düzeyi açısından fark bulunmazken, beklenildiği gibi 12. ayda D vitamini alan grupta anlamlı yükselme sağlandı ($31,2 \pm 10,1$ ng/ml, $p=0,007$). SKIT ve farmakoterapi gruplarında değişiklik görülmedi (sırasıyla, $p=0,8$, $p=0,06$).

4.2.4. Vitamin D Kullanımı Sırasında Görülen Yan Etkiler:

12. aylık tedavi sırasında biyokimyasal ve idrar analizlerinde patoloji bir bulgu gözlenmedi.

Tablo 6: Grupların laboratuvar testleri.

	SKIT+Dvit.		SKIT		FT	
Parametreler	Başlangıç	12.ay	Başlangıç	12.ay	Başlangıç	12.ay
SPT DF (mm)	7,9±2,0	5,3±1,3*	6,7±1,9	5,1±1,2*	7,0±2,0	7,8±4,2*
SPT DP (mm)	8,1±2,9	5,2±1,3	7,1±2,2	4,7±2,0	7,3±2,7	7,1±2,9
Total IgE (IU/ml)	478±545 370 (20-2300)	567±668 544 (33-2806)	381±275 325 (80-1209)	568±761 391 (34-3176)	668±734 451 (22-3000)	770±832 507 (41-3600)
S-IgE DF (kU/l)	50,0±34,1	35,8±33,4**	49,6±34,0	41,7±30,1**	54,1±38,6	72,7±33,4**
Eozinofil (mm³)	551±453	369±328	500±342	419±332	661±517	482±277
D vitamini (ng/ml)	19±9,0	31,2±10,1†	20±12	20±6,0†	16±8,0	20±6,0†
logPC20 (mg/ml)	2,4±0,6	1,5±0,9	2,5±0,5	1,2±0,8	1,5±1,0	1,6±1,0
FEV1 (%)	92±14	98±15	89±14	90±9	87±18	93±11
PEF (%)	83±17	90±15	82±8	88±18	82±19	98±17
FEF25/75 (%)	100±21	103±21	103±20	112±25	101±22	105±25

SPT: Deri prick testi, PC: provokasyon konsantrasyonu.

* Bağımsız T testi (p<0,01)

** Tek yönlü ANOVA testi (p<0,01)

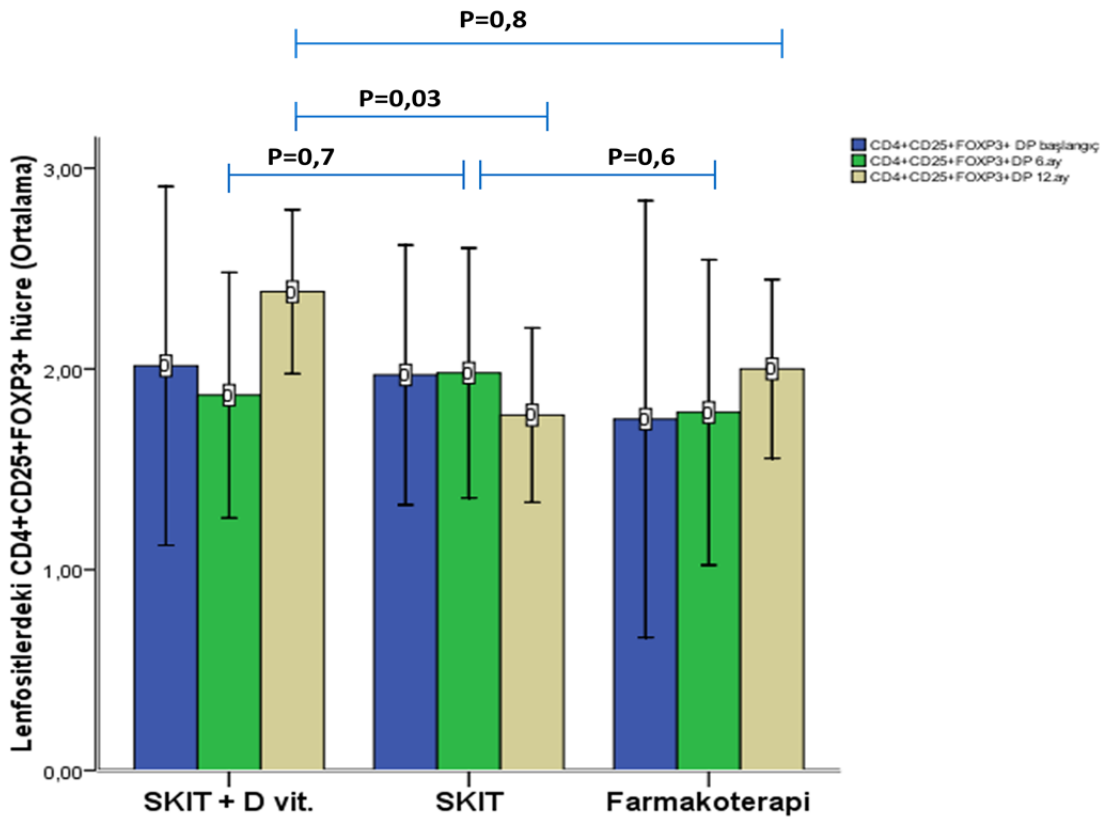
† Tek yönlü ANOVA testi (p<0,01)

4.3. İmmünolojik Çalışmalar:

A) Lenfositlerdeki T regülatuar (CD4+CD25+FOXP3+) hücre yüzdelerinin karşılaştırılması:

Periferik kan mononükleer hücreler izole edilerek *in-vitro* rekombinant Derp 1 (10 mcg/ml) içeren ve içermeyen ortamda 5 gün inkübe edildikten sonra çoğaltılan hücrelerden T regülatuar hücre elde etmek için özgü CD4+CD25+ monoklonal antikorlar ile hücreler boyandı.

Hücre içi boyama yapılarak FOXP3 transkripsiyon faktörü belirlendi. Sonuçlar uyaranlı ve uyaransız olarak başlangıç, 6.ay ve 12.ayda akımölçer cihazında değerlendirildi. Değerlendirmede; tüm olguların CD4+CD25+FOXP3+ hücre yüzdesi karşılaştırıldı. Birinci yıldaki değerlendirmede Derp 1 ile uyarılmış lenfositler içerisinde CD4+CD25+FOXP3+ hücre yüzdesi en fazla SKIT + D vit. grubunda ($2,3 \pm 0,6$) saptandı. Bu oran SKIT uygulanan gruba ($1,7 \pm 0,6$) göre anlamlı olarak daha yüksekti idi ($p=0,03$). Şekil 12’da gruplar arasında T regülatuar hücre yüzdeleri sunulmuştur.



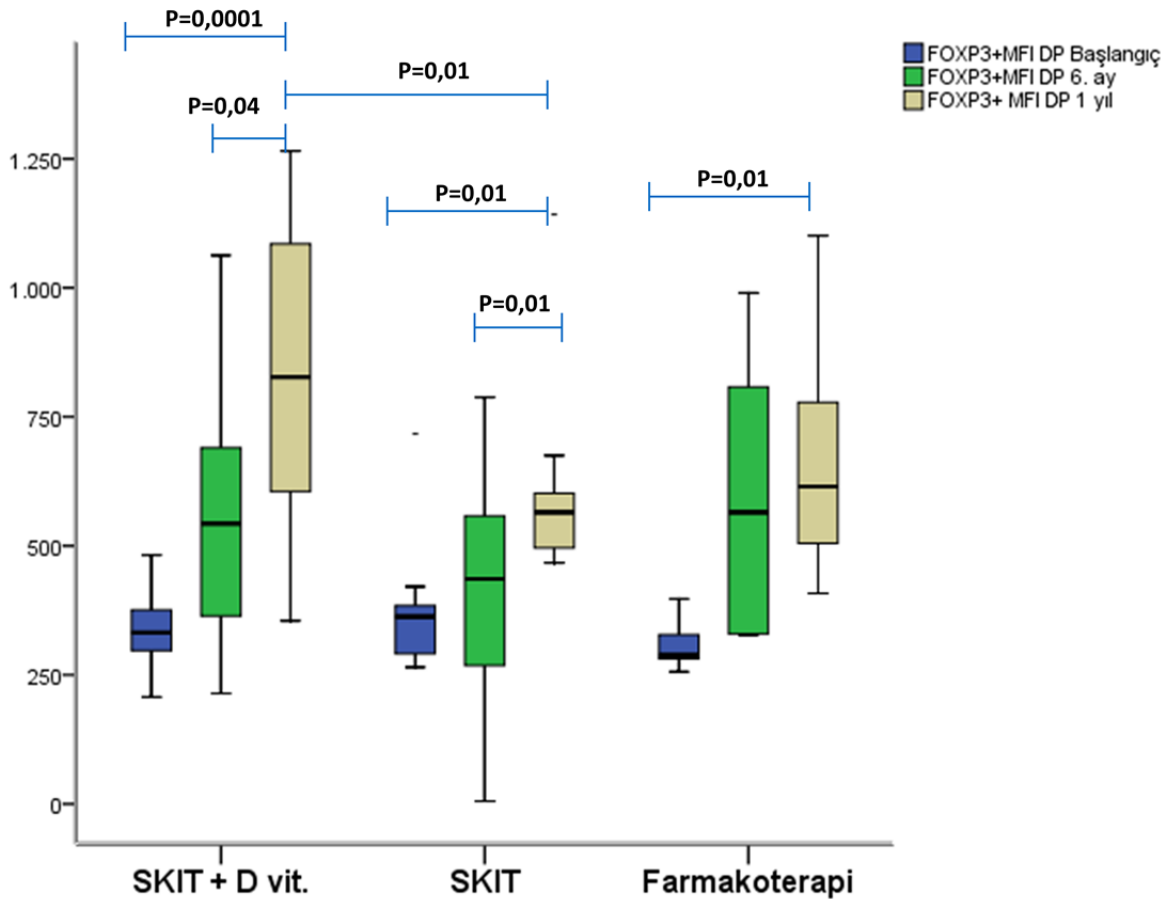
Şekil 12: Gruplar arasında T regülatuar hücre yüzdeleri

B) Lenfositlerdeki FOXP3 floresan yoğunluğunun karşılaştırılması:

Lenfositlerdeki toplam FOXP3 ekspresyonunun ortalama floresan yoğunluğu değerlendirildiğinde, 12.ayda FOXP3 ekspresyonunun ($825 \pm 303,4$) en fazla D vitamini alan grupta görülmüş olup, SKIT ($607,9 \pm 198,2$) grubu ile karşılaştırıldığında sınırda anlamlı fark saptandı ($p=0,05$).

Grup içi değerlendirmede, çalışmanın 12.ayında başlangıca göre Derp 1 (10 mcg/ml) uyarım ile FOXP3 ekspresyon değişim oranının en fazla D vitamini grubunda olduğu görüldü ($p=0,0001$). SKIT ve FT gruplarında da başlangıca göre daha düşük ancak anlamlı fark gözlemlendi ($p=0,01$, $p=0,01$).

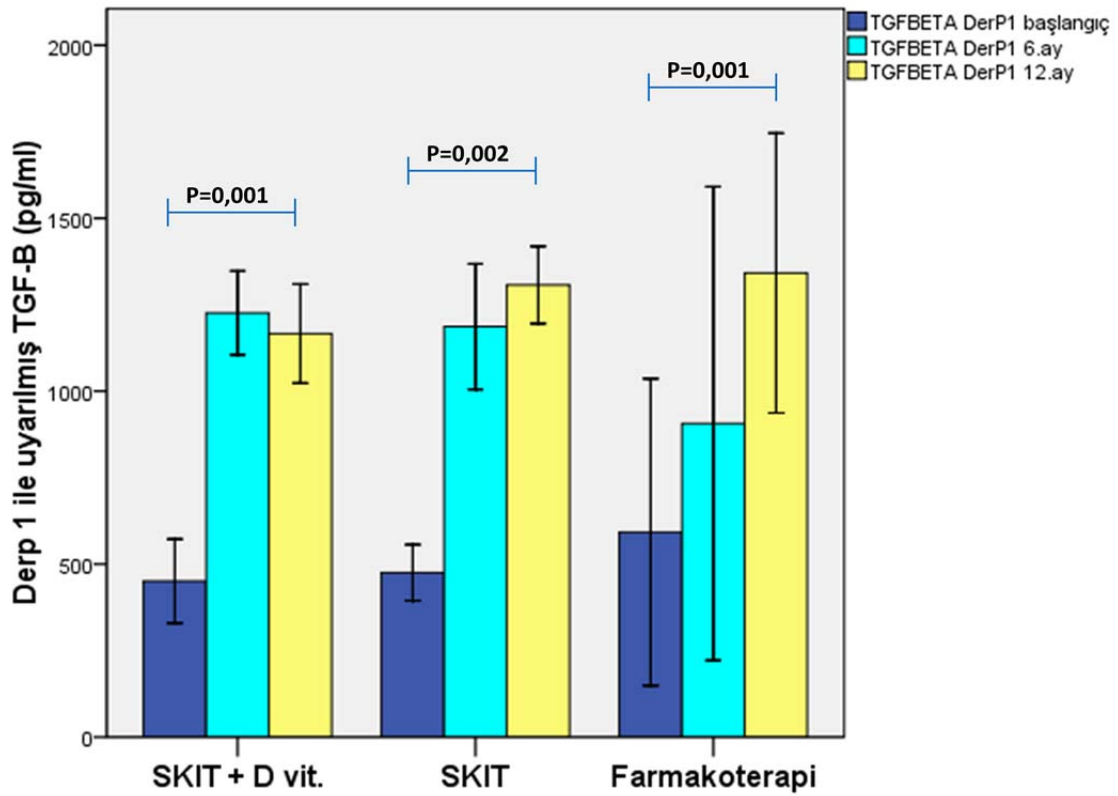
Çalışmanın 6. ve 12.ay arasındaki değerlendirilmede ise, vitamini alan grupta anlamlı artış saptanırken ($p=0,04$), SKIT ve farmakoterapi grubunda anlamlı bir artış saptanmadı ($p=0,06$, $p=0,7$). Şekil 13’de gruplar arasında FOXP3 ekspresyonu gösterilmiştir.



Şekil 13: Gruplar arasında FOXP3 ekspresyon oranları

C) Lenfositlerin Ev Tozu Akarına Özgü Sitokin Salınımları:

Periferik kan mononükleer hücreler izole edilerek *in vitro* ortamda rekombinant Derp 1 (10 mcg/ml) ile uyarıldı. Aynı zamanda uyarımsız ortamda oluşturuldu. Elde edilen hücre kültürü üstü sıvılarında başlangıç, 6.ay ve 12.ayda TGF- β sitokini ELİSA yöntemi ile çalışıldı. Gruplar arası ve grup içinde Derp 1 ile uyarılmış TGF- β yanıtlarında herhangi bir anlamlı fark elde gözlenmedi. Her 3 grupta da başlangıca göre 12.ayda Derp 1 ile uyarılmış TGF- β düzeylerinde anlamlı artış gözlemlendi (sırasıyla p=0,001, p=0,002, p=0,001). Şekil 14’de TGF- β sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 14: Gruplar arasında Derp1 ile uyarılmış TGF- β sonuçları

V. TARTIŞMA

İleriye yönelik, randomize, açık - kontrollü bu çalışmada, ev tozu akarına duyarlı astımlı ($\pm$ rinit) çocuklarda vitamin D kullanımının SKIT üzerine etkinliği araştırılmıştır. Çalışma sonunda, D vitamini kullanımının semptom ve medikasyon skorlarını, cilt allerji testi yanıtlarını farmakoterapi grubuna göre etkin bir şekilde azalttığı görülmüştür. Vitamin D'nin immünoterapiye eklenmesinin diğer çalışma gruplarından farklı olarak, 6. ayda astım semptom skorunu anlamlı derecede düşürdüğü, kortikosteroid kullanım ihtiyacını azalttığı, 1. yıl sonunda ise kortikosteroid kesme oranını anlamlı olarak artırdığı ve spesifik IgE yanıtını düşürdüğü belirlendi. Ayrıca, D vitamini düzeyi artıkça yıllık geçirilen atak sayısında azalma olduğu saptandı. İmmünolojik değerlendirme sonucunda ise, klinik ile uyumlu olarak, 12. ayda SKIT + D vit. grubunda Derp 1 ile uyarılmış CD4+CD25+FOXP3+ hücre yüzdesi ve FOXP3 ekspresyonu diğer tedavi gruplarına göre en yüksek bulundu.

5.1. Ülkemizde ve dünyada D vitamininin durumu

D vitamini yetersizliği dünyada ve ülkemizde sık olarak gözlenmektedir. Ülkemizde D vitamini düzeyi ile ilgili en geniş tarama Erzurum Bölgesinde yapılmış olup, 8631 çocuk taranmış ve %6,1 rikets düzeyinde eksiklik bulunmuştur (105). Yapılan bir diğer çalışmada ise, Ankara ilinde yaşayan, 1-16 yaş grubundaki sağlıklı çocuklarda, %25,5 oranında yetersizlik saptanmıştır (106). Ergenlerde ise %43,8 oranında yetersizlik (10 – 20 ng/ml), %21 oranında eksiklik (<10 ng/ml) gözlenmiş, kapalı giyinme tarzı risk faktörü olarak tesbit edilmiştir (7). Benzer olarak ülkemizdeki gebelerin, %46-80'inde D vitamini eksiklik düzeyinde (< 10 ng/ml) saptanmıştır (107). Önemli bir halk sağlığı problemi olan bu durumun önlenmesi için kalsiyumdan ve vitamin D'den zengin beslenmenin yanında, gebelik boyunca 2000 Ü/gün ve doğum sonrası sadece 1 yaşa kadar değil, okul öncesi ve ergenlik döneminde de 400 Ü vitamin D proflaksisi önerilmektedir (108).

5.2. D vitamini – Astım ilişkisi

Vitamin D düzeyi ile astım sıklığı ve ciddiyeti arasındaki bağlantıyı araştıran çalışmalar giderek artmaktadır (9, 109). Astımlı olgularda D vitamini yetersizliğinin sıklığı Kuzey Amerika'da yapılan çalışmalarda %47 (< 30 ng/ml) civarında iken, ekvator bölgesine yakın, güneş ışınlarına maruziyetin yüksek olduğu Kosta Rika'da 616 astımlı çocuğu içeren

çalışmada ise %28 (< 30 ng/ml) oranında saptanmıştır (6, 110). Benzer durum Ortadoğu ülkelerinde de gözlenmiş olup %68,1 oranında yetersizlik bildirilmiştir (109). Ülkemizde ise astım ve D vitamini ilişkisini araştıran bu ilk çalışmamızda ise, astımlı hastaların %58'inde yetersizlik saptandı. Astımda, vitamini D düşüklüğü yetersiz alım, mevsim değişkenliği, güneş ışınlarına maruziyet azlığı, koyu cilt rengi ve anneden geçen D vitamini azlığı ile ilişkilendirilmektedir (98, 111).

5.3. D vitamininin astım immünopatogenezindeki rolü

D vitamini ile astım immünopatogenezi ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda, D vitaminin akciğer epitel hücrelerinde antimikrobial peptit olan katalisidin yapımını artırdığı ve epitel hücresinde, 25 (OH) D vitamininin 1,25 (OH) D₂'ye dönüştüğü gösterilmiştir (112). Buna bağlı olarak, D vitamini eksikliğinde solunum yolu enfeksiyonlarda artış olabileceği vurgulanmıştır. Vitamin D tedavisi solunum epitelinde kortikosteroid etkinliğini artırarak antienflamatuvar sitokinlerden IL-10'u artırdığı ve eozinofilik infiltrasyondan sorumlu kemoatraktan yapısındaki RANTES miktarını doza bağımlı olarak azalttığı gösterilmiştir (113). Son olarak deneysel çalışmalarda, D vitamini kullanımı ile akciğer düz kas hücrelerinin bölünme yeteneğinin azaldığı buna bağlı olarak yeniden yapılandırma sürecine katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır (114).

5.4. Allerjen immünoterapisine eklenen D vitamininin rolü

5.4.1.Klinik parametreler:

İmmünoterapi sırasında D vitamini alınmasının klinik parametreler üzerine etkisi göz önüne alındığında, D vitamini kullanımının 6. ayda astım semptom skorunu diğer çalışma gruplarına göre anlamlı olarak düşürdüğü, günlük kortikosteroid miktarını farmakoterapi'ye göre anlamlı olarak azalttığı görüldü. Sonuç olarak astımda D vitamini kullanımı, daha erken dönemde astım ve ilaç kontrolü sağlamaktadır. Buna paralel olarak, çalışmamızda toplam yıllık astım atağı sayısı ile D vitamini arasında negatif korelasyon saptandı. Her üç grup kendi arasında değerlendirildiğinde SKIT + Dvit. ve SKIT gruplarının farmakoterapi grubuna göre anlamlı olarak daha az atak geçirdiği görüldü. En az atak sayısı D vitamini alan grupta idi.

5.4.1.1. Günlük steroid miktarı:

Astımda kullanılan inhale steroid miktarı ve D vitamini düzeyi ile ilgili önceden yapılan çalışmalarda (8, 110, 115) steroid ihtiyacının, D vitamini seviyesi düştükçe arttığı bulunmuştur. Vitamin D'nin steroid etkinliği üzerindeki etkisi, Searing DA ve arkadaşları (115) tarafından yapılan çalışmada belirlenmiştir. Bu çalışmada, steroid bağlı indüklenen antienflamatuvar özelliği olan IL-10 ve mitojen aktivated kinaz fosfotaz 1 m RNA düzeylerinin D vitamini ilavesi ile *in-vitro* ortamda D vitaminsiz ortama göre anlamlı olarak arttığı ve bu artış için daha düşük düzeyde steroid miktarına ihtiyaç olduğu saptanmıştır. Kortikosteroid dirençli astımlı olgularında, *in-vitro* ortamda deksametazon ve aktif D vitamini uyarımı ile T regülatuar hücrelerinden IL-10 salgı artışının yanı sıra, kortikosteroid reseptörü salınımındaki inhibisyonun kalktığı saptanmıştır (103). Çalışmamızda, D vitamini kullanımı ile 6.aydaki anlamlı steroid düşüklüğü ve buna paralel olarak astım semptom skorunun düşmesi bu konuda yapılan diğer çalışmaları desteklemektedir. D vitaminin immünoterapide kullanımı ile ilgili yapılmış tek plasebo kontrollü çalışmada (13), ev tozu akarına duyarlı hastalar randomize edilerek SKIT, SKIT + oral 20 mg prednizon (3 ay boyunca-haftalık) ve SKIT + oral 20 mg prednizon (3 ay boyunca-haftalık) + 1000 U/hafta D vitamini gruplarına ayrılmıştır. Üçüncü ve 12. ayda yapılan gruplar arası değerlendirmede, steroid kullanımının SKIT etkisini azalttığı ve semptom skorlarındaki düşmeyi diğer gruplara göre daha az yaptığı anlaşılmıştır. D vitamini ilavesiyle steroid tedavisinin semptom skorları üzerindeki olumsuz etkisi ortadan kalktığı görülmüştür. Çalışmada elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, immünoterapiye ek olarak D vitamini alan bir grup oluşturulmadığı için, D vitaminin etkileri net olarak ortaya konulamamıştır.

5.4.1.2. Astım atak sayısı:

Çalışmamızda toplam yıllık astım atağı sayısının D vitamini düzeyinin azalması ile arttığı saptandı. Vitamin D'nin viral (İnfluenza, RSV) ve bakteriyal enfeksiyonlara (*M.tuberculosis*) karşı koruyuculuğu bilinmekte ve bu immün güçlendirici etkiyi antimikrobiyal peptitleri artırmak yolu ile yaptığı gösterilmiştir (94). Öte yandan, D vitaminin antienflamatuvar etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, D vitamini ilavesi ile solunum yolu enfeksiyonlarında antimikrobiyal peptitlerin arttığı ve virüslere (RSV) karşı verilen antienflamatuvar yanıtın NF-kappa B yolağının inhibe edilmesine bağlı olarak azaltılması, solunum yollarında hasarı düşürebileceği vurgulanmıştır (112, 116). D vitaminin kemik dışı dokularda etki ettiği doz

aralığı tam olarak bilinmese de, deneysel olarak solunum epitel hücresi üzerinde yürütülen çalışmada, D vitamininin süreklilik halinde yapıldığını ve normal dozda 25(OH) D vitamini ile uyarılmasına rağmen (40 ng/ml) 4 kat daha fazla aktif 1, 25 (OH)₂ D vitamini sentezlediği saptanmıştır (112). Buna bağlı olarak, serum D vitamini düşük olsa bile, kemik dışı dokularda yeterli oranda aktif D vitamini oluşabileceği düşünülmektedir. Brehm JM ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (9), 1024 hafif-orta astımlı çocukta, ortalama 4,3 yıllık izlem sonunda, yetersiz D vitamini düzeyi ile astım nedeniyle hastaneye yatış veya acil başvuru arasında, diğer değişkenler (yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, gelir düzeyi, alınan tedavi) eşitlendikten sonra bile anlamlı ilişki saptanmıştır. Yine aynı çalışmada inhale steroid alan ve yeterli D vitamini düzeyi olan grubun izlem sırasında en az atak geçiren grup olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında, astımlı olgulara D vitamini desteğinin verilmesinin atak sayısını azaltabileceğini düşündürmektedir.

5.4.1.3. Allerji testleri:

Literatürde D vitamini kullanımı ile allerji testleri (total IgE, spesifik IgE, eozinofil sayısı) arasında ilişkiyi gösteren çalışmalar mevcuttur (8, 117). Bizim çalışmamızda, 12 aylık takip sonunda, SKIT + D vit. ve SKIT grubunda *D.Farinae* (DF) ve *D.Pteronyssinus* (DP) çaplarında anlamlı azalma görülürken, farmakoterapi grubunda değişiklik görülmemiştir. Subkutan immünoterapi tedavisine D vitamini ilavesiyle spesifik IgE (DF) değerinde anlamlı düşüş saptanmıştır. Geniş katılımlı, 3136 çocuk ve ergen, 3454 erişkin üzerinde yapılan bir sürveyans çalışmasında, çocuk ve ergenlerde D vitamini düzeyi 15 ng/ml altına düşmesi ile deri testinde allerjen pozitifliği sayısının artışı saptanmıştır. Benzer ilişki erişkin yaş grubunda gözlenmemiştir. Sonuç olarak D vitamini özellikle çocuk yaş grubunda astımda allerjen duyarlılığını ve buna bağlı olarak astım ciddiyetini artırabilir.

5.4.2.İmmünolojik parametreler

Allerjik hastalıkların tedavisinde önemli bir yer tutan immünoterapinin etkinliğinin artırılması amacıyla, alüminyum hidroksit (subkutan allerjen salınımını düşürerek), BCG aşı uygulamaları (Th1 yanıtını güçlendirme), TLR ligand uyarıları (CpG, Th1 yanıtını güçlendirme) gibi adjuvant uygulamaları denenmiştir (118). D vitamininin immün sistem üzerinde antijen sunucu hücreleri inhibe etmesi, T regulatuar hücrelerini artırması, immünoterapide adjuvant olarak kullanımının faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Bu

nedenle, çalışmamızda immünoterapi tedavisine D vitamini eklenmesinin immünolojik parametreler üzerine etkisini araştırmak üzere PKMH kültürü içersindeki CD4+CD25+FOXP3+ (doğal T regulatuar) hücre oranı, FOXP3 salınımı değerlendirilmiştir. D vitamini alan grupta T regulatuar hücre oranı 12.ayda SKIT grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Bu yükselmeye FOXP3 salınımı da eşlik etmektedir. Klinik bulgularla değerlendirildiğinde, çalışma sonunda D vitamini kullanan grupta kortikosteroid kesme oranının yüksekliği, artan T regulatuar hücrelerle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmalarda, immünoterapi etki mekanizmalarında doğal T reg hücreleri ve IL-10 ile TGF- β salgılayan indüklenebilir tip 1 Treg (Tr1) rolü olduğu bilinmektedir (3). İmmünoterapide FOXP3 ekspresyon artışını bölgesel olarak gösteren çalışmalar mevcuttur (119). Öte yandan, periferik kanda değişmediğini (120) veya arttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (121). Aktif 1,25 (OH)₂ D vitamini ile CD4+CD25- hücrelerin uyarılması sonucu FOXP3 ve CTLA-4'un artışı saptanmıştır (91). D vitamininin immünoterapi üzerine olan olumlu etkisinin daha fazla hasta sayısı ve farklı dozlar kullanılarak yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, astımlı çocuklarda allerjen immünoterapiye ek olarak verilen vitamin D hastalık kontrolünü daha erken dönemde sağlamış, inhale kortikosteroid dozunu azaltabilmiş ve klinikte sağlanan bu iyileşme, allerjen ile uyarılmış T regülör hücre yüzdesi ve hücre içi FOXP3 gösteriminin artışı ile ilişkili bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar allerjen immünoterapisinde vitamin D'nin adjuvant olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

VI. SONUÇLAR

- Tedavinin 12. ayında her iki immünoterapi yöntemi farmakoterapi alanlara göre total semptom skorlarını daha belirgin düşürmektedir.
- D vitamini alan grupta, SKIT ve FT grupları ile karşılaştırıldığında astım skorları 6.aydan itibaren anlamlı azalmaktadır.
- Görsel değerlendirme skalası değerlendirmesinde çalışma sonunda, SKIT+ D vit. ve SKIT alan gruplarla farmakoterapi grubu arasında anlamlı fark görüldü.
- Astım için görsel değerlendirme skalası değerlendirmesi yapıldığında, 6. ayda SKIT + D vit. grubunda FT'ye göre anlamlı düşme görülürken, SKIT ve FT arasında bu fark sınırdan anlamlı idi.
- SKIT+ D vit. ve SKIT alan gruplarla farmakoterapi grubu arasında 6. ve 12.ayda total medikasyon skorlarını düşürme açısından anlamlı fark saptandı.
- Kortikosterid ihtiyacı 6.ayda SKIT + D vit. grubunda en düşüktü. Farmakoterapi ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptandı.
- Çalışmanın sonunda her üç grupta inhaler kortikosteroid kesme oranları en yüksek SKIT + D vit. grubunda görüldü. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı fark saptandı.
- En düşük yıllık atak sayısı D vitamini grubunda gözlendi. Gruplar arası karşılaştırmada SKIT+ D vit. ile FT ve SKIT ile FT grubu arasında anlamlı fark gözlendi.
- Tüm hastalar değerlendirildiğinde, bazal D vitamini düzeyine göre değerlendirildiğinde; D vitamini düzeyi ile yıllık geçirilen atak sayısı arasında anlamlı negatif korelasyon saptandı.
- Bazal D vitamin düzeyine göre değerlendirildiğinde, %58 olguda yetersiz, %42 olguda yetersiz D vitamin düzeyi saptandı.

- İmmünoterapi grubunun cilt testlerinde, *D.Farinae* (DF) ve *D.Pteronyssinus* (DP) çapları açısından 6.ay ve 12. ayda farmakoterapiye göre anlamlı düşme gözlemlendi.
- SKIT+Dvit. grubunda, başlangıca göre 12. ayda spesifik IgE (DF) değerinde anlamlı azalma görüldü.
- *In-vitro* ortamda Derp 1 ile uyarılmış lenfositler içerisinde 12.ayda CD4+CD25+FOXP3+ hücre oranı en fazla SKIT+D vit. grubunda saptandı. Bu oran SKIT uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha yüksekti idi.
- FOXP3 ekspresyonunun ortalama floresan yoğunluğu değerlendirildiğinde, Derp 1 ile uyarılmış durumda SKIT + D vit. grubunda 12. ayda 6. aya göre anlamlı artış görüldü. Çalışma sonunda SKIT + D vit. ile SKIT grupları arasında sınırda anlamlı fark saptandı.
- Her 3 grupta da başlangıç ve 12.ay Derp 1 uyarılmış TGF- β anlamlı artış gözlemlendi.

VII. KAYNAKLAR

1. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006; 368:733-43.
2. National Institutes of Health. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention Revision, 2010. <http://www.ginaasthma.org>.
3. Akdis, M, Akdis, C.A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 780-91.
4. Searing DA, Leung DY. Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010; 30: 397-409.
5. Melamed ML, Kumar J. Low levels of 25-hydroxyvitamin D in the pediatric populations: prevalence and clinical outcomes. *Ped Health* 2010; 4: 89-97.
6. Çoruh M. Ülkemizde rikets sorunu. *Pediatric Katkı Dergisi* 1981; 2: 9-13.
7. Hatun S, Islam O, Cizmecioglu F, Kara B, Babaoglu K, Berk F, Gokalp AS. Subclinical vitamin D deficiency is increased in adolescent girls who wear concealing clothing. *J Nutr* 2005; 135: 218–22.
8. Brehm JM, Celedon JC, Soto-Quiros ME, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 765–71.
9. Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AL, et al. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 52-8.
10. Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 68–77.
11. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164: 2405-11.
12. Weiner, H. L. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and TR1 and TH3 regulatory cells. *Nat. Immunol* 2001; 2: 671-2.

13. Majak P, Rychlik B, Stelmach I. The effect of oral steroids with and without vitamin D3 on early efficacy of immunotherapy in asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1830-41.
14. Expert panel report 3 (EPR-3): Guidelines for the diagnosis and management of asthma- summary report 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120 (5 Suppl): S94-138.
15. Stock P, Macaubas C, Dekruyff RH, Umetsu DT. Immunology of the asthmatic response. In: Leung DYM, Sampson HA, Raif G, Szefer SJ, eds. *Pediatric Allergy*. 2nd edition. Saunders Elsevier; 2010: 336-47.
16. Hammad H, Lambrecht BN Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 193-204.
17. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 872-97.
18. Barnes PJ. Role of GATA-3 in allergic diseases. *Curr Mol Med* 2008; 8: 330-4.
19. Shi HZ, deng J, Xu H, et al. Effect of inhaled inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asmathics. *Am J Respir Crit Care med* 1998; 157: 1818-21.
20. Levy F, Kristofic C, Heusser C, Brinkmann V. Role of IL-13 in CD4 T cell dependent IgE production in atopy. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112: 49-58.
21. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008; 9: 1347-55.
22. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6: 1133-41.
23. Al Khatib S, Keles S, Garcia-Lloret M, et al. Defects along the T(H)17 differentiation pathway underlie genetically distinct forms of the hyper IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 342-8.
24. Pichavant M, Goya S, Meyer EH, et al. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med* 2008; 205: 385-93.
25. Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; 402: B18-23.

26. Robinson DS. The role of the T cell in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 1081-91.
27. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factorbeta-secreting Th3 regulatuary cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207-14.
28. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatuary T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 227-35.
29. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatuary T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 735-46.
30. Stein RT, Holberg CJ, Morgan WJ, et al. Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* 1997; 52: 946-52.
31. Vater KZ, McBride JT. Pulmonary function testing in childhood asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 1998; 18: 133-48.
32. Cockcroft DW. Bronchoprovocation methods: direct challenges. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003; 24: 19-26.
33. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, et al. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*. 2011 Nov 4. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02728.x. [Epub ahead of print].
34. Smith PH, Ownby DR. Clinical Significance of Immunoglobulin E. In: Middleton's Allergy Principles and Practice. Adkinson NF, Yunginer JW, Buse WW, Bochner BS, Holgate ST, Slomons FER, 7th eds. Mosby 2008.p.845-54.
35. Hamilton RG, Adkinson NF Jr. In vitro assays fort the diagnosis of IgE mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 213-25.
36. Gotzsche PC, Johansen HK. House dust mite control measures for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 2: CD001187.
37. Rodrigo G, Rodrigo C, Burschtin O. A meta-analysis of the effects of ipratropium bromide in adults with acute asthma. *Am J Med* 1999; 107: 363-70.
38. Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med* 2003; 139: 359-70.
39. Guilbert, T. W. et al. Long-term inhaled corticosteroids preschool children at high risk

- for asthma. *N Engl J Med* 2006; 354: 1985–97.
40. Jayasiri B, Perera C. Successful withdrawal of inhaled corticosteroids in childhood asthma. *Respirology* 2005; 10: 385-8.
 41. Lipworth BJ. Systemic adverse effects of inhaled corticosteroid therapy: A systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 1999; 159: 941-55.
 42. Lee DK, Bates CE, Currie GP, et al. Effects of high-dose inhaled fluticasone propionate on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in asthmatic patients with severely impaired lung function. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93: 253-8.
 43. Agertoft L, Pedersen S. Effect of long-term treatment with inhaled budesonide on adult height in children with asthma. *N Engl J Med* 2000; 343: 1064-9.
 44. Polosa R. Critical appraisal of antileukotriene use in asthma management. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13: 24-30.
 45. Bisgaard H. Effect of long-acting beta2 agonists on exacerbation rates of asthma in children. *Pediatr Pulmonol* 2003; 36: 391-8.
 46. Busse WW, Morgan WJ, Gergen PJ, et al. Randomized trial of omalizumab (anti-IgE) for asthma in inner-city children. *N Engl J Med* 2011; 364: 1005-15.
 47. Saini S, Rosen KE, Hsieh HJ, et al. A randomized, placebo-controlled, dose-ranging study of single-dose omalizumab in patients with H1-antihistamine-refractory chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 567-73.
 48. Freeman J. Vaccination against hay fever; report of results during the last three years. *Lancet* 1914; 1: 1178.
 49. Black JH, Holman J. Treatment of respiratory allergy in children by oral administration of dust and pollen extracts. *J Allergy* 1950; 21: 148-52.
 50. Bousquet J, Müller UR, Dreborg S, et al. Immunotherapy with Hymenoptera venoms. Position paper of the Working Group on Immunotherapy of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1987; 42: 401-13.
 51. Canonica GW, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, et al. Recommendations for standardization of clinical trials with Allergen Specific Immunotherapy for respiratory allergy. A statement of a World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy* 2007; 62: 317-24.

52. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 2007; 62: 943-8.
53. Scadding GK, Brostoff J. Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to house dust mite. *Clin Allergy* 1986; 16: 483–91.
54. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 558-62.
55. Canonica GW, Bousquet J, Casale T, et al. Sub-lingual immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper 2009. *Allergy* 2009; 64: 1–59.
56. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, et al. Immunotherapy with a ragweed toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 1445–55.
57. Casale TB, Stokes JR. Future forms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 8–15.
58. Senti G, Prinz Vavricka BM, Erdmann I, et al. Intralymphatic allergen administration renders specific immunotherapy faster and safer: a randomized controlled trial. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 17908–12.
59. Ross RN, Nelson HS, Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies. *Clin Ther* 2000; 22: 342-50.
60. Abramson M, Puy R, Weiner JM. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 4: CD001186.
61. Soyer OU, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of subcutaneous allergen immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2011; 31: 175-90.
62. Francis JN, James LK, Paraskevopoulos G, et al. Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1120–5.
63. Cady CT, Powell MS, Harbeck RJ, et al. IgG antibodies produced during subcutaneous allergen immunotherapy mediate inhibition of basophil activation via a mechanism involving both FcγRIIA and FcγRIIB. *Immunol Lett* 2010; 130 (1-2):57–65.

64. Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 2011; 41: 1235-46.
65. Wilson DR, Nouri-Aria KT, Walker SM, et al. Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 971-6.
66. Malhotra N, Robertson E, Kang J. SMAD2 is essential for TGF beta-mediated Th17 cell generation. *J Biol Chem* 2010; 285: 29044–8.
67. Wachholz PA, Nouri-Aria KT, Wilson DR, Walker SM, Verhoef A, Till SJ, Durham SR. Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios. *Immunology* 2002; 105: 56-62.
68. Majori M, Caminati A, Corradi M, Brianti E, Scarpa S, Pesci A. T-cell cytokine pattern at three time points during specific immunotherapy for mite-sensitive asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 341-7.
69. Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993; 178: 2123-30.
70. Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, et al. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 68–74.
71. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10- year follow up on the PAT study. *Allergy* 2007; 62: 943-8.
72. Des Roches A, Paradis L, Knani J, et al. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteroyssinus* extract. V. Duration of the efficacy of immunotherapy after its cessation. *Allergy* 1996; 51: 430-3.
73. Keles S, Karakoc-Aydiner E, Ozen A, et al. A novel approach in allergen-specific immunotherapy: combination of sublingual and subcutaneous routes. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 808-15.

74. Cevit O, Kendirli SG, Yilmaz M, Altintas DU, Karakoc GB. Specific allergen immunotherapy: effect on immunologic markers and clinical parameters in asthmatic children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; 17: 286-91.
75. Eifan AO, Akkoc T, Yildiz A, et al. Clinical efficacy and immunological mechanisms of sublingual and subcutaneous immunotherapy in asthmatic/rhinitis children sensitized to house dust mite: an open randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 922-32.
76. Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling HJ, Valovirta E. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2006; 61 Suppl 82: 1-20.
77. Cox L, Nelson H, Calabria C, et al. Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127 (Suppl 1):S1–55.
78. Bernstein DI, Wanner M, Borish L, et al. Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990-2001. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1129–36.
79. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007; 24: CD001936.
80. Bernstein DI, Epstein T. Systemic reactions to subcutaneous allergen immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2011; 31: 241-9.
81. Zuberbier T, Bachert C, Bousquet PJ, et al. GA² LEN/EAACI pocket guide for allergen-specific immunotherapy for allergic rhinitis and asthma. *Allergy* 2010; 65: 1525-30.
82. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M; Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008; 122: 398-417.
83. Searing DA, Leung DY. Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010; 30: 397-409.

84. Bozzetto S, Carraro S, Giordano G, Boner A, Baraldi E. Asthma, allergy and respiratory infections: the vitamin D hypothesis. *Allergy*. 2011 Sep 21. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02711.x. [Epub ahead of print].
85. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, et al. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 1308–10.
86. Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 1984; 224:1438–40.
87. Mahon BD, Wittke A, Weaver V, et al. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 922–32.
88. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4(1) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167: 4974–80.
89. Pichler J, Gerstmayr M, Szepefalusi Z, et al. 1 α , 25(OH)₂D₃ inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatr Res* 2002; 52: 12–8.
90. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, et al. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ abrogates regulatory function. *J Clin Invest*. 2009; 119: 387-98.
91. Jeffery LE, Burke F, Mura M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009; 183: 5458-67.
92. Mahon BD, Gordon SA, Cruz J, Cosman F, Cantorna MT. Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *J Neuroimmunol* 2003; 134: 128-32.
93. Tang J, Zhou R, Luger D, et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol* 2009; 182: 4624-32.
94. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311(5768):1770–3.

95. Wah J, Wellek A, Frankenberger M, Unterberger P, Welsch U, Bals R. Antimicrobial peptides are present in immune and host defense cells of the human respiratory and gastrointestinal tracts. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 449-56.
96. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* 2006; 36: 361-70.
97. Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, et al. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol.* 2007; 178: 7190-8.
98. Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, et al. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 788–95.
99. Erkkola M, Kaila M, Nwaru BI, et al. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 875-82.
100. Hata TR, Kotol P, Jackson M, et al. Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 829-31.
101. Yamanaka KI, Kakeda M, Kitagawa H et al. 1, 24-Dihydroxyvitamin D3 (tacalcitol) prevents skin T-cell infiltration. *Br J Dermatol* 2010; 162: 1206–15.
102. Taher YA, van Esch BC, Hofman GA, Henricks PA, van Oosterhout AJ. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 2008; 180: 5211-2.
103. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 2006; 116: 146-55.
104. Wagner CL, Greer FR, Greer FR, et al. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics* 2008; 122: 1142-52.

105. Ozkan B, Buyukavcı M, Aksoy H, Tan H, Akdag R. Erzurum'da 0-3 yas, grubu çocuklarda nutrisyonel rikets sıklığı. *Cocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1999; 42: 389-96.
106. Akman AO, Tumer L, Hasanoglu A, Ilhan M, Caycı B. Frequency of vitamin D insufficiency in healthy children between 1 and 16 years of age in Turkey. *Pediatr Int* 2011; 53: 968-73.
107. Hatun Ş, Ozkan B, Bereket A. Vitamin D deficiency and prevention: Turkish experience. *Acta Paediatr.* 2011; 100: 1195-9.
108. American Academy of Pediatrics. Clinical Report: Prevention of Rickets and Vitamin D Deficiency: New Guidelines for Vitamin D. *Pediatrics* 2003; 111: 908-11.
109. Bener A, Ehlayel MS, Tulic MK, Hamid Q. Vitamin D deficiency as a strong predictor of asthma in children. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157: 168-75.
110. Goleva E, Searing DA, Jackson LP, Richers BN, Leung DY. Steroid requirements and immune associations with vitamin D are stronger in children than adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Feb 11. [Epub ahead of print].
111. Gordon CM, De Peter KC, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004; 158: 531-37.
112. Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, et al. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *J Immunol* 2008; 181: 7090-99.
113. Banerjee A, Damera G, Bhandare R, et al. Vitamin D and glucocorticoids differentially modulate chemokine expression in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2008; 155: 84-92.
114. Song Y, Qi H, Wu C. Effect of 1,25-(OH)₂D₃ (a vitamin D analogue) on passively sensitized human airway smooth muscle cells. *Respirology* 2007; 12: 486-94.
115. Searing DA, Zhang Y, Murphy JR, Hauk PJ, Goleva E, Leung DY. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 995-1000.

116. Hansdottir S, Monick MM, Lovan N, Powers L, Gerke A, Hunninghake GW. Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF-kappaB-linked chemokines and cytokines in airway epithelium while maintaining the antiviral state. *J Immunol* 2010; 184: 965-74.
117. Sharief S, Jariwala S, Kumar J, Muntner P, Melamed ML. Vitamin D levels and food and environmental allergies in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127: 1195–1202.
118. Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M, Akdis CA. Role of bacillus Calmette-Guérin as an immunomodulator for the prevention and treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 552-7.
119. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1467-72.
120. Ajduk J, Marinic I, Aberle N, Rabatic S, Gagro A: Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor beta1-producing T cells in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 100: 314–322.
121. Lin YL, Shieh CC, Wang JY: The functional insufficiency of human CD4 + CD25 high Tregulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF- α modulation. *Allergy* 2008; 63: 67–74.

VII. EKLER

Ek-1A: Bilgilendirme Formu

Sizden ve çocuğunuzdan, ‘**EV TOZU AKARINA DUYARLI ASTIMLI ÇOCUKLARDA D VİTAMİNİ KULLANIMININ İMMÜNOTERAPİ ÜZERİNE ETKİSİ**’ isimli bir klinik araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Bu sayfalarda çalışmayla ilgili bilgiler mevcuttur. Yazıda anlamadığınız sözcükler olabilir. Anlamadığınız herhangi bir sözcük ya da bilgiyi lütfen çalışmayı yürüten doktorunuza sorunuz. Çalışmayı anladıktan sonra çocuğunuzla birlikte çalışmaya katılmayı uygun görürseniz, sizden bir onay formu imzalamanız istenecektir. Saklamanız için size formun bir kopyası verilecektir. Çalışmaya sizin ve çocuğunuzun katılımı tamamıyla isteğe bağlıdır. Çalışmaya katılmayabilirsiniz veya rutin tıbbi bakımdan elde ettiğiniz yararları kaybetmeden, bu çalışmadan herhangi bir zamanda çıkabilirsiniz.

Çalışmanın Amacı: Günümüzde astım tedavisinde standart ilaç tedavisinin dışında spesifik immunoterapi giderek önem kazanmıştır ve etkin bir şekilde uygulanmaktadır. Son yıllara immünoterapi etkinliğini daha fazla artırmak için çeşitli yöntemler denenmeye başlanmıştır. Ülkemiz çocuklarında sıklıkla yetersiz seviyede bulunan vitamin D’nin immünoterapi etkinliğine artırdığına dair deneysel çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada amacımız yan etkisi olmayan vitamin D’nin immünoterapi etkinliğini artırıp artırmadığını araştırmaktır.

Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler ve Tedavi: Katılımcıdan kan örneği alınacak, cilt testi ve solunum testi yapılacaktır. Bu çalışmadan elde edilen tüm bilgiler tıbbi kayıtlarda saklı tutulacaktır. Ayrıca elde edilen sonuçlar doğrultusunda size bilgi verilecektir.

EK-1B: Onam Formu

HASTA AİLESİNİN İFADESİ VE İMZASI

‘EV TOZU AKARINA DUYARLI ASTIMLI ÇOCUKLARDA D VİTAMİNİ KULLANIMININ İMMÜNOTERAPİ ÜZERİNE ETKİSİ’ isimli klinik araştırma çalışmasına ait tanımlamayı okudum ve bu konuda bana anlayacağım sözcük ve terimlerle açıklamalar yapıldı. Soru sorma şansı verildi ve tüm sorularım anlayacağım şekilde yanıtlandı.

Çocuğumun ve benim katılımının isteğe bağlı olduğunu anlamış bulunmaktayım. Bu çalışmasının amaçını, yöntemini, riskleri ve yaralarını, çalışmaya katılmaya karar verilebilecek kadar kavramış bulunmaktayım.

Doktorumun çocuğuma ait bilgileri toplayıp kullanmasını kabul ediyorum. Çalışmadan ayrılırsak, elde edilmiş bilgilerin kullanılmasını kabul ediyorum. Bu formu imzalayarak, çocuğumla birlikte bu çalışmaya katılmayı kendi isteğimle kabul ediyorum. Bu çalışmadan sorumlu olan doktorun, çalışma sırasında ortaya çıkabilecek ve çocuğumun çalışmaya devam etmesine izin verme isteğimi etkileyebilecek her türlü yeni bulgu hakkında beni haberdar edecektir.

Ben ve çocuğuma ait çalışma kayıtlarının lokal Etik İnceleme Kurulu’na iletilmesine izin veriyorum. Bu onay formunu imzalayarak, buradaki bilgileri okuduğumu, bana ve çocuğuma istediğimiz şekilde sorular sormamıza izin verildiğini ve sorularımıza yanıtlar olduğumuzu kabul etmiş olmaktadır.

Bu formu imzaladıktan sonra, tarafıma, buradaki bilgilerin ve imzaladığım onay formunun bir kopyası verilecektir.

Hasta ismi:

Hastanın kendisi, ebeveyni, yasal vekili, temsilcisinin ismi ve imzası, tarih:

Aşağıda imzası bulunan şahsım, ismi yukarıda yazılı olan hasta adına onay verme yetkisine sahip kişiye çalışmanın ilgili ayrıntılarını tam olarak açıklamış bulunmaktayım ve bu imzalı ve tarih atılmış bilgilendirilmiş olur formunun kopyasını temin edeceğim.

Araştırmacı Adı Soyadı, İmzası, Tarih:

Şahit Adı Soyadı, İmzası, Tarih:

Ek-2: Etik Kurul Onayı



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA KURUL BAŞKANLIĞI**

Sayı :B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/ **130**
Konu :

15.09.2011

Sayın : Prof.Dr. Işıl BARLAN

09.2010. 0051 protokol nolu "Evi tozu duyarlı astımlı çocuklarda D vitamini kullanımının immünoterapi üzerine etkisi" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hazer DİRESKENELİ
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Araştırma Etik Kurul Başkanı

EK-3: Semptom ve ilaç takip formu.**GÜNLÜK TAKİP FORMU**

Adı - Soyadı:
Başlangıç Tarihi:

	I. HAFTA	II. HAFTA	III. HAFTA	IV. HAFTA
AY:				
Öksürük 0: Yok 1: Hafif				
Hırıltı 0: Yok 1: Hafif				
Nefes darlığı 0: Yok 1: Hafif				
Sık soluma 0: Yok 1: Hafif				
Burun akıntısı 0: Yok 1: Hafif				
Burun tıkanıklığı 0: Yok 1: Hafif				
Gece öksürüğü 0: Yok 1: Hafif				
Hapşırık 0: Yok 1: Hafif				
Burun kaşıntısı 0: Yok 1: Hafif				
Göz kaşıntısı 0: Yok 1: Hafif				
Göz yaşarması 0: Yok 1: Hafif				
Göz kızarıklığı 0: Yok 1: Hafif				
Flixotide 50, 125 Pulmicort 100, 200				
Ventolin / Brıcanyl 6x2, 4x2, 2x2				
Nazonex / Flixonaze 2X1, 2X2				

EK-4: Görsel Değerlendirme Formu

Tarih: Adı Soyadı: Aldığı tedavi: Son bir hafta içindeki astım ile ilgili şikayetlerinizi (öksürük, hırıltı ve nefes darlığı) aşağıdaki cetvele göre puanlayınız. 0: Yok 5:Orta 10: Ağır 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Son bir hafta içindeki burun ile ilgili şikayetlerinizi (burun akıntısı, kaşıntısı, hapşırık) aşağıdaki cetvele göre puanlayınız. 0: Yok 5:Orta 10: Ağır 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Son bir hafta içindeki göz ile ilgili şikayetlerinizi (gözde kaşıntı, kızarıklık) aşağıdaki cetvele göre puanlayınız. 0: Yok 5:Orta 10: Ağır 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Ek-5: Subkutan İmmünoterapi

► **İçerik:** Sulu ekstre allerjenler alüminyum hidroksit jele emdirilmiştir. Koruyucu olarak % 0.5 fenol bulunur.

► **Endikasyon** Tip I allerjenin spesifik tedavisinde kullanılır. İmmünoterapi IgE mediates hastalıklarda etkin bir tedavi yöntemidir. Tedavi ancak spesifik teşhisten sonra başlatılmalıdır.

► **Ambalaj:** Başlangıç tedavisi 4x5 ml

Devam tedavisi 1x5 ml

► **Dayanıklılık:** 4-8 C’de saklandığı taktirde 2 sene.

Şişe /5 ml	Konsantrasyon SQ-U/ml	
1	100 SQ-U/ml	Mevsim esnasında doz artırımı yapılmaz. Devam fazında hastanın hassasiyet derecesine göre dozu ¼’e kadar indirmek önerilir. Mevsim geçtikten sonra, tekrar bir haftalık doz artırımına geçilebilir. Enjeksiyonlara program dışı ara verildiğinde son enjeksiyondan sonra geçen zaman kontrol edilmelidir. Zaman aralığı geçirilmiş ise doz azaltımına gidilebilir.
2	1000 SQ-U/ml	
3	10.000 SQ-U/ml	
4	100.000 SQ-U/ml	

Haftalık enjeksiyonlar sonucunda, devam dozuna erişiline enjeksiyon aralarını kademeli olarak artırmak gerekir. Örneğin; 2, 4, 6 hafta gibi	Şişe / 5 ml	Konsantrasyon SQ-U/ml
	4	100.000 SQ-U/ml

► Alutard uygulama şeması

Dozlar daima kişisel olarak ayarlanmalıdır. Dozu ayarlarken, hastanın genel durumu, herhangi bir sebeple ile tedaviye ara veriş ya da önceki enjeksiyonlarda reaksiyon görülmesi gibi faktörler dikkate alınmalıdır.

Lokal ve genel reaksiyonların varlığı da dikkate alınarak, maksimum tolere edilebilen doz tesbit edilir. Bu aynı zamanda devam dozu olarak kabul edilir. 100.000 SQ-U önerilen maksimum dozdur ve ekstratin cinsine bağlı olmaksızın optimum başarı ve güvenilirlik ifade eden en yüksek dozdur.(4 nolu şişe – 1ml).

► Şişe 1	Önerilen Doz
100	0.2 ml
SQ-U/ml	0.4 ml
Dozlar haftalık uygulanır	0.8 ml

► Şişe 2	Önerilen Doz
1000	0.2 ml
SQ-U/ml	0.4 ml
Dozlar haftalık uygulanır	0.8 ml

► Şişe 3	Önerilen Doz
10.000	0.2 ml
	0.4 ml
	0.6 ml
	0.8 ml
SQ-U/ml	
Dozlar haftalık uygulanır	

► Şişe 4	Önerilen Doz
100.000	0.1 ml
	0.2 ml
	0.4 ml
	0.6 ml
	0.8 ml
	1.0 ml
SQ-U/ml	
Dozlar haftalık uygulanır	

► Her enjeksiyon öncesi dikkat edilecek noktalar:

A. Hastanın hali ve allerjisi kontrol edilmeli: Hasta ateşli ise veya enfeksiyonu varsa, klinik veya subklinik astma gösteriyorsa semptomatik ilaç tedavisini ihmal etmişse ki bu durumda allerjik reaksiyon gösterme eşiği düşebilir.

B. Son enjeksiyondaki allerjik reaksiyonlar kontrol edilmeli: Allerjik reaksiyonlar lokal ‘‘eritem’’den, ‘‘tam anafilaktik şok’’a kadar değişkenlik gösterebilir.