

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK İMMÜNOLOJİ ve ALERJİ BİLİM DALI

**D VİTAMİNİ YETERSİZLİĞİ OLAN
ASTIMLI ÇOCUKLARIN
PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE,
GLUKOKORTİKOID RESEPTOR α ve β
GEN EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Şükrü Nail GÜNER

**Samsun
Haziran-2012**

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK İMMÜNOLOJİ ve ALERJİ BİLİM DALI

**D VİTAMİNİ YETERSİZLİĞİ OLAN
ASTIMLI ÇOCUKLARIN
PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE,
GLUKOKORTİKOID RESEPTÖR α ve β
GEN EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Şükrü Nail GÜNER

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Recep SANCAK

**Samsun
Haziran-2012**

TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine,

Yandal uzmanlık eğitimi süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan hocalarım Prof. Dr. Recep Sancak, Prof. Dr. Alişan Yıldırım ve Prof. Dr. Fadıl Öztürk'e; tezimdeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Abdülkerim Bedir, Dr. Sedat Gülten, Biyolog Hande Koldan, Osman Ekşioğlu ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı personeline; araştırmanın planlanmasında ve verilerin istatistiksel analizindeki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Yüksel Bek'e; benimle hastalarını paylaşan ve her zaman beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum kadim dostum Uz.Dr. Mehtap Kılıç'a,

Aile sıcaklığını iş yerine taşıyan hemşiremiz Satı Aykut, biyologlarımız Yasemin Ekinci ve Sezin Pelen'e, sekreterlerimiz Murat Coşkunsu, Sercan Aksüz ve Esra Açıkbaş'a, personellerimiz Nurcan Yanık ve Özgür Akpınar'a, beraber çalıştığım sürede desteğini gördüğüm tüm doktor arkadaşlarıma, bilgi ve emekleriyle her zaman yardımcı olan hemşire, laboratuvar çalışanı ve sağlık personeline,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen anneme, babama ve kardeşlerime; hayatımın anlamı, yaşama sevincim ve beni her zaman gururlandıran biricik kızlarım Merve ve Melike'ye, eşim Sümeyye'ye

Sonsuz teşekkür ederim.

Uz.Dr. Şükrü Nail Güner

ÖZET**D VİTAMİNİ YETERSİZLİĞİ OLAN ASTIMLI ÇOCUKLARIN PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE, GLUKOKORTİKÖİD RESEPTOR α ve β GEN EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

D vitamini (VitD), immün sistemin düzenlenmesi, akciğer gelişimi ve astımın tedavi cevabı ile ilişkilidir. Bugüne kadar VitD astım ilişkisine yönelik farklı mekanizmalar öne sürülmüş ancak glukokortikoid reseptörleri (GR) ile olan etkileşimleri henüz araştırılmamıştır. Bu çalışma ile VitD yetersizliği olan astımlı çocukların VitD tedavisi sonrası oluşan klinik cevabın, GR-alfa ve GR-beta-relatif gen ekspresyon (GR- α ve β RGE) düzeylerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalı'nda takipli 8-16 yaşları arasında VitD yetersizliği (serum 25(OH)D düzeyi < 30 ng/mL) bulunan astım tanılı 25 çocuk astım grubunu ve sağlıklı 14 çocuk kontrol grubu oluşturdu. Her iki gruba I. kontrolde 300bin ünite VitD ağızdan verildi. Tüm çocuklardan I. kontrollerinde ve 1 ay sonraki II. kontrollerinde serumda 25(OH)D ve periferik kan mononükleer hücrelerde GR- α ve β RGE düzeylerini değerlendirmek amacıyla 2 kez kan alındı.

Astımlı çocuklarda I. ve II. kontrollerde GR- α ve β RGE'de değişiklik yoktu. Kontrol grubunda ise II. kontrolde GR- β RGE azaldı (0,05). Kontrol dönemlerinde gruplar arasında GR- α RGE'de anlamlı bir fark yokken, kontrol grubunda astım grubuna göre GR- β RGE'de belirgin azalma kaydedildi (p=0,002). Kontrol grubunda I. kontrolde, GR- β RGE astım grubu göre anlamlı düzeyde yüksekken (p=0,006) II. kontrolde fark kayboldu (p=0,09). Hasta grubunda I. kontrolde 25(OH)D düzeyi ile IgE(log10) arasında pozitif yönde ilişki varken (r=0,44; p=0,03), kontrol grubunda gözlenmedi (r= -0,42; p=0,13).

Sonuç olarak; VitD'nin astımlı çocuklarda GR- α RGE'yi kontrol grubu kadar artıramadığı, kontrol grubunda GR- β RGE'nin astım grubuna göre belirgin azaldığı görüldü. Bu bulgular astımlı çocuklarda GR RGE'nin VitD ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Astım, vitamin D, glukokortikoid reseptör α , glukokortikoid reseptör β , çocuk

ABSTRACT**EVALUATION OF THE GLUCOCORTICOID RECEPTOR α AND β GENE EXPRESSION LEVELS OF THE PERIPHERAL MONONUCLEAR CELLS FOR VITAMIN D INSUFFICIENT CHILDREN WITH ASTHMA**

Vitamin D (VitD) is related with the composition of immune system, development of lung and response to treatment of asthma. To date, different mechanisms were suggested for the relationship between VitD and asthma, however, interaction of VitD with glucocorticoid receptors (GR) have not been studied yet. In this study, our aim was to investigate the clinical response, relative gene expressions (RGE) of GR- α and β after VitD treatment in children with asthma and VitD insufficiency.

Twenty-five patients with asthma composed the asthma group, 14 healthy children composed the control group who all were followed in Ondokuz Mayıs University Pediatric Immunology and Allergy Unit, aged between 8-16 years and had VitD deficiency (25(OH)D level under 30 ng/ml). Vitamin D with a dose of 300000 units was given orally to all the children at first visit. Two blood samples were taken from all children at admission and after one month to evaluate the serum 25(OH)D level and GR- α and β RGE levels of the peripheral mononuclear cells.

GR- α and β RGE did not change significantly between first and second visits in the asthma group. GR- β RGE decreased significantly at second visit in the control group ($p=0.05$). GR- α RGE did not change between the two groups, however the decrease of GR- β RGE between two periods was statistically significant in the control group ($p=0,002$). GR- β RGE was significantly higher at admission in the control group when compared with the asthma group ($p=0,006$), however the difference disappeared in the second visit ($p=0.09$). Positive correlation was found between 25(OH)D level and IgE(log10) in the patient group ($r=0.44$; $p=0.03$), while it was not detected in the control group ($r= -0.42$; $p=0.13$) at first visit.

As a result; GR- α RGE was not increased by VitD in the asthma group as control group, and VitD was decreased GR- β RGE in the control group more than asthma group. These findings show that VitD is associated with GR RGE for children with asthma.

Key words: Asthma, vitamin D, glucocorticoid receptor α , glucocorticoid receptor β , child

KISALTMALAR

1,25(OH)₂D₃	Kalsitriol
AKT	Astım kontrol testi
AP-1	Aktivatör protein-1
FEV	Zorlu ekspratuvar hacim
FVC	Zorlu vital kapasite
GD	Glukokortikoid direnci
GK	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoid reseptör
GRE	Glukokortikoid cevap elamanı
IFN-γ	İnterferon gama
Ig	İmmünoglobulin
IL	İnterlökin
İKS	İnhale kortikosteroid
NK-κB	Nükleer faktör- κ B
NO	Nitrik oksit
PAI	Prediktif astım indeksi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RGE	Relatif gen ekspresyon
RSV	Solunum sinsityal virüs
SFT	Solunum fonksiyon testi
SYE	Solunum yolu enfeksiyonu
TGF-β	Transforming büyüme faktörü
Th	T helper
TLR	Toll-like reseptör
TNF-α	Tümör nekrozan faktör alfa
Treg	T regülatuar hücre
VDR	D vitamini reseptörü
VitD	D vitamini

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
KISALTMALAR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar	vii
ŞEKİLLER.....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Astım	2
2.1.1.Patogenez	2
2.1.2.Tanı	5
2.1.2.1.Öykü	5
2.1.2.2.Prediktif Astım İndeksi	6
2.1.2.3.Laboratuvar	6
2.1.3.Tedavi	7
2.2.Glukokortikoidler ve Glukokortikoid reseptörleri	9
2.2.1.Adrenal Korteks Gelişimi	9
2.2.2.Glukokortikoidlerin Sentezi, Metabolizması ve Atılması	10
2.2.3.Reseptör ve Gen Transkripsiyonu	11
2.2.3.1.Glukokortikoid Reseptör Yapısı	12
2.2.3.2.Glukokortikoid Reseptör α	12
2.2.3.3.Glukokortikoid Reseptör β	17
2.2.4.Glukokortikoidlerin Anti-inflamatuar Etkileri	19
2.2.5.Glukokortikoid Rezistansı	21
2.2.6.Solunum Yolu Epitel Üzerinde Glukokortikoid Etkileri	22
2.3.D Vitamini ve Solunum Sistemi	24
2.3.1.D vitamini Kaynakları ve Sentezi	24
2.3.2.D vitamini Metabolizması	24
2.3.3.D vitaminin Etkileri	26

2.3.4.İmmün Sistem Üzerine Etkileri	27
2.3.4.1.D vitamini ve Doğal İmmünite (<i>innate immunity</i>)	27
2.3.4.2.D vitamini ve Kazanılmış İmmünite (<i>adaptive immunity</i>)	29
2.3.5.D vitamini ve Astım	32
3. HASTA ve METOD	35
3.1.Hasta Seçimi.....	35
3.1.1.Astım Grubu Dahil Edilme Ölçütleri	35
3.1.2.Kontrol Grubu Dahil Edilme Ölçütleri	36
3.2. Çalışma Takvimi.....	37
3.3. Örneklerin Alınması ve Saklanması	38
3.4. Örneklerin İncelenmesi.....	40
3.4.1.Serum IgE Düzeylerinin Ölçümü ve Tam Kan Sayımı	40
3.4.2.D Vitamin Serum Düzeyi Belirleme Protokolü	40
3.4.3.CD14 Monosit İzolasyonu Protokolü	40
3.4.4.RNA İzolasyon Protokolü	43
3.4.5.Gen Ekspresyon Çalışması	45
3.5.Cilt Prick Testi	53
3.6.Solunum Fonksiyon Testi	53
3.7.Astım Kontrol Testi.....	54
3.8.Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	54
3.8.1 Komparatif Ct Metodu ile Gen Ekspresyon Analizi.....	54
3.8.1.1.Relatif Kantitasyon	54
3.8.1.2.Komparatif Ct (Threshold Siklus) Metodu	56
3.8.2. İstatistiksel Analiz	57
4. BULGULAR	58
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	83
7. KAYNAKLAR	84

TABLolar

Tablo 1. Prediktif Astım İndeksi.....	6
Tablo 2. Astımda kontrole dayalı tedavi yaklaşımı.....	8
Tablo 3. Glukokortikoid ve GR tarafından düzenlenen bazı genler.....	15
Tablo 4. Astım kontrol durumunun değerlendirilmesi.....	35
Tablo 5. CD14 monosit izolasyonu.....	41
Tablo 6. RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlanması.....	43
Tablo 7. RNA izolasyon protokolü.....	44
Tablo 8. RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü.....	46
Tablo 9. GAPDH Q-PCR için master miks içeriği.....	50
Tablo 10. GAPDH Q-PCR programı.....	51
Tablo 11. Glukokortikoid reseptör α Q-PCR için master mix içeriği.....	51
Tablo 12. Glukokortikoid reseptör α Q-PCR programı.....	52
Tablo 13. Glukokortikoid reseptör β Q-PCR için master miks içeriği.....	52
Tablo 14. Glukokortikoid reseptör β Q-PCR programı.....	53
Tablo 15. Astım kontrol testi soru anket formu.....	55
Tablo 16. Astım ve kontrol grubu çocukların demografik özellikleri.....	59
Tablo 17. Astım ve kontrol grubundaki çocukların genel özellikleri.....	60
Tablo 18. Astım ve kontrol grubundaki çocukların kan eozinofil ve serum IgE düzeylerinin karşılaştırılması.....	61
Tablo 19. Astımlı çocukların tedavi öncesi ve sonrası astım kontrol testi (AKT) sonuçlarının karşılaştırılması.....	62
Tablo 20. Astımlı ve kontrol grubundaki çocukların I. ve II. kontrollerinde ölçülen SFT sonuçları.....	63
Tablo 21. Astımlı çocukların kullandıkları antiastmatik ilaçlar.....	65
Tablo 22. Astımlı ve kontrol grubundaki çocukların I. ve II. kontrollerinde belirlenen serum VitD düzeyleri, GR- α ve GR- β RGE, gruplar arasındaki farklılığın karşılaştırılması.....	66
Tablo 23. Astım ve kontrol grubu arasında GR- α ve GR- β RGE'nin karşılaştırılması.....	68
Tablo 24. Astım kontrol durumunun, kontrol dönemlerinde GR- α ve GR- β RGE'e etkilerinin karşılaştırılması.....	70

ŞEKİLLER

Şekil 1. Dünya astım prevalans atlası.....	2
Şekil 2. Hayatın erken döneminde astım gelişimi ve etkileyen faktörler.....	3
Şekil 3. Siklopentanoper-hidrofenantren yapısı.....	10
Şekil 4. Glukokortikoid reseptörün genomik lokalizasyonu ve organizasyonu.....	13
Şekil 5. Steroid tarafından düzenlenen moleküler mekanizmaların genetik regülasyonu.....	16
Şekil 6. Solunum sisteminin ana hücre tipleri ve yerleşim bölgeleri.....	22
Şekil 7. D vitamini sentezi ve metabolizması.....	25
Şekil 8. D vitamininin doğal ve kazanılmış immünite üzerine olan etkileri.....	31
Şekil 9. D vitaminin koruyucu etkisi ve sonuçları.....	34
Şekil 10. Çalışma akış diyagramı.....	39
Şekil 11. Glukokortikoid reseptör α primer-prob dizaynı.....	47
Şekil 12. Glukokortikoid reseptör β primer-prob dizaynı.....	47
Şekil 13. GAPDH Primer-Prob Dizaynı.....	48
Şekil 14. Toplam AKT skor ile SFT ve 25(OH)D'nin I. ve II. kontrol dönem farkları açısından değerlendirilmesi.....	64
Şekil 15. 25(OH)D ile IgE(log10) arasındaki ilişki grafiği.....	65
Şekil 16. I. ve II. kontrol dönemlerinde VitD düzeylerinin değerlendirilmesi.....	67
Şekil 17. Astım ve kontrol grubunda GR- α ve GR- β RGE'nin I. ve II. kontrol dönemlerine göre karşılaştırılması.....	67
Şekil 18. Astım ve kontrol grubunda, tedavi öncesi ve sonrası GR- α ve GR- β RGE çizelgesi.....	68
Şekil 19. Astım ve kontrol grubunda GR- α ve GR- β RGE'nin kontrol dönemleri arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi.....	69

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Astım tüm dünyada yaygın olarak görülen ve her yaş grubunu etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Astım kontrolü, altta yatan faktörlerin tespiti ve bunlara yönelik etkin tedavi ile mümkün olacaktır.

Astım sıklığı ekvator kuşağından uzaklaştıkça artmaktadır. Bu gözlem D vitamini (VitD) ile astım arasında bir ilişki olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (1). Deneysel ve klinik çalışmalar VitD immün sistemin düzenlenmesinde, akciğer gelişiminde ve astımın tedavi yanıtı üzerine faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir (2-6). Çocuklarda viral enfeksiyonlara karşı koruduğu ve astım alevlenmelerini azalttığı belirlenmiştir (7, 8). Gebelikte kullanılan VitD'nin bebeklerde akciğer olgunlaşması hızlandırdığı, ilerleyen yaşlarda tekrarlayan hışıltı ve astım gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğu görülmüştür (9-12).

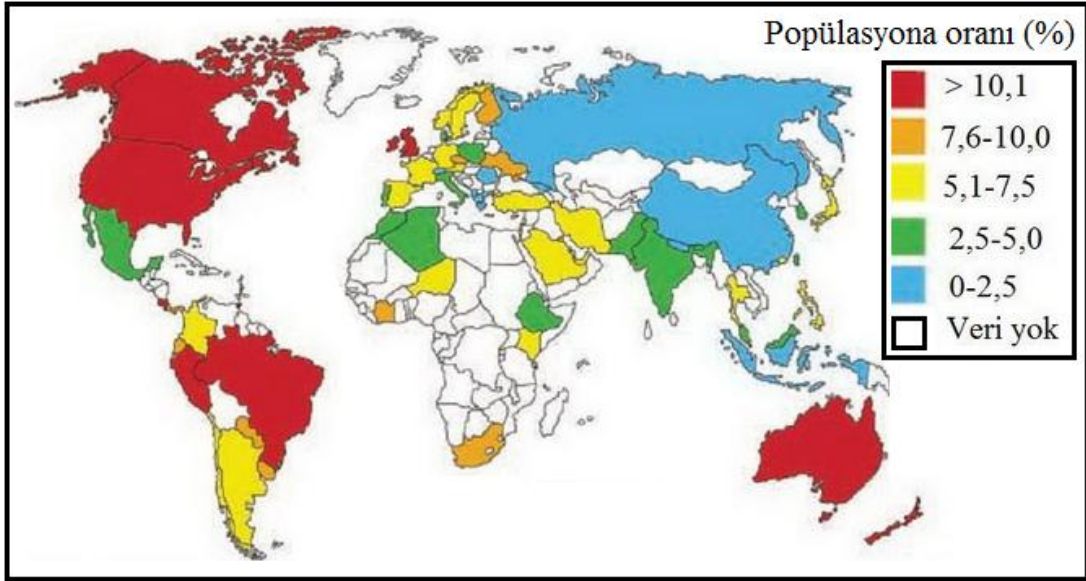
Yeterli VitD düzeyine sahip çocuklar, inhale glukokortikoide (İKS) daha az ihtiyaç duymakta ve atak sayısı azalmaktadır (8, 13). Periferik dokularda çoğu glukokortikoidler (GK) etkilerini glukokortikoid reseptörleri (GR) aracılığıyla gerçekleştirirler (14). D vitamini etkisini antimikrobiyal özelliği, proinflamatuvar sitokinlerden salınımını azaltıp interlökin (IL)-10 salgılayan CD4+/CD25+ T regülatuar hücre sentezini artırması ile sağlar (15). Bu güne kadar VitD astım ilişkisi yönelik farklı mekanizmalar öne sürülmesine karşın GR, VitD ve astım etkileşimi henüz araştırılmamıştır.

Glukokortikoid dirençli (GD) ağır astımlı hastaların tedavilerine VitD ilavesinin tedavi başarısını artırdığı belirlenmiştir (16). Astım ve VitD ilişkisini araştıran çalışmaların çoğunluğu erişkin yaş grubunu kapsayan, tedaviye dirençli astım hastalarından oluşmaktadır. Toplumda çok daha sık görülen kontrollü veya kısmi kontrollü astım grubunda VitD'nin astım üzerine olan etkileri hem klinik hem de laboratuvar boyutunda yeterince irdelenmemiştir. Araştırmamızda çocuk yaş grubunda VitD yetersizliği bulunan astımlı hastaların VitD tedavisine verdikleri cevabın klinik ve glukokortikoid reseptör (GR) α ve GR- β üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Astım

Astım dünyada her yaşta ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Çocukluk çağı hastalıkları içinde gün geçtikçe önemi artmaktadır. Hastalık hakkındaki bilgi düzeyi her ne kadar artsa da vaka sayısında azalma sağlanmamaktadır. Dünya genelinde okul öncesi çocukların yaklaşık % 40'ı en az bir kez astım semptomlarını içeren bir klinik tabloyla karşılaşılır. Tekrarlayan hışıltı öyküsü bulunan çocukların yaklaşık %30'u ise 6 yaşında astım tanısı alırlar (16). Tüm dünyada Uluslararası Çocukluk Çağında Astım ve Alerjik Hastalıklar Çalışması (ISAAC) anket formu kullanılarak yapılan epidemiyolojik çalışmalarda astım, farklı coğrafyalarda farklı sıklıklarda görülen küresel bir hastalıktır. (18, 19) (Şekil 1). Ülkemizdeki astım prevalansı batıda %13,7-16,4 oranları arasında iken doğuda %1,9-14,5 arasındadır (20).

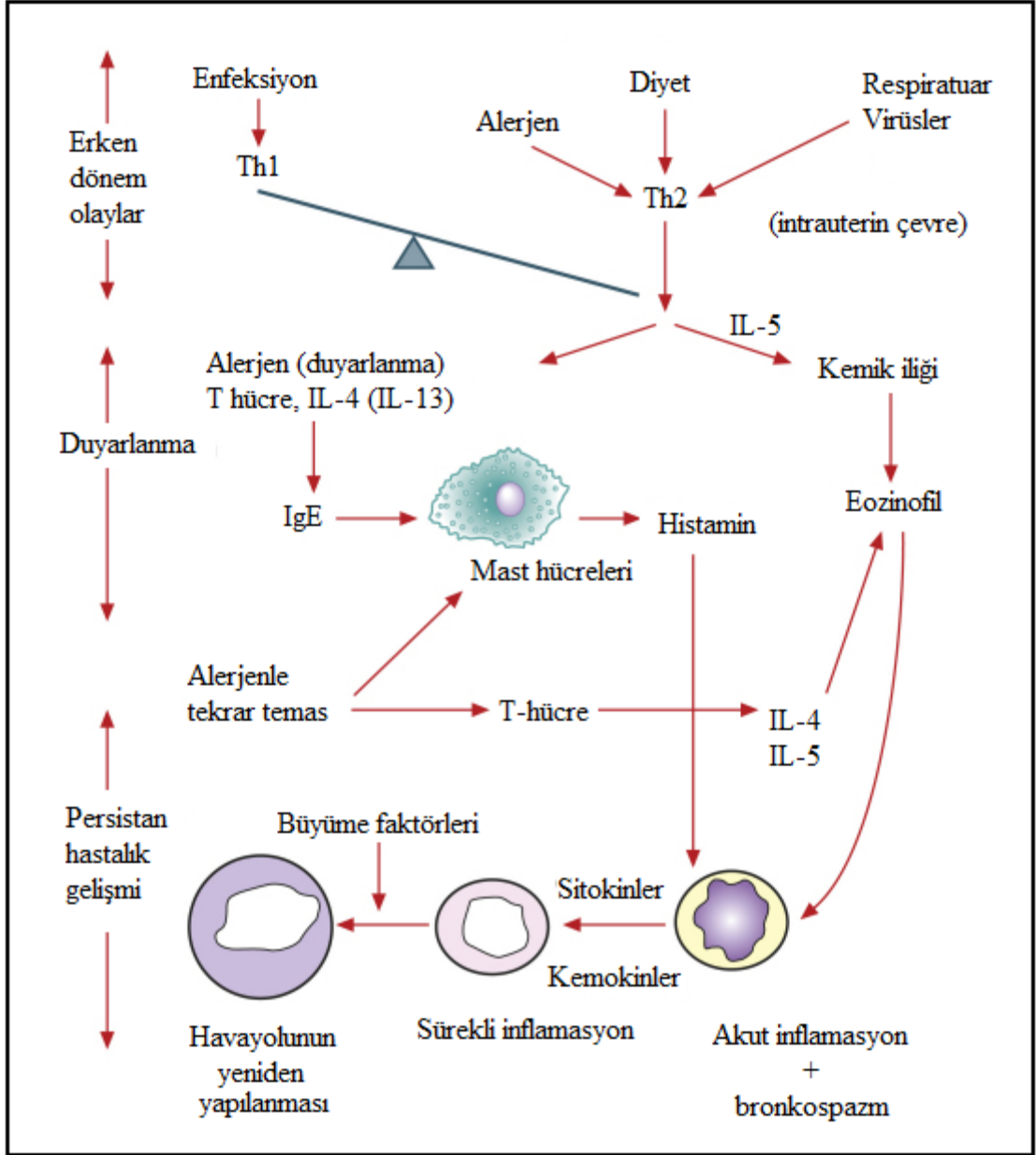


Şekil 1. Dünya astım prevalans atlası (18)

2.1.1. Patogenez

Hem genetik hem de çevresel faktörler astım patogenezinde etkin role sahiptirler. Hayatın erken döneminde alerjenle temas, solunum yolu enfeksiyonları ve diyet T-helper (Th) 2 yönünde, enfeksiyonlar ise Th1 yönünde farklılaşmaya neden olur. Astımlı hastalarda net etki Th2 yönündedir (şekil 2). Th2 yönündeki farklılaşma özgül immünoglobulin (Ig) E yapımında artışa ve ilerleyen dönemlerde de akut solunum

yolu enflamasyonu, persitan enflamasyon; sonuçta da hava yolunda hasar ve yeniden yapılanmaya neden olur (21).



Şekil 2 Hayatın erken döneminde astım gelişimi ve etkileyen faktörler (21,22)

Kromozom 5q üzerinde bulunan IL-4 gen kümesi olarak adlandırılan [IL-3, IL-4, IL-5, IL9, IL-12, IL-13 ve granülosit - makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)] çok sayıdaki gen, astım ve atopi ile ilgili inflamasyonun gelişiminde ve ilerlemesinde önemlidirler. Kromozom 5q32'nin β_2 adrenoreseptör genini kapsadığı, bunun da astıma genetik yatkınlığa sebep olabileceği öne sürülmüştür. Monosit, lökosit ve makrofaj yüzeyinde mevcut CD14'ün [*Toll-like reseptör*, (TLR)], çözünebilir formu

(sCD14), özellikle lipopolisakkaridlere karşı yüksek afiniteli reseptör görevi görerek bakterilere karşı doğal immün sisteme önemli katkıda bulunabilirler. Astım patogenezinde ve seyirinde bazı genetik faktörlerle ilişkiler belirlenmiştir. Bunlardan bazıları; kromozom 11q ile yüksek afiniteli IgE reseptörü, kromozom 6q üzerinde bulunan tümör nekrozan faktör alfa (TNF- α) geni, T hücre- α/δ gen kompleksi ile *dermatophagoides pteronyssinus*'un (Der p1) IgE cevabı, kromozom 12 ile interferon gama, stem cell faktör, IGF-1 ve nitrik asit sentaz ilişkili genler ve ADAM33 genidir (22).

Solunum yolu enfeksiyonuna yol açan özellikle rinovirüs (RV), solunum sinsityal virüs (RSV), klamidya ve mikoplazma enfeksiyonları sıklıkla suçlanan çevresel etkenlerdir. Rinovirus ile erken dönemde hışıltı atağı geçiren çocukların 8 yaşında bozuk akciğer fonksiyon testine sahip olacağı tespit edilmiştir (23). Annelerin farklı çiftlik hayvanları ile temasının astım riskini artırdığı gösterilmiştir (24). Çiğ sütün astıma karşı koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir (25) Çocukluk döneminde asetaminofen kullanımının astım riskini artırdığı iddia edilmektedir (24).

Astım patogenezindeki en güncel konulardan biri de Th17 lenfosit ve IL-17 sitokin cevabıdır. Atopik, IgE aracılı olmayan ve eozinofillerin eşlik etmediği inflamasyonla seyreden bazı astımlı hastalarda hava yolundaki nötrofil düzeyi ile astım şiddeti arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (26). Araştırmalarda IL-17'nin hava yoluna nötrofil göçünü tetiklediğinin gösterilmesiyle Th17 lenfositler bakteri ve mantarların ortamdaki hızla temizlenmesi için nötrofillerin o bölgeye göçünü sağlamaktadır. Th17 lenfositler aynı zamanda IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL-17 ve IL-22 salgılayıcı yeteneğine sahiptirler. Yakın zamanda hafıza CD4 T hücrelerinin yeni bir alt grubunda hem IL-17 hem de IL-4 ürettiği ve özellikle astımlı hastalarda normal bireylere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Sağlıklı bireylerde Th17/Th2 oranı oldukça düşüktür ancak şiddetli kronik astımlı hastalarda bu oranın belirgin arttığı görülür (27). Farklı tipteki T hücre popülasyonları, astım patogenezinin her basamağında, değişik etkilerde bulunabileceği ve her geçen gün bunlara yenileri ekleneceği aşikârdır (28).

Astımda hava yolunda önemli morfolojik değişiklikler oluşmakta ve havayolu epitelinde yeniden yapılanma (*remodeling*) meydana gelmektedir. Buna bağlı epitel ve silial hücrelerin dökülmesi, goblet hücre hiperplazisi, büyüme faktörlerinde artış,

anormal sitokin ve kemokin cevabı gözlenir. Epitel hücrelerindeki hasar ve tamir mekanizmasına ait dengenin bozulmasıyla hücreler arası sıkı bağlantı (*tight junction*) kaybolacak ve bariyer fonksiyonunun ortadan kalmasıyla da dış ortamdan gelecek etkilere açık hale gelecektir. (29).

2.1.2. Tanı

2.1.2.1. Öykü

Astımda tanı, birçok hastalıkta da olduğu gibi öykü ile konur. Sorular genellikle yaşa göre değişmekle birlikte tekrarlayan öksürük, hışıltı ve nefes darlığı atakları en sık karşılaşılan klinik bulgulardır. Laboratuvar incelemeler astım tanısı koymaktan çok ayırıcı tanı içindir. Bazı durumlarda tedaviden tanıya gitme seçeneği kullanılabilir.

Astım fenotipik olarak oldukça heterojen bir hastalıktır. Klinik hastaların yaşına, cinsiyetine, atopi varlığına, inflamasyonun tipine ve hastalığın şiddetine göre değişir. Fenotipik sınıflama infantil ve okul öncesi dönem için yapılmış, daha büyük yaş grupları için net bir sınıflama tanımlanmamıştır (30).

Atak öyküsü astım tanısında en kolay yoldur, buna karşın uzun süredir atak geçirmeyen veya hiç atak öyküsü bulunmayan daha sessiz seyirli tablolar da karşımıza çıkabilir. Bu durumlarda efor kapasitesinde azalma ve efor sonrası hışıltı, öksürük uyarıcı olmalıdır. Hışıltı, uzamış öksürük, balgam çıkarma, göğüs ağrısı ve göğüste sıkışma hissi sorgulanmalıdır. Astımlı hastalar iyi oldukları semptomsuz dönemler tarif ederler. Uzun süren ve ağır seyretmeyen astımlılar dışında büyüme gelişme geriliği, göğüs deformitesi ve çomak parmak astım için olağan bulgular değildirler (31).

Tanıda aile öyküsü oldukça önemlidir. Aile bireylerinde ve yakın akrabalarda astım bulunması tanıda oldukça yardımcıdır. Hastalığı tetikleyen faktörler dikkatle gözden geçirilmeli ve hastalara, fark edilenlerin kayıt altına almaları gerektiği anlatılmalıdır. Atakların enfeksiyon, egzersiz, ev tozu, çevre ve ısı değişikliği, besinler, keskin kokular ve sigara teması ile olan ilişkisi irdelenmelidir. Hastalığa eşlik edebilecek gastroözefagial reflü (GÖR), kronik sinüzit ve alerjik rinit gibi diğer patolojiler konusunda uyanık olunmalıdır.

2.1.2.2. Prediktif Astım İndeksi (PAI)

İlerleyen yaşlarda astım gelişimi için yüksek riskli çocukları belirlemek üzere geliştirilmiş bir yöntemdir. Özellikle ilk üç yaş için belirlenen risk faktörleri ile okul çocuğu yaş grubuna ait astım durumunu değerlendirmeye fırsat verir. Prediktif astım indeksi ilk kez 2000 yılı içinde Tuscon doğum kohort çalışma grubu tarafından geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur (Tablo 1) (32). Bu çalışmada erken dönem hışıltı (3 yaş altı, ≥ 3 atak/yıl) ve en az 1 majör veya 2 minör kriteri taşıyan çocuklarda, 6-13 yaş aralığında aktif astım olasılığı % 77; negatif PAI skoruna sahip çocukların okul çağı dönemde aktif astım olasılığı ise %3 olarak belirtilmiştir. Caudri ve ark (33) 2009 yılında Hollanda'da 3963 çocuğu kapsayan doğum kohort çalışmasında (*Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy-PIAMA*) erkek cinsiyet, postterm doğum, ebeveyn eğitimi, inhale ilaçlar, hışıltı sıklığı, enfeksiyon dışı hışıltı varlığı, solunum yolu enfeksiyonu ve egzemadan oluşan 8 parametrenin birbirinden ayrı olarak astımı predikte ettiği belirlenmiş ve eşik değer skoru (*cut-off*) 20 olarak tespit edilmiştir. Tüm bu araştırmalara rağmen PAI, farklı ülke ve ırklar üzerinde başarıyla uygulanmış ve halen günümüzde en çok tercih edilen skorlama sistemidir (17)

Tablo 1 Prediktif Astım İndeksi (32)

Majör Kriterler	Minör Kriterler
Ailede doktor tanımlı astım öyküsü	Doktor tanımlı alerjik rinit
Egzema	Enfeksiyon olmadan hışıltı
	Eozinofili ($\geq 4\%$)

2.1.2.3. Laboratuvar

Kronik havayolu inflamasyonu astım patogenezindeki ana mekanizmalardandır. İnflamasyon düzeyini belirlemedeki altın standart test, bronkoskopi ile biyopsi alınması ve bronkoalveolar lavaj yapılarak inflamasyonun ölçümüdür. Ancak bu invazif yöntem her hasta için uygun değildir. Bunun yerine invazif olmayan ekshale hava inflamasyon belirteci olan nitrik oksit (NO) ve karbon monoksit seviyelerinin ölçümü geliştirilmiştir (34). Fraksiyone ekshale NO, eozinofilik inflamasyonun bir göstergesidir ve astım dışı durumlarda yükselmez. Spirometre değerleri ile özgülüğü ve duyarlılığı %90'ın üzerine çıkmaktadır (35). Özellikle

sıvılaşmış ekshale solunumda bakılabilen sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri gibi inflamatuvar belirteçlerin astımda yükseldiği gösterilmiştir (36, 37). Ekshale NO ölçümleri, İKS alan astımlı hastalarda, ilerleyen yaşlarda kontrolsüz astım gelişimini tahmin etmede kullanışlı metot olabilir (38). Kanda eozinofil ölçümü PAI'nın bir parçasıdır, pozitif prediktif indeksi %76 civarındadır. Özellikle küçük yaşlarda IgE'nin hastalık şiddetiyle ilişkili olmadığı görülmektedir (32).

Solunum fonksiyon testleri (SFT), özellikle yaşı küçük ve uyum sağlayamayan çocuklarda önemli bir sorundur. Son yıllarda hava yolu rezistansının ölçümünde akım kesici teknik (*interrupter technique*), uyarı osilasyonu (*impulse oscillation*) ve zorlu osilasyon (*forced oscillation*) gibi yöntemler kullanıma girmiştir (37).

Tanıda kısa etkili bronkodilatör öncesi ve sonrasında %12'lik zorlu ekspiratuar hacim (FEV₁) değişikliği ile geri dönüşümlü hava yolu obstrüksiyonun belirlenmesi önemlidir. Ayrıca hipertonik salin, metakolin, histamin, adenozinmonofosfat gibi bronş uyarıcı ajanlarla bronşiyal aşırı duyarlılık belirlenmeye çalışılır.

2.1.3. Tedavi

Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar ve uygulama şekilleri ülkelere göre küçük farklılıklar bulunmasına karşın genellikle benzerdir. En sık tercih edilen kontrole dayalı basamak tedavisidir (Tablo 2).

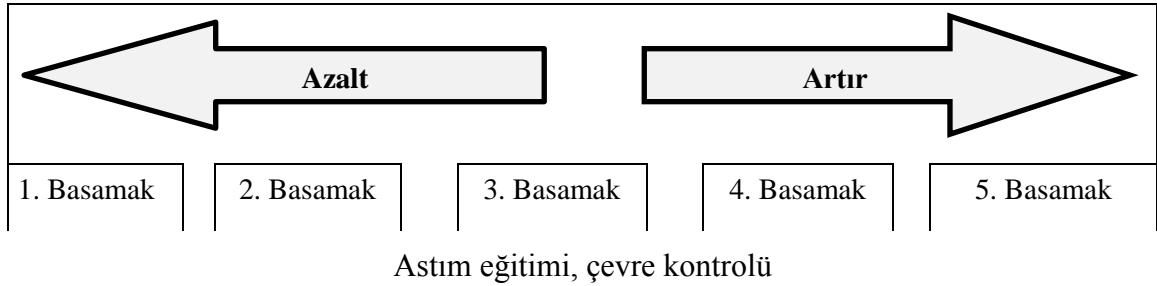
Astım alevlenmeleri genellikle mevsimseldir. Buna bağlı olarak özellikle şehrin varoşlarında yaşayan çocuklarda alevlenmenin belirginleştiği dönemlerde anti-IgE (omalizumab) tedavisinin daha net astım kontrolü sağladığı, atak sayısını ve İKS miktarını azalttığı gösterilmiştir (39). İdrar yüksek lökotrien E₄/FeNO oranının, hafif ve orta şiddetli astımlı hastaların tedavisinde montelukast cevabının inhale flutikazon propiyonata göre daha iyi olduğu belirlenmiştir (40).

Son yıllarda astım atakları ve VitD arasında ilişki olduğuna yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Düşük VitD düzeyine sahip astımlı hastalarda daha sık atak görüldüğü, VitD tedavisiyle atak sıklığının azaldığı belirlenmiştir.

Astım atağı esnasında antibiyotik kullanımı bakteriyal bir enfeksiyon bulgusu olmadıkça önerilmez. Makrolidlerin virüslerin tetiklediği cevaba karşı oluşturduğu antiinflamatuvar etkileri sanki astımda bakteriyal sebep olmasa da faydalı olabileceği

düşüncesine neden olabilir (41). Ancak prospektif bir araştırmada, klaritromisin astım kontrolü üzerine önemli bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (42).

Tablo 2 Astımda kontrole dayalı tedavi yaklaşımı



Gerektiğinde hızlı etkili B ₂ agonist				
	Birini seç	Birini seç	Bir ya da fazlasını ekle	Birini ya da ikisini ekle
Kontrol edici seçenekler	Düşük doz İKS*	Düşük doz İKS (+) uzun etkili B ₂ agonist	Orta düzeyde ya da yüksek doz İKS (+) uzun etkili B ₂ agonist	Oral glukokortikoid (en düşük doz)
	Lökotrien modifiye edici **	Orta düzeyde ya da yüksek doz İKS	Lökotrien modifiye edici	Anti-IgE tedavisi
		Düşük doz İKS (+) Lökotrien modifiye edici	Yavaş salımlı teofilin	
		Düşük doz İKS (+) yavaş salımlı teofilin		

*: İnhalasyon kortikosteroid; **: Reseptör antagonisti veya sentez inhibitörü

2.2. Glukokortikoidler ve Glukokortikoid Reseptörleri

İnsanlarda glukokortikoidler, bazal ve strese bağlı hemostazın düzenlenmesinde önemli role sahip, yaşamın temel fizyolojik fonksiyonların idamesini sağlayan yapı taşlarından birisidir. Glukokortikoidler neredeyse organizmanın tüm hücrenel, moleküler ve fizyolojik ağında görev alırlar. Büyüme, gelişme, çoğalma, immün ve inflamatuvar reaksiyonlarda, aynı zamanda santral sinir sistemin, kardiyovasküler sistemin ve renal tubüler fonksiyonların idamesinde ana biyolojik role sahiptirler (43, 44).

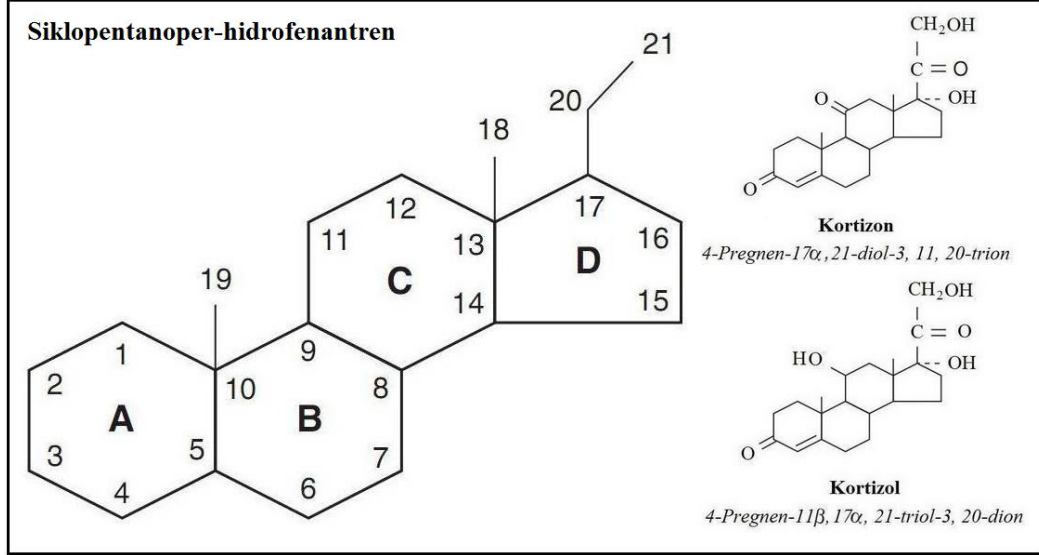
2.2.1. Adrenal Korteks Gelişimi

Adrenal korteksi oluşturan hücreler orta mezodermden kaynaklanırlar. Embriyonik orijinleri gonad ve böbreklerin de geliştiği ürogenital çıkıntı hücrelerindedir. Ürogenital primordium, ürogenital çıkıntının bir parçası olarak 4. haftada görülmeye başlar. Gebeliğin 8. haftasından itibaren adrenal primordium fetal iç zon ve nihai dış zon olarak iki parçaya ayrılır (45). Adrenal medulla 9. haftadan itibaren nöral krestin adrenal medüllaya göçüyle beraber oluşmaya başlar (46). Doğumla beraber fetal zon gerilerken, dış nihai zon olgunlaşmaya devam ederek zona fasikülata ve zona retikularisi oluştururlar (47).

Adrenal bezin erişkin boyu 4 gr ağırlığında 2 cm genişliğinde, 5 cm boyunca ve 1 cm kalınlığındadır. Kapsülün hemen altında korteksi %15'ini oluşturan zona granüloza bulunur. Zona fasikülata bezin yaklaşık %75'ini oluşturur. Fibrovasküler bir ağ içinde ışınal bağlantılara sahip büyük ve lipid yüklü hücreler bulunur. Hücre migrasyonu ve diferansasyonu Zona fasikülata içinde gerçekleşirken, yaşlanan hücreler Zona retikularis bölgesinde yoğunlaşırlar. Adrenal kortekste başlıca, GK (kortizol ve kortikosteron), minerralkortikoidler (aldosteron ve dioksikortikosteron) ve seks steroidleri sentezlenir. Tüm bu steroidler, 3 sikloheksan ve tek siklopentan halkasından oluşan siklopentanoperhidro-fenantrenden sentezlenir (Şekil 3) (45).

Kolesterol, adrenal steroidogenezin ana maddesidir ve dolaşımdan alınan düşük yoğunlukta lipoproteinlerin (LDL) endositler tarafından alınmasıyla elde edilir (48). Kolesterol, intraselüler mitokondrinin dış membranından iç membranına transportu sonrası bir sıra enzimatik işlemten sonra progesterona dönüşür. Ardından

glukokortikoidlerin sentezi, sırasıyla, 17OH pregnenolon, 17OH progesteron, 11-deoksikortizol, kortizol ve son basamakta da kortizon ile sonuçlanır (49).



Şekil 3. Siklopentanoper-hidrogenantren yapısı

2.2.2. Glukokortikoidlerin Sentezi, Metabolizması ve Atılması

IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflatuar sitokinler, histamin ve serotonin gibi aminler ve prostoglandin E2, ACTH sentezi hem direk olarak hem de CRH üzerinden artırır (50, 51). Bunlara ek olarak IL-6 ailesinden Lösemi inhibitör faktör (LIF) de hipotalamus-pitiuter-adrenal (HPA) aksın uyarılmasını sağlayan başka bir sitokindir. Bu şekilde fiziksel stres ve inflamatuvar bir uyarıya karşı, HPA aksı aktive olacak ve immün-endokrin etkileşim gelişerek kortizol sentezini artacaktır (52).

Kortizolün %90'ından fazlası dolaşımında plazma proteinlerine bağlı olarak bulunurlar. Kortizol ve diğer bazı steroidler, yüksek afinitelili kortikosteroid bağlayıcı-globulin veya transkortin adı verilen özel bir alfa-2 globuline bağlı durumdadır. Kortikosteroidler özellikle karaciğerde metabolize edilirler. Konjügasyon, hidroksilasyon, 11 β hidroksisteroid dehidrogenaz-2 (HSD2) enzim aracılı farklı metabolik yollarla yıkıma uğrarlar (51). Kortizolün plazma yarı ömrü 90 dakikadır ve metabolize olan steroidlerin %98'i idrarla atılırlar. Karaciğerde bulunan oksidaz ve glukoronil transferaz bazı GK metabolizmasında önemli rol alırlar. Dolayısıyla karaciğer hastalıkları, ilaçlar ve karaciğer fonksiyonlarını bozacak farklı kimyasallar

steroidlerin metabolizmasını etkileyeceklerdir. Karaciğer oksidasyon mekanizması üzerine etkili barbitüratlar, difenhidantoin ve epinefrin gibi bazı ilaçlar steroidlerin metabolizması hızlandıracaktır (51). Buna karşın bazıları ise steroidlerin oksidasyonunu azaltarak etki sürelerini uzatırlar. Bunlara metil prednisiolonun plazma yarı ömrünü uzatarak etki süresini uzatan troleandomisin örnek verilebilir. Hidrokortizonu HSD2, endojen reseptör aktivitesi olmayan kortizona çevirerek, özellikle cilt ve akciğerde steroidlerin antiinflamatuvar etkilerini zayıflatır (53). Likorik ve gliserik asit ile HSD2 inhibe edilerek steroidlerin antiinflamatuvar etkileri uzatılabilir (54).

Doğal ve sentetik steroidler yağda çözünür maddelerdir ve oral, subkütan, intravenöz veya topikal uygulandıktan sonra hızla emilirler. Maksimum kan düzeylerine 2-8 saat içinde ulaşırlar. Plazmada eliminasyon yarılanma ömrü 90-180 dakikadır. İntravenöz uygulanan steroidleri suda çözünür form olan fostat ve hemisüksinat esterli yapılar oluşturur. Topikal steroidler yağda yüksek çözünür özelliktedirler, deri ve solunum yoluna uygulandıklarında lokal olarak uzun süre o bölgede kalabilirler (51, 55)

2.2.3. Reseptör ve Gen Transkripsiyonu

Albümine veya transkörtine bağlı bulunmayan serbest kortizol, hedef hücelere basit veya kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla serbestçe girerler. Periferik dokularda çoğu GK'ler etkilerini glukokortikoid reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirirler. Glukokortikoid reseptörleri çekirdekli tüm hücrelerde mevcuttur. Bunlar hedef gende spesifik DNA sekansı ile etkileşime giren karboksi-terminal ligand-bağlayıcı domain, santral DNA-bağlayıcı domain ve tek N-terminal çok değişken bölgeye sahip transkripsiyon faktörlerinin bulunduğu steroid, tiroit, VitD ve retinoid reseptörler süper familyasının bir üyesidir (56). İn-vitro ve in-vivo kortizol etkileri (örn. ACTH salınımının inhibisyonu) 10-30 dakika içinde ortaya çıkmaya başlar. Ancak tüm etkinin gerçekleşebilmesi için saatler (plazma glikozunun artışı) veya günler (glukoz-6-fosfataz) gerekebilir (57).

Glukokortikoid reseptörlerin en önemli etkileri nükleusta meydana gelir. Reseptör-hormon kompleksi nükleusa taşınarak DNA'ya bağlanır. Glukokortikoid reseptörler, nükleusta gen ekspresyonunu iki ana mekanizma ile düzenler. Birincisi; GR promoter genlerdeki palindromik hormon yanıt elemanına (*glucocorticoid respond element*) (GRE) bağlanabilmesi için dimer yapısı oluşturması gerekir. Bu bağlanmadan

sonra transkripsiyon kompleksi oluşur ve hedef gende mRNA sentezi başlar (58, 59). Bu şekilde ilerleyen safhalarda kromatinin yeniden şekillenmesi ve transkripsiyonun hızlanmasına katkıda bulunmuş olurlar. İkincisi ise; indirekt yolla dimerizasyondan bağımsız ve DNA'ya bağlanmadan aktivatör-protein1 (AP-1), siklik adenozin mono fosfat (cAMP), cAMP cevap elementi bağlayıcı protein [*response element binding protein* (CREB)], oktomer bağlayıcı faktör-1(OCT-1), nükleer faktör interlökin-6 (NF-IL-6), transkripsiyonun sinyal iletici ve arttırıcı proteini [*signal transducers and activators of transcription* (STAT)], nükleer faktör kapka B (NF- κ B) ve GATA-3 gibi proinflamatuvar transkripsiyon faktörleri ile GR'nin monomer bağlar oluşturmasıdır (60) Bu bağlanma sonucunda proinflamatuvar genler baskılanarak, inflamasyonun çözülmesi sağlanır. Son zamanlarda, proksizom proliferatör-aktive reseptör (PPAR) ile GR arasında sinerjistik bir etki olduğu, sonucunda da NF- κ B ve interferon regülatuar faktör-3 (IRF-3) bağlantılı hedef genleri baskılayarak antiinflamatuvar etkinin arttığı gösterilmiştir (61).

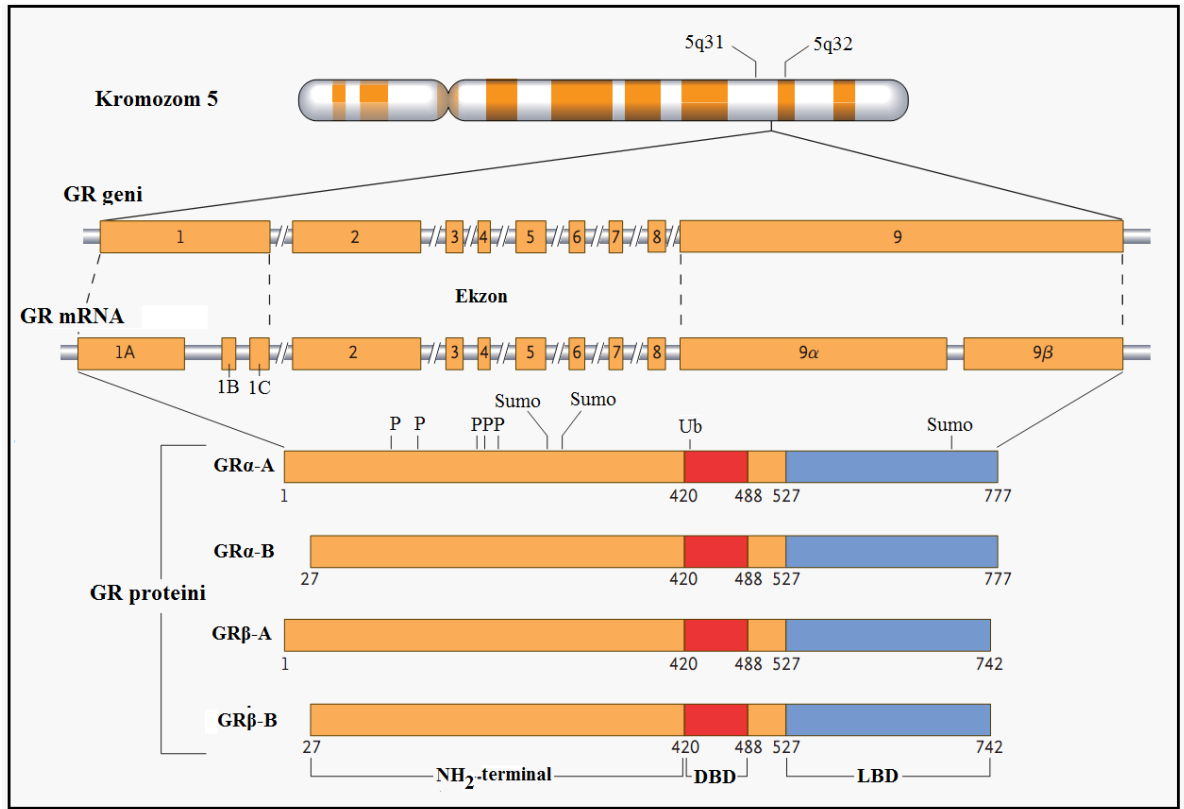
2.2.3.1. Glukokortikoid Reseptör Yapısı

İnsan G geni DNA'sı 1985 yılında ilk defa Hollenberg tarafından klonlanmıştır. Glukokortikoid reseptörleri çekirdekli tüm hücrelerde bulunmakla birlikte; akciğer, dalak, beyin ve karaciğer, GR mRNA seviyelerin en yoğun olduğu organlardır. Bu genin 9 ekzonunun alternatif splicing sonucunda GR- α (777 aa,) ve GR- β (742 aa) olmak üzere 2 ana izoform meydana gelir (79) (şekil 4). Bu iki reseptöre ilave olarak, yakın zamanda, GR- α ve GR- β 'nin 8 farklı (A, B, C1, C2, C3, D1, D2, ve D3) translasyonel izoformu keşfedilmiştir. Son yıllarda promoter bölgenin heterojenitesine bağlı olarak GK organa özgül farklı cevapların gelişebildiği belirtilmiştir (72). Bazı hematolojik malignansilerde, mRNA'nın splicing çeşitliliğine bağlı olarak oluşan GR δ ve GR γ 'in özellikle GK direncine sebep olabileceği düşünülmektedir (58,72).

2.2.3.2. Glukokortikoid Reseptör α

Glukokortikoid reseptörlerin başlıca izoformu GR- α olup, GK'lerin esas etkilerini ortaya çıkaran GR'dür. Glukokortikoid reseptör geni 5. kromozomun uzun kolunda (5q31.3) lokalize olup 9 ekzondan oluşmaktadır. Bu gen, N-terminal domain (transaktivasyonu içerir), merkez domain (GK düzenleyici genlerde DNA'ya bağlanır)

ve C-terminal domain (hormon ligandına bağlanır) olmak üzere 3 yapısal ve fonksiyonel alanı kodlar. Glukokortikoid reseptörleri sitoplazmada GK ile bağ oluşturmadığı durumlarda ısı şok proteinleri [(*heat shock proteins*=hsp) hsp40, hsp70, hsp90, p23 ve p60] ve immünofilinlerden (FKB51, FKB52, Cyp44 ve PP5) oluşan şaperonlarla kompleks oluştururlar (62). Hsp90 GK reseptörün ligand bağlayan kısmına bağlandıktan sonra bu şaperon kompleksinden ayrılır ve hiperfosforile edilir. Ligandın bağlanmasıyla aktifleşmiş olan GR nükleusa geçerek orada hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (63). Proinflamatuvar gen ekspresyonunu düzenlemek üzere T hücre reseptör (TCR) kompleksi ve PI3K, JNK, 14-3-3 gibi proteinlerden oluşan sinyal yoluyla etkileşime girerler (64).



P: Fosforilasyon, Ub: Ubikuinasyon, Sumo: Sumoilasyon, DBD: DNA bağlayıcı bölge, LBD: Ligand bağlayıcı bölge

Şekil 4 Glukokortikoid reseptörün genomik lokalizasyonu ve organizasyonu (74)

Reseptörün hiper-fosforilasyonu nükleus içine hormon-reseptör kompleksinin translokasyonu ve hedef DNA moleküllerinde GRE'ye bağlanmayı kolaylaştıran C-terminal tarafının açığa çıkmasını sağlar. GRE, hormon-reseptör dimerlerine bağlanan 2

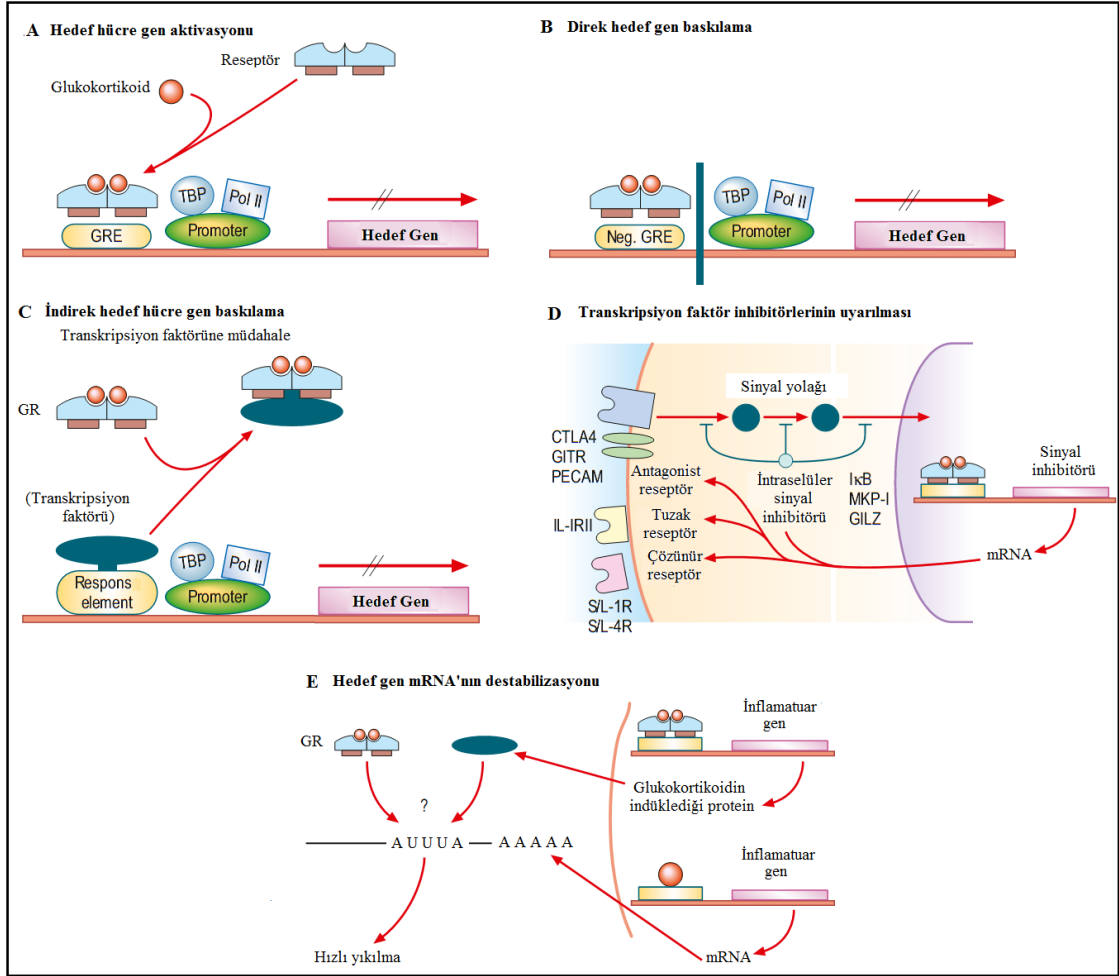
parçadan meydana gelir. İki ligandlı GR'ler, 3 baz çifti tarafından ayrılmış iki palindromik GRE'nin yarı tarafına (5'TGTTCT 3') çinko parmakları üzerine merdiven oluşturan bir homodimer ünite meydana getirirler. GRE'ye bağlanmaya ek olarak, ligand-reseptör kompleksi aktivatör protein-1 (AP-1) ve nükleer faktör- κ B (NK- κ B) gibi transkripsiyon faktörleriyle kompleksler oluşturarak sorumlu genlerindeki transkripsiyonun düzenlenmesine katkıda bulunurlar. AP-1 birçok sitokin ve forbol esteri tarafından indüklenen *Fos* ve *jun* alt birimlere sahip proinflamatuvar transkripsiyon faktörüdür. GR-ligand kompleksi *c-Jun*'a bağlanabilir ve AP-1 kısmı ile etkileşime girmesine engel olabilir. Bu şekilde GK'lerin transprepresif etkilerini düzenleyebilirler (65). Benzer şekilde GR ile lenfosit gelişimi, inflamatuvar cevap, konak cevabı ve apoptozis ile ilgili birçok geni aktive edebilen NK- κ B arasında da fonksiyonel antagonistlik bulunmaktadır (66). Bu güne kadar yüzlerce glukokortikoid duyarlı gen tanımlanmıştır. Glukokortikoidlerin uyardığı ve baskıladığı genlerden birkaç tanesi Tablo 3.'de verilmiştir.

Bağlandıktan sonra aktif hale gelen GR, direkt olarak ya da bazı proteinlerin (transkripsiyon faktörleri ve ko-aktivatörler) hedef genlerinin transkripsiyonunu aktifleştirir (Şekil 5) (51). Glukokortikoid reseptörlerin GRE veya diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi, GR koregulatuar (koaktivatör ve korepressör) olarak bilinen farklı protein gruplarının etkisiyle inhibe veya aktive olurlar. Transkripsiyonun baskılanmasında ise GR negatif GK düzenleyici elementi (nGRE) ve diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte çalışır. Ancak inflamatuvar yanıtların baskılanması nGRE'den bağımsız olarak gerçekleşir (Şekil 5A). Farklı transkripsiyon faktörleri, inflamatuvar gen aktivasyonu sağlayan yanıt element ile promotor bölgelerin etkileşime girmesini önleyerek hedef hücrede gen ekspresyonuna engel olurlar. İnflamatuvar yanıtlar için NF- κ B ve AP-1 gibi proinflamatuvar transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerde onların yanıt elementlerine bağlanmaları gerekmektedir (67-69). Bu konuda yapılan çalışmalarla proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun önlenmesinde GR ile özellikle NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin etkileşiminin önemli olduğu gösterilmiştir (Şekil 5C) (70). Glukokortikoid gen ekspresyonunu, aynı zamanda, transkripsiyon faktörlerinin inhibitörlerini aktive ederek de engelleyebilmektedir (Şekil 5D) (51).

Tablo 3. Glukokortikoid ve GR tarafından düzenlenen bazı genler

Etki bölgesi	Uyarılan genler	Baskılanan genler
İmmün sistem	Ik β (Nükleer faktör $\kappa\beta$ inhibitör) Haptoglobulin T Hücre reseptör (TCR)- ζ p21, p27 ve p57 Lipokortin	İnterlökinler TNF- α İnterferon- γ E-selektin İnterselüler adezyon molekül-1 Siklooksijenaz 2 Inducible nitrik oksit sentetaz Triptofan hidroksilaz
Metabolik	PPAR- γ Tirozin aminotransferaz Glutamin sentetaz Glikojen sentetaz Glukoz-6-fosfataz Leptin PEPCK γ -fibrinojen Kolesterol 7 α -hidroksilaz C/EBP/ β	
Kemik	Androjen reseptör Kalsitonin reseptör Alkalin fosfataz IGFBP6	Osteokalsin Kollajenaz
Kanallar ve transporterler	ENaC- α , - β ve - γ SGK Aquaporin I	
Endokrin	Fibroblast temel büyüme faktörü Vasoaktif intestinal peptid Endotelin Retinoid X reseptör GNRH reseptör Natriüretik peptid reseptör	Glukokortikoid reseptör Prolaktin POMC/CRH PTHrP Vasopressin
Büyüme ve gelişme	Sürfaktan protein A, B ve C	Fibronektin A-fetoprotein Nervus büyüme faktörü Eritropoetin Gastrointestinal siklinler Siklin-bağımlı kinaz

CRH: kortikokortin releasing hormon, C/EBP/ β : CAAT-enhancer binding protein, ENaC: epitelyal sodyum kanal, GHRH: growth hormon–releasing hormon, IGFBP6: insulin-like growth faktör–binding protein 6, PEPCK: fosfoenolpürivat karboksikinaz, POMC: pro-opiomelanokortin, PPAR: peroksizom proliferator-aktive reseptör, PTHrP: paratiroid hormon- related protein, SGK: serum ve glukokortikoid-indüklediği kinaz.



GRE: Glukokortikoid cevap elemanı, TBP: TATA bağlayıcı proteşn, Pol II: RNA polimeraz II, CTLA4: Sitotoksik T-Lenfosit antijeni 4, GILZ: GK indüklediği lösün fermuar (leucine zipper), MKP-1: Mitojen-aktive eden protein kinaz (MAPK) fosfataz-1, GITR: GK-indüklediği TNFR-ilişkili protein, PECAM: Platelet endotelial hücre adhezyon molekülü

Şekil 5. Steroid tarafından düzenlenen moleküler mekanizmaların genetik regülasyonu (51)

Kromatin, DNA ve histondan oluşan kromozomun temel proteindir. Glukokortikoid reseptörlerin diğer nükleer reseptörler gibi kromatin yapısının oluşumundaki etkinlikleri zamanla daha iyi anlaşılmaktadır. Kromatinler 146 baz içeren DNA sarmalı etrafında, her bir kor histon proteininden (H2A, 2B, 3 ve 4) iki molekül içeren nükleozomları yaparlar (71). Histon asetiltransferaz (HAT) etkisiyle histon üzerinde bulunan lizin yan bağı asetillenerek DNA'nın nükleozomdan ayrılmasını sağlar. Bu bölgenin asetilasyonu gen ekspresyonu ve RNA polimeraz II aracılığıyla mRNA sentezi gerçekleşir. (72). Diğer yandan, histon deasetilaz (HDA) tarafından tüm bu olaylar tersine çevrilerek transkripsiyon sonlandırılır. Steroidlerin, IL-1β'nin

indüklediği asetilasyonu direk HAT'ı inhibe ve HDA aktive ederek engellediği belirlenmiştir. (73).

2.2.3.3. Glukokortikoid Reseptör β

Günümüzde GR- α 'nın yapısına ve etki mekanizmalarına yönelik çok sayıda kanıta dayalı bilgilere sahip olmamıza karşın, GR- β halen birçok konuda gizemini korumaktadır. Glukokortikoid reseptör β , GR- α 'dan c terminalindeki farklılık nedeniyle ayrılır. Bu pozisyonda GR- α ilave 50 aminoasite, GR- β ise 15 aminoasite sahiptir. Ekson 9 β 'un uç birleştirilmesi (splicing) ile karboksi sona sahip 15 farklı aminoasitli bir proteine çeviren GR- β mRNA sentezlenir. Glukokortikoid reseptör ekson 2 içinde bulunan alternatif translasyon-inisilyasyon bölgeleri, GR'in yeni izoformlarını oluşturmaktadır. Glukokortikoid reseptör α ve β mRNA'da bulunan birinci metionin kodonunun translasyonun 777 aminoasitten oluşan GR- α -A ve 742 aminoasitten oluşan GR- β -A proteinlerin oluşumunu sağlamaktadır (74) (şekil 4). İkinci metionin translasyonu sonucunda da 751 aminoasitten oluşan GR- α -B ve 716 aminoasitten oluşan GR- β -B proteini sentezlenmektedir. Bu farklılık sonucunda da GR- β hem hormona hem de GRE bağımlı promotor bölgeye bağlanamamaktadır (79). GR- α -B in-vitro gen ekspresyonu çalışmalarda GR- α -A'ya göre iki kat fazla biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu iki izoform, farklı doku ve hücre gruplarında farklı oranlarda bulunduğundan in-vivo olarak GK farklı bölgelerde gösterdiği etkinin çeşitliliğine neden olabilmektedir (74).

İnsan vücudundaki birçok hücre tipinde GR- β mRNA'sına rastlamak mümkündür, ancak büyük kısmında çok düşük miktarlardadır. Birçok çalışmada GR- α ve β oranının 500/1'den daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. Karaciğer, timüs, akciğer epitel hücrelerinde ve inflamatuvar hücrelerde GR- β daha yoğun olarak bulunmaktadır. Bronşiyal epitel hücre kültürlerinde deksametazon uygulandıktan 6 saat sonra doza bağımlı olarak GR- β mRNA düzeyinde azalma (*down-regulation*) olduğu, yaklaşık 24 saat sonrada ilk düzeylere döndüğü görülmektedir (75). Lösemik hücre kültürlerinde ise deksametazon sonrası her iki reseptör düzeylerinde de azalma belirlenmiştir (76). Bunlara karşın sağlıklı iskelet miyoblast hücre kültürlerinde GR- β mRNA düzeylerinde up-regülasyon gelişirken, GR- α mRNA'nın ise down-regüle olduğu görülmüştür (77).

Esasen GR- β nükleusta bulunur ve henüz fizyolojik rolü belli değildir. Her ne kadar GR- β proteinini DNA'ya bağlanan homodimerler oluştursa da, şu ana kadar herhangi bir liganda bağlanmadığı ve transkripsiyonu aktive etmediği görülmüştür. Glukokortikoidlere duyarlı genlerin ekspresyonu GR- α etkisiyle ayarlanırken, GR- β izoformu transkripsiyonel olarak inaktiftir ve GK'lara bağlanmaz (78, 79). Bazı araştırmacılar GR- β 'nin önemli bir baskılayıcı etkisinin olmadığını ifade ederken (80), diğerleri GR- α ile heterodimerler oluşturarak GR- α etkisini azalttığını, dolayısıyla GR- α ve β etkileşiminin GK direnci ile ilişkili olabileceğini iddia etmektedirler (74). Ayrıca GR- β 'nin GR- α etkisini GRE'ye bağlanmak üzere yarışa girerek azalttığı düşünülmüş, ancak bunun benzer GRE'ye bağlanan androjen ve progesteron reseptörlerinde hiçbir negatif etki oluşturmadığından bu teoriden vazgeçilmiştir (81). İn-vitro ortamda transfeksiyon sistemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, GR- β 'nin hormonun bulunmadığı ortamlarda bile GRE ve hsp90'a bağlanma kapasitesine sahip olduğu ancak GRE, AP-1 ve NK- κ B üzerinde herhangi bir transkripsiyonel etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (75). GR- α 'nın, AP-1 ve NK- κ B'i repress ederek pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını inhibe ettiği bilinmektedir. GR- β 'nin, GR- α ait bu özelliğini baskılayarak GK direncine yol açabileceği düşünülebilir. İlginç olarak GR- β hormondan bağımsız olarak AP-1 ve NK- κ B bağlantılı olayları %25-60 oranlarında azalttığı gösterilmiş ve anti-inflamatuar sürece katkıda bulunduğu iddia edilmiştir (82). Bazı araştırmalarda GK tedavisine dirençli alerjik rinit ve atopik dermatitli hastalarda GR- β düzeylerinde artış belirlenmiştir (83, 84).

İnflamasyon durumunda kortizol plazma düzeyi arttığı zaman hipotalamus-pitüiter-adrenal aks sistemi down-regülasyona uğrayarak özellikle GR- α salınımı azalır. Ancak çalışmalarda GR- β üzerinde inhibisyon etkisinin GR- α 'ya göre ya çok az ya da hiç olmadığı görülmüştür (81). Dolayısıyla serum GK düzeyi yükseldiği zaman GR- α / GR- β oranında azalma görülecektir. Bakteriyal süperantijenler ve mikrobiyal toksinler GR- β salınımında artışa neden olabilirler. Bazı otoimmün hastalıkların enfeksiyonla beraber alevlenmesine veya tekrarlamasına neden olarak enfeksiyonun GR- β artışına ve GR- β artışının ise GK rezistansına neden olduğu düşünülebilir (85).

2.2.4. Glukokortikoidlerin Anti-inflamatuar Etkileri

İnflamasyon, antijen antikor kompleksi oluşturabilecek enfeksiyon, mekanik irritasyon ve hasarlanma sonucunda organizmanın verdiği refleksif bir cevaptır. Mikroplar, epitel bariyere ulaştıklarında direkt olarak doğal immünitinin 2 ana elamanını olan kompleman ve toll-like reseptörleri aktive ederler. Bu iki sistemin aktivasyonu ile inflammatuar mediatörlerin sentezi ve salınımı gerçekleşir. Sonuçta lokalize vasodilatasyon, vasküler geçirgenlikteki artış, plazma ve humoral proteinlerin ekstravazasyonu; ardından lökositlerin göçü sonucunda da inflamasyonun klasik bulguları ortaya çıkar. Ortamdaki lökositlerin etkisiyle oluşan pozitif *feedback*, ilave inflammatuar sitokinlerin salgılanmasına neden olur (74). Doğal ve adaptif immünitinin etkisiyle antiinflammatuar hemostaz mekanizmalar devreye girerek enfeksiyöz ajanlar ortamdaki temizlenir. İnflamatuar sürecin sınırlandırılmasında ve düzelmesinde özellikle glukokortikoidler ana rol alırlar. Alerji, astım, otoimmün hastalıklar ve sepsis gibi patolojilerde oluşan sürekli ve yoğun inflamasyon hücre hasarı hasarına yol açar. Glukokortikoidler birçok sinyal yolağı üzerinden GR'in pleitropik etkilerini değiştirerek inflammatuar sürecin hafiflemesini sağlarlar (86).

Steroid oral ve intravenöz alındıktan kısa süre sonra özellikle dolaşımdaki lökositler üzerinde değişiklikler oluşmaya başlar. Bazofil, eosinofil ve monosit sayılarında normal kan düzeylerinin %20 altına inmesine neden olurlar. Dolaşımdaki lenfosit sayısı diğer hücreler kadar olmasa da azalma eğilimindedir. T hücreler B hücrelere göre daha fazla azaldığından nispeten B hücre sayısında artış saptanabilir. T hücre alt grupları içinde ise CD4(+) T hücre sayısında belirgin azalırken CD8(+) T hücreler pek etkilenmez. Steroid sonrası erken dönemde doğal öldürücü hücre (NK, *natural killer*) hücrelerde belirgin bir değişiklik görülmez. Diğer hücrelerin aksine nötrofillerin dolaşımdaki sayısı GK uygulanması sonrasında artmaktadır. Buna neden olarak; dolaşımdan damar dışı göçlerinin azalması, nötrofil ömrünün apoptozis inhibisyonu nedeniyle uzaması ve kemik iliği nötrofil havuzunda küçülme gösterilebilir. Bunlara ilave olarak GK, fosofolipaz A2 aktive ederek prostoglandin, lökotrien ve platelet aktive eden faktör sentezini azaltarak lökosit fonksiyonları inhibe eder (87).

Eozinofiller, mast hücreleri ve bazofiller özellikle alerjik hastalıkların patogenezinden sorumlu en önemli hücrelerdir. Dolaşımda bulunan IL-5, IL-3 ve GM-CSF, eozinofil ve bazofillerin gelişiminde ve olgunlaşmasında önemli olan sitokinlerdir.

Glukokortikoidler özellikle IL-5 ve diğerk sitokinlerin yapımını azaltarak eozinofillerin sayısını ve etkinliklerini azaltmaktadırlar. Glukokortikoidler bazofillerin apoptozisini artırır. Ayrıca İKS'ler eozinofillerin akciğere migrasyonunu ve alerjen teması sonrası oluşacak eozinofil progenitörlerin oluşmasını önlediğı belirlenmiştir (88).

Mast hücrelerinin dolaşımda bulunan bazofillerle benzer yapısal özellikler göstermesi nedeniyle, mast hücrelerinin dokudaki bazofiller olduğu düşünülmüştür. Ancak her iki hücre kemik iliğindeki farklı kök hücrelerinden köken alırlar. Her iki hücrenin CD34 yüzey antijenine sahip olduğu ve IgE reseptör pozitif (FcεRI+) kemik iliğı öncü hücrelerinden köken aldığı gösterilmiştir (89). Mast hücrelerinin gelişimi, farklılaşmasını, çoğalmasını, adezyonunu, dokulara göçünü, aktivasyonunu ve canlılığını sürdürmesinde en etkili olan kemotatik faktör kök hücre faktörü (Stem cell factor= c kit ligand) dır (90). Mast hücreleri alerjik reaksiyonlarda IgE yüzey reseptörlerinin (FcqRI) çapraz bağlanmasıyla degranüle olarak histamin, sitokin ve proteolitik enzimler gibi vazoaktif, proenflamatuar mediatörlerin salınmasına sebep olurlar. Mast hücrelerinin FcεRI uyarılmasıyla lipid mediatörlerden endojen araşidonik asit kaynaklı prostoglandin D₂, lökotrien B₄ ve sistenil lökotrienler salgılanır. Tüm bu proinflamatuar mediatörlerin etkisiyle plazmanın hızlı ekstrasvasyonu, doku ödemi, bronkokonstriksiyon, lökosit göçü ve sürekli inflamasyon gelişir. Sonuçta anjioödem, anafilaksi, ürtiker ve astım alevlenmesi gibi klinik tanılarla karşımıza gelirler (91).

Monosit/makrofajların alveolar alanda en çok bulunan hücrelerdendir. Alveolar ortamda lenfosit ve eozinofillere oranla yaklaşık 7 kat fazladır ve alerjik inflamasyon esnasında bu oran daha da artmaktadır (92). Alveolar makrofajların doğal ve kazanılmış immünitede etkin role sahip olmaları ve birçok inflamatuvar mediatör salgılaya yeteneğinin bulunması nedeniyle astım ve alerjik akciğer hastalıklarında önemli role sahiptirler. Bu hücreler, daha önce IgE özgül antijenler tarafından duyarlanmış ise önemli miktarda inflamatuvar mediatör salgılayabilirler. Makrofajın uyarılması sonrası sistenil lökotrien, IL-1β, TNF-α, GM-CSF, RANTES, IL-8 ve IL-12 yapımını arttırırken, inflamasyonu azaltan IL-10 ve CD-40 ligand salınımı azaltmaktadır. Makrofaj kaynaklı IL-1 ve TNF, lenfositlerin gelişimine, fibroblast aktivasyonu ve proliferasyonuna, vasküler endotelin aktivasyonuna neden olurlar (93). Alveolar makrofajlar, havayolu remodeling üzerine transforming büyüme faktörü (TGF-β), metalloproteinaz ve inhibitör mediatörlerin salınımını değiştirerek etkide bulunur

(93). Astımlı hastalarda bronşiyal biyopsi örneklerinde mevsimsel alerjen teması ile makrofaj infiltrasyonu arasında ilişkili olduğu görülmüştür (92). Nokturnal astımda, GK cevabının alveolar makrofajlar tarafından sürekli salgılanan inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle bozulduğu belirlenmiştir (94). Ayrıca şiddetli astımlı hastalara ait monositlerde steroidlerin antiinflamatuvar etkilerine karşı duyarsızlık ve makrofajlarda fonksiyonel anormallikler gözlenmiştir (95). Glukokortikoidler, makrofaj ve diğer antijen sunucu hücrelerin fonksiyonları inhibe ederler. Bunları; fagositoz, mikroorganizma öldürme yeteneklerini inhibe ederek veya araşidonik asit, TNF- α , IL-1, metalloproteinaz, plazminojen aktivatör yapımını azaltarak sağlarlar.

2.2.5. Glukokortikoid Rezistansı

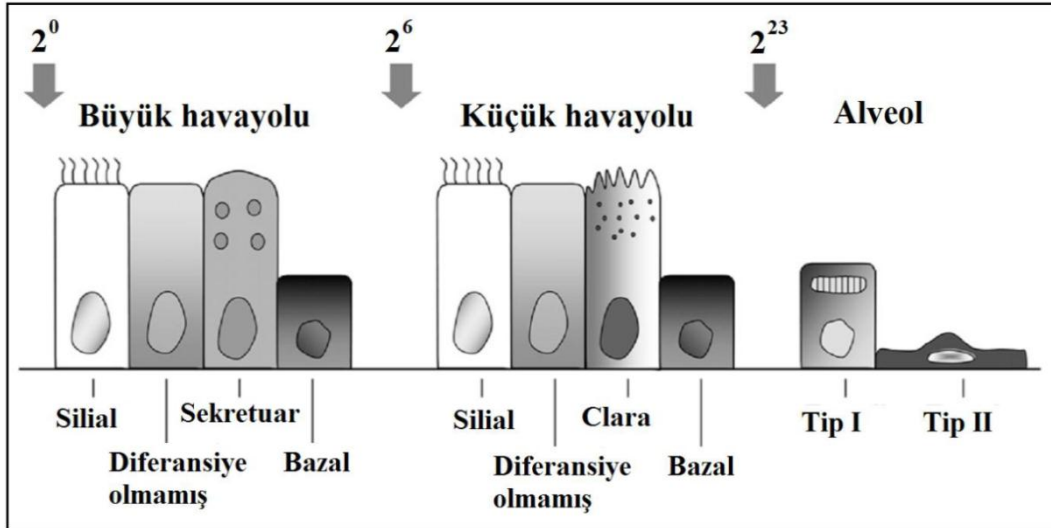
Kronik GK kullanan hastalarda bazen düşük doz almalarına rağmen yan etkiler görülürken bazı vakalarda daha uzun süre ve yüksek doza rağmen etkin kontrol sağlanamamaktadır. Toplumda GR karşı rölatif olarak %6,6 oranında hipersensitiviteye rastlanırken rölatif rezistans oranı ise %2,3 olarak belirlenmiştir (96). Hastaların %5-10'unda GK yeterince cevap oluşamamakta ve bu grup hastaların tedavi giderleri tüm giderlerin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (97). Uzun süreli ve yüksek doz GK kullanımı GR'nin mRNA'sı üzerine "down" regülatör etki yaparak akkiz GK rezistansına neden olabilir. Başlangıçta tedaviye iyi yanıt alınsa bile zamanla başarısızlığa uğrayan hasta grupları olabilmektedir (96, 98). Buna bağlı olarak, bazı astımlı hastalarda, steroidin antiastmatik etkinliğine karşı direnç gelişebilmekte ve sık sık sistemik GK kullanma ihtiyacı duyabilmektedirler.

Glukokortikoid rezistansı belirlenen hastaların lökositleri incelendiğinde GR sayıları sıklıkla normaldir. Bu durum; steroidin reseptörlere yetersiz afinitesine, GRE bağlanma kapasitesindeki düşüklüğüne, transkripsiyon faktörleriyle birlikte steroid-reseptör etkileşimindeki zayıflığına ve posttranskripsiyonel olaylardaki düzensizliğine bağlı gelişmiş olabilir (73, 99). Lenfositlerin IL-2, IL-4 veya IL-13'e maruz kaldıklarında steroid cevabının azaldığı belirlenmiştir. Ancak steroid cevabının neden yetersiz olduğu henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Hayvan deneylerinde özellikle latent adenoviral enfeksiyonlara bağlı steroid rezistansının geliştiği gösterilmiştir (100). Glukokortikoid reseptör β 'nin fazla salınımı sonucunda GR- α ile heterodimer oluşturarak GR'ye neden olduğu öne sürülmüştür (70). Ayrıca GR- β 'nin RU486 ile

ligand oluşturup, translokasyonu ve gen ekspresyonunu değiştirdiği ve represif özellik gösterdiği belirlenmiştir (101).

2.2.6. Solunum Yolu Epiteli Üzerinde Glukokortikoid Etkileri

Solunum yolu epiteli multifonksiyonel ve yüksek düzeyde organize hücre tabakasıyla atmosferik ortamdan konağı ayıran önemli bir yapıdır. Solunum yolu epiteli embriyonik dönemde endodermden köken alır. Büyük hava yolları silialı, diferansiye olmamış kolumnar, sekretuar ve basal hücrelerden oluşurken, bronşiollerde silial yapıdan daha zengin, sekretuar hücrelerin yerini Clara hücrelerinin aldığı tek sıralı kübik bir tabakaya dönüşür. Son olarak da skuamöz tek sıra Tip I ve Tip II alveolar epitel hücreleri ile sonlanır (şekil 6) (102). Bu yüksek organize epitel hücreleri astım veya alerjik rinit gibi bazı inflamatuvar hastalıklar tarafından tahribata uğratılırlar (103).



şekil 6 Solunum sisteminin ana hücre tipleri ve yerleşim bölgeleri (102)

Glukokortikoidler, alerjik rinit, kronik sinüzit ve astım gibi inflamatuvar alt ve üst solunum yolu hastalıklarının tedavilerinde en sık tercih edilen ve en etkili ilaçlardır. Lokal GK'nın 1970'lerin ortalarındaki keşfinin ardından tedavide kullanıma başlanmış ve sistemik GK'nın yan etkilerinin dramatik olarak azalmasıyla ilk basamak tedavi seçenekleri arasına alınmıştır. Glukokortikoidlerin anti-inflamatuvar etki hedefi solunum yolu epitelidir. Glukokortikoidler, solunum yolu epitelinde hem doğal hem de kazanılmış immünite üzerinden etki ederler. Hücre bütünlüğünü T-hücrelerin aktivasyonunu ve hayatta kalış sürelerini uzatan epitel kaynaklı sitokinleri ve kemoatraktanları baskılayarak, aşırı mukus sekresyonu azaltıp uygun hücre-hücre

adezyonunu sağlayarak korurlar. Bunu epital kaynaklı IL-1 β , IL-6, IL-9, TNF- α , gibi sitokinlerin; GM-CSF, TNF- β ve EGRF gibi büyüme faktörleri ve reseptörlerin; CXC ve CC ailesi, adezyon molekülleri, cytokine-inducible enzyme like COX-2, iNOS ve müsin gibi kemokinlerin gen ekspresyonunu azaltarak sağlarlar (104, 105).

Bronşiyal epitel hücrelerinde (BEH) proinflamatuvar sitokinlerin GR- α 'nın salınımı azaltmaktan çok fonksiyonlarını düzenlendiği görülmektedir. Bronşiyal epitel hücre kültürlerinde IL-1 β ve lipopolisakkaritin (LPS) hücre başına düşen GR sayısını arttırdığı bildirilmiştir (106). Benzer bulgular IL-2 ve IL-4 veya yalnız IL-13 ile inkübe edilmiş mononükleer hücrelerde gözlenmiştir (97). GR'in serin fosforilasyonu, GM-CSF salınımında azalmayı ve IL-10 salınımında artmayı sağlayan deksametazonun kapasitesini azaltmaktadır (107). Glukokortikoid reseptörleri, hormon bağlandıktan sonra spesifik serin rezidüleri üzerinden siklin/siklin-bağımlı kinaz (C/CDK), p38 MAPK ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) tarafından fosforile edilebilirler. Glukokortikoid reseptörlerin fosforilasyonu reseptör satbilitesini, subselüler lokalizasyonunu, diğer koregülatörlerle etkileşimini ve transkripsiyonel cevabını etkiler. Respiratuvar sinsityal virüs ile enfekte solunum epiteli hücrelerinde hidrokortizonun antiinflamatuvar etkilerine karşı proinflamatuvar mediatörlerden MIP-1 α ve IL-8'in down-regülasyonun bozulması nedeniyle direnç geliştiği bildirilmiştir (105)

Astım patogenezinde bronşiyal havayolunun damarlanması önemli bir role sahiptir. Astımda vazodilatasyon, hiperperfüzyon ve mikrovasküler permeabilitedeki artış ödem oluşumuna, inflamatuvar hücrelerin göçüne ve ilerleyen süreçte kronik inflamasyona bağlı olarak yeni damar oluşumuna (anjioenezis) neden olacaktır. Astımın akut alevlenmesi esnasında hava yolu mukozal kan akımı, sağlıklı bireylere göre belirgin olarak artmaktadır. Bazı çalışmalarda, flutikazon veya budesonid inhalasyonundan yaklaşık 30 dakika sonra kan akımının giderek azaldığı ve 90 dakika içinde de normal düzeye gerilediği belirlenmiştir. Glukokortikoidlerin vazokonstriksiyon hangi mekanizmalarla sağladığı henüz net olarak anlaşılamamıştır. Deliller, hava yolu kan akımını vasküler tonusun sinaptik kontrolünü düzenleyerek azalttığını göstermektedir. Glukokortikoidler bunu, bronşial arteriollerin düz kas hücreleri tarafından norepinefrinin salınımını azaltarak sağlarlar (108).

2.3.D Vitamini ve Solunum Sistemi

Geçmişte VitD eksikliğine bağlı en önemli sorunların rikets, osteomalazi ve osteoporoz gibi kemik hastalıklarıyla ilgili olduğu düşünülmüdü. D vitamini yaklaşık 1000 farklı insan geninin düzenlenmesinde görev alır. D vitamini eksikliği ya da yetersizliğinin kolon, meme ve akciğeri kanserlerinin; aktive olan proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla Tip I diabet, multiple skleroz, romatoid artrit ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi otoimmün tabanlı kronik sistemik hastalıkların patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir. Kalp rahatsızlıklarında, otoimmün hastalıklarda ve enfeksiyonlarda artışa neden olduğu belirlenmiştir (109,110).

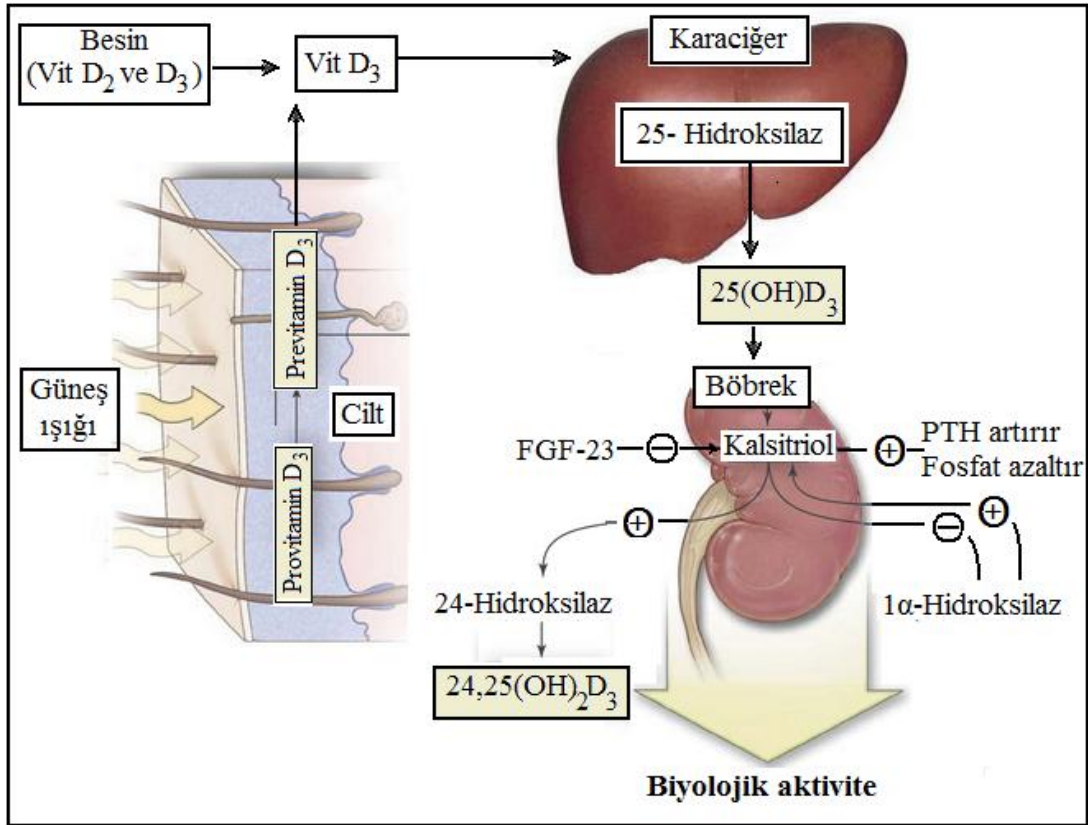
2.3.1. D vitamini Kaynakları ve Sentezi

Vitamin D'nin deride sentezlenen kolekalsiferol (vitamin D₃) ve besinlerden alınan ergokalsiferol (vitamin D₂) olmak üzere 2 ana kaynağı vardır. Kışın ya da güneş ışınlarının zayıf olduğu iklimlerde, VitD'nin diyetle alımı sağlık için önemlidir. Normal koşullarda vücutta bulunan VitD'nin %90-95'i güneş ışınlarının etkisi ile sentezlenir. Yağlı balık ürünleri, yumurta sarısı, süt, yeşil soğan, brokoli, maydanoz gibi besinler VitD'den zengindir. Ancak hiçbir gıda ile vücudun VitD ihtiyacı karşılamak mümkün değildir. Çocuklarda günlük VitD gereksinimini 400 U olarak belirlenmiştir (111). Bu sentez, ülkenin bulunduğu enlem, mevsimler, güneş ışınlarının yeryüzüne geldiği açı (Zenith açısı), güneşlenme saati ve süresi, deri pigmentasyonu, hava kirliliği düzeyi, deriye sürülen koruyucu kremler, giyinme tipi gibi faktörlere bağlıdır. Faktör düzeyi 15 veya üzerindeki koruyucu kremlerin kullanılması %99 oranında güneş ışınlarının deriye ulaşmasını engellemektedir (112).

2.3.2. D vitamini Metabolizması

Vitamin D sentezi deride epidermisin altında bulunan keratinositlerde gerçekleşir. Kolesterol metaboliti, 7-dehidrokolestrolden deride enzimatik olmayan yolla 290-310 nm boyunda ultraviyole ışını ile previtamin D, bundan da vücut ısısında (37⁰C) kolekalsiferol sentezlenir. Vitamin D kanda VitD bağlayan protein ile karaciğere taşınır. Orada mikrozomal enzim, vitamin D-25 hidroksilaz (CYP 27) aracılığıyla 25 hidroksi vitamin D [25(OH)D] (kalsidiol) oluşur (Şekil 7). Duedonum, adrenal bez, akciğer dokusu ve makrofajlarda gibi farklı doku ve hücrelerden sentezlenebilir.

Dolaşımdaki D vitamininin en büyük kısmını 25(OH)D vitamini oluşturup, kas ve yağ dokusunda depolanmış D vitamini ile bir denge halindedir. D vitamininin 25-hidroksilasyonunun %90'ı karaciğerde, %10'u diğer dokularda gerçekleşir. 25(OH)D'nin yarı ömrü yaklaşık 20 gün olması nedeniyle organizmadaki VitD seviyesini (sentez, alım ve harcanma) en iyi yansıtan parametredir (113). Mitokondrial sitokrom p-450 1 α hidroksilaz (CYP27B) ile böbreğe taşınan 25(OH)D, proksimal tübüllerde en aktif metaboliti olan 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol)'e dönüşür. Bu enzim VitD sentezindeki anahtar enzimdir. Proksimal tübül hücrelerinde 1,25(OH)₂D₃ sentezi parathormon (PTH) etkisi ile olur. PTH hücre zarındaki adenil siklaz enzimini aktive eder ve hücre içindeki cAMP artar. cAMP özel bir protein kinazı aktive ederek 1 alfa-hidroksilaz aktivesini artırır (114, 115). Hem kalsidiol hem de kalsitriol biyolojik aktiviteye sahiptir ancak kalsitriolün etkisi 500-1000 kat daha fazladır (116).



Şekil 7 D vitamini sentezi ve metabolizması (116)

VitD'nin tüm biçimleri serumda VitD bağlayıcı proteinle taşınır. D vitamininin %1-3'ü ise serbest durumdadır. D vitamini reseptörü (VDR) hipofiz, over, deri, mide,

pankreas, timus, meme, böbrek, paratiroid bezleri, kandaki lökositler gibi çekirdekli tüm hücreler tarafından sentezlendiği kabul edilir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konsantrasyonu ciddi VitD eksiliği dışında $25(\text{OH})\text{D}$ konsantrasyonundan bağımsızdır (117).

Paratiroid hormon, kalsiyum, fosfor ve fibroblast büyüme faktörü 23 (fibroblast growth factor-23: FGF-23) 1α hidroksilaz enzim aktivitesinin düzenlenmesinde rol alırlar. D vitamini yapımını, hipokalsemi, hipofosfatemi ve yüksek PTH 1α hidroksilaz enzimini aktive ederek artırır. Diğer taraftan hiperkalsemi, osteoblastlardan salgılanan FGF-23 ve aktif VitD'nin kendisi ise 1α hidroksilaz enzimi inhibe ederek VitD sentezi baskırlar. Ayrıca kalsitonin, prolaktin ve seks hormonları aktif VitD sentezini uyarır (118).

D vitamininin katabolize olması hem karaciğerde hem de böbrekte bulunan 24-hidroksilaz enzimi ile olur. Bu enzim $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'e bağlanarak dokulardaki aktif VitD'nin etkisi sınırlanır (119). Bu enzim aktivitesinin düşüklüğü, aktif VitD'nin yüksek olmasına ve sonuçta hiperkalsemi ve intramembranöz kemik mineralizasyonuna neden olabilir. Diğer yandan, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sentezi azaldığında 1-alfa hidroksilaz enzim aktivitesi artarken, 24-hidroksilaz enzim aktivitesi azalır (120).

Vücuttaki VitD düzeyinin değerlendirilmesinde $25(\text{OH})\text{D}$ kullanılır. Serum $25(\text{OH})\text{D}$ normal değerleri üzerinde görüş birliği yoktur. Önceki yıllarda $25(\text{OH})\text{D}$ serum düzeyi 10 mg/dl altına VitD eksikliği (*vitamin d deficiency*) 11-20 ng/mL aralığında ise VitD yetersizliği (*vitamin D insufficiency*) tanısı konulmuştur. $25(\text{OH})\text{D}$ vitamin düzeyi 30 ng/mL altına düştüğü zaman PTH salınmaya başlaması ve bu düzeyin üstünde kalsiyum emiliminin en üst düzeyde olması nedeniyle $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyinin alt limiti 30 ng/mL olarak bildirilmiştir. Son yıllardaki genel görüş, serum $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyi 20 ng/mL altında ise VitD eksikliği ve 21-30 aralığında ise VitD yetersizliği yönündedir (116)

2.3.3. D vitaminin Etkileri

D vitaminini kemik metabolizması üzerindeki etkilerinin keşfi ile çocuklarda rikets ve yaşlılarda osteoporotik kemik kırıkları gibi birçok hastalığın önlenebileceği görüldü (120). İlerleyen yıllarda vitD etkilerinin sadece kemik metabolizmasıyla sınırlı olmadığı ve birçok farklı hücre tipinde değişik fonksiyonlarının bulunduğu belirlendi.

D vitamini endokrin bezler tarafından üretilmediği için klasik bir hormon değildir. Moleküler değişikliğe uğrayarak uzaktaki hedef hücreleri etkileyen ürünlere dönüşür. Etki mekanizması diğer nükleer reseptörler üzerinden etki eden tiroid ve steroid hormonlara benzer. İnsan genomunun yaklaşık %3'ü 1,25(OH)₂D₃ kontrolü altındadır. Böbrek dışında en az 10 farklı doku VitD'yi aktif forma çeviren 1 α -hidroksilaz enzimi salgılama potansiyeline sahiptir (13, 121, 122). 1,25(OH)₂D₃ doğrudan ya da dolaylı yollarla hücrenin çoğalması, farklılaşması, apoptosiz ve anjiyogenezisten sorumlu 200 den fazla geni kontrol eder. Böylece anormal hücre tiplerinin ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller (115, 123). 1,25(OH)₂D₃ güçlü bir immunmodulatördür. Artmış 1,25(OH)₂D₃ üretimi *Mycobactrium tuberculosis* ve diğer infeksiyöz ajanları ortadan kaldırma özelliği olan katelisin peptidinin sentezinin artırır (124). 1,25(OH)₂D₃ renin sentezini inhibe eder, insulin üretimini artırır ve miyokard kasılmasını artırır (125). Farklı çalışmalarda VitD eksikliğine bağlı infeksiyona yatkınlık, bazı kanser türlerinde artış ve otoimmün hastalıkların gelişebileceği bildirilmiştir (126). Biz burada VitD'nin immün sistem, solunum sistemi ve enfeksiyon hastalıkları üzerine olan etkilerini tartışacağız.

2.3.4. İmmün Sistem Üzerine Etkileri

Yaklaşık 30 yıl önce farklı neoplastik hücre serilerinde VDR'nin keşfi ile 1,25(OH)₂D₃'ün immün sistem üzerine etkileri tartışılmaya başlandı (126). İlerleyen yıllarda bazı granülatöz hastalıklarda (sarkoidoz) hiperkalseminin yüksek serum 1,25(OH)₂D₃ düzeyiyle ilişkili olduğu görüldü (127). Bunun makrofajlardaki 1 α -hidroksilaz salınımına bağlı geliştiği gösterildi (128). Sonuç olarak immün sistemin 1,25(OH)₂D₃ sentezleme potansiyeline sahip olduğu ve immün hücrelerden eksprese edilen VDR'in otokrin ve parakrin etkiye neden olabileceği gösterildi (Şekil 8) (129).

2.3.4.1. D Vitamini ve Doğal İmmünite (*innate immunity*)

NK, sitotoksik T lenfosit, makrofaj ve onların monosit öncülleri patojenik mikroorganizma veya doku hasarlarına karşı özgül olmayan immün yanıt oluştur. Görevleri hücre kalıntılarını ve patojenleri fagosite etmek ve bunları ortamdan uzaklaştırmaktır. Buna ilave olarak makrofajlar, T hücrelere antijen sunarak kazanılmış immünite üzerine de etki ederler (129). Aktive T ve B hücreler, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi birçok immün sistem elemanları VDR üretebilirler (130,131).

Sarkoidozlu hastaların makrofajlarında 1α -hidroksilaz aktivitesinin gösterilmesi ile immün sistem ve VitD arasındaki ilişki yeni bir boyut kazandı. Makrofajların interferon- γ (IFN- γ) ile uyarıldığında $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sentezleyebildikleri gösterildi (132). TLR özgün olmayan patojeni tanıyan, erken inflamatuvar immün yanıtın başlamasında önemli olan reseptörlerdir. Monositler üzerindeki TLR'lerin sayısının azalması proinflamatuvar TNF- α üretiminde azalmaya neden olur. D vitaminin antimikrobiyal fonksiyonlarından sorumlu olan peptid hCAP-18 (human cathelicidin antimicrobial peptid-18), nötrofillerde, alveoler makrofajlarda ve keratinositlerde bulunur. Katelisidin ve hCAP-18 VitD bağımlı mekanizmalarla nötrofil ve monositler için kemoatraktan etki gösterir ve fagositik vakuollerde mikrobiyal öldürme işlemini hızlandırır (110). hCAP-18 gen promoter bölgesi VDRE (*Vitamin D responsive element*) içerir, kalsitriol çeşitli hücre dizelerinde bunun ekspresyonunu artırır (133). Liu ve ark. (134) 2006 yılında VDR'nin ve 1α -hidroksilaz (CYP27B1) geninin indüklenmesiyle TLR 2/1 (*M tuberculosis*'i tanıyan reseptör) aktive olduğunu göstermişlerdir. Özellikle TLR2/1- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombinasyonunun antibakteriyal protein olan katelisidin ekspresyonunu tetiklediği, sonuçta *M tuberculosis*'in monosit tarafından ortadan kaldırılmasına katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Adams ve ark. 2009 yılındaki araştırmalarında VitD tedavisinin TLR2/1 bağılı katelisidin ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir (135). Araştırmalarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bağılı VDR'nin katelisidinin transkripsiyonel düzenleyicisi olduğu tespit edilmiştir (136). TLR2/1'in indüklediği IL-15, CYP27B1 ve 1α -hidroksilazın güçlü bir uyarıcısıdır (137). D vitaminin aynı zamanda immün yolakta negatif feed-back düzenleyici etkisi de bulunmaktadır. Özellikle $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'in güçlü şekilde monosit TLR2 ve TLR4 ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu baskılayabildiği bildirilmiştir (133). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, dentritik hücrelerin TLR4 ekspresyonunu down-regüle edip PAMP'ın (*pathogen-associated molecular pattern*) duyarlılığını azaltarak lipopolisakkaritlere verilen cevabı kolaylaştırır. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, IFN- γ ile aktive edilmiş makrofajların efektör fonksiyonlarını baskılayarak dentritik hücrelerin immatür halde kalmasını ve fagosit fonksiyonunun azalmasını sağlar (14). Lipopolisakkaritler VDR düzeyini, VDR promoter bağlantı bölgesini ve ardında NF- κ b aktivasyonu azaltırken, CD80/CD86 ve HLA-DR ekspresyonunu artırır (138).

Keratinositlerde, epidermal yaralanma sonrası TGF- β etkisiyle 1α -hidroksilaz üretimi artar. Keratinositlerde $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konsantrasyonundaki artış, doku hasarı ve patojenlere karşı doğal immünitinin gelişmesini sağlayan TLR2 ve TLR4 ekspresyonunda artışa neden olacaktır (139).

Dentritik hücreler en iyi tanımlanmış profesyonel antijen sunucu hücrelerdir. İlk kez 1987 yılında dentritik hücrelerde VDR ekspresyonu olduğu gösterildi (140). Ardından cilt Langerhans hücrelerinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'in antijen sunmayı azalttığı tespit edildi (141). Aktive makrofaj ve dentritik hücreler VitD'ni aktif forma dönüştüren 1α -hidroksilaz enzimi salgılama yeteneğine de sahiptirler (142). Araştırmalarda, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'in monosit kaynaklı dentritik hücrelerin maturasyonunu inhibe ettiği, T hücrelere antijen sunma kapasitesini azalttığını ve T regülatuar hücre matürasyonunu indüklediği belirlenmiştir (143, 144). Böylece T hücre cevabını baskılayarak MHC class II ve kostimülator ligandların ekspresyonundaki azalmaya bağlı tolerans gelişimi indükleyecek, immünostimülator olan IL-12 sekresyonunu azaltacak ve bir antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 salınımını artıracaktır (145). IL-10, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'in dentritik ve T regülatuar hücre matürasyonu üzerine olan etkileri özellikle host-graft rejeksiyonu ve otoimmün hastalıkların tedavilerinde yeni ufuklar açmaktadır

2.3.4.2. D Vitamini ve Kazanılmış İmmünite (*adaptive immunity*)

D vitamini kazanılmış immün cevap üzerine inhibitör etki gösterir. Aktif VitD özellikle immünglobulin üretimini ve B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını baskılar. Antijenle uyarılan T hücreleri, ortamda bulunan sitokin durumuna göre Th1 (inflamatuvar T hücreler), Th2 (anti inflamatuvar T hücreler) olarak 2 farklı T hücre tipine ayrışırlar (146, 147). Th1 hücreleri proinflamatuvar sitokinler, IFN- γ , IL-2 ve TNF- α üretirler ve bu sayede kuvvetli hücre immün cevaptan (otoimmünite) sorumludurlar. Th2 hücreleri ise anti-inflamatuvar sitokinler IL-4, IL-5 ve IL-13 üretir ve antikor merkezli immün cevaptan sorumludur. Bu iki hücre tipi arasındaki dengenin bozulması immün yanıtın hangi yönde çalışacağını gösterir (146).

D vitamini T lenfosit fonksiyonlarını direkt ya da antijen sunan hücre üzerinden baskılar. Özellikle CD4^+ T hücreler üzerinde güçlü antiproliferatif etkinliğe sahiptir. Birçok araştırmada VitD'nin Th1 ilişkili sitokin yapımını inhibe ettiği gösterilmiştir (128). D vitamini T hücreleri Th1'den Th2'ye doğru yönelttiği ve bu

şekilde Th1'in hücrel immün cevabı azaltarak doku hasarının oluşmasını engelleyebileceği iddia edilmişti. Ancak O'Kelly J ve ark. (148) T hücreler üzerine yaptıkları deneysel araştırmalarında 1,25(OH)₂D₃'in hem Th1 (IFN-γ) ve hem de Th2 (IL-4) ilişkili sitokin salınımlarını inhibe ettiğini göstermişlerdir.

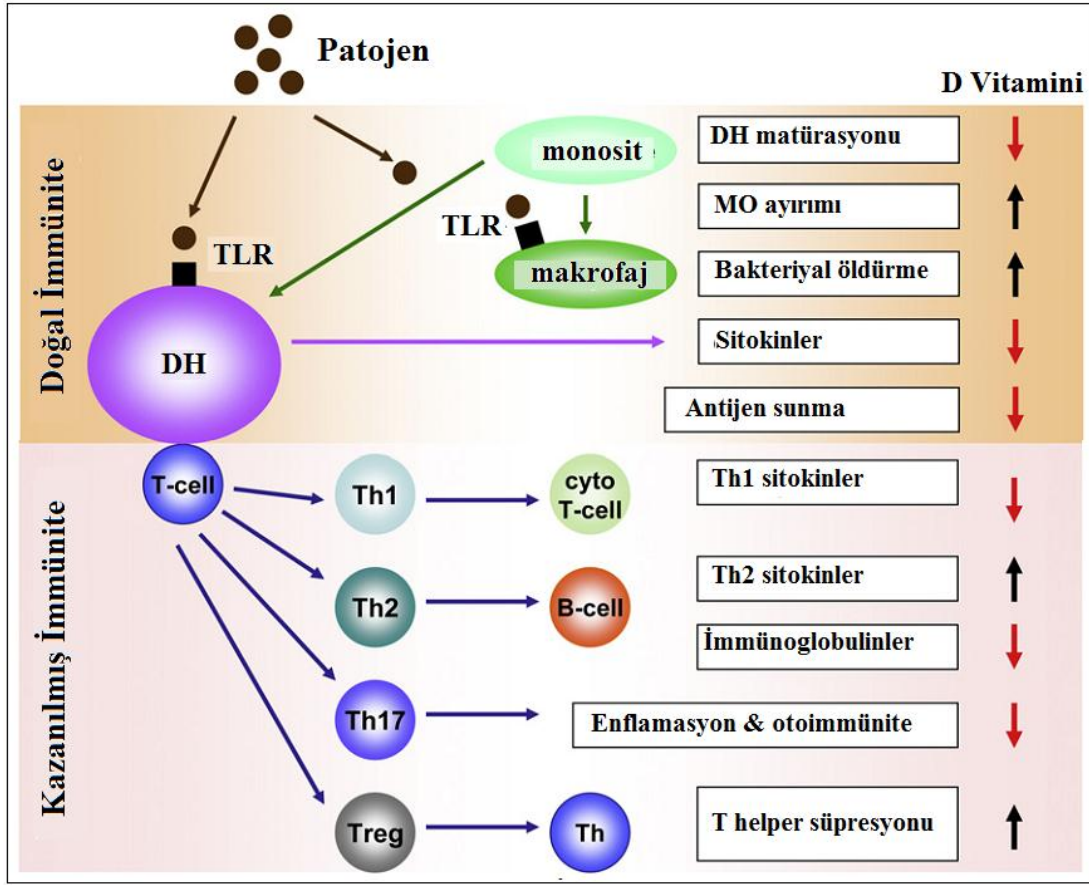
D vitaminin Th2 üzerine olan etkileri daha karmaşıktır. Literatürde VitD'nin hem Th2 cevabını arttırdığını hem de azalttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Th2 hücreler IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinlerin salınması, B hücrelerden IgE yapımının artırılması, mast ve eozinofillerin büyüme ve diferansiyonunu sağlayarak astım patogeneğinde anahtar rol üstlenirler (149). Bir araştırmada VitD'nin IL-4 ve IL-13 sentezini arttırdığı (150) ve bir diğerinde ise IL-4 sentezini azalttığı (151) bildirilmiştir. 1,25(OH)₂D₃, bronkoalveolar lavaj sıvısında IL-4 düzeyinde düşüklüğe, azalmış T hücre migrasyonuna ve inflamatuvar cevabı baskılanmaya neden olabilmektedir (152).

D vitaminin CD8⁺ sitotoksik T hücreleri üzerine olan etkileriyle ilgili sınırlı sayıdaki araştırmalarda sitotoksik T hücrelerde de yüksek oranlarda VDR belirlenmiştir. 1,25(OH)₂D₃'in CD8⁺ hücrelerin proliferasyonunu ve sitokin salınımını düzenlediği gösterilmiştir (153).

T hücre ailesinin yeni keşfedilen bir üyesi de Th17'dir. Th17 tarafından salınan IL-17'nin ekstraselüler bakterilere karşı savunmada önemli görevlerinin bulunduğu, otoimmün ve alerjik hastalıkların patogeneğinde yer aldığı gösterilmiştir. IL-17, VitD etkisiyle inhibe olmaktadır (154). İnflamatuvar barsak hastalığı hayvan modellerinde VitD tedavisi ile IL-17 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. VitD'nin Th17 üzerinden otoimmün ve inflamatuvar hastalıklara etki edebileceği düşünülmüştür (155). IL-17'nin, 1α-hidroksilaz ve VDR aktivitesinden bağımsız olarak 1,25(OH)₂D₃-bağlı katelisinindin indüksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (156).

T hücre ailesinden T regülatuar hücreler (Treg) immün cevabının kontrolünde önemli görevleri üstlenir. Th2 cevabını, havayolu inflamasyonu ve havayolu aşırı duyarlılığı baskırlar. D vitamini tek başına veya GK ile beraber IL-10 salgılayan CD4⁺/CD25⁺ Treg sentezi artırır (15). Deneysel havayolu hastalıkları modellerinde IL-10'un antiinflamatuvar etkisinin olduğu ve havayolu aşırı duyarlılığını azalttığı belirlenmiştir (154). NF-κB'nin güçlü bir inhibitörü olan 1,25(OH)₂D₃, dentritik hücrelerin matürasyonu önleyerek tolerans gelişimine katkıda bulunur. Alerjik astımlı

fare modellerinde VitD'nin alerjen immünoterapisinin etkisini IL-10 ve TGF- β üzerinden arttırdığı gösterilmiştir (157).



Şekil 8 D vitamininin doğal ve kazanılmış immünite üzerine olan etkileri (129)

2.3.5. D vitamini ve Astım

Astım prevalansı tüm dünyada 1960'lı yıllarla beraber giderek artmıştır. Son yıllarda astımlı kişi sayısı tüm dünyada 300 milyonu aşmıştır. Gelişmiş toplumlarda astımın daha sık görülmesi sıklıkla hijyen hipotezi ile açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak sadece hijyen hipotezi ile obezite, şehrin varoşlarında yaşayan ve çok sık hasta olan çocuklarda ve bazı Th1 aracılığı otoimmün hastalıklarda astım sıklığındaki artışı açıklamak mümkün değildir. Özellikle astımın ekvator kuşağından uzaklaştıkça artması üzerine yetersiz kutanöz VitD sentezi ile astım patogenezi arasındaki bağlantı fikri ortaya atıldı. VitD'nin immün sistemin düzenlenmesi ve akciğer olgunlaşması üzerindeki etkilerinin keşfiyle yeni bir boyut kazanmıştır (1).

Akciğer gelişimi intrauterin hayattan başlayarak yaşamın ilk birkaç yılı boyunca devam eder. Erken gebelikte, desidial hücreler tarafından sentezlenen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, otokrin ve parakrin yollarla fetüsün immün sistemi etkiler. İnsan kord kan hücrelerinde VitD etkisiyle IFN- γ , IL-4 ve IL-13 sentezinin azalır (11, 158). Fetal akciğerin olgunlaşması tip II pnömositlerin farklılaşmasıyla gerçekleşir. Rat fetal akciğer çalışmalarında $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün tip II pnömositlerin olgunlaşmasında ve sürfaktan yapımında etkili olduğu belirlenmiştir (159, 160). Diyetten VitD çıkarılan Rat'ların bebeklerinde çıkarılmayanlara göre akciğer kompliansında belirgin azalma görülmüştür (12).

Gebelikte VitD'li diyet alımı ile hışıltı fenotipleri arasındaki ilişki araştıran iki farklı doğum kohort çalışmada, gebelikte yüksek VitD ile beslenen annelerin çocukların 3 yaşında iken tekrarlayan hışıltı riskinin %62 ve 5 yaşına geldiklerinde ise persistan hışıltı olasılığının %67 oranında azaldığı gösterilmiştir (9, 10). Aynı çalışmada annenin yüksek maternal VitD diyetinin alerjik rinit sıklığını da azalttığı bildirilmiştir. Kuzey Finlandiya'daki doğum kohort çalışmasında ise hayatın ilk yılında VitD kullanmanın 31 yaşında iken astım ve atopi sıklığının arttığı gösterilmiştir (161). Gale ve ark. gebelikte serum $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyi 30 ng/mL üzerinde olan annelerin çocuklarında zeka gelişimi, psikolojik durum ve kardiyovasküler sistemin etkilenmediğini ancak 9 aylıkken egzama ve 9 yaşında astım gelişme riskinin arttığını vurgulamışlardır (162). Astım tanılı çocuklarda Eylül - Haziran ayları arasında VitD desteği (500 IU/gün) almak enfeksiyona bağlı astım alevlenmelerini azaltmaktadır (8). Yaygın görüş VitD'nin astıma karşı koruyucu etkisi olduğu yönündedir.

Genetik çalışmalarla astım ve VitD arasındaki ilişki yeni bir boyut kazanmıştır. Kuzey Amerika'da aile tabanlı iki farklı çalışmada VDR polimorfizm ve astım arasında ilişki olduğu gösterilmesine karşın diğer çalışmalarla bu ispatlanmamıştır (1). Wittke ve ark. vahşi tip ve VDR ortadan kaldırılmış (*knockout*) farelerde OVA ile sensitizasyon yapılarak deneysel astım modeli oluşturulmaya çalışmışlar; vahşi tip farelerde havayolunda eozinofilik inflamasyon, Th2 sitokinlerde artış, mukus sekresyonu ve havayolunda artmış duyarlılık geliştiğini ancak VDR ortadan kaldırılmış farelerde ise yüksek IgE ve artmış Th2 sitokin cevabına rağmen eozinofilik havayolu inflamasyonu veya artmış hava yolu duyarlılığının oluşmadığını göstermişlerdir. D vitamininin akciğerde Th2 aracılı inflamasyonun düzenlenmesini etkilediği ve inflamasyonun

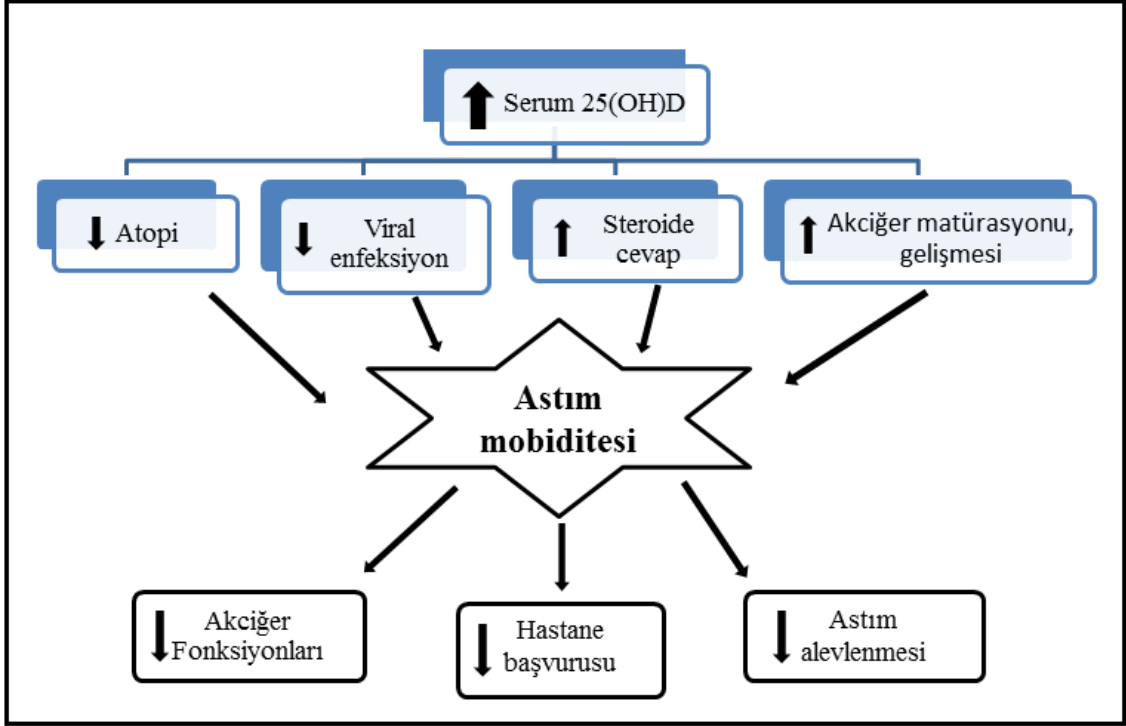
gelişebilmesi için VDR ihtiyaç olduğu yorumunda bulunmuşlardır (163). D vitamini bronşiyal düz kas hücrelerini düzenleyen birçok geni regüle etmektedir. D vitaminin akciğer düz kaslarının kasılmasını, inflamasyon, glukokortikoid ve prostoglandin regülasyonu ile ilişkili olabileceği; akciğerde hücre sel göç, büyüme, olgunlaşma ve ölümü etkileyerek havayolunun yeniden düzenlenmesine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (164).

İnfanlarda ve erişkinlerde düşük VitD düzeyi ile solunum yolu enfeksiyonu (SYE) arasında ilişki önceki yıllarda tanımlanmıştı. Özellikle riketsli çocuklarda solunum yolu enfeksiyonu riskinin arttığı ve daha ağır seyrettiği uzun yıllardır bilinmektedir (142, 165-167). D vitamini gram pozitif ve negatif bakteriler tanımada önemli olan TLR koreseptörü olan CD14 yapımını arttırarak SYE'e karşı vücut savunmasını güçlendirir (168). D vitamini sadece in-vitro ortamlarda değil aynı zamanda hayvan modellerinde de enfeksiyonun vücuttan temizlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (7). Solunum yolu viral enfeksiyonlarına maruz kalan infanlarda astım gelişim riski artmıştır. Rinovirüs ve RSV enfeksiyona maruz kalan çocuklarda daha sık astım görülür (169, 170). Genetik olarak ağır SYE geçirmeye yatkın infanlarla VitD arasında bir ilişkinin tespiti, uygun tedavi ile ileride astım gelişme riskini azaltacaktır

Yaşları 12'nin üzerinde yaklaşık 19bin katılımcıyı kapsayan Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırması Anketi III (*National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES*) verileri kullanılarak yapılan bir araştırmada, serum VitD düzeyinin, mevsim farklılığı, sigara temas öyküsü, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) etkilerinden bağımsız olarak, tekrarlayan SYE ile ters orantılı ilişkiye sahip olduğu; astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklı bireylerde bu ilişkinin çok daha belirgin olduğu gösterilmiştir (171). *CAMP (Childhood Asthma Management Program)* çalışma grubuna dahil olan 1024 orta ve ağır astım tanılı çocuğun 4 yıllık izlemleri esnasında serum VitD düzeyleri düşük olanların daha sık acile başvurdukları belirlenmiştir (5).

Özet olarak, deneysel ve klinik çalışmalar VitD'nin astım morbiditesi ve gelişimi üzerinde faydalı etkileri bulunduğunu göstermektedir (şekil 9) (6). Çocuklarda viral enfeksiyonlara karşı koruduğu ve astım alevlenmelerini azalttığı belirlenmiştir. Gebelikte kullanılan VitD'nin bebek akciğer olgunlaşması ve gelişimini hızlandırdığı, ilerleyen yaşlarda tekrarlayan hışıltı ve astım gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. Gelecekte infantil dönemde verilecek VitD tedavisinin çocukları viral

enfeksiyonlara mı yoksa astım gelişimine karşı mı koruduğu, okul çağı çocuklarda astım alevlenmelerini mi azalttığı yoksa (IKS'lere adjuvan ilaç) astım kontrolüne mi katkıda bulunduğu daha geniş katılımlı uzun soluklu çalışmalarla gösterilmelidir.



Şekil 9 D vitaminin koruyucu etkisi ve sonuçları

3. HASTA ve METOD

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmaya Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalında astım tanısıyla takip edilen 8-16 yaş aralığındaki 73 astımlı ve çocuk genel polikliniğine başvurmuş ancak herhangi bir sağlık sorunu belirlenmeyen, yaş grubu ve cinsiyet dağılımı astım grubuna benzer 25 sağlıklı, toplam 98 çocuk alındı. Astım tanısı, şiddetinin ve kontrol durumunun değerlendirilmesi Küresel Astım Girişimi [Global Initiative for Asthma (GINA)] kriterlerine göre yapıldı (172) (Tablo 4).

Tüm hastalara çalışmayla ilgili detaylı bilgi verildi, ebeveynlerinden yazılı onamları alındı.

Tablo 4. Astım kontrol durumunun değerlendirilmesi

Kriter	Kontrol (hepsi)	Kısmi Kontrol (biri / herhangi bir haftada)	Kontrolsüz
Gündüz semptomları	Yok (< 2 kez /hf*)	>2 kez / hf	
Aktivite kısıtlanması	Yok	Var	Herhangi bir haftada kısmi kontrol
Gece semptomları	Yok	Var	değerlerinden
Kurtarıcı ilaç kullanımı	Yok	>2 kez / hf	
SFT (PEF, FEV ₁)	Normal	<%80 (beklenen veya kendi en iyi değeri)	≥3
Ataklar	Yok	1 veya daha fazla / yıl	

*: Hafta

3.1.1. Astım Grubu Dahil Edilme Ölçütleri

- Ondokuz Mayıs Üniversitesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji kliniğinde takipli olması,
- En az 6 aydır düzenli İKS tedavisi alması,
- Cilt prick testinde dermatophagoides pteronyssinus (Der p 1) pozitif olması,
- Solunum fonksiyon testi zorlu vital kapasite (FVC) ve 1. saniyede zorlu ekspiratuar hacim (FEV₁) değerleri için > %80 olması,
- I. kontrolde ölçülen serum 25(OH)D düzeyinin < 30 ng/mL olması,
- II. kontrolde ölçülen serum 25(OH)D düzeyinin > 30 ng/mL olması,

- Gastroözefagial reflüye yönelik tedavi almıyor olması,
- Son 1 yıl içinde alerjen immünoterapisi almıyor olması,
- Son 1 ay içinde atak öyküsü bulunmaması,
- Son 1 yıl içinde ağır astım atağı nedeniyle hastaneye yatmamış olması,
- Son 15 gün içinde herhangi bir enfeksiyon geçirme öyküsü bulunmaması,
- Son 3 ay içinde uzun süreli VitD destek tedavisi almamış olması,
- Çalışma süresince (1 ay) herhangi bir sistemi ilgilendiren enfeksiyon geçirmemesi,
- Çalışma süresince atak öyküsü bulunmaması,
- Boy, kilo ve vücut kitle indeksi ölçümlerinin yaşına göre 10 — 90 persentil aralığında bulunması,
- Samsun veya Samsun'a bağlı sahil ilçelerinde yaşıyor olması,
- Sigara kullanmaması.

3.1.2. Kontrol Grubu Dahil Edilme Ölçütleri

- Astım grubuyla benzer yaş ve cinsiyet dağılımına sahip olması
- Bilinen kronik hastalık öyküsü ve göğüs deformitesi bulunmaması
- Daha önce doktor tarafından konulmuş astım, alerjik bronşit, bronşiyal hiperaktivite, atopik dermatit, alerjik rinit, kronik ürtiker, besin veya ilaç alerjisi ve kronik akciğer hastalığı tanıları olmaması
- Cilt prick testinde herhangi bir alerjene duyarlılığının bulunmaması
- Solunum fonksiyon testi değerleri FVC ve FEV₁ için >%80 olması
- I. kontrolde ölçülen serum 25(OH)D düzeyinin < 30 ng/mL olması
- II. kontrolde ölçülen serum 25(OH)D düzeyinin > 30 ng/mL olması
- Boy, kilo ve vücut kitle indeksi ölçümlerinin 10 — 90 persentil aralığında bulunması
- Son 3 ay içinde herhangi bir alt solunum yolu hastalığı öyküsü bulunmaması
- Son 15 gün içinde herhangi bir enfeksiyon geçirme öyküsü bulunmaması
- Son 3 ay içinde uzun dönem vitamin D destek tedavisi almamış olması
- Çalışma süresince herhangi bir enfeksiyon geçirmemesi
- Samsun veya Samsuna bağlı sahil ilçelerinde yaşıyor olması
- Sigara kullanmaması

Hastalarla yüz yüze görüşülerek (SNG) 49 sorudan oluşan anket formu dolduruldu. Anket formuyla hastaların fiziksel özellikleri, adres bilgileri, doğum bilgileri, beslenme alışkanlıkları, ailenin sosyoekonomik yapısı, yaşadıkları eve ait detaylar, ailede sigara kullanımı, astım, alerjik rinit ve egzama öyküleri, son 12 ay içinde öksürük sıklığı, hışıltı sıklığı, gece öksürüğü, egzersizle oluşan öksürük, hastaneye yatış, acil başvurusu, okula devamsızlık, vücutta döküntü, gastrointestinal semptomlar, kapalı ortamda geçirdiği süre ve kullandığı ilaçlar sorgulandı. Kontrol grubuna ise fiziksel özellikleri, adres bilgileri, doğum bilgileri, beslenme alışkanlıkları, ailenin sosyoekonomik yapısı, yaşadıkları eve ait detaylar, ailede sigara kullanımı, astım, alerjik rinit ve egzama öyküleri soruldu. Tüm bilgiler anket formuna kaydedildi.

3.2. Çalışma Takvimi

Çocuk İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalı kayıt veri tabanındaki bilgiler Nisan-Mayıs 2011 tarihleri aralığında incelenerek uygun hastalar belirlendi ve telefonla aranarak çalışma hakkında bilgi verildi. Kontrol grubuna genel çocuk polikliniğe başvurmuş ancak herhangi bir sağlık sorunu tespit edilememiş çocuklar alındı. Çalışma akış şeması şekil 10'da gösterilmiştir. Her iki gruptan çalışma öncesi serum 25(OH)D, kan eozinofil ve serum IgE düzeylerinin belirlenmesi için kan örnekleri alındı. Vitamin düzeyi < 30 ng/mL olan çocuklar tekrar hastaneye çağrılarak GR izolasyonu için kan örnekleri alındı ve 300bin ünite VitD oral olarak verildi. Tüm çocuklar, 25-30 gün aralığında kontrole çağrılarak aynı anda 25(OH)D ve GR düzeyleri için kan örnekleri alındı. Her iki dönemde de tüm çocuklara SFT testi uygulandı.

I. ve II. kontrollerde tüm çocuklara detaylı fizik inceleme yapıldı ve bulgular kaydedildi. Muayene esnasında enfeksiyon bulguları belirlenen, aktif astım semptom ve bulguları olan hastalar belirlendi ve çalışma dışı tutuldu.

Astımlı çocuklara I. ve II. kontrollerde, standardize edilmiş ve Türkçeye uyarlanmış 7 sorudan oluşan astım kontrol testi (AKT) anketi uygulandı. Toplam skorları belirlenerek ayrı ayrı kaydedildi.

3.3. Örneklerin Alınması ve Saklanması

I. Davet

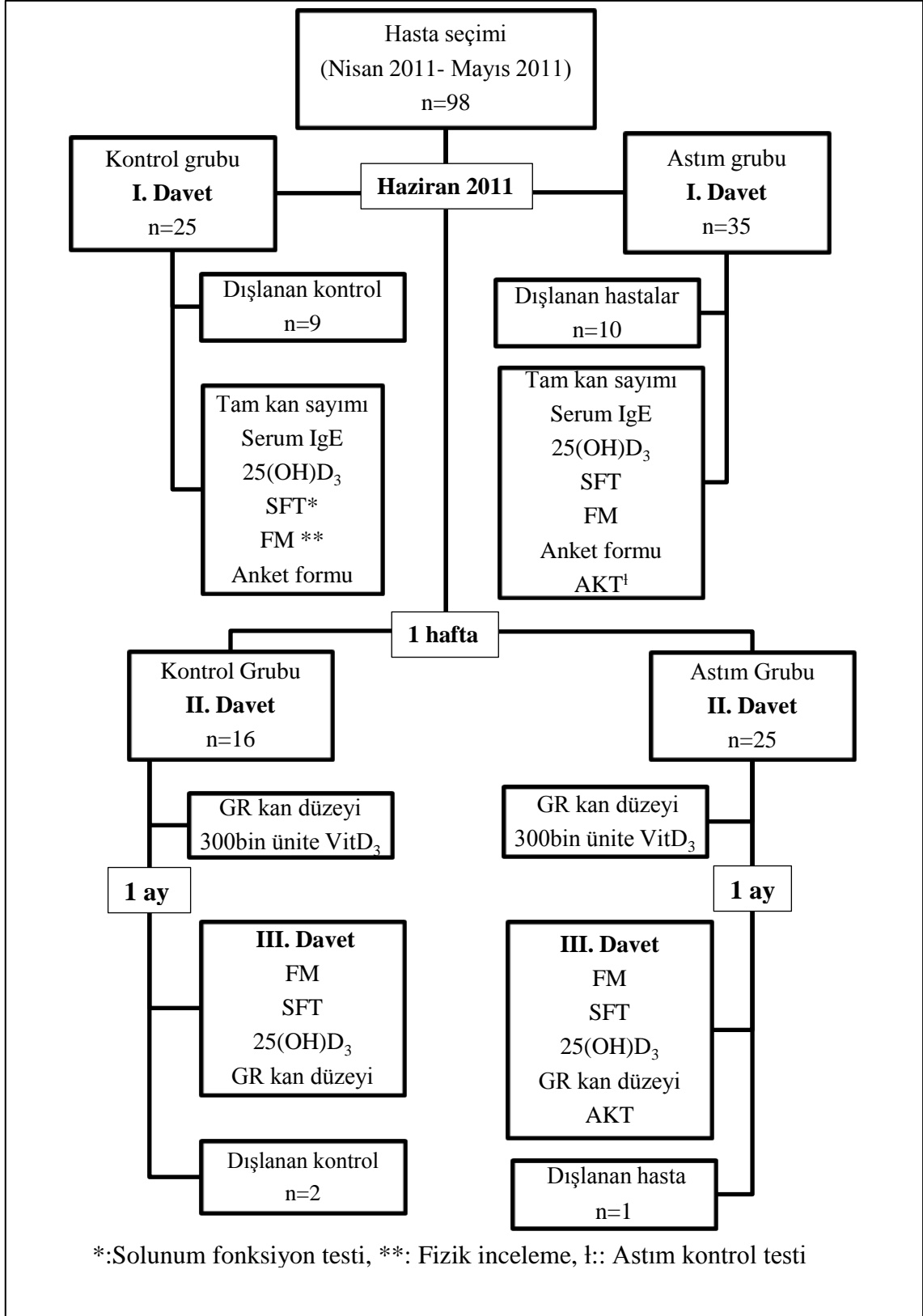
Tüm hastalardan Haziran 2011'in ilk haftası içerisinde sabah 08.00 – 08.30 saatleri arasında bir adet 2 cc EDTA'lı tüp ve bir adet biyokimya tüpüne kan alındı. Biyokimya tüpüne alınan kan örneği 4000 devir/dakika santrifüj edildi. Tam kan sayımı aynı gün çalışıldı. Serum total IgE ve 25(OH)D çalışmak üzere serum örnekleri ışık almayan ependorf tüplerine ayrılarak numaralandırıldı ve -20°C buzdolabına saklanmak üzere yerleştirildi. Tüm örnekler aynı gün serum örneklerinin kime ait olduğunu bilmeyen teknisyen tarafından bir sonraki hafta başında çalışıldı.

II. Davet

Serum 25(OH)D düzeyi 30 ng/mL altında çıkan astımlı ve kontrol grubundaki çocuklar Haziran 2011 ikinci haftasında tekrar hastaneye davet edilerek kan glukokortikoid reseptör α ve β relatif gen ekspresyonu kat değişiminin (*fold change*) (RGE) belirlenebilmesi için 8 ml kan örneği 2,0 ml ficoll solüsyonu içeren “BD Vacutainer CPT™” markalı özel tüpe sabah 08.00 – 08.30 saatleri arasında alındı. Alınan örnekler en geç yarım saat içerisinde laboratuvara ulaştırılarak monosit izolasyon işlemi yapılmaya başlandı. Monosit izolasyonu sonrası örnekler -80°C 'de saklandı.

III. Davet

Tüm hastalar VitD tedavisinden 1 ay sonra tekrar davet edildi. Kan örnekleri sabah 08.00 – 08.30 saatleri arasında alındı. Serum 25(OH)D için biyokimya tüpüne alınan kan örneği 4000 devir/dk santrifüj edildi, 25(OH)D çalışmak üzere serum örnekleri ışık almayan ependorf tüplerine ayrılarak numaralandırıldı ve -20°C buzdolabına saklanmak üzere yerleştirildi. Tüm örnekler, serum örneklerinin kime ait olduğunu bilmeyen teknisyen tarafından bir sonraki hafta başında çalışıldı. Kontrol GR α ve β RGE için alınan örnekler en geç yarım saat içerisinde laboratuvara ulaştırılarak monosit izolasyon işlemi yapılmaya başlandı. Monosit izolasyonu sonrası örnekler 3 ay sonra çalışılmak üzere -80°C 'de saklandı.



Şekil 10 Çalışma akış diyagramı

3.4. Örneklerin İncelenmesi

3.4.1. Serum IgE Düzeylerinin Ölçümü ve Tam Kan Sayımı

Serum IgE düzeyleri, Siemens BN II nephelometer™ cihazı ile N Latex IgE Mono kit kullanılarak “IU/mL” biriminde ölçüldü. Yaş gruplarına göre IgE normal serum düzeyleri 6-9 yaş için < 90 IU/mL, 10-15 yaş grubu için <200 IU/mL, 15 yaş üstü >100 IU/mL olarak alındı. Tam kan sayımı için 2,5 cc antikoagülan içeren tüplere kan örnekleri alındı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Çocuk Hematoloji Laboratuvar’ında, Coulter LH 750 aleti ile tam kan sayımı çalışıldı.

3.4.2. D Vitamin Serum Düzeyi Belirleme Protokolü

Vitamin D serum düzeyinin belirlenmesi Agilent 1100 series UV detector 265 nm, HPLC ile sağlanmıştır. Serum örnekleri soğuk zincire uyularak ve ışıktan korunarak laboratuvara ulaştırıldı. Tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Serum kalibrasyon stadartı 2 ml distile su ile çözünmesi için 10 dakika bekletildi. Internal standart 500 µL seruma eklenerek karıştırıldı ve 500 µL precipitasyon reaktifi ilave edilerek 20 saniye vortekslendi. On dakika süresince 4°C derecede inkübasyon sonrası 5 dakika 13.000 devir/dk’de santrifüj edildi. Supernatan alınarak ön kolona uygulandı. Bir dakika 1.500 devir/dk santrifüj edildi. Kolona 1 ml “wash buffer I” ilave edildi. Tekrar 1 dakika 1500 devir/dk santrifüj edilerek süzüntü atıldı. Ön kolonlar temiz bir tüpe yerleştirildi. Ön kolona 200 µL “elution buffer” koyuldu ve tekrar 1 dakika 1500 devir/dk santrifüj edilerek süzüntü toplandı. Bu eluent, 20 µL distile su ile dilue edilerek karıştırıldı.

3.4.3. CD14 Monosit İzolasyonu Protokolü

Tampon hazırlama (Tablo 5):

1. Fosfat Buffer Salin (PBS) 10 mM, pH:7.2 0,5 L
2. pH 7.2’e ayarlanarak 0,5 litreye tamamlandı.
3. 0.45 µm’lik fitre ile filtre edilir. 2-8°C’de saklandı.

Tablo 5. CD14 monosit izolasyonu

Madde	Miktar	Firma
NaCl 136 mM	4 g	Merck, Art.6400, S-12
KCl, 2.7 mM	0.1 g	Merck, Art.4935, P-11
Na ₂ HPO ₄ , 10 mM	0,72 g	Merck, Art.6586, S-7
KH ₂ PO ₄ , 10 mM	0,68 g	Merck, A997671 851, P-3
BSA %0,5	2,5 g	Sigma A-9647, B13
EDTA 2 mM	20 mL 50 mM stokdan eklenir.	Pancreac 131026, E-1
dH ₂ O	400	

50 mM EDTA Stok

1. $0,05M = n/0,025 L$ $n = 0,00125 mol = m/292,24$ $m = 0,3653g$
2. 0,3653 g EDTA tartıldı, 20 mL dH₂O üzerine ekledi. NaOH ile pH 8'e ayarlanarak EDTA çözülür. 25 mL' ye tamamlandı.
3. $50mM * x = 500mL * 2mM$ $x = 20mL$
4. Tamponu 2-8°C de tutun. Hava kabarcıkları kolonu tıkayabilir o nedenle kullanmadan önce hava kabarcıkları engellendi.

Numune hazırlama:

Antikoagüle periferik kan ile veya "buffy coat" ile çalışacağımız zaman periferik kan mononükleer hücreleri yoğunluk gradiyenti santrifugasyonu ile izole edildi (örneğin; Ficoll- Paque kullanarak).

Periferik kan mononükleer hücreleri yoğunluk gradiyenti santrifugasyonu

1. Kan örnekleri (6-8 mL) kan alındıktan hemen sonra yavaşça ters düz edilerek karıştırıldı.
2. Örnekler alındıktan sonra yarım saat içinde getirildi.
3. Tüpleri oda ısısında ve dik bir şekilde tutuldu.
4. Tüpler oda ısısında (18-25°C de) "swing-out rotor" içinde 30 dakika 1800 g de çevrildi. Santrifüj edilen tüpler 2-8 °C ye kaldırıldı.

(NOT: Tüpler santrifügasyon öncesi nazıkçe 8-10 kez ters-düz edildi.)

5. Santrifüjden sonra mononükleer hücreler ve plateletler plazma tabakasının altında beyazımsı tabakada görüldü. Hücre tabakasına zarar vermeden plazma ficoll çizgisine kadar aspire edildi.
6. Hücre tabakasını pastör pipetle toplandı, toplama yaparken dipte kalan hücreleride almak için alver yapıldı ve ondan sonra 2 lik ependorfa aktarıldı. Santrifügasyonu takiben hücrelerin hemen toplanılması en iyi sonuçları sağlayacaktır.

Magnetik işaretlenme

Hızlı çalışın, hücreleri soğukta tutun ve önceden soğutulmuş solüsyonlar kullanıldı. Bu, hücre yüzeyinde antikörlerin kapaklanmasını ve nonspesifik hücre işaretlenmesini engelleyecektir.

Manyetik işaretleme için aşağıda verilen miktarlar 10^7 hücreye kadardır. 10^7 hücreden daha az hücre ile çalışırken, belirtildiği gibi aynı hacim kullanıldı. Yüksek hücre sayıları ile çalışırken reaktif volümünü ve total volümü uygun bir şekilde arttırıldı. (Örneğin: Toplam 2×10^7 hücre için tüm belirtilen reaktif hacimlerini ve toplam hacimlerin 2 katı hacim kullanıldı.)

1. Ependorfa aktarılan hücre süspansiyonu 10 dakika boyunca oda ısısında $500 \times g$ ' de santrifüj edildi. Süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı.
2. Ependorfun üzerine 1.2 ml çizgisine gelinceye kadar PBS tampon ilave edildi. Ependorf alt üst edildi. Parmakla hafifçe vurularak karıştırıldı. $200 \times g$ de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantın tamamı uzaklaştırıldı.
3. $80 \mu L$ tampon eklendi ve parmakla hafifçe vurularak karıştırıldı.
4. $20 \mu L$ CD14 Mikrobeads tamponu içine pipetlendi.
5. Parmakla hafifçe vurularak karıştırıldı ve buzdolabında 15 dakika inkübe edildi ($2-8^\circ C$)
6. $1.5 mL$ tampon ekleyerek hücreleri yıkandı, hafifçe ters düz edildi ve 10 dakika boyunca $300 \times g$ ' de santrifüj edildi. Süpernatantı tamamen uzaklaştırdı.
7. $500 \mu L$ tamponda resüspanse edildi.
8. Magnetik ayırma aşamasıyla devam edildi.

Magnetik ayırma

1. Toplam hücre sayısı ve CD14 hücre sayısına göre uygun bir MACS kolon ve MACS ayırıcı seçildi.
2. Uygun MACS separatörünün manyetik alanına kolonu yerleştirildi.
3. Kolon hazırlığı için 500 µL (MS için) PBS tampon geçildi.
4. Kolon üzerine hücre süspansiyonu uygulandı. (Dökerek konulabilir)
5. Her seferinde 500 µL olmak şartıyla 3 kere PBS tampon (MS: 3X 500 µL) ile kolonu yıkandı. (Kolon boşaldığında sadece yeni tampon eklendi)
6. Separatörden kolonu uzaklaştırıldı ve hücreleri toplayacağımız yeni bir ependorfa yerleştirildi.
7. Kolona 1 ml (MS için) PBS tampon pipetlendi. Hemen ardından pistonla manyetik işaretli hücreleri dışarı alındı.
8. 300x g de 10 dakika oda ısısında santrifüj edildi. Üzerinden 800 µL atıldı. Geriye kalan 200 µL -80° C ye kaldırıldı.

3.4.4. RNA İzolasyon Protokolü

RNA izolasyon solüsyonlarının hazırlanması (Tablo 6)

Tablo 6. RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlanması

İçerik	Hazırlama	Saklama /Stabilite	Kullanım alanı
DNase 1	0.55 ml Elüsyon Buffer içinde çözülür.	Alikotlanır, -15-25 °C'de 12 ay stabildir.	DNA kontaminasyonunu engellemek için kullanılır.
Wash Buffer 1	20 ml absöü etanol, Wash Buffer I üzerine eklenir ve iyice karıştırılır.	15 -25 °C'de son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.
Wash Buffer II	40 ml absöü etanol, Wash Buffer II üzerine eklenir ve iyice karıştırılır.	15 -25 °C'de son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.

High-pure PCR RNA isolation kiti (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak izole edilen momositlerde tablo 7'deki protokole göre RNA izolasyonu yapıldı ve nanospektrofotometre ile miktar tayini yapıldı.

Tablo 7. RNA izolasyon protokolü

1.	Kuyulardaki medium multikanal pipet ile tabana değmeden uzaklaştırılır.
2.	Kuyular 150 µl 37 °C'ye ısıtılmış PBS ile 1 kez yıkanır.
3.	Bütün kuyulara 50 µl Tripsin EDTA pipetlenir.
4.	Plate 3 dakika CO ₂ inkübatörde bekletilir.
5.	Kuyulara 100'er µl MCF-7 için RPMI 1640, HepG2 için DMEM komplet medium eklenir.
6.	1000' lik pipetle 6 kuyu birleştirilip 1,5 mL' lik eppendorfa alınır.
7.	Eppendorflar 1000 g' de 5 dakika 8 °C'de santrifuj edilir.
8.	Süpernatant atılır.
9.	Hücreler, 200 µl PBS ile resüspanse edilir.
10.	Lysis/-Binding Buffer' dan 200 µl (yeşil kapak) eklenir ve 15 s. vortekslenir.
11.	Filtreli tüp, toplayıcı tüpe yerleştirilir ve numune filtreli tüpe pipetlenir (maksimum 700 µl)
12.	Numuneler oda sıcaklığında, 1 dakika, 14000 rpm'de santrifuj edilir.
13.	Toplayıcı tüpten artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp tekrar yerleştirilir.
14.	Steril bir reaksiyon tüpüne her numune için 90 µl DNase Incubation Buffer (beyaz kapak) pipetlenir, üzerine 10 µl DNase I eklenerek karıştırılır. Solüsyon filtreli tüpe transfer edilir.
15.	15 dakika, +15 +25°C'de inkübe edilir.
16.	Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer I pipelenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifuj edilir.
17.	Artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
18.	Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifuj edilir.
19.	Artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
18.	Filtreli tüpe 200 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 2

dakika maksimum hızda (~14000 rpm) santrifüj edilerek gerideki Wash buffer'ın uzaklaşması sağlanır.
19. Ekstra santrifügasyon ile rezidü wash bufferın uzaklaşması sağlanır
20. Toplayıcı tüp atılarak filtreli tüp temiz, steril 1,5 ml'lik mikro-santrifüj tüpüne yerleştirilir.
21. RNA' yı elüe etmek için, Filtreli tüpe 50 µl Elution Buffer pipetlenir.
22. Oda sıcaklığında 1 dakika, 14000 rpm'de santrifüj edilir.
23. Mikrosantrifüj tüpte biriken elüe RNA'dır.
24. Elüe RNA direk REAL TIME-PCR için kullanılır ya da -80°C'de daha sonra analiz edilmek üzere saklanır

3.4.5. Gen Ekspresyon Çalışması

Hücre RNA izolatlarından cDNA sentezi

Transcriptor first strand cDNA synthesis kiti (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak Thermal Cycler cihazında tablo 8'de gösterilen protokol ile cDNA sentezi yapıldı.

Biyoinformatik analiz

İyi düzenlenmiş primerler ve probler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon sağlarlar ve genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilirler. Primer ve probların düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır.

1. Tm dereceleri, primer için 58-60°C, prob için 68-70°C olmalı.
2. G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalı.
3. Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı.
4. Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.
5. Maksimum amplikon büyüklüğü 400 bp'i aşmamalı (ideali 50-150 bp).
6. Problar ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla G).
7. Problardaki % 30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G'den fazla olmalı.
8. Probların 5' ucunda G olmamalı

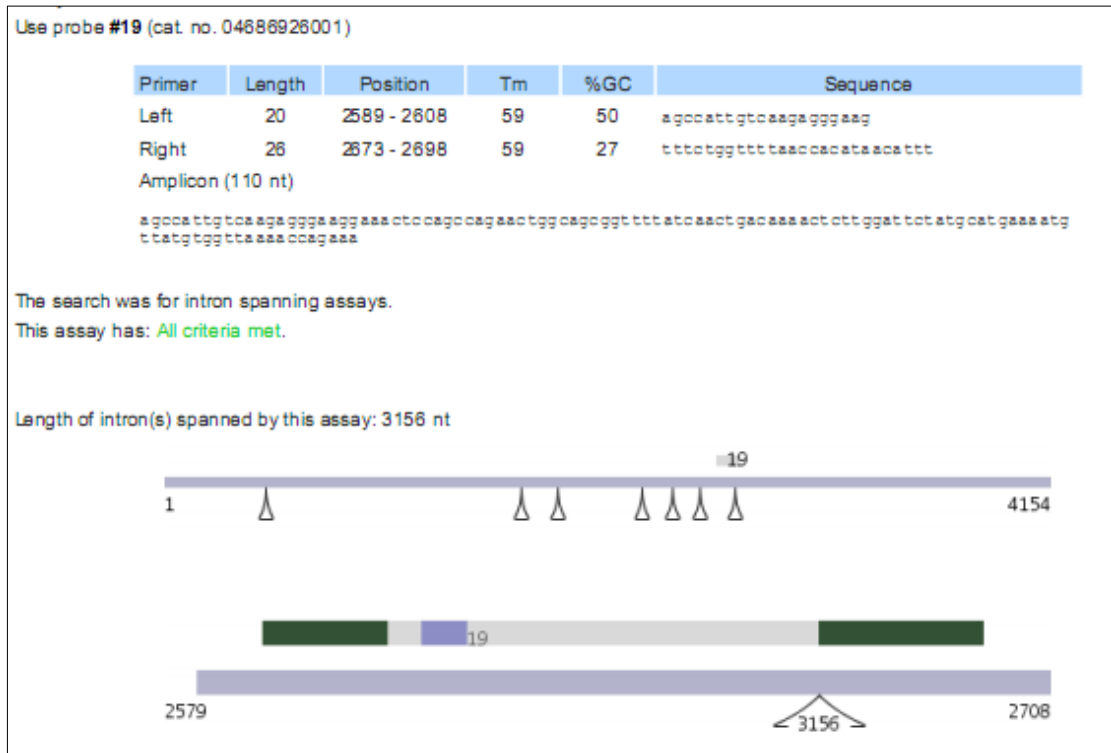
Tablo 8. RNA izolatlarından cDNA sentez protokolü

1.	Kullanmadan önce tüm reaktiflerin çözünmesi sağlanır.
2.	Protokol uygulamadan önce tüm reaktifler kısa süreli santrifüj edilir.
3.	Reaksiyon düzenlenirken tüm reaktifler buz üzerinde tutulmalıdır.
4.	Buz üzerinde ya da soğuk kolon üzerinde tutulan steril, nuclease-free, thin-walled PCR tüpüne, reaksiyon başına 50 µl olacak şekilde template-primer karışımı hazırlanır. Bu karışımda; 17,5 µl PCR-grade distile su 30 µl (1 µg) Total RNA template 2,5 µl (2.5 µM) Anchored-oligo(dT)18 Primer bulunur.
5.	Template-primer karışımı içeren tüpler 10 dakika 65°C'de termal cycler cihazında tutulur. Bu basamak RNA sekonder yapısının denaturasyonunu sağlar. (Bu amaçla GeneAmp 9700 Thermal Cyclers, 'cdna1' programı kullanıldı)
6.	Tüpler daha sonra acele olarak soğuk ortama alınır.
7.	Template-primer karışımını içeren tüplere aşağıdaki maddeler pipetlenir. <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl, 5X Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer • 1,25 µl (20 U) Protekör RNaz İnhibitör • µl her biri 1 mM olan Deoksinükleotid Miks • 1,25 µl (10 U) Transkriptör Revers Transkriptaz
8.	Toplam 50 µl olan tüpteki reaktifler iyice karıştırılır. Vorteks yapılmamalıdır.
9.	Tüpler GeneAmp 9700 termal Cyclers cihazına yerleştirilir ve cdna-oligo-trans' programı ayarlanır.
10.	60 dakika, 50°C'de inkübasyona bırakılır.
11.	Transcriptor Reverse Transcriptase inaktivasyonu için tüp, 85°C'de 5 dakika bekletilir.
12.	Tüpler buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulur.
13.	Reaksiyon tüpü +2-+8°C'de 1-2 saat ya da -15-25°C'de daha uzun süre saklanabilir.
14.	Elde edilen cDNA purifikasyona gerek olmadan PCR için kullanılabilir.
15.	PCR için 20 µl reaksiyon hacmi içinde 2-5 µl cDNA kullanılmalıdır.

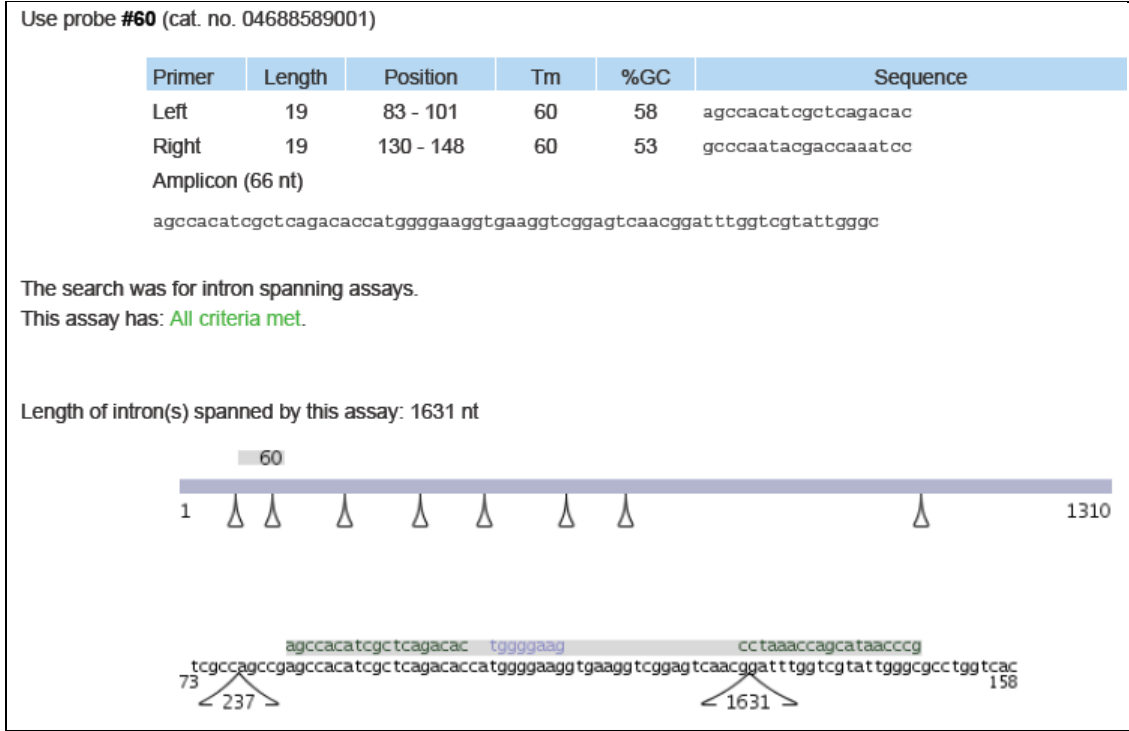
Çalışmada Referans gen olarak Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. GAPDH ekspresyonunun belirlenmesi için primer-prob dizaynı, Roche Universal Probe Library (UPL) programı kullanılarak yapıldı. BLAST (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Aşağıdaki tablolarda primer-prop dizaynları görülmektedir (şekil 11, 12 ve 13).



Şekil 11. Glukokortikoid reseptör α primer-prob dizaynı



Şekil 12. Glukokortikoid reseptör β primer-prob dizaynı



Şekil 13. GAPDH Primer-Prob Dizayını

Glukokortikoid reseptör α ekspresyonunun belirlenmesi için GR- α primer-prob dizayını, Roche UPL programı kullanılarak yapıldı. BLASTn analizi ile doğrulukları teyit edildi.

Glukokortikoid reseptör α mRNA primer ve probları mevcut literatürden alınarak ve BLASTn analize tabi tutulup doğrulandıktan sonra araştırmamızda kullanılmıştır. Glukokortikoid reseptör β ekspresyonunun belirlenmesi için GR- α primer-prob dizayını, Roche UPL programı kullanılarak yapıldı. BLASTn analizi ile doğrulukları teyit edildi (Tablo 9).

Q-PCR Çalışması

Relatif gen ekspresyon analizi yapılırken dikkat edilmesi gereken konular:

1. RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmalı ve elüsyon hacmi hücre sayısı az ise RNA dilüsyonunu önlemek amacıyla düşük volümle yapılmalı (~ 50 μ L)
2. İzolasyon sonrası RNA'lar nanospektrofotometre ile ölçülerek cDNA sırasında kullanılacak RNA miktarı belirlenmeli. Eğer düşük miktarda RNA izole edilmişse cDNA sentezi sırasında olabildiğince yüksek RNA kullanılmalı.

3. cDNA sentezi için kullanılacak RNA konsantrasyonları, farklı gruplar arasında birbirine yakın olmalıdır. Gerekirse RNA dilüsyonu yapılarak yakın konsantrasyonlara getirilebilir.
4. cDNA sentezi Transkriptör First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak yapılmalı.
5. cDNA sentezi oligod (T) primer kullanılarak, her bir mRNA'ya ait tek bir cDNA sentezi sağlanarak daha spesifik yapılabilir. (Random hegzamer ile bir mRNA'dan birkaç cDNA oluşabilir).
6. Düşük konsantrasyondaki RNA kullanılarak yapılan cDNA sentezinde Random hegzamer kullanılarak verim arttırılabilir.
7. QPCR'da kullanılacak primer ve proplar Roche UPL programı kullanılarak dizayn edilebilir. Hiçbir sorun ile karşılaşılmağı.
8. Kullanılacak primerler sipariş edilmeden önce mutlaka biyoinformatik analize tabi tutulmalı.
9. Primerler 100 pmol/ μ L olacak şekilde sulandırıldıktan sonra aliqoutlanarak saklanmalı. PCR çalışılacağı zaman aliqout 10 pmol/ μ L'e dilüe edilerek kullanılmalı.
10. Proplar tekrarlayan don-özlerden kaçınmak için aliqoutlanarak saklanmalı.
11. Normalizasyon için kullanılacak referans genin ekspresyonu hücrenin maruz kaldığı koşullardan etkilenmeden eksprese olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'lerden en sık kullanılanları GAPDH, β -actin, siklofilin ve 28S rRNA'dır.
12. Seçilen referans gen, çalışılacak genin ekspresyon düzeyine yakın olmalıdır. Örneğin yüksek oranda eksprese olan bir gen için düşük düzeylerde ekspresyonu olan bir referans gen uygun değildir.
13. Yapılan çalışmada numuneler standart deviasyonun hesaplanabilmesi için en az 3 tekrarlı olarak çalışılmalı.
14. Çalışılacak olan her bir gen background hesabında yanlışlığa yol amaması için mutlaka ayrı pleytte çalışılmalı veya aynı pleytte çalışılacaksa ayrı ayrı subsetler tanımlanarak çalışılmalı.
15. QPCR relative kantitasyon Komparatif Ct Metodu ($-\Delta\Delta C_t$ metodu) ile çalışılacaksa Efficiency mutlaka 2'ye ayarlanmalı.

16. 15 Ct'nin altı ve 40 Ct'nin üzeri analizde değerlendirmeye alınmamalıdır. 35-40 Ct gri zondur gen ekspresyonu çok düşük düzeydedir ve "0" kabul edilebilir.

17. Çalışma gruplarının relatif gen ekspresyon analizi QIAGEN 2009 relative expression software (REST) kullanılarak yapıldı.

Her bir ilaç grubundan 6'şar kuyu birleştirilerek 2 RNA izolatu elde edildi.

Her bir RNA izolatından Revers Transkriptaz ile 2'şer tane cDNA elde edildi.

Her bir cDNA'dan 2'şer tane QPCR çalışılarak her bir ilaç grubu 8 tekrarlı çalışılmış oldu.

GAPDH için Q-PCR Çalışması

Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo 10, 11).

Tablo 9. GAPDH Q-PCR için master miks içeriği

Malzeme	Hacim	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µL		
Prim _{forw} GAPDH	1 µL	10 µM	0,5 µM
Prim _{rev} GAPDH	1 µL	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (LNA 60)	0,2 µL	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µL	2X	1X
Toplam Hacim	18 µL		

1. Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
2. Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer µL cDNA Template pipetlendi.
3. Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
4. 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
5. LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

Tablo 10. GAPDH Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 $^{\circ}\text{C}$	10 dk.	None
Amplifikasyon	45	95 $^{\circ}\text{C}$	10 sn.	Kantifikasyon
		55 $^{\circ}\text{C}$	15 sn	
		72 $^{\circ}\text{C}$	1 sn	
Soğutma	1	40 $^{\circ}\text{C}$	10 sn.	None

Glukokortikoid reseptör α için Q-PCR Çalışması

Her reaksiyon için toplam 18 μL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo 12 ve 13).

Tablo 11. Glukokortikoid reseptör α Q-PCR için master miks içeriği

Malzeme	Hacim	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su (vial 2)	2,8 μL		
GR alfa -Prim _{forw}	1 μL	20 μM	0,5 μM
GR alfa -Prim _{rev}	1 μL	20 μM	0,5 μM
GRa TaqMan Probe	0,2 μL	10 μM	0,1 μM
LC 480 Probe Master (vial 1)	10 μL	2X	1X
cDNA Template	5 μL		
Toplam	20 μL		

1. Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er μL master mix pipetlendi.
2. Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer μL cDNA Template pipetlendi.
3. Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
4. 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
5. LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

Tablo 12. Glukokortikoid reseptör α Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 $^{\circ}$ C	10 dk.	None
Amplifikasyon	45	95 $^{\circ}$ C	10 sn.	Kantifikasyon
		55 $^{\circ}$ C	10 sn	
		72 $^{\circ}$ C	10 sn	
Soğutma	1	40 $^{\circ}$ C	10 sn.	None

Glukokortikoid reseptör β için Q-PCR Çalışması

Her reaksiyon için toplam 18 μ L olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo 14 ve 15).

Tablo 13. Glukokortikoid reseptör β Q-PCR için master miks içeriği

Malzeme	Hacim	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su(vial 2)	2,8 μ L		
GR beta -Prim _{forw}	1 μ L	20 μ M	0,5 μ M
GR beta -Prim _{rev}	1 μ L	20 μ M	0,5 μ M
LNA Hidroliz Prob 19	0,2 μ L	10 μ M	0,1 μ M
LC 480 Prob Master (vial 1)	10 μ L	2X	1X
cDNA Template	5 μ L		
Total Volume	20 μL		

1. Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er μ L master mix pipetlendi.
2. Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer μ L cDNA Template pipetlendi.
3. Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
4. 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
5. LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

Glukokortikoid reseptör β Q-PCR programı

Tablo 14. Glukokortikoid reseptör β Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 $^{\circ}$ C	10 dk.	None
Amplifikasyon	45	95 $^{\circ}$ C	10 sn.	Kantifikasyon
		55 $^{\circ}$ C	15 sn	
		72 $^{\circ}$ C	1 sn	
Soğutma	1	40 $^{\circ}$ C	10 sn.	None

3.5. Cilt Prick Testi

Cilt prick testleri aileleri onay veren tüm çocuklara aynı kişi tarafından yapıldı. Cilt prick testi (Laboratoire des Stallergenes, Fresnes Cedex, Fransa) Dermatophegoides Farinea (DF), Dermatophegoides Pteronyssimus (DP), ot polen karışımı (*Chenopodium*, *Artemisia*, *Plantago*, *Salsola Kali*), ağaç polen karışımı (*Ulmus*, *Quercus*, *Populus*, *Salix*), yabancı ot karışımı (*poa mix*, *C. dactylon*, *P. pratensis*, *D. glomerata*, *A. sativa*, *Festuca*), *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, kedi tüyü, köpek tüyü ve hamamböceği içeren alerjenler ile yapıldı. Deri testi yapılmadan önce hastaların yakın zamanda kullandığı ilaçlar sorgulandı. Deri testi deneklerin sırt veya ön kolun volar kısmına prick yöntemiyle yapıldı. Negatif kontrol için serum fizyolojik, pozitif kontrol için histamin hidroklorid 10 mg/ml kullanıldı. Alerjen test solüsyonları her bir alerjen için en az aralarında 2 cm olacak şekilde ve her bir alerjen için damlatıldı. Damlatılan bölge 1 mm'lik tek kullanımlık lansetle epidermisi geçmeyecek ve kanatılmayacak şekilde delindi. 15 dakika sonra oluşan endurasyonun (kabarıklık) çapı ölçüldü. Negatif kontrolde kabarıklık varsa ve alerjenin oluşturduğu kabarıklığın çapı negatif kontrolden en az 3 mm daha büyükse test pozitif olarak kabul edildi.

3.6. Solunum Fonksiyon Testi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalı Laboratuvarında yer alan, Solunum Fonksiyon Testi Birimi'nde akıma duyarlı spirometri cihazı (ZAN 100, Handy™) ile ölçüldü. Tüm ölçümler aynı kişi teknisyen tarafından yapıldı. Solunum fonksiyon testleri aynı uygulayıcı tarafından hastaya açık bir

dille anlatıldıktan sonra, hastanın burnu yumuşak bir mandalla kapatılarak, oturur pozisyonda 3 tekrarlı olarak yapıldı, hastanın başarabildiği en iyi ölçüm değerleri kullanıldı. Yapılan ölçümler sonunda, solunum parametrelerinden, zorlu vital kapasite (FVC), birinci saniyedeki zorlu ekspiratuvar hacim (FEV_1), ekspiratuvar tepe akımı (PEF) ve orta ekspiratuvar akım (MEF_{25-75}) değerleri belirlenerek, normale göre yüzdeleri alındı.

3.7. Astım Kontrol Testi

“Astım kontrol testi (AKT)” Türkçeye uyarlanmış ve çeşitli çalışmalarla test edilmiş 7 sorudan oluşan anket formu I. ve II. kontrol dönemlerinde aynı kişi tarafından tüm astımlı çocuklara uygulandı (Tablo 16) (173). Alınabilecek en yüksek puan 27 olarak belirlendi. Alınan puan 20 veya üzerinde ise kısmi veya tam kontrollü, 12-20 aralığında ise kontrolsüz ve 12 veya altında ise şiddetli astım olarak gruplandırıldı. Yönlendirmede bulunmamak için AKT anket cevapları alındıktan sonra SFT ve diğer değerlendirme formunda bulunan sorular soruldu.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

3.8.1. Komparatif Ct metodu ile gen ekspresyon analizi

3.8.1.1. Relatif kantitasyon

Gen ekspresyonununun relatif kantitasyonu, farklı dokulardaki spesifik genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemeye izin verir. Bu farklılık, absölu kantitasyonda olduğu gibi bir değer olarak değil, n-katı şeklinde ifade edilir. Real-time PCR kantitasyonunda hedef numunenin başlangıç miktarındaki küçük farklılıklar, amplifikasyon ürününe katlanarak yansır. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bu relatif kantitasyonda yanlış sonuçlara sebep olur. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol tüm dokulardan ekspresse olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan ‘housekeeping gen’ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık GAPDH, β actin, Asidik ribozomal fosfoprotein (36B4) ve rRNA kullanılmaktadır. Bu genler referans gen olarak da isimlendirilmektedir (174). Çalışmamızda referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

Tablo 15. Astım kontrol testi soru anket formu

ASTIM KONTROL SKORU (TOPLAM:.....)	1. Kontrol	2. Kontrol
	Puan	Puan
I. Astımın bugün nasıl? 0) Çok kötü 1) Kötü 2) İyi 3) Çok iyi		
II. Koştuğun, egzersiz veya spor yaptığın zaman astım senin için ne kadar problem oluyor? 0) Çok büyük problem istediklerimi yapamıyorum 1) Bir problem ondan hoşlanmıyorum 2) Biraz problem oluyor ama zararsız 3) Problem değil		
III. Astım yüzünden öksürüyor musun? 0) Evet, her zaman 1) Evet, çoğu zaman 2) Evet, bazen 3) Hayır, hiçbir zaman		
IV. Astım yüzünden gece uyanıyor musun? 0) Evet, her zaman 1) Evet, çoğu zaman 2) Evet, bazen 3) Hayır, hiçbir zaman		
V. Son 4 hafta içinde gündüz haftada kaç kez astım semptomları gösterdi? 0) Her gün 1) 19-24 gün/ay 2) 11-18 gün gün/ay 3) 4-10 gün/ay 4) 1-3 gün/ay 5) Hiç		
VI. Son 4 hafta içinde gündüz haftada kaç kez astım yüzünden hırıltı oldu? 0) Her gün 1) 19-24 gün/ay 2) 11-18 gün gün/ay 3) 4-10 gün/ay 4) 1-3 gün/ay 5) Hiç		
VII. Son 1 ay içinde hırıltı nedeni ile yaklaşık kaç kez rahat uyuyamadı? 0) Her gün 1) 19-24 gün/ay 2) 11-18 gün gün/ay 3) 4-10 gün/ay 4) 1-3 gün/ay 5) Hiç		
TOPLAM SKOR		

3.8.1.2. Komparatif Threshold Siklus Metodu

$-\Delta\Delta Ct$ metodu olarak da isimlendirilen bu metod, standart eğri metoduna benzer ancak konsantrasyonların yerine Ct değerleri kullanılır. Hedef genin Ct değeri bir referans genin Ct değerine oranlanarak normalize edilir. Daha sonra normalize Ct değerleri kalibratöre oranlanır. Sonuçlar kalibratörün n-katı şeklinde verilir. Komparatif Ct metodu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile ifade edilir.

Burada:

$$-\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{hedef gen}) - \Delta Ct(\text{kalibratör})$$

$$\Delta Ct(\text{hedef gen}) = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$$

$$\Delta Ct(\text{kalibratör}) = Ct(\text{kalibratör}) - Ct(\text{referans gen})$$

Karşılaştırmalı Ct metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Bunun için iki şart gereklidir: Birincisi, hedef gen amplifikasyonunun verimliliği ile referansın gen amplifikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit ve % 100'e yakın olmasıdır. İkincisi de farklı başlangıç konsantrasyonlarında ΔCt değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı ΔCt grafiğinde slope değerinin sıfıra yakın ($<0,1$) olmasıdır (175).

Çalışma gruplarının relatif gen ekspresyon analizi, GAPDH geni referans gen ve kontrol grupları da kalibratör olarak kabul edilerek, QIAGEN 2009 relative expression software (REST) programı kullanılarak yapıldı.

3.8.2. İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesinde "The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows versiyon 15.0" istatistik analiz programı kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarının genel özelliklerinin karşılaştırılmasında normallik testleri yapıldı. Kategorik verilerin sıklık oranları arasındaki farkın karşılaştırılmasında Ki-Kare ve Fisher'in kesin olasılık testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan sayısal veriler ortalama \pm standart sapma, normal dağılıma uymayan sayısal veriler ortanca (minimum-maksimum) şeklinde verildi. Normal dağılıma uyan verilerin ortalamaları arasındaki farkın karşılaştırılmasında Student-t testi, normal dağılıma uymayan verilerin ortalamaları arasındaki farkın karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tekrarlanan ölçümler ilişkili örneklem tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

Tüm sonuçlar için anlamlılık düzeyi p değerinin 0.05'den küçük olması ve güven aralığı (CI) % 95 olarak belirlendi.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Araştırma Etik Komisyon 26.08.2010 tarih 2010/87 nolu kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından **PYO.TIP.1904.10.044** proje numarası ile desteklenmiştir.

4. BULGULAR

Birinci davette astımlı çocuklardan (n=73) dahil edilme ölçütlerine uyan 35 çocuk rastgele seçilerek değerlendirmelere geçildi. Vitamin D düzeyinin 4 hastada 30 ng/mL üzerinde olması, 2 hastanın SFT'ye uyum gösterememesi ve 3 hastanın ilk FEV ve FVC değerlerinin %80 altında olması ve 1 hastanın çalışma periyodunda solunum yolu enfeksiyonu geçirmesi nedeniyle 10 çocuk çalışmadan çıkarıldı. Kontrol grubundaki 4 ocuğun VitD düzeylerinin 30 ng/mL üzerinde olması, 3 ocuğun SFT'sini uygun şekilde yapamaması ve 2 çocuğun cilt prick testinde Dep 1 pozitif olması üzerine toplam 9 ocuk çalışma dışı tutuldu. Astımlı bir ve kontrol grubundan iki ocuk II. ve III. davet arasındaki dönemde solunum yolu enfeksiyonu geçirmeleri nedeniyle çalışmadan çıkarıldı (şekil 10). Sonuç olarak çalışmaya astımlı 9 (%37,5) kız ve 15 (%62,5) erkek toplam 24, sağlıklı 6 (%40) kız 8 (%60) erkek toplam 14 ocuk seçildi. Astım ve kontrol gruplarının demografik özellikleri Tablo 17'de gösterilmektedir.

Tablo 16. Astımlı ve kontrol grubundaki çocukların demografik özellikleri

	Toplam (n=38) n(%)	Astım (n=24) n(%)	Kontrol (n=14) n(%)	p
Cinsiyet				
Kız	15 (39,5)	9 (37,5)	6 (40)	1,0
Erkek	23(60,5)	15 (62,5)	8 (60)	
Anne Eğitim				
İlköğretim	18 (47,4)	12 (50)	6 (40)	0,93
Lise ve üstü	20 (52,6)	12 (50)	8 (60)	
Baba Eğitim				
İlköğretim	27 (63,2)	17 (70,8)	7 (50)	0,35
Lise ve üstü	14 (36,8)	7 (29,2)	7 (50)	

Tablo 16 (devamı). Astımlı ve kontrol grubundaki çocukların demografik özellikleri

	Toplam	Astım	Kontrol	
	(n=38)	(n=24)	(n=14)	
	n(%)	n(%)	n(%)	p
Aile Alerji öyküsü	15 (39,5)	13 (54,2)	2 (14,3)	0,037
Kardeş Alerji Öyküsü	11 (28,9)	7 (29,2)	4 (28,6)	1,0
Doğum Şekli				
NSVY	28 (73,7)	19 (79,2)	9 (64,3)	0,53
Sezaryen	10 (26,3)	5 (20,8)	5 (35,7)	
Sigara	22 (57,9)	14 (58,3)	8 (57,1)	1,0
Anne gebelik sigara	8 (21,1)	5 (20,8)	3 (21,4)	1,0
Isınma şekli				
Sobalı	31 (81,6)	20 (83,3)	11 (78,6)	1,0
Kaloriferli	7 (18,4)	4 (16,7)	3 (21,4)	
Güneş alma	32 (84,2)	19 (79,2)	13 (92,9)	0,38
Evcil hayvan	8 (21,1)	5 (20,8)	3 (21,4)	1,0

Astım ve kontrol grupları arasında cinsiyet, aile eğitim düzeyi, aile gelir düzeyi, kardeş alerji öyküsü, doğum şekli, ev yapısı ve ısınma şekli, sigara kullanma, evde yaşayan kişi sayısı, evcil hayvan teması ve çocuk odasının güneş alma ile ilgili istatistiksel farklılık belirlenmedi. Ailede alerji öyküsü astım grubunda %54,2 iken kontrol grubunda %14,3 olduğu görüldü (p=0,037).

Diğer taraftan astım ve kontrol grupları arasında yaş, vücut ağırlığı, boy, vücut kitle indeksi (BMI), doğum ağırlığı, ek gıdaya başlama yaşı ve mama kullanım süreleri açısından önemli farklılık belirlenmedi (Tablo 17). Anne sütü alma süreleri kontrol grubu astım grubundan yaklaşık 13 ay daha uzundu ($p=0,008$).

Tablo 17. Astım ve kontrol gurubundaki çocukların genel özellikleri

	Astım	Kontrol	p
	Ortalama±SS Ortanca (min-maks)	Ortalama±SS Ortanca (min-maks)	
Yaş (yıl)	11,1±2,1 11 (8-16)	11,5±1,7 11 (9-15)	0,51
Vücut ağırlığı (kg)	38,9±12,5 38 (22-77)	38,6±11,3 36,5 (24-57)	0,98
Boy (cm)	143,0±13,4 140 (118-177)	146,4±13,2 145 (127-168)	0,44
BMI (%)	18,6±2,8 18,3 (13,9-23,1)	17,7±2,8 17,8 (13,9-23,1)	0,34
Doğum ağırlığı (gr)	3410±5420 3500 (2500-4000)	3310±322 3300 (2700-3750)	0,45
Anne sütü (ay)	6,7±5,4 5(1-24)	14,9±8,9 18(2-24)	0,008
Ek gıda (ay)	3,5±1,6 4(1-6)	3,8±1,2 4(2-6)	0,71
Mama (ay)	7,9±7,2 6(0-24)	4,0±5,4 0(0-12)	0,09
Evde kişi sayısı	4,5±1,1 5(3-7)	4,6±1,3 4(3-8)	0,92

BMI: Vücut kitle indeksi [vücut ağırlığı(kg) / boy(m)²]

Tam kan sayımı incelemesinde astımlı çocuklarda eozinofil yüzdesi ($p=0,05$), eosinofil sayısı ($p=0,018$), serum IgE düzeyleri hasta grubunda kontrole göre belirgin olarak yüksekti ($p<0,001$) (Tablo 18).

Tablo 18. Astım ve kontrol grubundaki çocukların kan eozinofil ve serum IgE düzeylerinin karşılaştırılması

	Astım	Kontrol	p
	Ortalama \pm SS*	Ortalama \pm SS	
	Ortanca (min-maks)**	Ortanca (min-maks)	
Eosinofil (/uL)	616,2 \pm 668,9 500 (110-3220)	263,5 \pm 187,8 220 (80-660)	0,02
Eosinofil (%)	8,3 \pm 6,9 6,6 (1,5-31,0)	4,3 \pm 2,7 4,0 (1,2-8,9)	0,05
IgE (IU/mL)	713 \pm 844 392 (15-3170)	106 \pm 131 57 (15-532)	<0,001
IgE_(log10)	2,57 \pm 0,56	1,83 \pm 0,41	<0,001

*: Standart sapma, **: Ortanca (minimum - maksimum)

Astımlı çocuklara I. ve II. kontrol dönemlerinde AKT uygulandı. II. kontrol döneminde, I kontrole dönemine göre tüm skorlar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttı (Tablo 19). I. ve II. kontrol dönemlerinde alınan toplam skor 3 hastada değişmezken, 3 hastada azaldığı ve 18 hastada ise yükseldiği görüldü. D vitamini düzeyi ile AKT skorları arasında I. kontrol ($r=0,31$; $p=0,15$) ile II. kontrol ($r= -0,08$; $p=0,73$) arasında ilişki tespit edilmedi.

Tablo 19. Astımlı çocukların I. ve II. kontrol dönemlerinde AKT sonuçlarının karşılaştırılması

	I. Kontrol Ortalama±SS Ortanca (min-maks)	II. Kontrol Ortalama±SS Ortanca (min-maks)	p
Astımın bugün nasıl?	2,2±0,6 2(1-3)	2,5±0,6 2,5(1-3)	0,03
Koştuğun, egzersiz veya spor yaptığın zaman astım senin için ne kadar problem oluyor?	1,8±0,9 2(0-3)	2,2±0,9 2(0-3)	0,08
Astım yüzünden öksürüyor musun?	1,9±0,6 2(1-3)	2,3±0,6 2(1-3)	0,004
Astım yüzünden gece uyanıyor musun?	2,5±0,7 3(2-3)	2,9±0,3 3(2-3)	0,008
Son 4 hafta içinde gündüz haftada kaç kez astım semptomları gösterdi?	4,0±0,9 4(2-5)	4,4±0,8 5(3-5)	0,03
Son 4 hafta içinde gündüz haftada kaç kez astım yüzünden hırıltı oldu?	4,3 ±0,8 4,5(3-5)	4,5±0,7 5(3-5)	0,17
Son 1 ay içinde hırıltı nedeni ile yaklaşık kaç kez rahat uyuyamadı?	4,2±0,8 4(3-5)	4,7 ±0,5 5(3-5)	0,01
TOPLAM SKOR	21,06±4,07 21,5 (12-27)	23,50±3,36 25 (15-27)	0,003

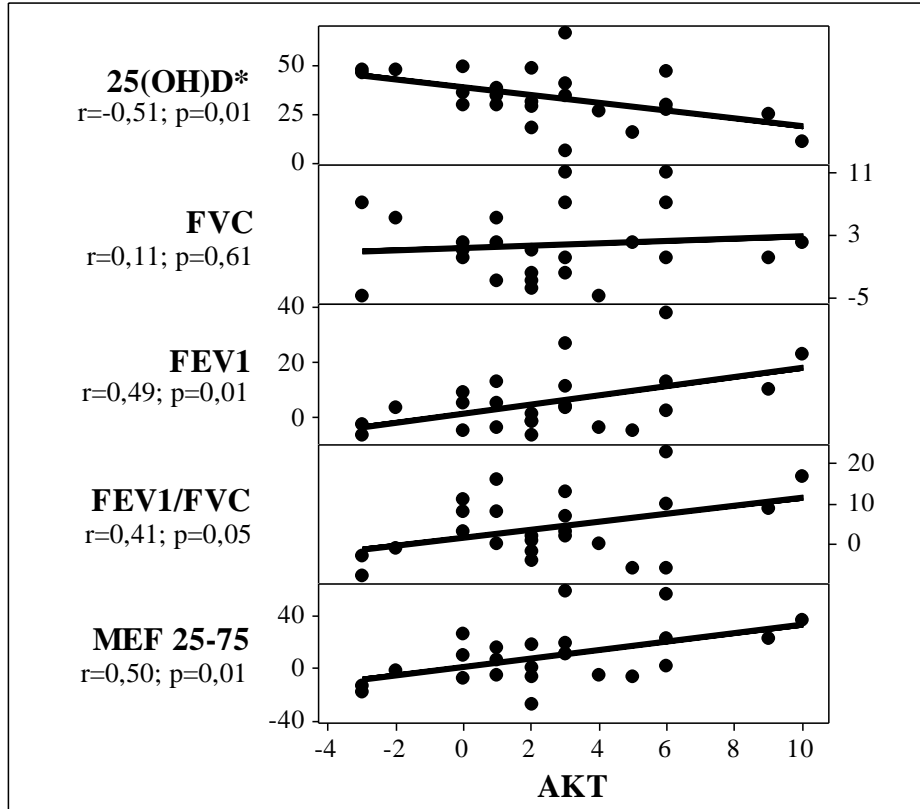
Tüm çocuklara I. ve II. kontrol dönemlerinde SFT ölçümleri yapıldı (Tablo 20). Astımlı çocukların FEV1 değerleri, FEV1/FVC oranı, MEF 25-75 ölçüm değerleri II. kontrol döneminde anlamlı düzeyde yükseldi. Buna karşın gruplar arasındaki farklılık karşılaştırıldığında sadece astımlı çocukların FEV1/FVC oranında anlamlı olarak arttı (p=0,009).

Tablo 20. Astımlı ve kontrol grubundaki çocukların I. ve II. kontrollerinde ölçülen SFT sonuçları

	Astım		Kontrol		Gruplar arası p
	Ortalama±SS*	p	Ortalama±SS	p	
FVC					
I. Kontrol	104,9±14,7	0,09	98,7±14,0	0,03	0,24
II. Kontrol	106,5±15,9		101,0±12,8		
FEV1					
I. Kontrol	101,7±16,5	0,03	103,9±13,9	0,55	0,97
II. Kontrol	107,0±17,7		104,4±14,2		
FEV1/FVC					
I. Kontrol	94,17±10,1	0,01	103,8±5,9	0,06	0,009
II. Kontrol	98,5±6,7		101,7±5,8		
PEF					
I. Kontrol	90,3±16,2	0,09	89,4±16,2	0,48	0,25
II. Kontrol	96,6±18,9		85,4±19,6		
MEF₂₅₋₇₅					
I. Kontrol	82,6±25,2	0,04	100,7±18,4	0,67	0,076
II. Kontrol	92,1±22,0		99,4±18,6		

SS: Standart sapma, FVC: Zorlu Vital kapasite, FEV1: Zorlu ekspiratuvar hacim (1 saniye), PEF: Ekspiratuvar tepe akımı, MEF₂₅₋₇₅: Orta ekspiratuvar akım (25-75 sn)

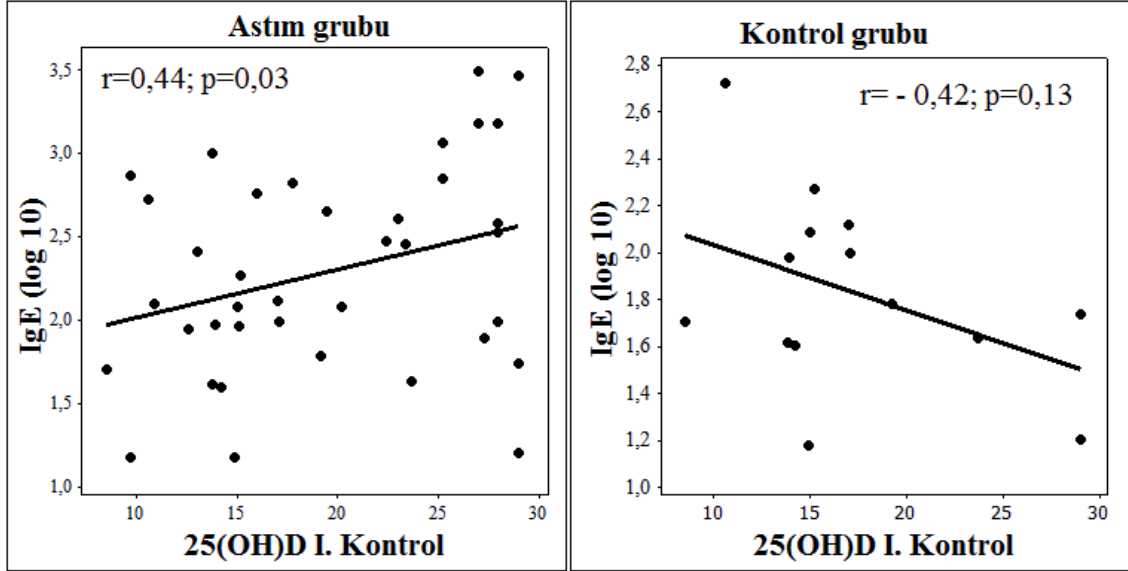
I. ve II. kontrol dönemlerinde toplam AKT skoru farkı ile 25(OH)D ve SFT değerleri farkları karşılaştırıldığında; AKT skoru farkı ile 25(OH)D arasında negatif; FEV1, FEV1/FVC, MEF25-75 arasında pozitif yönde ilişki olduğu görüldü (şekil 14).



*: II. kontrol değerlerin I. kontrol değerinden farkı (II. kontrol — I. kontrol), AKT: Astım kontrol testi, FVC: Zorlu vital kapasite, FEV1: Zorlu ekspiratuvar hacim (1 saniye), PEF: Ekspiratuvar tepe akımı, MEF₂₅₋₇₅: Orta ekspiratuvar akım (25-75 sn)

Şekil 14. Toplam AKT skor ile SFT ve 25(OH)D'nin I. ve II. kontrol dönem farkları açısından değerlendirilmesi

IgE dağılımı normal olmadığı için logaritmik düzeltme yapıldı. Astım grubunda I. kontrol 25(OH)D düzeyi ile $IgE_{(log10)}$ arasında pozitif yönde ilişki varken ($r=0,44$; $p=0,03$), kontrol grubunda gözlenmedi ($r= -0,42$; $p=0,13$) (şekil 15).



Şekil 15. 25(OH)D ile $IgE_{(log10)}$ arasındaki ilişki grafiği

Astımlı çocukların I. ve II. kontrol dönemlerinde kullandıkları ilaçların çeşidi ve miktarı açısından farklılık olmadığı görüldü (Tablo 21). Üç hastanın son 6 aylık dönemde klinik ve laboratuvar iyileşmesi nedeniyle çoklu ilaç tedavisinden bir alt basamak tedaviye geçildi.

Tablo 21. Astımlı çocukların kullandıkları antiastmatik ilaçlar

	I. kontrol	II. kontrol	p
	n(%)	n(%)	
İKS	9 (37,5)	10 (41,7)	
İKS + LABA & LTA	8 (33,3)	10 (41,7)	0,10
İKA + LABA + LTA	7 (29,2)	4 (16,7)	

İKS: İnhalasyon kortikosteroid, LABA: Uzun etkili beta mimetik, LTA: Lökotrien reseptör antagonisti

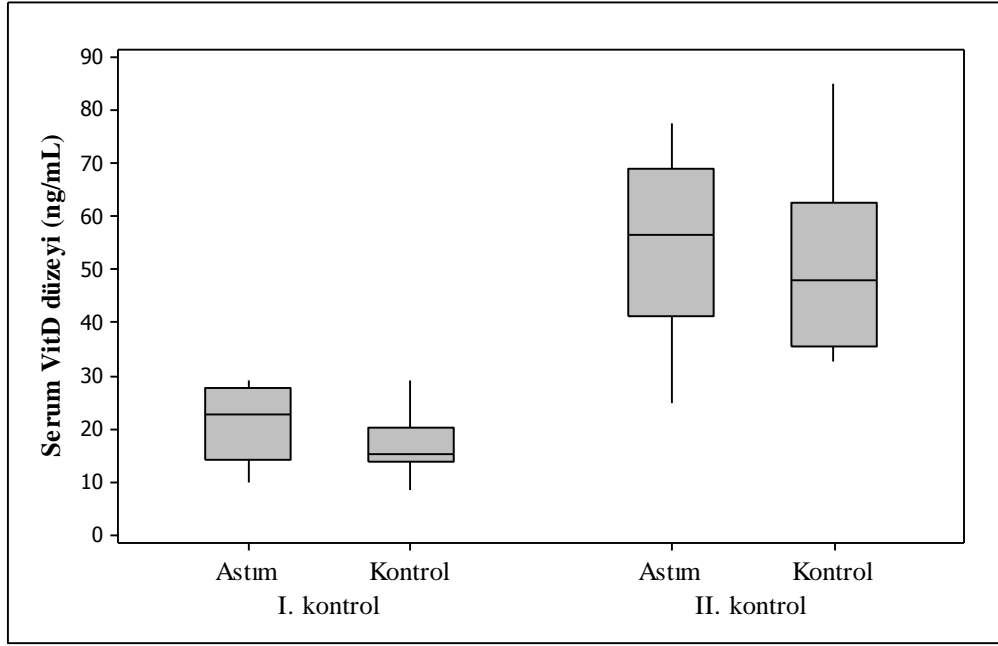
Astım ve kontrol grubunda II. kontrol döneminde serum 25(OH)D düzeyleri belirgin olarak yükseldi. Fakat gruplar arasında artış miktarı farklı değildi (Tablo 22 şekil 16 ve 17). I. ve II. kontrollerdeki GR- α ve GR- β RGE'deki değişimler, astım ve kontrol grupları için ayrı ayrı değerlendirildiğinde, sadece kontrol grubunda II. kontrol döneminde GR- β GRE'nin anlamlı düzeyde azaldığı görüldü ($p=0,05$). Astım ve kontrol grubundaki değişimler birbirleriyle karşılaştırıldığında GR- α RGE için önemli bir farklılık yokken GR- β GRE'nin kontrol grubunun astım grubuna göre belirgin olarak azaldığı kontrol grubunda değişiklik olmadığı belirlendi ($p=0,002$) (Tablo 22, şekil 18).

Tablo 22. Astımlı ve kontrol grubundaki çocukların I. ve II. kontrollerinde belirlenen serum VitD düzeyleri, GR- α ve GR- β RGE, gruplar arasındaki farklılığın karşılaştırılması

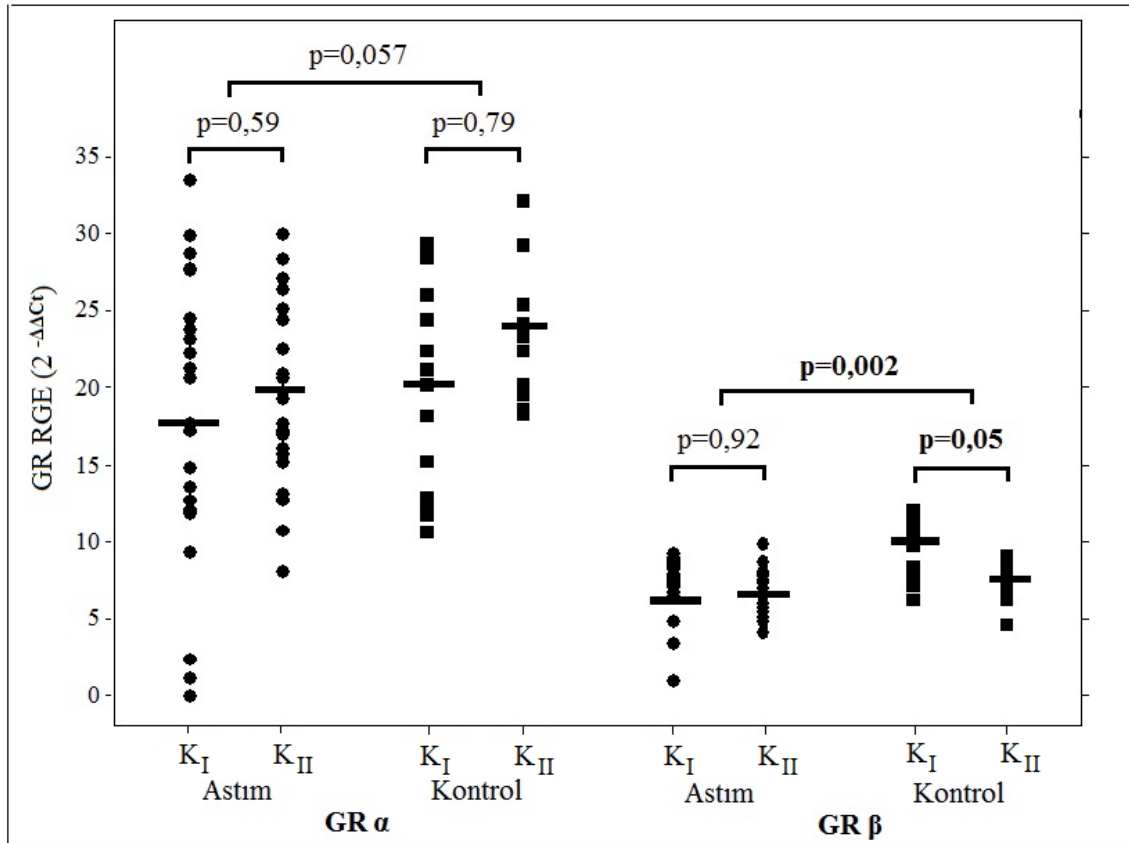
	Hasta		Kontrol		Gruplar arası p
	Ortalama \pm SS	p	Ortalama \pm SS	p	
25(OH)D*					
I. Kontrol	20,9 \pm 6,7	<0,001	17,2 \pm 6,1	<0,001	0,32
II. Kontrol	54,2 \pm 15,4		51,4 \pm 17,7		
GR** α					
I. Kontrol	17,78 \pm 9,34	0,59	20,14 \pm 6,81	0,79	0,057
II. Kontrol	19,34 \pm 5,79		23,35 \pm 4,37		
GR** β					
I. Kontrol	6,41 \pm 2,94	0,92	9,29 \pm 1,82	0,05	0,002
II. Kontrol	6,73 \pm 1,37		7,63 \pm 1,39		

*: (ng/mL), **: GR RGE kat değişimi (*fold change*, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Astım ve kontrol grupları arasında I. kontrolde GR- α için istatistiksel farklılık yokken ($p= 0,42$), II. kontrol döneminde kontrol grubunda GR- α RGE anlamlı düzeyde yüksekti ($p=0,05$). Diğer taraftan GR- β için I. kontrol döneminde kontrol grubunda astım grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekken ($p=0,006$) II. kontrol döneminde farklılık yoktu ($p=0,09$).

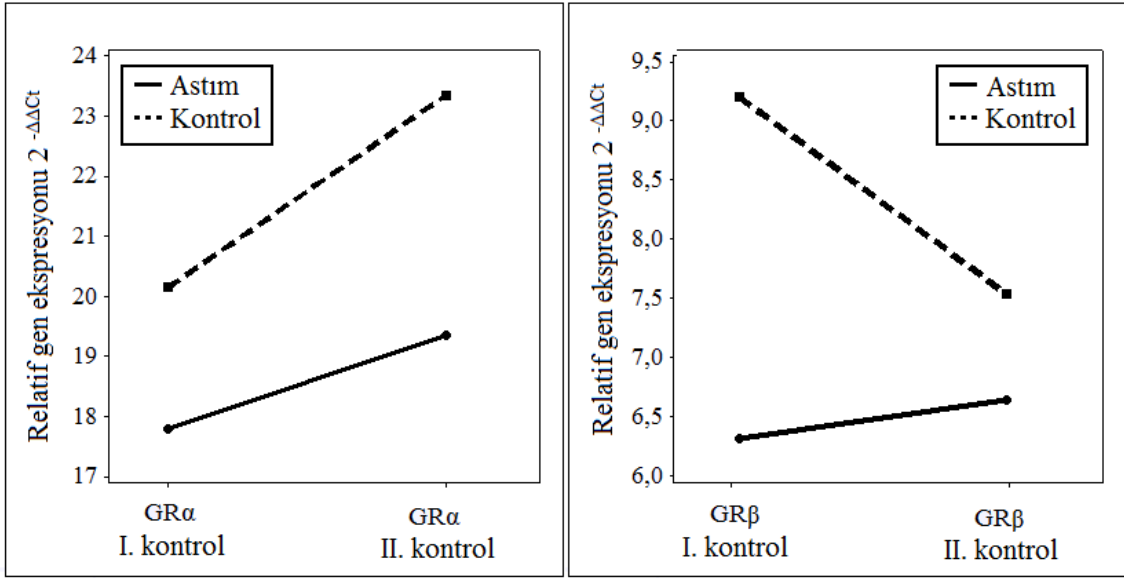


Şekil 16. I. ve II. kontrol dönemlerinde VitD düzeylerinin değerlendirilmesi



K_I: I. kontrol dönemi; K_{II}: II. kontrol dönemi

Şekil 17. Astım ve kontrol grubunda GR-α ve GR-β RGE'nin I. ve II. kontrol dönemlerine göre karşılaştırılması



Şekil 18. Astım ve kontrol grubunda, GR-α ve GR-β RGE'nin kontrol dönemlerine ait değişim çizelgesi

Glukokortikoid reseptör α ve β RGE'nin I. ve II. kontrol dönemlerinde birbirlerine olan oranları değerlendirildiğinde, astım grubunda GR-β için fark azalırken kontrol grubunda arttığı görüldü (p=0,015) (Tablo 23).

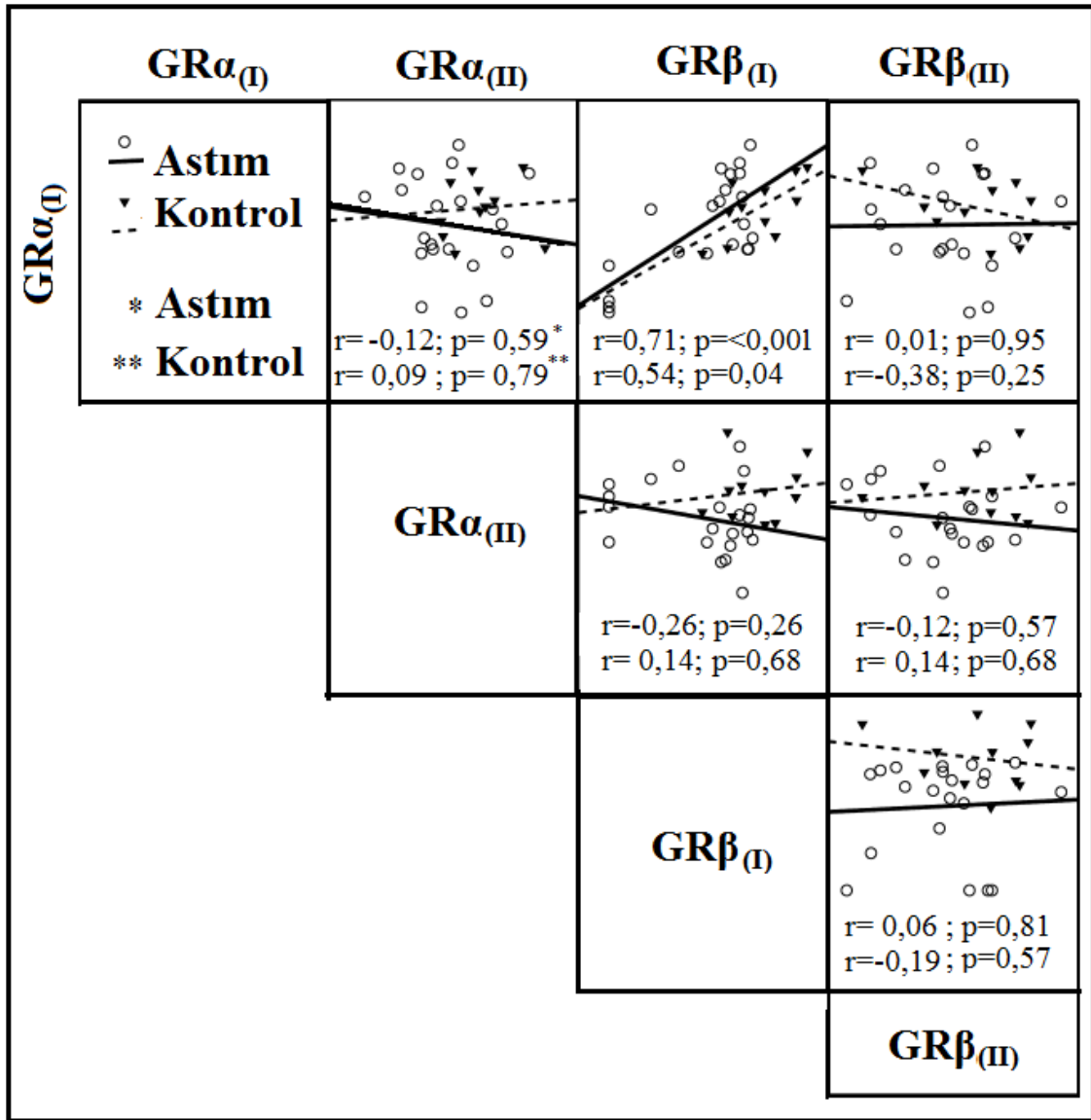
Tablo 23. Astım ve kontrol grubu arasında GR-α ve GR-β RGE'nin karşılaştırılması

	Astım	Kontrol	P
	Ortalama ^δ ±SS Ortanca (Min-Maks)	Ortalama±SS Ortanca (Min-Maks)	
GR α _(I) * / GR α _{(II)**}	2,23±11,57 -3,59 (-22,09 — 16,13)	-2,45±7,05 -3,0 (-19,30 — 6,50)	0,95
GR β _(I) / GR β _(II)	-0,09±3,75 0,37 (-7,04 — 9,23)	3,30±4,04 2,25 (-1,82 — 10,57)	0,015
GR α _(I) / GR β _(I)	11,25±7,91 9,18 (-1,0 — 24,67)	11,62±4,95 12,50 (4,99 — 18,2)	0,82
GR α _(II) / GR β _(II)	12,52±5,76 11,75 (1,37 — 22,21)	15,72±4,40 16,18 (9,56 — 23,41)	0,14

*: I. Kontrol, **: II. Kontrol, δ: GR RGE kat değişimi (fold change, 2^{-ΔΔCt})

I. ve II. kontrol dönemlerindeki GR- α ve GR- β RGE arasındaki ilişkiler şekil 19'da gösterilmiştir.

Astım grubunda astım kontrol düzeyleri dikkate alınarak tam kontrollü 12 (%50) ve kısmi kontrollü 12 (%50) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Gruplar arasında GR- α ve GR- β RGE açısından hem kontrol dönemleri arasında hem de kontrol düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi (Tablo 24).



(I): I. Kontrol, (II) : II. Kontrol

Şekil 19. Astım ve kontrol grubunda GR- α ve GR- β RGE'nin kontrol dönemleri arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi

Tablo 24. Astım kontrol durumunun, kontrol dönemlerinde GR- α ve GR- β RGE'e etkilerinin karşılaştırılması

	Kontrollü		Kısmi kontrol		Gruplar arası p
	Ortalama* \pm SS	p	Ortalama \pm SS	p	
GR-α					
I. Kontrol	19,69 \pm 7,98	0,10	18,68 \pm 10,97	0,72	0,49
II. Kontrol	19,18 \pm 5,45		19,49 \pm 6,32		
GR-β					
I. Kontrol	6,83 \pm 3,00	0,15	5,98 \pm 2,97	0,98	0,98
II. Kontrol	6,49 \pm 1,37		6,95 \pm 1,39		

*: Glukokortikoid reseptör RGE kat değişimi (*fold change*, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

5. TARTIŞMA

Çocukluk yaş grubunda astım ve alerjik hastalıkların sıklığı, özellikle batılı ve gelişmiş ülkelerde giderek artmaktadır. Bu artış hem çevresel hem de bireysel faktörlerle ilişkilidir. Bireysel faktörler içerisinde genetik yatkınlık, atopi, havayolu hiperreaktivitesi, cinsiyet ve ırk, çevresel faktörler arasında da viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, diyet, pasif sigara içiciliği, sosyoekonomik durum ve ailedeki kişi sayısı sayılabilir (176). Çevresel faktörlerin kontrolü ve astıma eşlik eden hastalıkların tedavisi hem bireye daha kaliteli yaşan sunacak hem de ülke ekonomisine katkıda bulunacaktır. Astım ve VitD yetersizliği birçok toplumun ortak sorunudur. D vitamini yetersizliğinin astım atak sıklığında artışa neden olabildiği ve daha fazla ilaca ihtiyaç gösterdiği birçok yeni araştırmayla belirlenmiştir (2,3).

Son zamanlarda VitD eksikliği ile astım arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Araştırmaların birçoğunun şiddetli veya kontrolsüz astım üzerine yoğunlaştığı ve hafif veya kontrollü astım grubu üzerinde pek durulmadığı görülmektedir. Ancak astımlı hastaların büyük çoğunluğunu tam veya kısmi kontrollü hastalar oluşturur. Çalışmamızda özellikle kliniğimizde takipli VitD eksikliği belirlediğimiz GINA kriterlerine göre tam veya kısmi kontrollü astımlı hastalar ile benzer özelliklere sahip sağlıklı çocukları seçtik. Yapılan birçok araştırmada dikkatimizi çeken konu, her ne kadar sonuçları etkileyebilecek faktörler dışlanmaya çalışılsa da çalışma sürelerinin uzun ve sonuçları etkileyebilecek birçok bağımlı değişkeni barındırıyor olmasıdır. Dolayısıyla çalışma süremizi bir ay ile sınırlandırdık. D vitaminin astım şiddetini ve atak sıklığını enfeksiyonu önlediği için mi azalttığı yoksa direk olarak akciğer üzerine etkisinden dolayı mı olduğunu daha iyi belirlemek için, çalışmamızı nispeten solunum yolu enfeksiyon sıklığının daha düşük olduğu haziran ayında planladık. Coğrafi koşullar, güneşe maruz kalma süreleri, yaşanılan ortama ait faktörler, sigara teması, sosyokültürel yapı ve ekonomik durum dikkate alındı. Kontrol ve astım grupları karşılaştırıldığında cinsiyet, doğum şekli, doğum ağırlığı, vücut ağırlıkları, boy, vücut kitle indeksi, sigarayla temas oranları, ısınma şekilleri, evcil hayvan teması, evin güneşe olan cephesi, evde yaşayan kişi sayısı açısından farklılık olmadığını gördük. İki grup arasında sonuçları etkileyebilecek faktörleri (confounding factors) en az düzeyde tutarak VitD'nin direk etkisini belirlemeyi, aynı zamanda VitD'nin GR ile olan etkileşimini tespit etmeyi amaçladık.

D vitamini yarılanma süresi 2-3 hafta civarındadır. Ölçülen 25(OH)D düzeyleri çocukların son 1 ay içindeki durumunu yansıtır (120). Araştırmaların birçoğu sonbaharda başlayıp ilkbahar sonuna kadar süren periyodları kapsadığı için, bu süreçte çalışmayı etkileyebilecek birçok farklı parametreyle karşılaşmak mümkündür (2, 3, 4,5). Ancak araştırmamızın 1 ay içinde tamamlanması, mevsimsel farklılık, çevresel etkenler ve enfeksiyon gibi diğer faktörlerin elenmesiyle sonuçlarımızın güvenilirliğini etkileyecek unsurlar en aza indirilmiştir. Çalışmamız, serum 25(OH)D değişimi ile GR arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik olduğu için düşük doz ve uzun süreli VitD3 tedavisi amacımıza uygun olmayacaktı. D vitamini yetersizliğinde ve rikets tedavisinde sıklıkla tercih edilen Stoss tedavisini (300.000 IU/ tek doz) kısa sürede serum 25(OH)D düzeyini istediğimiz seviyeye yükseltecek olması nedeniyle tercih ettik (177). D vitamini yaralanma ömrüne uygun olarak kontrol dönemini 3-4 hafta aralığında belirledik. Stoss tedavisi uygulanan çocukların tamamında serum 25(OH)D düzeyleri 30 ng/mL üzerine çıktı ve serum 25(OH)D düzey artışı açısından gruplar arasında fark yoktu.

Serum 25(OH)D düzeyi obezite, ilaç kullanımı, kronik hastalıklar, çevre şartları, coğrafi konumdan etkilenebilir. Özellikle sonbahar sonları ve kış ayı boyunca kuzey yarımkürede özellikle 35° enlem üzerinde bulunan ülkelerde yetersiz ultraviyole ve güneş ışığına maruz kalınması nedeniyle vücutta VitD sentezi durma noktasına gelir. Ayrıca yaz aylarına artan yüksek faktörlü güneş koruyucu kremler kullanılması durumu daha da kötüleştirir (178). Çalışmamıza deniz seviyesinde olan, vücut kitle indeksi 10-90 persentil aralığında bulunan çocuklar dahil edildi. Astım grubundan 4(%11) ve kontrol grubunda 4(%16) çocuğun 25(OH)D düzeyleri 30 ng/mL üzerinde olması nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Bölgemize 8-16 yaş aralığına ait VitD yetersizliği veya eksikliğini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamıza dahil olan hastaların toplumumuzdaki VitD durumunu ne kadar yansıttığıyla ilgili gerçekçi bir yorumda bulunamayacağız. Samsun ili coğrafi konum olarak 40° 50' - 41° 51' kuzey enlemleri, 37° 08' ve 34° 25' doğu boylamları arasındadır. Samsun'da 2010 yılı verilerine göre açık gün sayısı 50, bulutlu gün sayısı 237, kapalı gün sayısı 78 ve yağışlı gün sayısı ise 141 gündür (179). Diğer illerle karşılaştırılınca Karadeniz Bölgesinin güneşli gün süresi daha azdır (180). Ankara'da 1-16 yaş aralığındaki çocukların Nisan-Mayıs aylarında bakılan serum 25(OH)D düzeylerinin %8'inde 20

ng/mL altında ve %25,5'inde ise 20 ng/mL altında olduğu bildirilmiştir (181). İzmir bölgesinde adölesan yaş grubunun dahil edildiği bir araştırmada, VitD yetersizliğini kış sonunda %59.4, yaz sonunda %25 oranında ve sosyoekonomik düzeyle ters ilişkili olduğu bildirilmiştir. Manisa'da 20 yaş üstü erişkinlerden oluşan bir araştırmada 25(OH)D düzeylerinin vakaların sadece % 11,3'nde 30 ng/mL üzerindedir. Çalışmamıza dahil edilen çocukların sadece %16'inde serum 25(OH)D düzeyleri normal sınırlardaydı. Çalışmanın serum 25(OH)D için en düşük düzeyde olabileceği ilkbahar sonuna doğru başlaması kısmen yüksek oranda VitD yetersizliğini açıklayabilir. Ancak Kuzey Avrupa ülkelerinde bile VitD yetersizliğini bu oranda yüksek değildir (129, 182). Araştırmamızla belirlenen VitD yetersizliği oranının nedeni toplumumuzu yansıttığı ancak bölgemizde yapılacak geniş katımlı epidemiyolojik bir araştırma ile gösterilebilir. Bir an önce hem erişkin hem de çocukları kapsayan bölgemize ait veriler elde edilmeli ve önemli bir toplum sorunu olan VitD yetersizliğinin sebep olabileceği sorunların önüne geçilmelidir.

Birçok araştırmada hastalık şiddeti ve atak öyküsü ile 25(OH)D arasında ters ilişki olduğu vurgulanmıştır (2-5). Astımlı çocukların sağlıklı çocuklara göre ev içinde geçirdikleri sürenin daha uzun olması beklenir. Özellikle sık atak öyküsü olan ve kontrolsüz astım grubunda bulunan çocukların aileleri, ev dışı temaslardan korumak amacıyla çocuklarını daha uzun süre kapalı ortamda tutacaklardır. D vitamininin sentezi için en önemli kaynak güneş ışımıdır. Dolayısıyla sürekli kapalı ortamda bulunmak güneşle olan teması azaltacağı için yetersiz VitD sentezine neden olacaktır. Tüm bu olasılıkların ışığında "VitD yetersizliği mi astım atağına neden oluyor, yoksa astım mı VitD yetersizliğine neden oluyor?" sorusu dikkatli irdelenmelidir.

Bebeklikte karşılaşılan akciğer sorunları ilerleyen dönemlerde hışıltı sıklığında artışa ve astım gelişimine neden olabilir. D vitamininin solunum yolu üzerine etkileri fetüsten itibaren araştırılmaya başlanmış ve ilerleyen dönemlerde neden olabileceği sorunlar tespit edilmeye çalışılmıştır. Hayvan modellerinde VitD'nin tip II pnömositlerin farklılaşmasını başlattığı, sürfaktan sentezine öncülük ettiği ve sonuç olarak akciğer gelişimini direk etkilediği gösterilmiştir (160). Dolayısıyla sağlıklı bir akciğer için gebelikten itibaren VitD gereklidir. Devereux ve ark. (10) 2000 gebeyi kapsayan bir doğum kohort çalışmasında, gebeliğin 12 haftasından itibaren diyetle aldıkları VitD miktarları anket formu kullanarak belirlenmiş ve doğan çocuklar 5 yaşına

kadar takip edilmiş. Takibi tamamlayan 1212 çocukta maternal VitD alımı arttıkça hışıltı sıklığında azalma olduğu, maternal VitD alımı düşük çocuklarda bronkodilatör cevabın azaldığı görülmüştür. Maternal VitD alımı ile spirometrik sonuçlar ve ekshale nitrik oksit konsantrasyonu arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir (10). Maternal VitD alımının 100-IU/gün artması tekrarlayan hışıltı sıklığını 0.81 kat azaltacaktır (9). Camargo ve ark. kord 25(OH)D düzeyi ile solunum yolu enfeksiyonu ve hışıltı arasında ters bir ilişki bulunduğunu ancak astım gelişimiyle ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir (183). Yenidoğanlarda subklinik VitD eksikliği ile akut alt SYE sıklığı arasında ilişki olduğu gösterilmiş ve özellikle kışın doğacak bebeklerin annelerine VitD destek tedavisi verilmesi önerilmiştir. Beş yaş altı çocukları kapsayan diğer bir araştırmada ise serum 25(OH)D düzeyi ile alt SYE'ye yakalanma arasında anlamlı bir ilişki yokken, serum 25(OH)D düzeyinin düşük olanlar daha çok yoğun bakım ihtiyacı göstermiştir (184). Diğer taraftan Roth ve ark. erken çocukluk döneminde akut bronşiolite bağlı hastaneye yatış riskinin serum 25(OH)D düzeyi ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (185).

Maternal ve yenidoğana ait VitD durumunu kapsayan araştırmalar ışığında düşük 25(OH)D düzeyinin SYE sıklığını ve etkilerini arttırdığından bahsedilebilir. Ancak yaş gurubu yükseldikçe 25(OH)D düzeyi ile SYE ilişkisinin giderek zayıfladığı ve daha çok hastalık şiddetini ilgilendiren sorunların ön plana geldiğini görülüyor. Araştırmamızı planlarken annelerin maternal dönemlerinde beslenme alışkanlıklarını sorgulamayı düşündük. Ancak annelerin maternal dönemlerine ait beslenme alışkanlıklarını net hatırlayamadıkları ve tutarlı bilgi veremedikleri için bundan vazgeçtik. Anne sütü ve mama kullanım süreleri dikkate alındığında, astım grubunda kontrol grubuna göre anne sütü alma süresinin daha kısa, mama kullanım süresinin daha uzun olduğunu gördük. Anne sütünün astıma yönelik koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir (186, 187). Ancak bu koruyucu etkinin neden kaynaklandığı henüz net olarak anlaşılamamıştır. Özellikle RSV ve influenza virüs gibi astımla ilişkisi bilinen virüslerin neden olduğu viral bronşiolit ve pnömoni sıklığında azalmaya neden olması ve probiyotik etkisi nedeniyle barsak florasında patojen mikroorganizmalara karşı bariyer oluşturması, anne sütünün koruyucu etkilerine örnek gösterilebilir (187). D vitamini özellikle defensin ve katelisidin gibi moleküller aracılığıyla viral enfeksiyonlara karşı immün defansa katkıda bulunacaktır (188).

İnfanıl döneme ait beslenme alışkanlıklarının gelecekte çocuklarda astım sıklığını etkileyeceğini bildiren farklı araştırmalar bulunmaktadır. İnfantil dönemde kullanılan VitD'nin ileride astıma mı yol açacağı yoksa astımdan mı koruyacağı halen cevaplanamamıştır. Bazı araştırmacılar, besinlerin VitD ile zenginleştirilmesinin astım prevalansında artışa neden olabileceğini iddia etmişlerdir (189). Sears ve ark. anne sütünün astım ve atopiye karşı koruyucu etkisi olmadığını hatta riski arttırdığını bildirmişlerdir (190). Türk toplumunda emziren annelerin VitD düzeyleri genellikle düşüktür (191). Ülkemizde doğumdan itibaren bebeklere 400 IU VitD profleksisi uygulanmaktadır. Bebeklerde VitD alımı ilk 1. ayda %80-90 dolayında iken 6. aydan sonra %75'e gerilemektedir (192). Astım grubunda anne sütü alım süreleri kontrol grubuna göre yaklaşık 8 ay daha kısaydı. Buna karşın istatistiksel olarak anlamlı olmasa da mama kullanım süresini astım grubunda 4 ay daha uzundu. Türk pazarında bulunan mamalar VitD ile güçlendirilmektedir. Bir taraftan anne sütündeki VitD yetersizliği diğer taraftan VitD ile takviye edilmiş mamalar beraber düşünüldüğünde, astım grubundaki çocukların infanıl dönemde daha fazla VitD aldığı varsayılabilir. Buradan infanıl dönemde VitD alımı artıka daha sık astıma gelişeceği gibi bir sonuç çıkacaktır. Ancak bu düşünce, geçmişe yönelik beslenme alışkanlıklarının ve annelerin VitD düzeylerini belirleme şansı olmadığı için sadece hipotez olarak kalacaktır. Ayrıca literatürde anne sütü, VitD ve astım ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Sonuç olarak bu ilişkiyi araştıran ileriye yönelik doğum kohort çalışmaları planlanmalıdır.

Astım grubunda 25(OH)D I. kontrol dönemi düzeyi ile IgE arasında pozitif doğrusal bir ilişki vardı ($r=0.41$, $p=0.04$). Brehm ve ark. (5) 616 astımlı çocuğun dahil olduğu araştırmalarında 25(OH)D düzeyi ile IgE ve eozinofil düzeyleri arasında negatif doğrusal ilişki olduğunu ve 25(OH)D düzeyinin her 10 ng/mL artışına karşılık serum IgE düzeyinin 25 IU/mL düştüğünü bildirmişlerdir. Ancak bu araştırmada 25(OH)D normal olan ve olmayan tüm çocuklar dahil edildiği için çalışmamızla karşılaştırmak doğru olmayacaktır. Diğer taraftan Hyppönen ve ark. (193) erişkin yaş grubunda 25(OH)D düzeyi ile IgE arasında doğrusal olmayan (U-shaped association) bir ilişki olduğu, 25nmol/L altında ve 135 nmol/L üzerindeki değerlerde IgE değerlerinin arttığını belirlemişlerdir. Matheu ve ark (194) hayvan deneylerinde VitD tedavisi sonrası T-hücrelerin IL-4 ve IL-13 etkisiyle Th2'ye doğru yönlendiği ve IgE yapımının arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda II. kontrol döneminde IgE değişimini ölçüm

tekrarı olmadığı için değerlendiremedik. Kontrol grubunda 25(OH)D ile IgE(log10) arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da negatif lineer bir ilişki belirledik. Yetersiz kontrol sayına bağlı olarak istatistiksel farkın oluşmadığını düşündük (şekil 15). Özellikle sağlıklı bireylerde VitD'nin immün sistem üzerindeki regülatuar etkisi azaldıkça IgE sentezinde artışa neden olabilecektir. Hyppönen ve ark.(193) hem yüksek hem de düşük 25(OH)D düzeylerinde IgE sentez artışını göstermeleri, özellikle normal dışı VitD'nin immün disregülasyona sebep olabileceği düşündürmektedir. Bu immün disregülasyon metabolizmayı Th2 yönünde cevap oluşturmasına ve dolayısıyla alerjik hastalıklara yatkınlığa yol açacaktır. Çalışmamızda astım grubunda VitD ile IgE'nin pozitif yönde, aynı özellikteki kontrol grubunda ise negatif yönde ilişki olması bize, astımlı hastalarda VitD ve IgE'nin birbirleriyle sıkı etkileşimde olduklarını göstermektedir. Daha geniş katımlı benzer özelliklere sahip kontrol grubunun da bulunduğu bir çalışmayla IgE ve VitD etkileşimi daha detaylı incelenmelidir.

Astım kontrolünü değerlendirmek için birkaç anket geliştirilmiştir. "Astım Kontrol Testi" bu anketlerden birisidir. Türkçeye uyarlanmış ve 4-11 yaş aralığında kullanılmak üzere oluşturulan AKT, son bir yıl içinde klinik kullanıma girmiştir (173). Anket formu değerlendirilmesi ile toplam alınan puan 20 ve üzerinde ise kısmi ya da tam kontrol, 12 ve altında ise kötü kontrol olarak yorumlanır (196, 197). Çalışmamıza dahil olan hastalar GINA kriterleri baz alınarak sınıflandırıldı ve hiçbir hasta kontrolsüz astım grubunda değildi. GINA rehberi ve AKT sonuçlarını karşılaştıran bir araştırmada şaşırtıcı olarak sonuçların her zaman birbiriyle uyumlu olmadığı ve uyumsuzluğun yaklaşık %25 civarında olduğu bildirilmiştir (198). Çalışmamızda AKT skoru ile GINA kriterlerine göre kontrollü grupta olup AKT skoruna göre kontrolsüz grupta değerlendirilecek (< 20 puan) 8 (%33,3) hasta vardı. Hiçbir hasta 12'nin altında puan almadı. VitD tedavisi sonrası sadece 3 (%12,5) hastanın AKT puanı 20'nin altındaydı. Yedi hastada AKT skoru 4 veya daha fazla yükseldi. I. ve II. kontrol dönemlerinde karşılaştırıldığında toplam AKT skoru sadece 3 hastada azalırken 18 hastada yükselmesi önemli bir bulgudur. 25(OH)D ile alınan toplam AKT skorları arasında bir ilişki olamamasına rağmen II. ve I. kontrol dönemleri arasındaki 25(OH)D farkıyla AKT skor değişimi arasında negatif yönde lineer bir ilişki vardı (şekil 14). Çalışmamızda astımlı çocukların tamamı tam veya kısmi kontrol grubu astım hastalarıydı ve hiçbirinde GK direnci bulguları mevcut değildi. Buna rağmen VitD tedavisiyle FEV1, FEV1/FVC ve

MEF 25-75 ölçümlerinin anlamlı şekilde düzelme ve AKT skorunda artış belirledik (şekil 14). Diğer taraftan solunum fonksiyon testlerinden II. ve I. kontrol dönemleri arasındaki AKT farkı arttıkça FEV1, FEV1/FVC ve MEF25-75 ait kontrol dönemleri arasındaki farkın arttığı görüldü. D vitamini tedavisinin hem sübjektif olarak AKT skorundaki artışa, hem de objektif olarak SFT değerlerindeki yükselişe neden olduğu açıktır. Bir ay gibi kısa bir sürede AKT skorunun ve SFT değerlerinin anlamlı şekilde düzelmesi ilginçti. Literatürdeki birçok araştırma VitD'nin etkilerini daha çok zor tedavi edilen ağır astım astım grubu üzerinedir. Buradan VitD etkisinin sadece ağır ve GK dirençli astım grubuyla sınırlı olmadığı ve daha hafif formlarda bile anlamlı şekilde düzelmelere neden olabileceği sonucuna vardık.

D vitamini astım gelişimine karşı koruyucu etkisinin yanında astımla ilişkili morbiditeyi de azaltır (6). Brehm ve ark. orta ve hafif şiddetteki 1024 astımlı çocuğu kapsayan araştırmalarında, 4 yıl boyunca VitD yetersizliği olan çocukların astım alevlenmeleri ve acile başvurularının olmayanlara göre anlamlı düzeyde arttığını belirlemişlerdir. Bunun VitD'nin viral enfeksiyonlara karşı koruyucu etkisi ve sekelsiz iyileşmeye katkısı sonucunda oluştuğu savunulmuştur (5). İnhal steroid kullanımının astım atak sıklığını azalttığı bilinmektedir (13). Aynı araştırmada VitD yetersizliği olanların daha az inhale steroid kullanıldığı görülmüştür. Yazarlar, VitD yetersizliği bulunan çocuklarda düşük oranda inhale steroid kullanmanın atak sıklığındaki artışa sebep olabileceğini, bunun yanında düzenli inhale steroid kullananlarda yeterli VitD seviyesinin astım atak sıklığını azaltabileceğini vurgulamışlardır. Majar ve ark. (8), yaş ortalaması 11 ve sadece ev tozu alerji olan 48 astım tanılı çocuğu çift kör rastgele iki gruba ayırarak bir gruba inhale steroid ve plasebo VitD, diğerine ise inhale steroid ve 500 IU VitD3 tedavisi 6 ay boyunca uygulamışlar. Araştırma sonucunda VitD tedavisi alan grupta astım atak sayısının, Astım Tedavisi Değerlendirme Anketi (Asthma, Therapy Assessment Questionnaire) skorunun belirgin azaldığı, FEV1 değerlerinin ise yükseldiği bildirilmiştir. En dikkat çeken bulgu ise düşük 25(OH)D düzeyine sahip çocuklarda astım atak sayısının 8 kat artmasıdır. İlginç olarak 6 ay süresince VitD tedavisi alan çocuklarda başlangıç dönemine göre 25(OH)D düzeyinde değişiklik olmamıştır. Yazarların yorumu ise VitD tedavisiyle doğal immün sistemin antimikrobiyal etkinliğinin artırarak inflamasyon gelişim sürecini engellendiği yönündedir.

Çalışmamızda bir aylık takip esnasında astım grubunda bir, çalışma grubunda iki çocuk üst SYE öyküsü olması nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Astımlı çocukların hiçbirisi bir aylık takip süresince astım atağı geçirmedi. Sadece üç hastada (haftada bir seferden daha az) kısa etkili inhaler betamimetik (terbutalin) kullanma ihtiyacı oldu. Çalışmamızda VitD tedavisinin atak sayısına ne kadar etkisi olduğunu çalışma süresinin kısalığı nedeniyle değerlendiremedik. Tüm çocuklar halen kliniğimizde takip edildiği için ilerleyen aylarda bu konuda daha net bilgiler sunacağız. Bir aylık kısa bir sürede dahi SFT değerlerinin belirgin düzelmesini sadece VitD'nin enfeksiyonlara karşı doğal immüniteyi regüle etmesiyle açıklamak yeterli olmayacaktır.

Solunum yolu epiteli dış ortamdan gelen ve her solunumda sürekli tekrarlanan antijenik uyarıyla karşı karşıyadır. Antijenik uyarıya yanıt, doğal ve kazanılmış immün sistem işbirliğiyle sağlanır. Uygun olmayan veya kontrolsüz immün yanıt doku hasarına yol açacaktır. Alerjenlerin neden olduğu sürekli immün sistem uyarımı aşırı duyarlılıkla birlikte kontrolsüz alerjik akciğer enflamasyonuna neden olabilir (204). Adrenal doku dışında da GK sentezi gerçekleşebilir. Akciğer dokusundaki GK sentezi ile antijenik uyarıya karşı oluşacak aşırı immün yanıtın önüne geçilebilir. Bu konuda Hostettler ve ark. akciğer epitelinde lokal GK sentezinin varlığını araştıran çalışmalarında, fare akciğer dokusunun anti-CD3 antikoru, lipopolisakkaritler ve TNF- α ile uyarılması ile kolesterolden bol miktarda kortikosteron salgılandığını belirlemişlerdir (205).

D vitamini ve GK ilişkisini araştıran çalışmaların büyük çoğunluğu kanser biyolojisi üzerinedir. Kalsitriol (1,25(OH)₂D₃) bazı kanser hücre tiplerinde hücre büyümesini inhibe ederken hücre olgunlaşmasını ve hücre döngü duraklatılmasını (*cell cycle arrest*) destekler. D vitamininin skuamöz hücreli karsinom, meme, kolon ve prostat kanseri üzerinde anti-tümör aktivitesi olduğu gösterilmiştir (199). Bu araştırmalar esnasında VDR ve GK arasında sinerjistik etkileşimin olduğu, deksametazonun VDR protein düzeyini ve kalsitriolün anti-proliferatif etkisini arttırdığı belirlenmiştir (200). Hidalgo ve ark. kısa süre önce yayınlanan araştırmalarında deksametazonun VDR reseptör transkripsiyonunu artırarak kalsitriolün etkisini potansiyalize ettiğini gösterilmişlerdir (201). Kalsitriol, yağ dokusu hücresinde glukokortikoid öncüllerini kortizon ve kortizole dönüştüren 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz tip I enzim aktivitesini 2 kat artırarak GK sentezine pozitif yönde katkıda bulunur (202). Dokuda artan artan GK ise VDR aktivitesini artıracaktır (203).

Literatürde solunum yolu epitelinde GK ve VDR arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızda bir ay gibi kısa süre içinde AKT skorunda artış, SFT değerlerinde düzelme ve ihtiyaç duyulan ilaç miktarında azalma belirledik. Kısa süre içinde oluşan bu değişim için, VitD'nin akciğer üzerindeki düzenleyici ve koruyucu etkisinden kaynaklandığını söylemek yeterli olmayacaktır. 11β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi aktif olmayan dehidrokortikosteronu aktif hale dönüştürür (205). Kalsitriolün yağ dokusunda 11β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzim aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (203). Akciğer dokusunda steroidogenez için gerekli tüm enzimler bulunur. Literatürde solunum yolu epitelinde VitD'nin GK salınımına olan etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Henüz araştırılmamış olsa da kalsitriolün akciğer dokusunda, yağ dokusunda olduğu gibi, GK'nın aktif formlara dönüşmesini sağlayarak lokal etkisini artırabileceği hipotezi öne sürülebilir. Böylece VitD, dolaylı yoldan akciğer dokusundaki lokal GK yoğunluğunu artırarak eksojen steroid ihtiyacını azaltacaktır. Bu konuda yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Banerjee ve ark. havayolu düz kas hücre kültürlerinde VitD ve flutikazonun RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted), IP-10 (interferon-inducible protein 10) ve fractalkine (FKN) gibi kemokinleri nasıl etkilediğini araştırmışlar ve VitD 'ün tek başına solunum yolu düz kas hücrelerinden kemokin salınımını düzenleyebildiği sonucuna varmışlardır (206). Son dönemde yayınlanan bazı araştırmalar sonucunda, akciğer dokusunda VitD'nin neden olduğu anti-inflamatuar etkinin direk mi yoksa GK sentezini artırmasına mı bağlı dolaylı bir etki mi olduğunu tekrar sorgulamamız gerekir (201, 203, 204) . Her ne sebeple olursa olsun, hava yolunun yeniden düzenlenmesinde VitD'nin hem immün sistemi etkileyerek hem de havayolunda kemokin salınımını düzenleyerek etkide bulunabileceği söylenebilir.

Deksametazon ve $1,25(OH)2D3$ varlığında $CD4^+$ Treg yüksek miktarlarda IL-10 salgılayabilirler (16). Xystrakis ve ark. klinik olarak GK'ya dirençli şiddetli astımlı hastaların hücre kültürlerinde deksametazonun yalnız başına $D4^+$ Treg'lerden yeterince IL-10 sentezlemediği ve VitD ilavesiyle bu sorunun üstesinden geldiğini bildirmişlerdir. Sonuçta GK dirençli ağır astımlı hastaların tedavilerine VitD ilavesiyle tedavi başarısını arttırabileceğini ifade etmişlerdir (16).

Glukokortikoidler antiinflamatuvar tedavinin en önde gelen ilaçlarındandır. Glukokortikoidlerin inhaler formlarının tedavide kullanıma girmesiyle astım morbiditesinde önemli gelişmeler kaydedildi. Glukokortikoidler her ne kadar etkin bir antiinflamatuvar tedavi olmasına karşın uzun süre ve yüksek dozlarda kullanıldığında önemli yan etkilere sebep olabilirler. Amaç, tüm bu yan etkilerden sakınmak ve daha az ilaç dozu ile daha iyi sonuç elde etmektir. Glukokortikoidler hücrede etkilerini GR aracılığıyla gerçekleştirir. Bazı astımlı hastaların GK'lara yetersiz cevap vermesi yüksek dozda ilaç ihtiyacı doğurur. Bazı araştırmacılar GK direncine (GD) GR üzerinden yanıt aramışlar (207- 212).

Araştırmaların büyük çoğunluğu GR ile ağır astımlı hastaların GD üzerine yoğunlaşmıştır. İn vitro çalışmalarda GR-β ilişkili olarak GK gen ekspresyonunun azaldığı ve GR klasik etkilerini bozarak GK duyarsızlığına neden olduğu gösterilmiştir (213). Chirtodouloupoulos ve ark. postmortem alınan solunum yolu epitelinde fatal astımda kontrol grubuna göre özellikle T-hücreler üzerindeki GR-β düzeyinin anlamlı düzeyde arttığını belirlemişlerdir. Küçük ve büyük havayollarında GR-β ekspresyon miktarının farklı olmadığı görülmüştür (209). Steroid duyarsız astımlılarla artmış GR-β ekspresyon düzeyinin astım mortalitesi ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Pujols ve ark. steroid tedavisi sonrası akciğer dokusundaki fibrotik doku patoloji skoru ile GR-α arasında negatif ilişki, FVC ile GR-α arasında pozitif ilişki belirlemişlerdir. İntertisyel akciğer hastalıklarında steroid cevabının GR-α ekspresyonuna göre değişebileceği sonucuna varmışlardır (211). Goleva ve ark. ise benzer şekilde GK duyarsız astımlı hastalarda bronkoalveolar lavaj sıvısındaki makrofajlarda GR-α nükleer translokasyonunun azaldığı ve GR-β ekspresyonunun arttığı bulmuşlardır. Çalışma grubumuzda steroid duyarsız hasta yoktu. Ancak kısmi veya tam kontrollü hastaların GR-α ve GR-β RGE aralarında farklılık olmadığı görüldü. Aynı zamanda VitD tedavisiyle farklılık oluşmadı.

Çalışmamızda periferik mononükleer hücrelerdeki (PMNH) GR ekspresyon düzeylerini belirdi. Dolaşımda bulunan PMNH GR düzeyini farklı parametreler etkileyebilir. Dolayısıyla araştırmamıza kontrol grubu ekleyerek gücünü artırmayı düşündük. Kısa zaman aralığında yapılan ölçümler ile etki edecek faktörler sınırlandırdı. Astım grubunda ölçülen en düşük ve en yüksek GR-α GRE değerleri için 2^{33} kat ve GR-β RGE için 2^{12} kat fark olduğu görüldü. Literatürde farklı teknik ve ölçüm metodları kullanıldığı için çalışma değerlerimizi diğerleriyle

karşılaştıramayacağız. GR- α 'nın hem kontrol grubunda hem de astım grubunda GR- β göre yaklaşık 1000 (2^{10}) kat daha fazla bulunuyordu. Bu farkı Torrego ve ark. 600 kat, Pujol ve ark. ise 1000 kat olduğunu bildirmişlerdir (208, 211). Çalışmamızda VitD tedavisi önceki ve sonrası GR- α ve GR- β RGE değişimi açısından astım grubunda farklılık yoktu (Tablo 22).

Çalışmamızda en dikkat çeken bulgu GR- β RGE'deki farklılıklardır. D vitamini tedavisi sonrası astım grubunda hafif oranda GR- β RGE'de artış olmasına karşın kontrol grubunda belirgin olarak azaldı. VitD tedavisi sonrası GR- α RGE'leri kontrol grubunda daha fazla olmak üzere her iki grupta arttı. Glukokortikoid tedavisi sonrası GR- α ekspresyonunun hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel mekanizmalar aracılığıyla down-regüle olabileceği belirtilmiştir (r52). Uzamış GK alımına bağlı gelişebilecek yan etkilerden vücudu korumak için gelişen negatif feedback mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (105). Buna bağlı olarak çalışmamızda astım grubunda GR- α RGE'deki artışın kontrol grubuna göre daha düşük olması beklenebilir. Ayrıca VitD tedavisi sonrası GR- α RGE'deki artışın kontrol grubu kadar belirgin olmaması, bu down-regülasyon mekanizması ile açıklanabilir. Ancak hastalarımızın hiçbiri sistemik steroid kullanmıyorlardı. Hastalarımızın tamamı günlük 400 mcgr budesonid veya 200 mcgr flutikazon propiyonat inhaler olarak alıyorlardı. Bu dozlarda sistemik dolaşıma katılan GK'nın biyoyaralanımı oldukça düşüktür (214). Sistemik dolaşıma bu kadar az oranda karışan GK'nın PMNH üzerinde GR- α RGE üzerine etkide bulunup bulunamayacağını araştıran bir çalışmaya literatürde karşılaşmadık. Sonuçta, astım grubunda uzun dönem GK alımının GR- α 'nın downregülasyon uğramasına neden olacağını ve daha az eksprese edilmesine sebep olacağını düşündük. Kontrol grubunda ise GR- α 'nın VitD etkisiyle artan steroidogenez sonucunda daha çok eksprese edildiği ve uzun GK kullanım etkisine bağlı reseptör down-regülasyonu oluşmadığı için astım grubuna göre GR- α RGE'de anlamlı artış olduğu sonucuna vardık.

Birçok araştırmada GR- β , GD ile ilişkilendirilmiş ve GR- α 'ya bağlı transaktivasyon ve transrepressyon mekanizmaları üzerine negatif etkide bulunduğu bahsedilmiştir (207, 215). Çalışmalarda daha çok GR- α ve GR- β 'nin neden oldukları protein sentezleri üzerinde durulmuştur. Birbirlerini nasıl etkiledikleri net değildir. Negatif feedback mekanizmaları dikkate alındığında GR- α düzeyi arttıkça bunu antogonize edebilmek için GR- β düzeyinde de artış olması beklenir. Çalışmamızda

astım grubunda düşük miktarda da olsa artış, kontrol grubunda ise tam tersi, GR- β düzeyinde azalma belirledik. Astımlı hastalarda VitD düzeyi ile önemli bir proinflamatuvar sitokin olan TNF- α arasında ters ilişki vardır (3). D vitamini MAPK aktivitesi artırarak GK'nın daha etkin olmasını sağlar (2,3). İnvitro çalışmalarda ortama VitD ilavesiyle deksametazonun aktif dozunun 10 kata kadar azaldığı görülmüştür. Ayrıca VitD IL-10 gibi regülatuar fonksiyonu olan sitokinlerin de salınımını artırmaktadır (2). Steroid direnci olan hücre modellerinde VitD'nin doza bağlı olarak deksametazonun etkinliğini ve immüsupresif fonksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (2). Çalışmamızda astım grubunda GR- β 'nin VitD tedavisi ile süprese olmazken, kontrol grubunda anlamlı düzeyde süprese olması bize, astımlı hastalarda sağlıklı bireylere göre GR- β 'nin GK aktivitesindeki süpresif etkisinin göre daha baskın olduğu gösterir. Dolayısıyla proinflamatuvar sitokin salımındaki kontrolsüzlük ve regülatuar hücre fonksiyonlarındaki yetersizlik doku hasarının oluşmasına, bronşiyal aşırı duyarlılık ve astıma neden olabilen sitokin bağımlı birçok patolojik değişikliğe kaynak olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Astım grubunda ailede alerjik hastalık bulunma öyküsü kontrol grubuna göre yüksekti.
2. Astım grubunda anne sütü alma süresi kontrol grubuna göre ortalama 8 ay daha kısaydı.
3. Astım grubunda kan eozinofil sayısı ve IgE düzeyleri kontrol grubuna göre yüksekti.
4. D vitamini tedavisi astımlı çocuklarda, AKT toplam skorunu anlamlı düzeyde artırdı.
5. Astımlı çocuklarda D vitamini tedavisi ile SFT parametreleri belirgin düzeldi. Astımlı hastalarda sağlıklı bireylere göre SFT parametrelerindeki en belirgin düzelme FEV1/FVC değerindeydi.
6. I. ve II. kontrollerde 25(OH)D düzeyi farklı ile AKT skorları arasında negatif, FEV1, FEV1/FVC ve MEF₂₅₋₇₅ değerler farkları arasında pozitif yönde ilişki vardı.
7. 25(OH)D düzeyi ile IgE_(log10) değerleri arasında astım grubunda pozitif yönde, kontrol grubunda ise negatif yönde ilişki belirlendi.
8. Glukokortikoid reseptör α RGE, GR- β RGE'den 1000 kat daha fazlaydı.
9. Astımlı hastalarda VitD tedavisi ile GR- α RGE'deki artış kontrol grubuna göre daha azdı.
10. Astımlı hastalarda VitD tedavisinin GR- α ve GR- β RGE anlamlı düzeyde etkilemediği görüldü.
11. Astımlı hastalarda VitD tedavisi ile GR- β RGE'de önemli bir değişiklik olmazken kontrol grubunda anlamlı miktarda azdı.
12. Bölgemizde, çocuklarda VitD yetersizliği sıklığının belirlenmesi için çalışmalar planlanmalıdır
13. Astımlı çocuklarda hastalık şiddetinden bağımsız olarak VitD yetersizliğinin araştırılması ve VitD yetersizliği belirlenenler tedavi edilmelidir.
14. Astım patogeneğinde günümüzde glukokortikoid fonksiyonlarını inhibe eden mediatörler ve reseptörlere ait yeni çalışmalar planlanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Nov;120(5):1031-5.
2. 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 May;125(5):995-1000.
3. Sutherland ER, Goleva E, Jackson LP, Stevens AD, Leung DY. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Apr 1;181(7):699-704.
4. Brehm JM, Acosta-Pérez E, Klei L, Roeder K, Barmada M, Boutaoui N, ER AL. Vitamin D Insufficiency and Severe Asthma Exacerbations in Puerto Rican Children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 May 31(Baskıda)
5. Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AL, Hollis BW, Strunk RC, Zeiger RS, Weiss ST, Litonjua AA; Childhood Asthma Management Program Research Group. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Jul;126(1):52-8.
6. Paul G, Brehm JM, Alcorn JF, Holguín F, Aujla SJ, Celedón JC. Vitamin D and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Jan 15;185(2):124-32.
7. Mansbach JM, Ginde AA, Camargo CA Jr. Serum 25-hydroxyvitamin D levels among US children aged 1 to 11 years: do children need more vitamin D? *Pediatrics.* 2009 Nov;124(5):1404-10.
8. Majak P, Olszowiec-Chlebna M, Smejda K, Stelmach I. Vitamin D supplementation in children may prevent asthma exacerbation triggered by acute respiratory infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 May;127(5):1294-6.
9. Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, Kleinman K, Gillman MW. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr.* 2007 Mar;85(3):788-95.
10. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Helms PJ, Seaton A, Weiss ST. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr.* 2007 Mar;85(3):853-9.

11. Pichler J, Gerstmayr M, Szépfalusi Z, Urbanek R, Peterlik M, Willheim M. 1 alpha,25(OH)2D3 inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatr Res.* 2002 Jul;52(1):12-8.
12. Brun P, Dupret JM, Perret C, Thomasset M, Mathieu H. Vitamin D-dependent calcium-binding proteins (CaBPs) in human fetuses: comparative distribution of 9K CaBP mRNA and 28K CaBP during development. *Pediatr Res.* 1987 Apr;21(4):362-7.
13. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group. *N Engl J Med.* 2000 Oct 12;343(15):1054-63.
14. Adorini L. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Apr;987:258-61.
15. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al.. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002 Mar 4;195(5):603-16.
16. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.* 2006 Jan;116(1):146-55.
17. Castro-Rodriguez JA. The Asthma Predictive Index: early diagnosis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011 Jun;11(3):157-61.
18. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R; Global Initiative for Asthma (GINA)Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004 May;59(5):469-78.
19. Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW, et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J.* 1995 Mar;8(3):483-91.
20. Guner SN, Gokturk B, Kilic M, Ozkiraz S. The prevalences of allergic diseases in rural and urban areas are similar. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2011 May-Jun;39(3):140-4.
21. Gern JE, Lemanske RF Jr, Busse WW. Early life origins of asthma. *J Clin Invest.* 1999 Oct;104(7):837-43.

22. Holgate ST, Lemanske RF, O'Byrne PM, Kakumanu S, Busse WW. Asthma Pathogenesis In: Adkinson NF Jr, Bochner BS (eds). Middleton's Allergy: Principles and Practice. 7th ed. St Louis: Mosby, 2009:893-920
23. Guilbert TW, Singh AM, Danov Z, Evans MD, Jackson DJ, Burton R, et al. Decreased lung function after preschool wheezing rhinovirus illnesses in children at risk to develop asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128(3):532-8.e1-10.
24. Szeftler SJ, Dakhama A. New insights into asthma pathogenesis and treatment. *Curr Opin Immunol*. 2011 Dec;23(6):801-7.
25. Loss G, Apprich S, Waser M, Kneifel W, Genuneit J, Büchele G, et al. GABRIELA study group. The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: the GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct;128(4):766-773.e4.
26. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanović R The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jan;161(1):9-16.
27. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, et al. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17 and IL-4. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jan;125(1):222-30.e1-4.
28. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011 Aug;66(8):989-98
29. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128(3):451-62; quiz 463-4.
30. Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics*. 2002 Feb;109(2 Suppl):362-7.
31. Türктаş İ. Çocukluk astımında tanı. In: Dağlı E, Karakoç F (eds). Çocuk Göğüs Hastalıkları. 1.Baskı. İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti; 2007:77-90
32. Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Oct;162(4 Pt 1):1403-6.
33. Caudri D, Wijga A, A Schipper CM, Hoekstra M, Postma DS, Koppelman H, et al. Predicting the long-term prognosis of children with symptoms suggestive of asthma at preschool age. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Nov;124(5):903-10.e1-7.

34. Piippo-Savolainen E, Korppi M. Long-term outcomes of early childhood wheezing. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009 Jun;9(3):190-6.
35. Sandrini A, Taylor DR, Thomas PS, Yates DH. Fractional exhaled nitric oxide in asthma: an update. *Respirology*. 2010 Jan;15(1):57-70.
36. Dallinga JW, Robroeks CM, van Berkel JJ, Moonen EJ, Godschalk RW, Jöbsis Q, et al. Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children. *Clin Exp Allergy*. 2010 Jan;40(1):68-76.
37. van de Kant KD, Klaassen EM, Jöbsis Q, Nijhuis AJ, van Schayck OC, Dompeling E. Early diagnosis of asthma in young children by using non-invasive biomarkers of airway inflammation and early lung function measurements: study protocol of a case-control study. *BMC Public Health*. 2009 Jun 29;9:210.
38. Zeiger RS, Schatz M, Zhang F, Crawford WW, Kaplan MS, Roth RM, Chen W. Elevated exhaled nitric oxide is a clinical indicator of future uncontrolled asthma in asthmatic patients on inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Aug;128(2):412-4
39. Busse WW, Morgan WJ, Gergen PJ, Mitchell HE, Gern JE, Liu AH, et al. Randomized trial of omalizumab (anti-IgE) for asthma in inner-city children. *N Engl J Med*. 2011 Mar 17;364(11):1005-15.
40. Rabinovitch N, Graber NJ, Chinchilli VM, Sorkness CA, Zeiger RS, Strunk RC, et al. Childhood Asthma Research and Education Network of the National Heart, Lung, and Blood Institute. Urinary leukotriene E4/exhaled nitric oxide ratio and montelukast response in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Sep;126(3):545-51.e1-4.
41. Gielen V, Johnston SL, Edwards MR. Azithromycin induces anti-viral responses in bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*. 2010 Sep;36(3):646-54
42. Sutherland ER, King TS, Icitovic N, Ameredes BT, Bleecker E, Boushey HA, et al. National Heart, Lung and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network. A trial of clarithromycin for the treatment of suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Oct;126(4):747-53.
43. Clark JK, Schrader WT, O'Malley BW. Mechanism of steroid hormones. In: Wilson JD, Foster DW, editors. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders Co.;1992.p.35-90.
44. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP, Bornstein SR. Gene profiling reveals unknown

- enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J*. 2002 Jan;16(1):61-71.
45. Stewarts PM, Krone NP. The Adrenal Cortex. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM. eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 12. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011:479-544
 46. Else T, Hammer GD. Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Dec;16(10):458-68
 47. Jaffe RB, Mesiano S, Smith R. The regulation and role of fetal adrenal development in human pregnancy. *Endocr Res*. 1998;24:919-926.
 48. Faust JR, Goldstein JL, Brown MS. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *J Biol Chem*. 1977;252:4861-4871.
 49. White PC, New MI, Dupont B. Cloning and expression of cDNA encoding a bovine adrenal cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Apr;81(7):1986-90.
 50. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995 May 18;332(20):1351-62.
 51. Schleimer RP. Pharmacology of Glucocorticoids in Allergic Disease. In: Adkinson NF Jr, Bochner BS (eds). *Middleton's Allergy: Principles and Practice*. 7th ed. St Louis: Mosby, 2009:1550-1573
 52. Ray DW, Ren SG, Melmed S. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97(8):1852-9.
 53. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*. 1988 Oct 28;242(4878):583-5.
 54. Schleimer RP. Potential regulation of inflammation in the lung by local Metabolism of hydrocortisone. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991 Feb;4(2):166-73.
 55. Bonsmann U, Bachert C, Delank KW, Rohdewald P. Presence of fluticasone propionate on human nasal mucosal surface and in human nasal tissue over a period of 24 h after intranasal application. *Allergy*. 2001 Jun;56(6):532-5.
 56. Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J, Poellinger L, Okret S, Wikström AC, Brönnegård M, Gillner M, Dong Y, Fuxe K, Cintra A. Biochemistry, molecular

- biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocr Rev.* 1987 May;8(2):185-234.
57. Strehl C, Spies CM, Buttgerit F. Pharmacodynamics of glucocorticoids. *Clin Exp Rheumatol.* 2011 Sep-Oct;29(5 Suppl 68):S13-8.
 58. Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science.* 2009 Apr 17;324(5925):407-10.
 59. John S, Sabo PJ, Johnson TA, Sung MH, Biddie SC, Lightman SL, et al. Interaction of the glucocorticoid receptor with the chromatin landscape. *Mol Cell.* 2008 Mar 14;29(5):611-24.
 60. De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 2009 Mar;23(3):281-91.
 61. Baschant U, Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 May 31;120(2-3):69-75
 62. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003 Feb;228(2):111-33.
 63. Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol Cell Biol.* 2003 Mar;23(6):1922-34.
 64. Löwenberg M, Stahn C, Hommes DW, Buttgerit F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids.* 2008 Oct;73(9-10):1025-9.
 65. Schüle R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell.* 1990 Sep 21;62(6):1217-26.
 66. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev.* 1999 Aug;20(4):435-59.
 67. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 1997;336:1066-1071

68. Miner JN, Yamamoto KR. The basic region of AP-1 specifies glucocorticoid receptor activity at a composite response element, *Genes Dev.* 6 (1992) 2491.
69. Adcock MI, Caramori G, Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids, *Immunol. Cell Biol.* 2001;79:376.
70. Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann. Intern. Med.*, 2003;139, 359–370.
71. Demirtaş Ş, Tatlıcıoğlu T. Kronik akciğer hastalığında steroid direnci(histon asetilasyon ve histon deasetilasyon). *Solunum* 2007; 9(2):117-122
72. Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem.* 1993 Jan 5;268(1):305-14.
73. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J.* 2005 Mar;25(3):552-63.
74. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20;353(16):1711-23.
75. Pujols L, Mullol J, Torrego A, Picado C. Glucocorticoid receptors in human airways. *Allergy.* 2004 Oct;59(10):1042-52.
76. Pedersen KB, Vedeckis WV. Quantification and glucocorticoid regulation of glucocorticoid receptor transcripts in two human leukemic cell lines. *Biochemistry.* 2003 Sep 23;42(37):10978-90.
77. Whorwood CB, Donovan SJ, Wood PJ, Phillips DI. Regulation of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms and type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance? *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 May;86(5):2296-308.
78. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985 Dec 19-1986 Jan ;318(6047):635-41.
79. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem.* 1996 Apr 19;271(16):9550-9.

80. Hecht K, Carlstedt-Duke J, Stierna P, Gustafsson J, Brönnegård M, Wikström AC. Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17;272(42):26659-64.
81. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27857-66
82. Gougat C, Jaffuel D, Gagliardo R, Henriquet C, Bousquet J, Demoly P, Mathieu M. Overexpression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms inhibits AP-1 and NF-kappaB activities hormone independently. *J Mol Med (Berl).* 2002 May;80(5):309-18.
83. Hägg PM, Hurskainen T, Palatsi R, Ilves M, Oikarinen A. Increased expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with severe atopic dermatitis unresponsive to topical corticosteroid. *Br J Dermatol.* 2010 Feb 1;162(2):318-24.
84. Ishida A, Ohta N, Koike S, Aoyagi M, Yamakawa M. Overexpression of glucocorticoid receptor-beta in severe allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 2010 Oct;37(5):584-8.
85. Goecke A, Guerrero J. Glucocorticoid receptor beta in acute and chronic inflammatory conditions: clinical implications. *Immunobiology.* 2006;211(1-2):85-96.
86. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003 Apr 7;348(16): 1546-54.
87. Katzung BG. Pharmacokinetics. In: Katzung BG (ed) *Basic and clinical pharmacology*, 10th edition. Mc Graw Hill Education; 2007.
88. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci.* 1985 May;5(5):1222-7.
89. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res.* 2006;34(2):97-115.
90. Da Silva CA, Reber L, Frossard N. Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundam Clin Pharmacol.* 2006 Feb;20(1):21-39.

91. Ercan F, Çetinel Ş. Mast hücrelerinin enflamasyondaki yeri: İnsan ve deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmaların değerlendirilmesi Marmara Medical Journal 2008;21(2);179-186
92. Seymour ML, Rak S, Aberg D, Riise GC, Penrose JF, Kanaoka Y, Austen KF, Holgate ST, Sampson AP. Leukotriene and prostanoid pathway enzymes in bronchial biopsies of seasonal allergic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Dec 1;164(11):2051-6.
93. Calhoun WJ, Thomas S, Saavedra MC. The Biology of Monocytes and Macrophages In: Adkinson NF Jr, Bochner BS (eds). *Middleton's Allergy: Principles and Practice.* 7th ed. St Louis: Mosby, 2009:355-72
94. Kraft M, Hamid Q, Chrousos GP, Martin RJ, Leung DY. Decreased steroid responsiveness at night in nocturnal asthma. Is the macrophage responsible? *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Apr;163(5):1219-25.
95. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jul 15;174(2):134-41.
96. Ökten A, Kalyoncu M. Glukokortikoidlerin hücresel etki mekanizmaları ve glukokortikoid rezistansı. *T Klin J Pediatr* 2003;12:132-137
97. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Mar;117(3):522-43. A
98. Huizenga NA, de Lange P, Koper JW, de Herder WW, Abs R, Kasteren JH, de Jong FH, Lamberts SW. Five patients with biochemical and/or clinical generalized glucocorticoid resistance without alterations in the glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 May;85(5):2076-81.
99. Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jan;111(1):3-22;
100. Yamada K, Elliott WM, Brattsand R, Valeur A, Hogg JC, Hayashi S. Molecular mechanisms of decreased steroid responsiveness induced by latent adenoviral infection in allergic lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Jan;109(1):35-42.
101. Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA. Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol Cell Biol.* 2007 Mar;27(6):2266-82.

102. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Sep 15;5(7):772-7.
103. Stellato C. Glucocorticoid actions on airway epithelial responses in immunity: functional outcomes and molecular targets. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Dec;120(6):1247-63.
104. Yıldırım A, Düzgün A, Sancak R. Glucocorticoids: As a clinician we use much, we know less. *J Exp Clin Med* 2009;26:102-106.
105. Pujols L, Mullol j, Picado C. Glucocorticoid Receptor in human respiratory epithelial cells. *Neuroimmunomodulation* 2009;16:290–299
106. de Lange P, Koper JW, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW. Natural variants of the beta isoform of the human glucocorticoid receptor do not alter sensitivity to glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 Jul 20;153(1-2):163-8.
107. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Apr;109(4):649-57.
108. Alangari AA. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med.* 2010 Jul;5(3):133-9.
109. Lange NE, Litonjua A, Hawrylowicz CM, Weiss S. Vitamin D, the immune system and asthma. *Expert Rev Clin Immunol.* 2009 Nov;5(6):693-702.
110. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Vitamin D, respiratory infections, and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009 Jan;9(1):81-7.
111. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8-28.
112. Saner G. Beslenme gereksinimleri. In *Pediyatri.* Neyzi O, Ertuğrul T. eds. 4.Baskı. İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevi, 2010: 195-210
113. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69(5): 842-856
114. Adams JS, Hollis BW. Vitamin D: Synthesis, metabolism and clinical measurement. In: Coe FL, Favus MJ. (eds) *Disorders of bone and mineral metabolism*, 2th edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2002:157-174

115. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116: 2062-2072
116. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med*. 2011 Jan 20;364(3):248-54..
117. Berberoğlu M. Paratiroid gland, kalsiyum, fosfor ve vitamin D metabolizması ve hastalıkları. Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtoğlu S.(ed) *Pediatric Endocrinoloji Kitabı* Ankara: *Pediatric Endocrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları* 1, 2003: 507-574.
118. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289: 8-28.
119. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 664-73
120. Holick MF. Vitamin D: Extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39: 381-400
120. Prentice A. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutr Rev*. 2008 Oct;66(10 Suppl 2):S153-64.
121. Bouillon R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism and action to clinical applications. In: *Endocrinology*, Jameson JL, De Groot LJ (Eds), Saunders Elsevier, Philadelphia 2010. Vol 1, p.1089.
122. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008 Oct;29(6):726-76. Epub 2008 Aug 11.
123. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26: 662-87
124. Liu PT, Stenger S, Li H. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; 311: 1770-1773
125. Zittermann A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 39-48.
126. Lange NE, Litonjua A, Hawrylowicz CM, Weiss S. Vitamin D, the immune system and asthma. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009 Nov;5(6):693-702.

127. Papapoulos SE, Clemens TL, Fraher LJ, Lewin IG, Sandler LM, O'Riordan JL. 1,25-dihydroxycholecalciferol in the pathogenesis of the hypercalcaemia of sarcoidosis. *Lancet*. 1979 Mar 24;1(8117):627-30.
128. Adams JS, Gacad MA. Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J ExpMed*. 1985 Apr 1;161(4):755-65.
129. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010 Jun;39(2):365-79,
130. Adorini L, Penna G, Giarratana N, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Uskokovic M. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):437-41.
131. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3-binding macromolecules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production. *J Immunol*. 1986 Apr 15;136(8): 2734-40.
132. Hewison M. Vitamin D and the immune system. *J Endocrinol*. 1992Feb;132(2): 173-5.
133. Schwalfenberg GK. A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Jan;55(1):96-108.
134. Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Investig*. 2004 Jul;11(5):263-71.
135. Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, Gombart AF, Borregaard N, Modlin RL, Hewison M. Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol*. 2009 Apr 1;182(7):4289-95
136. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*. 2004 Sep 1;173(5):2909-12
137. Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, Robles JA, Stenger S, Adams JS, Modlin RL. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol*. 2008 Nov 15;181(10):7115-20.
138. Prentice A. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutr Rev*. 2008 Oct;66(10 Suppl 2):S153-64

139. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Büchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zügel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):803-11.
140. Brennan A, Katz DR, Nunn JD, Barker S, Hewison M, Fraher LJ, O'Riordan JL. Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology.* 1987 Aug;61(4):457-61.
141. Dam TN, Møller B, Hindkjaer J, Kragballe K. The vitamin D3 analog calcipotriol suppresses the number and antigen-presenting function of Langerhans cells in normal human skin. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1996 Apr;1(1):72-7.
142. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Feb;4(2):80-90.
143. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smioldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):1945-53.
144. 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 Mar 1;164(5):2405-11.
145. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, McDonald J, Sattar Z, Cousins DJ, Corrigan CJ, Hickman E, Brown Z, Hawrylowicz CM. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J Clin Invest.* 2009 Feb;119(2):387-98.
146. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1730-1737
147. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jan;94(1):26-34.
148. O'Kelly J, Hisatake J, Hisatake Y, Bishop J, Norman A, Koeffler HP. Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(8):1091-9
149. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008 Jun;38(6):872-97.

150. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):4974-80.
151. Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1181-9.
152. Topilski I, Flaishon L, Naveh Y, Harmelin A, Levo Y, Shachar I. The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing. *Eur J Immunol.* 2004 Apr;34(4):1068-76
153. Willheim M, Thien R, Schratlbauer K, Bajna E, Holub M, Gruber R, et al. Regulatory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3739-44.
154. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):271-83.
155. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Jan;324(1):23-33.
156. Peric M, Koglin S, Kim SM, Morizane S, Besch R, Prinz JC, Ruzicka T, Gallo L, Schaubert J. IL-17 enhances vitamin D₃-induced expression of cathelicidin antimicrobial peptide in human keratinocytes. *J Immunol.* 2008 Dec 15;181(12):8504-12
157. Taher YA, van Esch BC, Hofman GA, Henricks PA, van Oosterhout AJ. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF- β . *J Immunol.* 2008 Apr 15;180(8):5211-21.
158. Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Effects of 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cytokine production by human decidual cells. *Biol Reprod.* 2006 Dec;75(6):816-22.
159. Litonjua AA. Childhood asthma may be a consequence of vitamin D deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009 Jun;9(3):202-7.

160. Nguyen M, Trubert CL, Rizk-Rabin M, Rehan VK, Besançon F, Cayre YE, Garabédian M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and fetal lung maturation: immunogold detection of VDR expression in pneumocytes type II cells and effect on fructose 1,6 bisphosphatase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 May;89-90(1-5):93-7.
161. Hyppönen E, Sovio U, Wjst M, Patel S, Pekkanen J, Hartikainen AL, Järvelinb MR. Infant vitamin d supplementation and allergic conditions in adulthood: northern Finland birth cohort 1966. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1037:84-95.
162. Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, Javaid MK, Jiang B, Martyn CN, Godfrey KM, Cooper C; Princess Anne Hospital Study Group. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J Clin Nutr.* 2008 Jan;62(1):68-77.
163. Wittke A, Weaver V, Mahon BD, August A, Cantorna MT. Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3432-6.
164. Bossé Y, Maghni K, Hudson TJ. 1alpha,25-dihydroxy-vitamin D₃ stimulation of bronchial smooth muscle cells induces autocrine, contractility, and remodeling processes. *Physiol Genomics.* 2007 Apr 24;29(2):161-8.
165. Holt PG, Strickland DH, Sly PD. Virus infection and allergy in the development of asthma: what is the connection? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012 Apr;12(2):151-7.
166. Karatekin G, Kaya A, Salihoğlu O, Balci H, Nuhuğlu A. Association of subclinical vitamin D deficiency in newborns with acute lower respiratory infection and their mothers. *Eur J Clin Nutr.* 2009 Apr;63(4):473-7.
167. Hatun Ş, Ozkan B, Bereket A. Vitamin D deficiency and prevention: Turkish experience. *Acta Paediatr.* 2011 Sep;100(9):1195-9.
168. Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):7090-9.
169. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 May;161(5):1501-7
170. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, et al Printz. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Oct 1;178(7):667-72.

171. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med.* 2009 Feb 23;169(4):384-90.
172. van Weel C, Bateman ED, Bousquet J, Reid J, Grouse L, Schermer T, Valovirta E, Zhong N. Asthma management pocket reference 2008. *Allergy.* 2008 Aug;63(8):997-1004.
173. Sekerel BE, Soyer OU, Keskin O, Uzuner N, Yazicioglu M, Kılıç M, et al. The reliability and validity of Turkish version of Childhood Asthma Control Test. *Qual Life Res.* 2011 Jul 27.
174. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 16;259(3):523-6.
175. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005 Jul;39(1):75-85.
176. Xuan W, Marks GB, Toelle BG, Belousova E, Peat JK, Berry G, Woolcock AJ. Risk factors for onset and remission of atopy, wheeze, and airway hyperresponsiveness. *Thorax.* 2002 Feb;57(2):104-9.
177. Hatun Ş, Ozkan B, Bereket A. Vitamin D deficiency and prevention: Turkish experience. *Acta Paediatr.* 2011 Sep;100(9):1195-9.
178. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
179. <http://www.samsun.gov.tr/samsun-sehri.asp?ContentId=21>
180. <http://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=SAMSUN>
181. 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 Dec;53(6):968-73.
182. Absoud M, Cummins C, Lim MJ, Wassmer E, Shaw N. Prevalence and predictors of vitamin D insufficiency in children: a Great Britain population based study. *PLoS One.* 2011;6(7):e22179.
183. Camargo CA Jr, Ingham T, Wickens K, Thadhani R, Silvers KM, Epton MJ, et al. New Zealand Asthma and Allergy Cohort Study Group. Cord-blood 25-

hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics*. 2011 Jan;127(1): e180-7.

184. McNally JD, Leis K, Matheson LA, Karuananyake C, Sankaran K, Rosenberg AM. Vitamin D deficiency in young children with severe acute lower respiratory infection. *Pediatr Pulmonol*. 2009 Oct;44(10):981-8.
185. Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S. Vitamin D status is not associated with the risk of hospitalization for acute bronchiolitis in early childhood. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63:297-9.
186. Silvers KM, Frampton CM, Wickens K, Pattermore PK, Ingham T, Fishwick et al. New Zealand Asthma and Allergy Cohort Study Group. Breastfeeding Protects against Current Asthma up to 6 Years of Age. *J Pediatr*. 2012 Jan 28. [Epub ahead of print]
187. Friedman NJ, Zeiger RS. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jun;115(6):1238-48.
188. Beard JA, Bearden A, Striker R. Vitamin D and the anti-viral state. *J Clin Virol*. 2011 Mar;50(3):194-200.
189. Wjst M, Dold S. Genes, factor X, and allergens: what causes allergic diseases? *Allergy*. 1999 Jul;54(7):757-9.
190. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Taylor DR, Flannery EM, et al. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet*. 2002 Sep 21;360(9337):901-7.
191. Andiran N, Yordam N, Ozön A. Risk factors for vitamin D efficiency in breast-fed newborns and their mothers. *Nutrition*. 2002 Jan;18(1):47-50.
192. Tıraş Ü, Dilli D, Dallar Y. Evaluation of Children Followed-Up at the Well-Child Unit of Ankara Training and Research Hospital. *Erciyes Medical J* 2007;29(6): 444-450
193. Hyppönen E, Berry DJ, Wjst M, Power C. Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE - asignificant but nonlinear relationship. *Allergy*. 2009 Apr;64(4):613-620.
194. Matheu V, Bäck O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Sep;112(3):585-92.

195. Matheu V, Bäck O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Sep;112(3):585-92.
196. Liu AH, Zeiger R, Sorkness C, Mahr T, Ostrom N, Burgess S, Rosenzweig JC, Manjunath R. Development and cross-sectional validation of the Childhood Asthma Control Test. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):817-25.
197. Liu AH, Zeiger RS, Sorkness CA, Ostrom NK, Chipps BE, Rosa K, et al. The Childhood Asthma Control Test: retrospective determination and clinical validation of a cut point to identify children with very poorly controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Aug;126(2):267-73, 273.e1
198. Erkoçoğlu M, Akan A, Civelek E, Kan R, Azkur D, Kocabaş CN. Consistency of GINA criteria and childhood asthma control test on the determination of asthma control. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Feb;23(1):34-9.
199. Hidalgo AA, Trump DL, Johnson CS. Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Jul;121(1-2):372-5.
200. Yu WD, McElwain MC, Modzelewski RA, Russell DM, Smith DC, Trump DL, Johnson CS. Enhancement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated antitumor activity with dexamethasone. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jan 21;90(2):134-41.
201. Hidalgo AA, Deeb KK, Pike JW, Johnson CS, Trump DL. Dexamethasone enhances 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ effects by increasing vitamin D receptor transcription. *J Biol Chem*. 2011 Oct 21;286(42):36228-37
202. Morris KL, Zemel MB. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ modulation of adipocyte glucocorticoid function. *Obes Res*. 2005 Apr;13(4):670-7.
203. Sun X, Zemel MB. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Aug;32(8):1305-11
204. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy*. 2011 May;66(5):579-87.
205. Hostettler N, Bianchi P, Gennari-Moser C, Kassahn D, Schoonjans K, Corazza N, Brunner T. Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation. *Allergy*. 2012 Feb;67(2):227-34.

206. Banerjee A, Damera G, Bhandare R, Gu S, Lopez-Boado Y, Panettieri R Jr, Tliba O. Vitamin D and glucocorticoids differentially modulate chemokine expression in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2008 Sep;155(1):84-92.
207. Goleva E, Li LB, Eves PT, Strand MJ, Martin RJ, Leung DY. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Mar 15;173(6):607-16.
208. Torrego A, Pujols L, Roca-Ferrer J, Mullol J, Xaubet A, Picado C. Glucocorticoid receptor isoforms alpha and beta in in vitro cytokine-induced glucocorticoid insensitivity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Aug 15;170(4): 420-5.
209. Christodoulopoulos P, Leung DY, Elliott MW, Hogg JC, Muro S, Toda M, Laberge S, Hamid QA. Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Sep;106(3):479-84.
210. Gagliardo R, Chanez P, Vignola AM, Bousquet J, Vachier I, Godard P, Bonsignore G, Demoly P, Mathieu M. Glucocorticoid receptor alpha and beta in glucocorticoid dependent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Jul; 162(1):7-13.
211. Pujols L, Xaubet A, Ramirez J, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Cidlowski JA, Picado C. Expression of glucocorticoid receptors alpha and beta in steroid sensitive and steroid insensitive interstitial lung diseases. *Thorax.* 2004 Aug;59(8):687-93.
212. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsiopoulos A, Wallaert B, Lafitte JJ, Chrousos GP, Szeffler SJ, Leung DY. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May;159(5 Pt 1):1600-4.
213. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, Chrousos GP, Klemm DJ. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med.* 1997 Nov 3;186(9):1567-74.
214. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N Engl J Med.* 1995 Mar 30;332(13):868-75.
215. Pujols L, Mullol J, Picado C. Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2007 May;7(2):93-9.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
PEDIATRİK ALERJİ VE KLİNİK İMMÜNOLOJİ
PROJE TAKİP PROTOKOLÜ

SIRA NO:

Tarih:...../...../.....

HASTA KODU:

Protokol No:

Dosya No:

VA:

BOY:

BMI:

Doğum Tarihi/ Yaşı

Cinsiyeti: Kız Erkek

Adres :

Telefon ev:

cep:

Ailenin gelir düzeyi: < 600 600-1500 1500-2500 >2500

Anne eğitim düzeyi: Baba eğitim düzeyi:.....

Anne meslek: Baba meslek:.....

Bilinen kronik hastalıkları: 1)..... 2)..... 3).....

7. Doğumdan itibaren herhangi bir doktor çocuğunuza aşağıdaki tanılardan birini koydu mu?

- Astım Saman nezlesi Egzema
 Ürtiker Gıda alerjisi İlaç alerjisi
 Sinüzit Parazit H Pylori

8. Astım tanısı konalı geçen süre:.....(ay)

9. Son 12 ay içinde göğsünde kaç kez hışıltı oldu?

- Hiç 1-3 4-12 12 den fazla
 Hiçbir zaman
 Haftada bir veya daha az
 Haftada birden daha fazla

10. Ayda ortalama kaç gece öksürük nedeniyle uyandınız?

- Hiç 1-3 4-12 12 den fazla
 Hiçbir zaman
 Haftada bir veya daha az
 Haftada birden daha fazla

11. Ayda ortalama kaç gündüz hırıltı/öksürük oluyor?

- Hiç 1-3 4-12 12 den fazla
 Hiçbir zaman
 Haftada bir veya daha az
 Haftada birden daha fazla

12. Son 12 ay içinde egzersiz sonrası göğsünde hışıltı

- Evet(.....) Hayır

13. Son 12 ay içinde acile başvurduunuz mu?

- Evet(.....) Hayır

14. Son 12 ay içinde hastaneye yatış oldu mu?

- Evet(.....) Hayır

15. Okula devamsızlık süresi son 12 ayda:.....

16. Son 12 ay içerisinde nezle grip olmadan burun akıntısı, hapşırma, burun tıkanıklığı oldu mu?.....

- Evet(.....) Hayır

17. Son 12 ay içerisinde burun problemi ile birlikte gözlerde sulanma kaşıntı kızarıklık oldu mu?.....

- Evet(.....) Hayır

18. Son 6 ayda ateş olmadan vücutta kızarıklık, kaşıntı veya döküntü oldu mu?

- Evet(.....) Hayır

19. En sık hangi aylarda şikayetiniz artıyor?

- Ocak Şubat Mart Nisan Mayıs
 Haziran Temmuz Ağustos Eylül Ekim
 Kasım Aralık

20. Gastrik semptomlar: YOK

- Karın ağrısı Kusma Yanma
 İshal Kabızlık Diğer.....

21. Aktif yaptığı spor var mı?

- Evet(.....) Hayır

22. Çocuğunuz günün ne kadarını kapalı ortam dışında geçiriyor?..... (saat)

23. Düzenli kullandığı ilaç / doz /süresi/cevabı:

a)...../...../..... /.....

b)...../...../..... /.....

c)...../...../..... /.....

d)...../...../..... /.....

24. Astım kontrol düzeyi:

- a. Kontrollü b. Kısmi kontrol c. Kontrolsüz

25. AİLE ALERJİ ÖYKÜSÜ HAYIR

- Astım Anne Baba Tanılı
Saman nezlesi Anne Baba Tanılı
Egzema Anne Baba Tanılı
Diğer

26. KARDEŞ ÖYKÜSÜ HAYIR

- Astım 1. 2 3. Tanılı
Saman nezlesi 1. 2 3. Tanılı
Egzema 1. 2 3. Tanılı
Diğer

27. Doğum şekli NSVD C/S**28. Doğum Kilosu:**.....**29. Anne sütü alma süresi (ay)** :.....**30. Ek gıdaya başlangıç yaşı (ay)** :.....**31. Formüla mama ile beslenme** :.....ay**EV VE ÇEVRE****32. Evde toplam kişi sayısı:**.....**33. Aile kaçınıcı çocuk:**.....**34. Evcil hayvan var mı?**

- Evet (Tür.....) Hayır

35. Evde sigara kullanan var mı? Hayır

- Annetane Babatane

36. Gebelikte sigara annenin içmesi:

- Evet Hayır

37. Gebelikte Babanın Sigara içmesi:

- Evet Hayır

38. Yünle temas Evet Hayır**39. Yaşadığı ev**

- Apartman Müstakil Bahçeli
 Rutubetli

40. Isınma şekli

- Sobalı Kaloriferli Kombi

41. Evin Çephesi,

- Kuzey Güney Doğu Batı

42. Çocuğun odası

- Güneş alıyor Güneş almıyor

Şu anda

	1 Kontrol	2.Kontrol	3. Kontrol
Kullandığı ilaç	1..... 2..... 3.....	1..... 2..... 3.....	1..... 2..... 3.....
Ateş öyküsü			
Öksürük			
Hırıltı			
Nefes darlığı			
Gece öksürüğü			
Egzersizle öksürük			
ÜSYE öyküsü			
Okula gitmediği gün			

ASTIM KONTROL SKORU (TOPLAM:.....)	1. Kontrol	2. Kontrol
43. Astımın bugün nasıl? 0) Çok kötü 1) Kötü 2) İyi 3) Çok iyi		
44. Koştüğün, egzersiz veya spor yaptığın zaman astım senin için ne kadar problem oluyor? 0) Çok büyük problem istediklerimi yapamıyorum 1) Bir problem ondan hoşlanmıyorum 2) Biraz problem oluyor ama zararsız 3) Problem değil		
45. Astım yüzünden öksürüyor musun? 0) Evet, her zaman 1) Evet, çoğu zaman 2) Evet, bazen 3) Hayır, hiçbir zaman		
46. Astım yüzünden gece uyanıyor musun? 0) Evet, her zaman 1) Evet, çoğu zaman 2) Evet, bazen 3) Hayır, hiçbir zaman		
47. Son 4 hafta içinde gündüz haftada kaç kez astım semptomları gösterdi? 0) Hergün 1) 19-24 gün/ay 2) 11-18 gün gün/ay 3) 4-10 gün/ay 4) 1-3 gün/ay 5) Hiç		
48. Son 4 hafta içinde gündüz haftada kaç kez astım yüzünden hırıltı oldu? 0) Hergün 1) 19-24 gün/ay 2) 11-18 gün gün/ay 3) 4-10 gün/ay 4) 1-3 gün/ay 5) Hiç		
49. Son 1 ay içinde hırıltı nedeni ile yaklaşık kaç kez rahat uyuyamadı ? 0) Hergün 1) 19-24 gün/ay 2) 11-18 gün gün/ay 3) 4-10 gün/ay 4) 1-3 gün/ay 5) Hiç		
TOPLAM SKOR		

	1.Kontrol	2. Kontrol	3. Kontrol
TAM KAN			
Lokosit			
Hb			
Htc			
MCV			
RDW			
Esosinofil			
Eosinofil (%)			
Nötrofil			
Nötrofil (%)			
Lenfosit			
Lenfosit (%)			
Trombosit			
IgE			
Spesifik IgE			
SFT			
FVC			
FEV1			
FEV1/FVC			
PEF			
MEF 25-75			
25-OH Vitamin D ng/dl			
GKS reseptör α			
GKS reseptör β			

KONTROL HASTA GRUBU PROTOKOLÜ

HASTA KODU:

Protokol No:

Dosya No:

VA:

BOY:

BMI:

Doğum Tarihi/ Yaşı

Cinsiyeti: Kız Erkek

Adres :

Telefon ev:

cep:

Ailenin gelir düzeyi: < 600 600-1500 1500-2500 >2500

Anne eğitim düzeyi: Baba eğitim düzeyi:

Anne meslek: Baba meslek:

Bilinen kronik hastalıkları: 1)..... 2)..... 3).....

25. AİLE ALERJİ ÖYKÜSÜ HAYIR

Astım Anne Baba Tanılı

Saman nezlesi Anne Baba Tanılı

Egzema Anne Baba Tanılı

Diğer

Evet (Tür.....) Hayır

35. Evde sigara kullanan var mı? Hayır

Annetane Babatane

26. KARDEŞ ÖYKÜSÜ HAYIR

Astım 1. 2. 3. Tanılı

Saman nezlesi 1. 2. 3. Tanılı

Egzema 1. 2. 3. Tanılı

Diğer

36. Gebelikte sigara annenin içmesi:

Evet Hayır

37. Gebelikte Babanın Sigara içmesi:

Evet Hayır

38. Yünle temas Evet Hayır

39. Yaşadığı ev

Apartman Müstakil Bahçeli

Rutubetli

40. Isınma şekli

Sobalı Kaloriferli Kombi

41. Evin Çephesi,

Kuzey Güney Doğu Batı

42. Çocuğun odası

Güneş alıyor Güneş almıyor

27. Doğum şekli NSVD C/S

28. Doğum Kilosu:.....

29. Anne sütü alma süresi (ay) :.....

30. Ek gıdaya başlangıç yaşı (ay) :.....

31. Formüla mama ile beslenme :.....ay

EV VE ÇEVRE

32. Evde toplam kişi sayısı:.....

33. Aile kaçınıcı çocuk:.....

34. Evcil hayvan var mı?

Şu anda

Kullandığı ilaç	1	Nefes darlığı	
	2	Gece öksürüğü	
	3	Egzersizle öksürük	
Ateş öyküsü		ÜSYE öyküsü	
Öksürük		Okula gitmediği gün	
Hırıltı			

	1.Kontrol	2. Kontrol	3. Kontrol
TAM KAN			
Lokosit			
Hb			
Htc			
MCV			
RDW			
Esosinofil			
Eosinofil (%)			
Nötrofil			
Nötrofil (%)			
Lenfosit			
Lenfosit (%)			
Trombosit			
IgE			
Spesifik IgE			
SFT			
FVC			
FEV1			
FEV1/FVC			
PEF			
MEF 25-75			
25-OH Vitamin D ng/dl			
GKS reseptör α			
GKS reseptör β			