

T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

ALERJİK RİNİTTE REGULATUVAR T HÜCRELERİN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Özlem ÖZENTÜRK KIRGIZ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Cengiz KIRMAZ
Manisa, 2009

ÖNSÖZ

İç Hastalıkları ihtisasım boyunca araştırmaya, öğrenmeye teşvik eden, bilimsel bir iş ortamında çalışmamı sağlayan, her konuda desteğini her zaman hissettiğim İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hakan YÜCEYAR' a, asistanlığımın ilk yıllarında bizlere yol gösteren, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Bülent KILIÇÇIOĞLU' na, İç Hastalıkları eğitimim süresince hem mesleki hem de insani vasıflarıyla uzmanlık eğitimime ve hekimlik sanatımı icra edişime büyük katkıları ve emekleri bulunan anabilim dalımızın saygıdeğer hocaları Prof. Dr. Seyhun KÜRŞAT, Doç. Dr. Bilgin ÖZMEN, Doç. Dr. Ülkü ERGENE, Doç. Dr. Ender ELLİDOKUZ, Doç. Dr. Zeliha HEKİMSOY, Doç. Dr. Timur PIRILDAR, Yard. Doç. Dr. Mine MİSKİOĞLU ve diğer tüm öğretim üyelerimize tek tek teşekkür ederim. En önemlisi asistanlık hayatımın başından bu yana her açıdan desteğini benden esirgemeyen, mesleki ufkumu genişleten, hem bilimsel hem de teknik açıdan büyük yardımlarını gördüğüm, tezimin hazırlanma aşamalarında sabırla bana destek olan saygıdeğer ve sevgili hocam Doç. Dr. Cengiz KIRMAZ' a çok teşekkür ederim. Tezimin hazırlanma sürecinde büyük yardımlarını gördüğüm Celal Bayar Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Kliniği' ne, Histoloji Anabilimdalı' ndan Sayın Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN' e, Biyokimya Anabilimdalı' ndan Doç. Dr. Ece ONUR' a çok teşekkür ederim.

Ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca birçok güzelliği paylaştığım asistan arkadaşlarıma, uzmanlarımıza, hemşirelerimize ve hastane personelimize, hayatımın her döneminde yanımda olan annem Tülay Özentürk, babam Nevzat Özentürk ve ablam Şükran Kurtulmuş' a, asistanlığımın son yıllarında sabrını ve desteğini benden esirgemeyen eşim Saim Kırgız' a ve 1 yıldır aramızda olan sevgili kızım Defne Kırgız' a çok teşekkür ederim.

Dr. Özlem Özentürk KIRGIZ

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ	1
2	GENEL BİLGİLER	3
2.1	ALERJİK RİNİT TANIMI VE GÖRÜLME SIKLIĞI	3
2.2	ALERJİK RİNİT SINIFLAMASI	3
2.3	ALERJENLER	4
2.4	ALERJİK RİNİT İMMÜN PATOGENEZİ	5
2.5	T REGULATUVAR HÜCRELER	8
2.5.1	Timus kaynaklı doğal Treg hücreleri	11
2.5.2	Alerji ve Doğal CD25+ Treg hücreleri	12
2.5.3	Ekzojen antijene özgü adaptif Treg hücreleri	12
2.5.4	Alerji ve astımda IL-10 ve tolerans	14
2.5.5	Alerjik hastalıklarda alerjene-özgü immünoterapiler	14
3	GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1	Hasta Seçimi	16
3.2	Kontrol grubu	16
3.3	Deri Prick Testi	17
3.4	Alerjik Rinit Semptom Skorlaması	18
3.5	Burun Yıkaması	18
3.6	ELISA Yöntemi	18
3.7	Rinomanometri	19
3.8	İnferior Türbinat Biyopsi	20
3.9	Işık Mikroskopik Gereç Ve Yöntem	20
3.9.1	İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi	22
3.10	Polen Sayımı	24
3.11	İstatistiksel Analiz	25
4	BULGULAR	26
5	TARTIŞMA	36
6	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	40
7	ÖZET	42
8	SUMMARY	44

9 KISALTMALAR	46
10 EKLER	47
11 REFERANSLAR	55

1 GİRİŞ

Alerjik rinit (AR), toplumda sık görülen ve alerjik inflamasyonun hakim olduğu kronik bir hastalıktır. Hastalığın aktif olduğu dönemlerde özellikle nazal mukozada T helper 2 (Th2) tipi sitokinlerin hakim olduğu ve inflamasyonda daha çok Th2 tipi sitokinlerin baskın olduğu gösterilmiştir. T helper hücreler, transkripsiyon faktörleri ve ürettikleri sitokinlere göre T helper 1 (Th1), Th2, T regülatuar (T_{reg}) hücreler olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadır. Bu hücrelerden Th1, sitokin paterni yönünden interferon γ (IFN- γ), interlökin 2 (IL-2), tümör nekrozis faktör β ağırlıklı bir üretim yaparken transkripsiyon faktörü olarak T bet' i kullanmaktadır. Th2 hücreler ise sitokin paterni olarak interlökin 4 (IL-4), interlökin 5 (IL-5), interlökin 6 (IL-6), interlökin 10 (IL-10) gibi üretim yaparken GATA-3 transkripsiyon faktörünü kullanmaktadır. Bizim ilgi alanımız içinde olan T_{reg} hücreler ise immünosupresif etkili IL-10 ve transforming growth faktör β (TGF- β) şeklinde sitokin üretimi yaparken FoxP3 transkripsiyon faktörünü kullanmaktadır. Hastalığın küratif tedavisi için şu an yalnızca alerjen spesifik immünoterapi seçeneği mevcuttur. Bu tedavinin uygulandığı ve yanıt alınan vakalarda; öncelikle Th2 tipi sitokinler azalır ve Th1 tipi sitokinler artar. Zaman içerisinde özellikle T_{reg} hücrelere ait olan sitokinler yükselir. Bu sitokinler; hem Th1 hem de Th2 tipindeki immünolojik yanıtları inhibe eder. T_{reg} hücreler, IL-10 ve TGF- β gibi immünosupresör sitokinlerin sekrete edilmesi yoluyla anti-inflamatuvar etki yaratırlar ve hastalıkta remisyon ve belki de kür olmasını sağlarlar. AR' li hastalarda teorik ve hipotetik olarak alerjene yanıt sırasında T_{reg} hücrelerin sayısal ve/veya fonksiyonel eksikliğine bağlı daha çok Th2 tipindeki yanıtın oluşması önemli bir patogenetik mekanizmadır.

Bu alışmada; AR' li hastalarda T_{reg} hücre yetmezliğinin varlığı, spesifik immünoterapiye T_{reg} yanıtı ve buna sekonder Th1 veya Th2 hücrelerinin değişiminin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 ALERJİK RİNİT TANIMI VE GÖRÜLME SIKLIĞI

AR, nazal mukozanın alerjik inflamasyonu sonucu ortaya çıkan bir tablodur. Tüm ülkelerde, tüm etnik gruplarda ve tüm yaşta insanlarda görülür. Klinik tablo çok ağır seyretmemesine rağmen hastanın sosyal hayatını ve yaşam kalitesini etkilemektedir (1-5). Ayrıca çok yüksek bir ekonomik maliyeti söz konusu olup yeterince tedavi edilememektedir (5).

800 milyonun üzerinde AR' li hasta vardır ancak hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, immun reaksiyon farklılığına bağlı olarak kentsel ve kırsal alanlarda hala fark görünmektedir (6-14).

AR çok sık görülmekle birlikte pek çok hasta hekime başvurmamaktadır. Bu nedenle prevalans aslında daha yüksektir. Farklı toplumlarda, yaştan bağımsız AR prevalansı % 10 - 25 arasında değişmektedir (14). Ülkemizde, yapılan çalışmalarda rinit prevalansının çocuklarda % 4.5 - 36.3, erişkinlerde % 8.9 - 27.7 arasında değiştiği gözlenmektedir (15-33).

Manisa' da yapılan bir çalışmada AR prevalansı % 14.5 oranında saptanmıştır (33).

2.2 ALERJİK RİNİT SINIFLAMASI

AR, klasik bilgilerimize göre mevsimsel ve yıl boyu olarak iki grupta incelenmektedir. Mevsimsel alerjik rinit ve yıl boyu alerjik rinit ayrımı alerjene temas etme süresi esas alınarak yapılan bir sınıflandırmadır. Bu sınıflandırma altta yatan patolojiyi, inflamasyonu yansıtmamakta; hastanın, hastalıktan ne kadar etkilendiği konusuna ve AR' in hastanın yaşam kalitesini

nasıl etkilediği üzerine vurgu yapmamaktadır. Bu nedenle AR için yeni bir sınıflandırma gereksinimi doğmuştur. Bu sınıflama Dünya Sağlık Örgütü ile işbirliği içinde yürütülen Alerjik Rinit ve Astım Üzerine Etkisi (ARIA) adı altında 2001 yılında yayımlanan derlemede kabul edilmiş ve alerjik riniti ciddiyetine göre hafif, orta-ağır ve intermittan, persistan olarak değerlendirmiştir.

2.3 ALERJENLER

Alerjenler; spesifik immunglobin E (IgE) antikor oluşumunu uyaran ve bu antikor ile reaksiyona giren antijenlerdir. Alerjen kaynağı olarak hayvanlar, bitkiler, mantarlar ya da küçük molekül ağırlıklı kimyasal ajanlar mevcuttur ve bunlar solunum yolu, oral, parenteral yollarla vücuda alınabilirler. Gerçekte alerjenlerin çoğu ev içi ve ev dışı yerleşimleri nedeniyle sürekli inhale etmek durumunda olduğumuz vücut sıvılarında çözünür özellikte proteinlerdir.

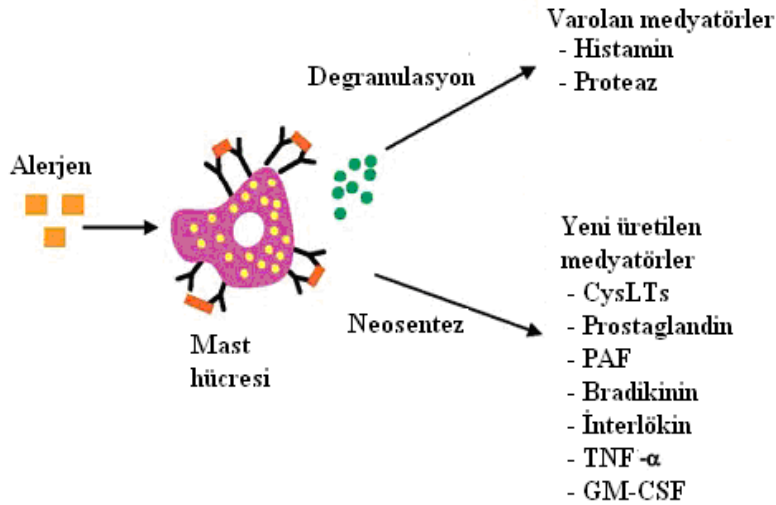
Mevsimsel alerjik rinitten başlıca; çayır, ağaç, yabani ot polenleri ile mevsimsel dağılım gösteren mantarlar sorumludur. İklim ve bölgeye göre değişmekle birlikte farklı polen gruplarının polenizasyonunun mevsimsel özellik gösterdiği bilinmektedir. Ağaç polenleri, Mart-Nisan aylarında, çayır polenleri Mayıs-Temmuz başı arasında dış ortamda bulunurlar. Ağustos sonu ve sonbahar ise ortamda yabani ot ve hububat polenlerinin bulunma zamanıdır. Polenizasyon dönemi ve polenin havada bulunma süresi bölgeden bölgeye değişebilmektedir. AR' te semptomların havadaki polen sayısı ile korele olduğu bildirilmiştir. Bir polenin alerjiye neden olabilmesi için 1 m³ havada 25-50 polen olması gerekir. Ülkemizde özellikle Ege bölgesinde, AR' e en fazla neden olan alerjenlerden biri zeytin polenidir (34-36). Polenizasyon sezonu Mayıs-Temmuz ayları arasında gözlenir (36). Fakat yapılan bir çalışmada Manisa bölgesinde zeytin polen alerjisinin beklenenden daha uzun sürdüğü gözlenmiştir (37). Yıl boyu alerjik rinitten ise iç ortam alerjenleri olan ev tozu akarları, hamam böceği, hayvan tüyleri ile mantarlar

sorumludur. Ev tozu akarları nem oranının arttığı dönemlerde artarak duyarlı kişilerde semptomlarda mevsimsel bir artmaya da yol açabilmektedir.

2.4 ALERJİK RİNİT İMMÜN PATOGENEZİ

AR' te burun mukozasında inflamasyona götüren olaylar zinciri oldukça karışıktır ve duyarlanmış bireyin alerjenler ile karşılaşmasıyla başlar. AR' e neden olan başlıca alerjenler aeroalerjenlerdir.

AR; 2 fazlı alerjik reaksiyon ile karakterizedir. 1. faz; bireyin duyarlanma fazıdır. Bu faz; bireyin polen, ev tozu, hayvan epiteli ve döküntüleri gibi bir alerjenle karşılaşması ile başlar. Humoral yanıtın indüklenmesiyle birlikte IgE oluşumu meydana gelir. Bu alerjenler, mast hücre üzerindeki IgE' e bağlanırlar. (Şekil 1)



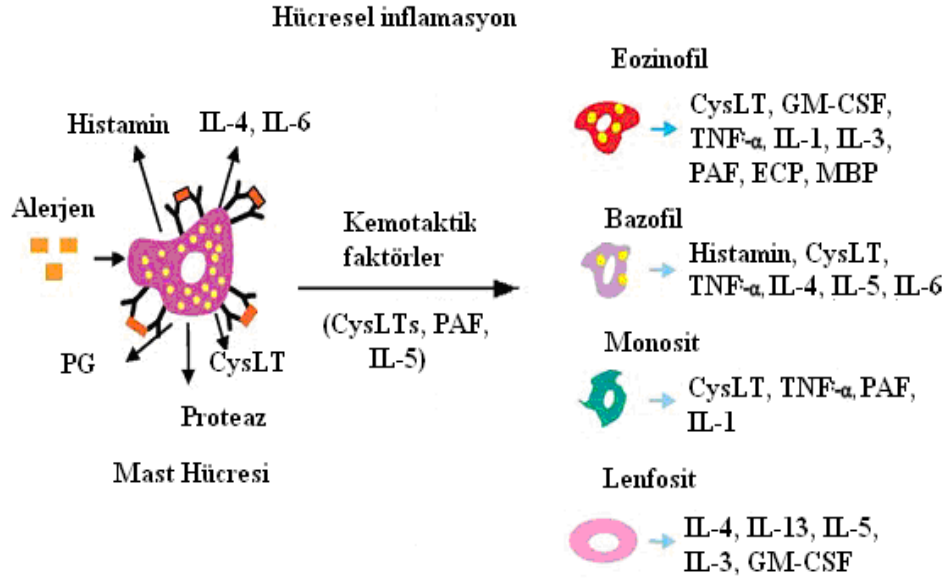
CysLTs: sisteinil lökotrien; GM-CSF: granulosit-makrofaj koloni stimulan faktör; PAF: platelet aktivator faktör; TNF-α: tümör nekrozan faktör

Şekil 1. Sensitize hastalarda alerjen maruziyetine karşı oluşan reaksiyon— medyatörler (38-41).

2. faz ise klinik fazdır. Bu faz; erken ve geç yanıtı fazlar olmak üzere ikiye ayrılır. Erken faz inflamatuvar yanıtta alerjenler mast hücre üzerindeki IgE' e

bağlanır. Dakikalar içinde alerjenin mast hücreye bağlı en az 2 spesifik IgE molekülü ile çapraz bağlanması hücrenin degranüle olması, histamin, triptaz, CysLT, sitokinler (IL-4, IL-5, IL-6 ve $TNF\alpha$), kemotaktik faktörler ve enzimlerin salınması ile sonuçlanır (Şekil 1). Bu medyatörlerin endotel, sinirler, damar ve müköz bezler üzerindeki etkisi ile vazodilatasyon, mukus yapımında artış, hapşırık, burun akıntısı ortaya çıkar. Bunlar Tip 1 immun yanıtın akut fazını oluştururlar.

Erken fazın aksine, geç faz; alerjen maruziyetini takiben 2-4 saat içinde meydana gelen bir hücresel olaydır. (Şekil 2) (41-44).



ECP=eozinofil katyonik protein; MBP=major bazik protein; PG=prostaglandin

Şekil 2. Sensitize hastalarda alerjen maruziyetine karşı gelişen reaksiyon-inflamatuvar hücreler (44-47).

İnflamatuvar hücreler aktive olurlar ve ödem, doku hasarı gibi durumlara sebep olan medyatörlerini açığa çıkarırlar (47-49). Akut fazın süregelen hapşırık ve burun akıntısına bu dönemde burun tıkanıklığı da katılarak AR' in tüm klinik tablosu tamamlanmış olur. Mast hücrelerinden salınan histamin

damar endoteli üzerinde P selektin ortaya çıkışına neden olarak lökosit adezyonunun ilk basamağı olan 'rolling' olayını başlatır.

CysLT₂; nazal havayolu direncini ve havayolu obstrüksiyonunu artırır. Damarsal geçirgenliği ve mukus sekresyonunu artırarak rinoreye neden olurlar (49-53). Aynı zamanda eozinofiller başta olmak üzere inflamatuvar hücreler için kemoatraktandırlar. Bu eozinofilleri aktive ederler ve CysLT₂' de dahil olmak üzere daha fazla medyatör açığa çıkar. Bu da artmış inflamasyon ve konjesyona sebep olur (53,54).

Diğer medyatörlerden PG, kinin ve nöropeptitler de AR patogeneğinde önemlidir. PG' lerden özellikle PGD₂, konjesyon ve rinoreye sebep olur (55,56). Alerjen maruziyetinden sonra kininler açığa çıkar; bradikinin konjesyon, rinore ve boğazda tahriş meydana getirir (57,58). Nöropeptitler, vazodilatasyon yoluyla konjesyona neden olurlar (59-62).

AR' deki inflamatuvar olayda sitokin salınımı önemli rol oynar. Mast hücresinden salınan TNF α ; E-selektin, ICAM-1, VCAM-1 gibi lökosit endotel adezyon moleküllerinin upregülasyonuna ve bunu izleyen lökosit-endotel adezyonu ve kemotaktik uyarılar altında transendotelyal migrasyonuna neden olur (62-65). Ayrıca mast hücresinden IL-4 salınımı VCAM-1 upregulasyonu yapmakta, IL-5 salınımı ise eozinofil aktivasyonu ve kemotaksisine götürmektedir. Mast hücresi ve epitel gibi diğer hücrelerden IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler, eotaxin 1, 2, 3 gibi kemokinler ve GM-CSF gibi eozinofil büyüme faktörleri de salınabilir (65). Nazal alerjen maruziyetinden sonra mukozal eozinofili ile ilişkili olarak IL-4, IL-5, GM-CSF' de artış tespit edilmiştir (66)

Eozinofil ve T lenfosit gibi inflamatuvar hücrelerin mukozaya göçünde sitokinler ve kemokinlerin ve bunların endotel üzerinde adezyon molekülleri ortaya çıkışı üzerine etkisinin önemli rolü vardır. Mukozaya göç eden eozinofiller bundan sonra ECP, MBP ve diğer inflamatuvar maddeleri salarak inflamasyona katılırlar. Bu aktif eozinofiller, T lenfositler, bazofiller ve bunlar kaynaklı medyatörler, enzimler, sitokinler alerjen maruziyetini izleyen 2 - 4 saat sonra ortaya çıkan geç faz olaylara aracılık ederler. Akut fazın süren

hapşırık ve burun akıntısına bu dönemde burun tıkanıklığı da katılarak AR' in tüm klinik tablosu tamamlanmış olur.

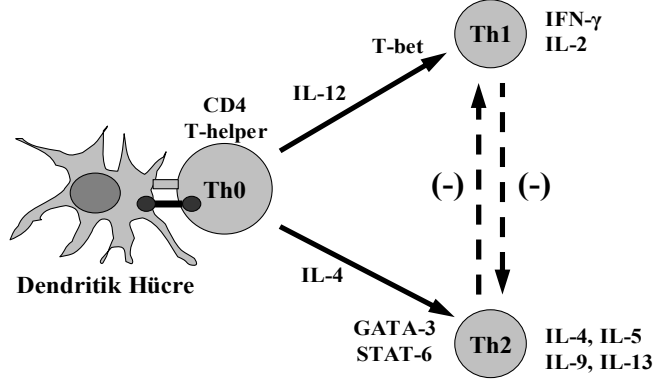
2.5 T REGULATUVAR HÜCRELER

Bir çok immunolojik olaydan Th2 lenfositlerden salınan sitokinler sorumludur. IL-4 ve IL-13 aşırı miktarda IgE yapımında, IL-5 ve IL-9 eozinofil kemotaksisi ve maturasyonunda, IL-3 ve IL-9 mast hücre gelişiminde, IL-9 ve IL-13 bronş hiperreaktivitesinde, IL-4, IL-9 ve IL-13 ise aşırı mukus yapımında rol oynarlar (67).

Günlük yaşantıda polen, kedi, ev tozu akarı gibi alerjenler inhalasyonla alınmaktadır. Atopik olmayan kişiler bu alerjenlere zayıf yanıt vermekte ve alerjene özgü IgG1 ve IgG4 gibi antikolar yapmaktadır. Invitro ortamda alerjenlerle karşılaşan T lenfositler Th1 hücre özelliği taşıyarak IFN- γ sentez etmektedir. Bunun aksine atopik kişi alerjenle karşılaşınca aşırı miktarda spesifik IgE yapmakta ve Th2 lenfosit kaynaklı sitokinler ortamda artmaktadır. Bu yanıtın farklılaşmasında genetik ve çevresel faktörler önemlidir. Antijen sunan dendritik hücrenin maturasyonu, sunulan antijenin özelliği, mikroortamın sitokin profili polarizasyonda rol oynar.

Duyarlı bireylerde ortamda IL-4 varlığında CD4⁺ yardımcı T hücreler anormal Th2 aracılı alerjik immun yanıtı tetiklerken, IL-12 varlığında bu farklılaşma Th1 yönünde olur. Th1 ve Th2 hücrelerin diferansiyasyonunda transkripsiyon faktörleri önemli roller üstlenir. GATA3 ve STAT-6 Th2 lenfosit gelişimi ve IL-5 sentezini kontrol ederken, T-bet ise Th1 lenfosit gelişimi, IL-12 ve IFN- γ yapımını kontrol eder (Şekil 3).

GEÇ TİP HİPERSENSİTİVE OTOİMÜNİTE

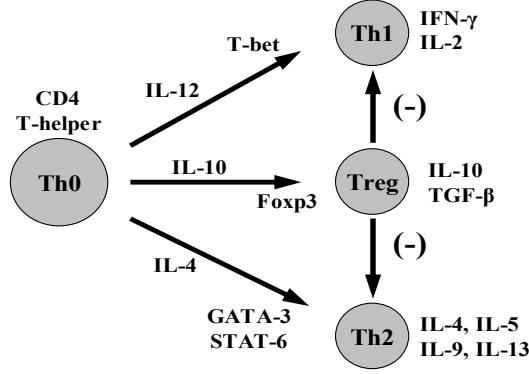


ALERJİK İNFLAMASYON

Şekil 3: Th1 ve Th2 farklılaşması

Son yıllarda CD4⁺ hücrelerden farklılaşan ve efektör immün yanıtı kontrol eden ve baskılayan yeni bir grup T hücresi tanımlanmıştır. Bu hücrelere reglatuvar T hücreleri (T_{reg}) denilmektedir (Şekil 4).

GEÇ TİP HİPERSENSİTİVE



ALERJİK İNFLAMASYON

Şekil 4: İmmun yanıtta regülatuar T hücreleri

CD4⁺ lenfositlerden Foxp3 transkripsiyon faktörünün kontrolünde T_{reg} hücreler farklılaşır. Bu hücrelerden IL-10 ve TGF-β gibi sitokinler salgılanır. IL-10 ve TGF-β, Th1 ve Th2 lenfosit fonksiyonlarını düzenler. T_{reg} hücrelerden IL-10 ve TGF-β yapımı ve salınımı çevreden gelen değişik immünolojik uyarılarla idame ettirilmektedir. Mikroorganizmalarla, endotoksinlerle ve parazitlerle sürekli karşılaşma T_{reg} hücreleri aktif bir konumda tutmakta, dolayısıyla Th1 ve Th2 lenfosit fonksiyonları kontrol altına alınmaktadır. Doğal ve adaptif immünolojik uyarıların yokluğu T_{reg} lenfositlerin aktivitelerinde ve IL-10, TGF-β gibi sitokinlerin yapımında azalmaya neden olmaktadır. Böylece Th1 ve Th2 lenfositler üzerinde T_{reg} baskısı azalmaktadır. Dolayısıyla son yıllarda sadece Th2 kaynaklı alerjik hastalıklarda değil, Th1 kaynaklı insüline bağlı diyabetes mellitus gibi otoimmün hastalıklarda da artışlar görülmektedir. Çoğu alerji vakasında hastalık kontrol edilebilse de, uzun dönem şifa ya da kalıcı tedavi elde edilememektedir. Regülatuar T hücrelerin indüklenebilir IL-10 üretici T_{reg}

hücre ve timik kökenli doğal olarak ortaya çıkan $CD4^+CD25^+$ T_{reg} hücreler gibi alt sınıfları hakkında elde edilen son bilgilerle kalıcı tedavilere biraz daha yaklaşılmıştır.

İç ya da dış antijenlere/alerjenlere karşı oluşan immün tolerans; klonal delesyon, anergi ve T_{reg} ' in de içinde bulunduğu birkaç mekanizma tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu toleransı T_{reg} hücreleri non reglatuvar efektör T hücrelerinin aktivasyon ve fonksiyonunu engelleyerek gerçekleştirir. T_{reg} hücrelerinin alt grupları mevcuttur. Bunlar; merkezi olarak timusta gelişen vücudun oto/kendi-antijenlerine özel T hücreleri ($CD25^+$ T_{reg} hücreleri) ile periferde ekzojen antijen/alerjenlere maruz kalmakla gelişen T hücreleri (adaptif T_{reg} hücreleri) yer alır. Alerjene özel adaptif T_{reg} hücrelerinin alerjenlere karşı gelişen immün yanıtlarda ve alerjik hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir.

2.5.1 Timus kaynaklı doğal T_{reg} hücreleri

Doğal T_{reg} hücreleri timusta gelişirler ve periferde yer alan $CD4^+$ T hücrelerinin % 5 - 10' unu oluştururlar. Doğal T_{reg} hücreleri; 'CD25' (IL-2 reseptörü), bir immunglobulin süperfamilyası üyesi olan sitotoksik 'T-lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4 / CD152)', tümör nekroz faktörü-sinir hücresi büyüme faktörü reseptör ailesi proteinlerinin bir üyesi olan 'glukokortikoid ile indüklenen tümör nekroz faktörü - GITR' ve bir transkripsiyon faktörü olan FoxP3 (68) moleküllerini eksprese ederler. Aktive edilmiş $CD4^+$ T hücreleri üzerinde CD25 fazla miktarda eksprese edilir. Bu nedenle immün aktivasyon durumunda bir T_{reg} hücre belirteci olarak CD25' in değeri neredeyse yok olmaktadır (68). Buna karşın, FoxP3 ekspresyonu büyük ölçüde $\alpha\beta$ T-hücre reseptör hücreleriyle kısıtlıdır ve FoxP3 ekspresyonu baskılayıcı (supresor) etki gösterir (69). Farelerle yapılan çalışmalar, DNA' ya bağlanan FoxP3' nin çekirdeğe lokalize olarak bir transkripsiyonel reseptör olarak davrandığını (70) ve T_{reg} hücresi dizilerinin belirteç faktörü olarak fonksiyon gördüğünü (71-74) ortaya çıkarmıştır.

Doğal T_{reg} hücreleri TCR-ligand etkileşimleri ile reglatuvar özellik taşımayan T hücrelerinden farklı mekanizma ile timusta gelişirler (74). Doğal T_{reg} hücrelerinin pozitif seleksiyonunda önemli bir rol oynayan faktörün timik stromal lenfopoetin olduğu düşünölmektedir; bu faktör timik medulladaki Hassal korpusküllerinde oldukça fazla eksprese edilir ve dendritik hücrelerin timositlerinde FoxP3 ekspresyonunu aktive eder (75). Doğal $CD25^+$ T_{reg} hücrelerinin gelişimiyle sonuçlanan bu mekanizmanın adaptif T_{reg} hücrelerinin gelişiminde de rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir.

2.5.2 Alerji ve Doğal $CD25^+$ T_{reg} hücreleri

$CD4^+CD25^+$ T hücreleri inhale edilen alerjenlere karşı yanıtı baskılayabilirler (örneğin, kedi alerjenleri ya da ot polenleri gibi); alerjik olmayan vericilerden alınan $CD25^+$ T hücreleri kendilerine ait olan, alerjen ile uyarılmış $CD4^+CD25^+$ T hücreleri aracılığıyla proliferasyonu ve IL-5 sekresyonunu baskılamıştır ancak bu baskılanma alerjik olan vericilerde gerçekleşmemektedir (76). Alerjik vericilerdeki $CD25^+$ T hücrelerinin inhibisyon aktivitesindeki kaybın en belirgin olduğu dönemler, polen sayısının en fazla olduğu semptomatik dönemlerdir. Çalışmalarda 'doğal' $CD25^+$ T hücresi popülasyonunun alerjenleri tanıyan T hücrelerinden ya da aktive edilmiş $CD25^+$ eksprese eden antijene özgü 'adaptif' T_{reg} hücrelerinden oluştuğunu göstermiştir (77).

2.5.3 Ekzojen antijene özgü adaptif T_{reg} hücreleri

Doğal T_{reg} hücrelerinin timusta kendi antijenlerine maruz kalarak pozitif seleksiyon ile seçildikleri açık olmasına karşın, alerjene özgü adaptif T_{reg} hücreleri ekzojen alerjenlerle (örneğin yiyecek ya da bitkiler) karşılaştıktan sonra timustan ziyade periferde oluşur. Bu durum, adaptif T_{reg} hücrelerinin doğal $CD25^+$ T_{reg} hücrelerinden farklı yollarla oluştuğunu gösterir. Adaptif T_{reg}

hücreleri 2 alt gruba ayrılır; T_{reg} tip 1 hücresi ve T helper 3 hücresi. Adaptif T hücrelerinin kolayca tanınmalarını ve izole edilmelerini sağlayacak net işaretleyicileri (marker) olmadığından bu hücrelerin oluşumundaki özel karakteristiklerin ve yolların çalışılması oldukça güçtür. İmmün disregülasyonu, poliendokrinopatisi, X ilişkili sendromu ya da FoxP3 geninde mutasyonu olan hastalarda otoimmün hastalıkların ya da yiyecek alerjisi ve egzemanın gelişimi FoxP3 eksprese eden düzenleyici T hücrelerinin hem otoimmünitenin düzenlenmesinde hem de ekzojen alerjenlere karşı alerjik yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını gösterir. Bu nedenle, doğal ve adaptif T_{reg} hücreleri FoxP3 ekspresyonu bakımından ilişkili olabilir. Bu yüzden de alerji oluşumu, FoxP3 eksprese eden alerjene özgü T_{reg} hücrelerinin yetersiz düzeyde oluşumuna bağlı olabilir (78).

Bir dizi deneysel çalışmada antijene özgü adaptif T_{reg} hücreleri indüklenmiştir. Örneğin, antijenlerin intravenöz ya da oral yollardan uygulanması ile gerçekleştirilen tolerans indüksiyonu antijene özgü (CD25⁺) adaptif T_{reg} hücrelerinin (79) ya da supresif Th3 hücrelerinin (80) gelişimini sağlamıştır. Bu çalışmalarda FoxP3 ekspresyonu incelenmemiştir. Bunlara ek olarak; peptidin subkutan olarak uygulanması (81) ya da subkutan olarak ozmotik pompalarla uygulanması (82) ya da antijenin solunum yoluna uygulanması (83, 84) ya da antijenin ısı ile öldürülmüş 'Listeria monocytogenes' adjuvanı ile birlikte uygulanması (85) FoxP3 eksprese eden, antijene özgü T_{reg} hücrelerinin gelişimini indüklemiştir. Bu T_{reg} hücrelerinin bazıları IL-10 eksprese ederken (86), bazıları TGF- β (84) ya da hem IL-10 ve IFN- γ (85) eksprese etmiştir. IL-10 üreten T_{reg} hücreler (Th2 polarizasyonu ve FoxP3 için majör düzenleyici olan GATA-3 eksprese eden hücreler), IL-10 ve IFN- γ üreten T_{reg} hücreler (T-bet ve FoxP3 eksprese eden hücreler) (85, 86) ve TGF- β üreten hücreler (FoxP3 eksprese eden hücreler) oldukça etkili inhibitör aktivitelere sahiptirler ve farelerde astım modelleri üzerinde hava yollarında hiper yanıtın gelişimini engellemişlerdir. Bu nedenle, FoxP3 eksprese eden ve doğal T_{reg} hücreleri ile ilişkili olabilecek T_{reg} hücresi tipleri Th2 nedenli inflamasyonun gelişimini inhibe edebilir.

2.5.4 Alerji ve astımda IL-10 ve tolerans

Bugüne kadar alerjik hastalıkların oluşumunun alerjene özgü Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki dengesizliğe bağlı olduğu düşünölmekteydi. Ancak, son zamanlarda alerjinin daha çok alerjene özgü T_{reg} hücreleri ile Th2 hücreleri arasındaki dengesizliğe bağlı olduğu düşünölmektedir. Alerjik olmayan kişiler ile kıyaslandığında alerjik kişilerde IL-4 sekresyonunun sıklığında ve alerjene özgü T hücrelerinin sayısında bir artış varken IL-10 sekresyonunun sıklığında ve alerjene özgü T_{reg} hücrelerinin sayısında bir azalma söz konusudur (87). Alerjik kişilerde alerjene özgü toleransın yokluğunun (ve T_{reg} hücrelerinin kısıtlı gelişiminin) sanayileşmiş ölkelerdeki gelişmiş hijyen şartları ile ilişkili olduğu hipotezi öne sürölmüştür; muhtemelen azalan enfeksiyonlar, sindirim sisteminde kommensal mikrofloradaki değişimler ve toll-benzeri reseptör sinyalleşmesindeki düşüş bundan sorumlu tutulmuştur (88).

2.5.5 Alerjik hastalıklarda alerjene-özgü immünoterapiler

Eğer alerjik hastalık alerjene özgü T_{reg} hücrelerinin yokluğuna bağlı ise etkili alerji tedavileri ile IL-10 gibi sitokinleri üreten T_{reg} hücrelerinin gelişimi indüklenmelidir (89). Her ne kadar rekombinant IL-10' un kendisini kullanan tedaviler iyi tolere edilseler de, IL-10 hem inflamatuvar hem de inflamatuvar olmayan etkilere sahiptir ve farmakolojik bir ajan olarak uygulandığında alerjik hastalığı alevlendirebilir (90). Bu nedenle alerjen immünoterapisi ile alerjene özgü T_{reg} hücreleri aracılığıyla IL-10 üretimi daha etkileyici bir yaklaşımdır ve alerjili hastaları tedavi etme potansiyeline sahiptir. Alerjen immünoterapileri, özel alerjen ekstraktının artan dozlarının subkutan, dil altı ya da burun içi yollardan uygulanmasını içerir ve AR, astım, venom anafilaksisi gibi (91-93) IgE aracılıklı hastalığı olan hastalarda oldukça

etkilidir. Neredeyse bir yüzyıldır kullanılmakta olan geleneksel alerjen desensitizasyon immunoterapisi (92,93) T_{reg} hücrelerinin gelişimini indüklediğinden dolayı da bugün de alerji tedavisinde etkilidir. Bu nedenle başarılı bir alerjen immunoterapisi alerjene özgü Th2 yanıtındaki düşüş ve alerjenle indüklenmiş IL-10 sekrete eden T_{reg} hücrelerinin artışı ile ilişkilidir (94,95).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hasta Seçimi

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilimdalı, İmmünoloji Bilimdalı ve Alerji Birimine 2007-2008 tarihleri ve Nisan-Haziran ayları arasında burun akıntısı, tıkanıklık, hapşırık semptomları ile başvuran ve anamnez, fizik muayene, deri prick testi dahil diğer laboratuvar bulguları ile mevsimsel alerjik rinit (zeytin pozitif) tanısı alan 40 hastanın çalışmaya dahil edilmesi planlandı. Fakat; alınan biyopsi materyalinin yetersiz olması, 1 yıllık immünoterapiyi hastaların tamamlamaması ve 1 yılın sonunda bazı hastalara ulaşılamaması gibi nedenlerden dolayı 24 hasta çalışmayı bitirdi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri: hastanın semptomatik hastalık döneminde olması, deri prick testi ile kanıtlanmış zeytin ağacı polen alerjisi varlığı, araştırma öncesinde immünoterapi uygulanmamış olması olarak kabul edildi. Negatif deri prick testi varlığı ve daha önceden immünoterapi gibi immünomodulator bir tedavi almış olması dışlanma kriteri olarak kabul edildi.

3.2 Kontrol grubu

Başka bir nedenle (septum deviasyonu ya da rinoplasti vb.) nazal operasyon yapılmış endikasyonu bulunan ve deri testi negatif olan non-atopik 20 kişinin kontrol grubuna alınması planlandı fakat 15 adet hasta gruba dahil edilebildi. Operasyon sırasında alınan tanısal amaçlı inferior türbinat biyopsi örneklerinden faydalanıldı.

3.3 Deri Prick Testi

Deri prick testi EAACI rehberine uygun olarak alerji tanısını desteklemek ve sorumlu alerjen ve/veya alerjenleri saptamak için hastaların ön kol iç yüzüne lanset kullanılarak uygulandı. Bu testte ticari olarak elde edilebilen alerjen (çayır otu polenleri: *Hulcus lanatus*, *Lolium perene*, *Fectuca pratensis*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, hububat polenleri: *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Secale cerela*, *Triticum sativum*, yabancı ot polenleri: *Artemisia vulgaris*, *Urtica dioica*, *Taraxacum vulgare*, *Plantago lanceolata*, ağaç poleni: *Olea europaea*, *Fraxinus excelsior*, *Ulmus scabra*, *Alnus glutinosa*, *Quercus robur*, akarlar: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, mantarlar, kedi köpek tüyü) (Allergopharma Joachim Ganzer KG, Reinbek, Almanya) ekstraları kullanıldı (96).

Pozitif kontrol olarak standardize histamin (histamine 1.7 mg/mL) ve negatif kontrol olarak gliserinli salin (9mg NaCl, 4 mg phenole, 563 mg gliserol/mL) (Allergopharma Joachim Ganzer KG, Reinbek, Almanya) kullanıldı. Prick testi, alerjen ve kontrol solüsyon uygulamasından 15 dakika sonra değerlendirildi. Deri prick testlerinin zeytin ağacı polen ekstresi (*Olea europaea*)'nin ve histaminin neden olduğu kabarıklık en az 3 mm veya daha üstünde olan hastalar zeytin ağacı polenine karşı alerjik olarak kabul edildi.

3.4 Alerjik Rinit Semptom Skorlaması

Alerjik rinokonjonktivit semptom skorları, hastaların semptomatik olduğu aktif hastalık döneminde alındı. Rinit için burunda tıkanıklık, kaşıntı, su gibi akıntı, hapşurma şikayetlerinin her biri ayrı ayrı sorgulanarak skorlaması yapıldı ve 0 ile 12 puan arasında değerlendirildi. Semptomatik olmayan mevsimsel alerjik rinit hastaların skoru 0; günde 1 saatten az semptomu olan hastaların skoru 1; günde 1-2 saat semptomu olan hastaların skoru 2; günde 2 saatten fazla semptomu olan hastaların skoru 3 olarak değerlendirilip bu skorların toplamı esas alındı.

3.5 Burun Yıkaması

Burun yıkaması işlemi hastaların her bir nazal kavitesine nazogastrik sonda ile 10 cc serum fizyolojik verilerek yapıldı. Verilen serum fizyolojik tekrar toplanıp 10 cc' lik enjektörde biriktirilerek ELISA yöntemi ile çalışıldı.

3.6 ELISA Yöntemi

Nazal yıkama sıvısı Celal Bayar Üniversitesi Biyokimya Bölümünde ELISA yöntemi ile analiz edilerek IL-10, IL-4, IFN- γ , TGF- β çalışıldı.

a) IL-10 materyal metod; Ray Bio Human IL-10 immunassay kit ile ELISA metodu ile çalışılmıştır. Ray Biotech, Inc. Web: www.raybiotech.com, e-mail: info@raybiotech.com kiti ile çalışılmıştır. Intra-assay varyasyon katsayısı < %10 olarak saptanmıştır. Inter-assay varyasyon katsayısı < %12 olarak saptanmıştır. Kitin sensitivitesi 1 pg/mL' dir.

b) IL-4 materyal metod; Ray Bio Human immunassay kit ile ELISA metodu ile çalışılmıştır. Ray Biotech, Inc. Web: www.raybiotech.com, e-mail: info@raybiotech.com kiti ile çalışılmıştır. Intra-assay varyasyon katsayısı < %10 olarak saptanmıştır. Inter-assay varyasyon katsayısı < %12 olarak saptanmıştır. Kitin sensitivitesi 5 pg/mL' dir.

c) TGF- β materyal metod; Ray Bio Human TGF- β immunassay kit ile ELISA metodu ile çalışılmıştır. Ray Biotech, Inc. Web: www.raybiotech.com, e-mail: info@raybiotech.com kiti ile çalışılmıştır. Intra-assay varyasyon katsayısı < %10 olarak saptanmıştır. Inter-assay varyasyon katsayısı < %12 olarak saptanmıştır. Kitin sensitivitesi 80 pg/mL' dir. ,

d) IFN- γ materyal metod; Ray Bio Human IFN g immunassay kit ile ELISA metodu ile çalışılmıştır. Ray Biotech, Inc. Web: www.raybiotech.com, e mail: info@raybiotech.com kiti ile çalışılmıştır. Intra-assay varyasyon katsayısı < %10 olarak saptanmıştır. Inter-assay varyasyon katsayısı < %12 olarak saptanmıştır. Kitin sensitivitesi 15 pg / mL' dir.

3.7 Rinomanometri

Burun içi hava akımı ve basınç ölçümü rinomanometri cihazı ile yapıldı. Rinomanometri cihazı olarak Betterflow ZAN 100 USB Rhinomanometry (ZAN Ferraris Respiratory, Messgeraete Gmbh, Northern Bavaria, Almanya) kullanıldı. Sistemin içerisinde pre ve post akım nazal basınçları transduser aracılığı ile ölçen ve kaydeden bir sensör bulunmaktadır. Burun deliklerinin birinden hava akımı sağlanırken diğer burun deliğinden nazal basınç ölçümleri yapılmaktadır. Bu sistemde burun içindeki hava akımı ve basınçlar ölçülüp, değerlendirilmekte ve istatistik analiz için bilgisayara kaydedilmektedir.

Hava akımı hem sağ hem de sol burun deliğinden olmak üzere, nazal pasajda 150 Pascal (Pa) basınç altında, saniyede geçen hava akımlarının toplamı olarak rapor edildi.

3.8 Inferior Türbinat Biyopsi

Hastanın omuz hizasındaki ışık kaynağı ve alın aynası ile sağlanan görüş eşliğinde Killian (veya Hartmann) burun spekulumu aracılığında sağa açılı Blakesley-Wile forceps ile punch biyopsi alınması işlemi uygulandı. Biyopsi materyali engel oluşturan bir patoloji olmadığı takdirde sol nazal kaviteden ve alt konka ön ucundan alındı. Biyopsi materyali alındığı sırada nazal mukozanın enfekte ya da enflame olmamasına ve alınan materyalin en az 2 mm derinliğinde olmasına dikkat edildi. Biyopsi işleminden önce hastanın biyopsi uygulanacak olan nazal kaviteye Xylocain (Lidocain HCl %2)' den 2 puff sıkılarak lokal anestezisi yapıldı. Punch biyopsi alınması sonrasında hemostazı sağlamak amacıyla nazal kaviteye Jetokain (Lidokain-Adrenalin) emdirilmiş pamuk tampon yerleştirildi. Hastalar bu işlem sonrasında 5-10 dakika arasında istirahat ettirilerek kanama açısından tekrar kontrol edildi. Hemostaz sağlandığı tespit edildikten sonra hastalar 48 saat boyunca hapşurma, ıkınma, sümürme, öksürme gibi basınç artımına sebep olacak hareketlerden kaçınacağı ve gerekirse soğuk su ile nazal lavaj yapabileceği konusunda bilgilendirilerek işlem sonlandırıldı.

3.9 Işık Mikroskopik Gereç Ve Yöntem

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Bölümünde, nazal biyopsiler parafine gömülerek bloklandı, deparafinize edildikten sonra immunohistokimyasal olarak boyanarak mikroskopik incelemeleri yapıldı.

Parafin Takibi;

- | | |
|-----------------------------|------------|
| 1) Fiksasyon: % 10 formalin | 24-48 saat |
| 2) Akarsuda yıkama | 12-16 saat |

3) %60 etil alkol	30 dk
4) %70 etil alkol	30 dk
5) %80 etil alkol	30 dk
6) %95 etil alkol	30 dk
7) %100 etil alkol I'de	1 saat
8) %100 etil alkol II'de	1 saat
9) Ksilen-alkol'de	30 dk
10) Ksilen I' de	45 dk
11) Ksilen II'de	45 dk
12) Ksilen-parafinde	30 dk
13) 60°C'lik etüvde erimiş parafinde	1 saat
14) Parafin I'de	1 saat
15) Parafin II'de	1 saat bekletildiler.

Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek bloklandı. Işık mikroskopunda incelemek üzere hazırlanan parafin bloklardan 5 mikronluk seri kesitler alındı. Preparatların ilk bölümü histokimyasal yöntemlerle Hematoksilen-Eozin (Surgipath) ile boyandı. Seri kesitlerin diğerlerine ise immünohistokimya boyaması yapıldı.

Histokimyasal boyama için ayrılan preparatlar 60 °C'lik etüvde bir gece deparafinize edildi.

Hematoksilen-Eozin Boyası;

1) Ksilen I	30 dk
2) Ksilen II	30 dk
3) % 95 alkol	2 dk
4) % 80 alkol	2 dk
5) % 70 alkol	2 dk

6) % 60 alkol	2 dk
7) Akar su	5 dk
8) Hematoksilen	3 dk
9) Akarsu	5 dk
10) Asit-alkol	1 sn
11) Akarsu	2 dk
12) Eozin	4 dk
13) % 80 alkol	2 dk
14) % 95 alkol	2 dk
15) Ksilen	30-60 dk
16) Entellan ile kapama	

3.9.1 İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi

Kullanılan Malzemeler:

- Ksilen
- Alkol
- PBS (Fosfat Tampon Solusyonu)
- Tripsin (BioGenex Kat No: EK001-5K, Ca USA)
- Pap-pen (Beckman Coulter Kat No: IM3580 Fransa)
- % 3 Hidrojen Peroksidaz (DBS Kat No: K033 Pleasanton-CA)
- Bloking solüsyonu (Zymed Kat No:85-9043 USA)
- Primer Antikor T-bet (sc-21003,Santa Cruz Biotechnolog, Ca USA)
- Primer Antikor FoxP3 (sc-56680,Santa Cruz Biotechnolog, Ca USA)
- Primer Antikor Gata3 (sc-268,Santa Cruz Biotechnolog, Ca USA)

- Sekonder Antikor Kit (Zymed Histostain- Plus Broad Spectrum Kat No:85-9943 South San Francisco)
- DAB (Kat. No: 1718096 Roche Indianapolis USA)
- Mayers Hematoksilen (JTBaker Kat No:2810 Holland)
- Entellan (Surgipath Kat No: 16125 USA)

Boyama Yöntemi

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanacak preparatlar 60°C' lik etüvde bir gece bekletilip deparafinizasyon yapıldıktan sonra boyama başlatıldı.

- 1) Ksilen 30 dk
- 2) Ksilen 30 dk
- 3) % 95 alkol 2 dk
- 4) % 80 alkol 2 dk
- 5) % 70 alkol 2 dk
- 6) % 60 alkol 2 dk
- 7) Kesitlere tripsin konarak 37 °C' de 10 dakika inkübe edildi.
- 8) Distile su 5 dk
- 9) Distile sudan alınan kesitlerin doku etrafındaki su silinip, Dakopenle çevresine daire çizildi. Bu işlem dokuların kurummasını engellemek ve uygulanacak maddelerin lam üzerinde dağılmasını engellemek amacıyla yapıldı. Üzerine PBS damlatıldı.
- 10) PBS' le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 11) % 3' lük Hidrojen Peroksidaz' da 5 dakika tutuldu.
- 12) PBS' le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 13) Bloking solüsyonu damlatıldı, 1 saat bekletildi.
- 14) Dokulara primer antikor damlatıldı 1 saat bekletildi. (Bizim çalışmamızda primer olarak T-bet, FoxP3, GATA-3 kullanıldı)

- 15) PBS' le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 16) Biotinlenmiş sekonder antikor uygulandı 30 dk boyunca.
- 17) PBS' le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 18) Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biotin kompleksi (streptavidin) 30 dk uygulandı.
- 19) PBS' le yıkama gerçekleştirildi (3×5 dk).
- 20) DAB boyaması yapıldı 3 dk.
- 21) Distile su ile yıkandı.
- 22) Mayers hematoksilen ile zıt boyama. 1-2 dk.
- 23) Distile su ile yıkandı.
- 24) % 80 etil alkol 2 dk.
- 25) % 90 etil alkol 2 dk.
- 26) Ksilen 30 dk.
- 27) Entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan preparatlar, boyanma derecelerine göre kuvvetli (+++), orta (++) ve zayıf (+), belirsiz-varyok (±) diye tanımlandı. Preparatlar ışık mikroskobu ile iki histolog tarafından değerlendirildi.

3.10 Polen Sayımı

Aeropalinojide havadaki polen yoğunluğunu ve polen cinsini saptamak için gravimetrik ve volumetrik olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Bu çalışmamızda ucuz, basit ve kullanışlı olduğundan gravimetrik yöntem tercih edilmiştir.

Gravimetrik yöntem, yerçekimi etkisiyle cm^{21} e düşen polen miktarını belirlemeye yarayan bir yöntemdir. Durham aracı kullanılarak yapılan bu

yöntemde havadaki polenler genelde günlük veya haftalık olarak toplanır. Durham aracı Manisa il merkezinde bulunan iki farklı park alanına yerleştirilmiştir. Araştırmamızda Manisa ilindeki polenler Mart 2007 – Temmuz 2007 ve Mart 2008 – Temmuz 2008 tarihleri arasındaki sürede, haftalık toplanmış ve sayımları yapılmıştır.

3.11 İstatistiksel Analiz

Çalışmaya katılan tüm hastalarımızdan onam formları alındı. İstatistikler için Statistical Package for Social Sciences Version (SPSS) 11.0 programı kullanılmıştır. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası vakalarının sonuçları, kontrol grubu vakalarının sonuçları gruplar arasında Mann-Whitney testi kullanılarak; tedavi öncesi ve tedavi sonrası hastalarımızın değerleri grup içinde Independent Samples T test kullanılarak yapıldı.

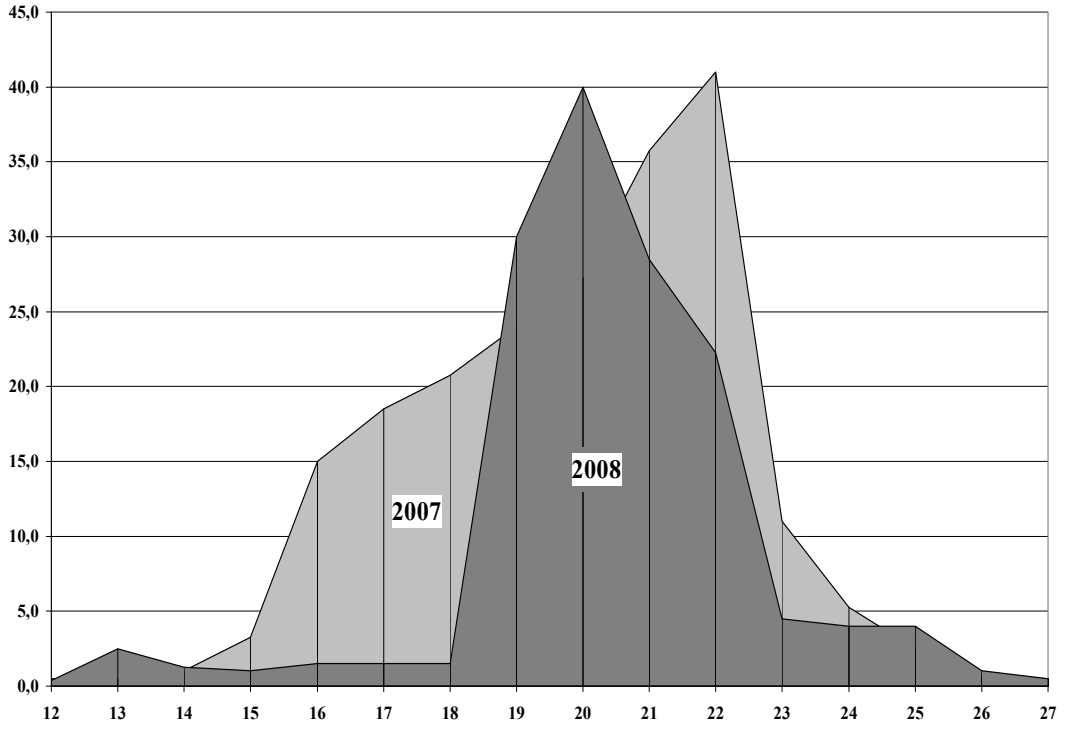
4 BULGULAR

Çalışmamıza İç Hastalıkları Alerji - İmmunoloji Polikliniği' ne başvuran AR tanısı almış 19' u kadın (% 79.1), 5' i erkek (% 20.8), yaş ortalamaları 35.5 ± 12 olan toplam 24 hasta alınmıştır. Kontrol grubu olarak 8' i kadın (% 53.3), 7' si erkek (% 46.6) yaş ortalaması 29 ± 10 arasında değişen toplam 15 kişi çalışmaya dahil edilmiştir.

	Hasta grubu	Kontrol grubu
Vaka sayısı (n)	24	15
Erkek	5	7
Kadın	19	8
Yaş ortalaması (mean \pm SD)	35.5 ± 12	29 ± 10

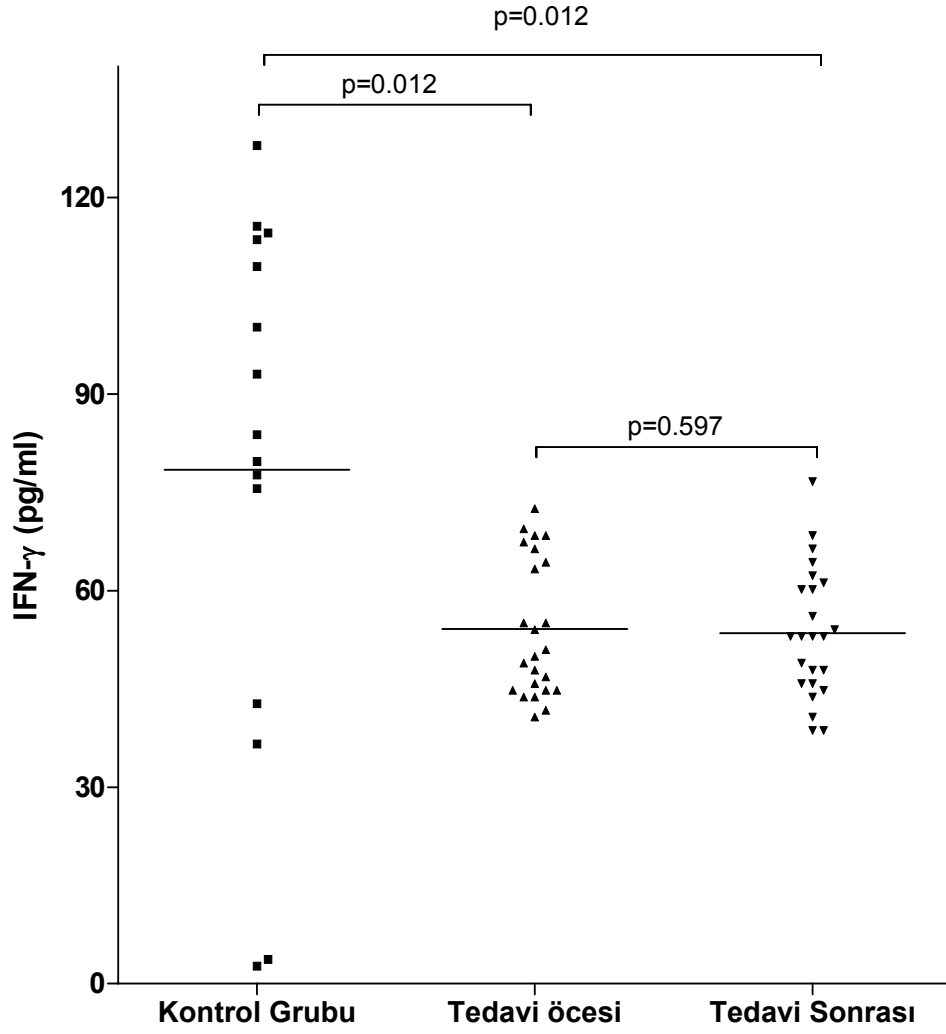
Tablo 1. Demografik verilerimiz.

Çalışmamızda; polenler, Manisa ili çevresinde Mart 2007 – Temmuz 2007 ve Mart 2008 – Temmuz 2008 tarihleri arasındaki sürede, haftalık olarak toplanmış ve sayımları yapılmıştır. Mart ayında başlayan polenizasyon Nisan, Mayıs, Haziran aylarında gittikçe artarak pik yapmış ve Haziran ayı sonu ve Temmuz ayı başında polenizasyonda azalma gözlenmiştir (Şekil 5).



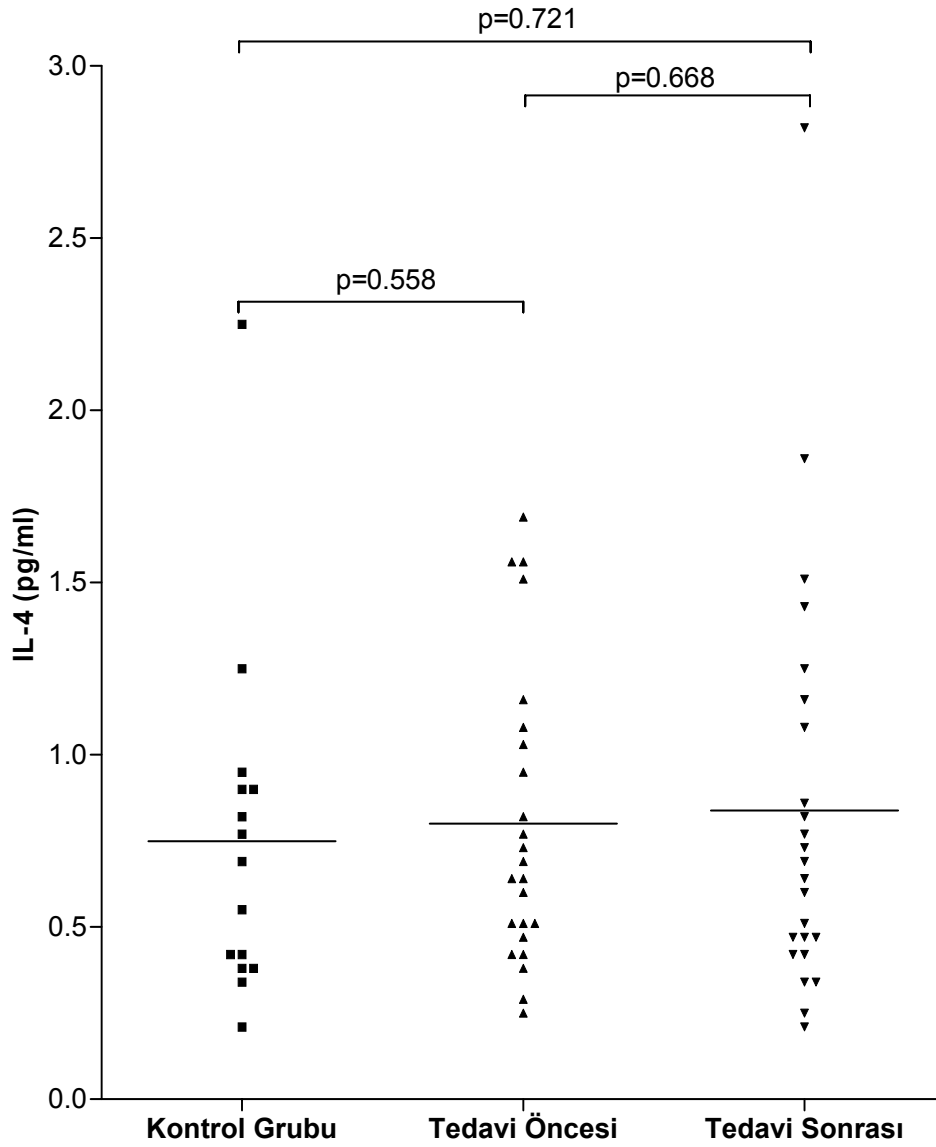
Şekil 5. Manisa ili Mart-Temmuz 2007 ve Mart-Temmuz 2008 haftalık polen sayımı

Hasta grubumuzdaki vakalarımız ve kontrol grubu vakalarımız zeytin polen sezonu döneminde değerlendirildi. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası dönemlerinde olmak üzere hastalarımızdan ve kontrol grubumuzdan nazal yıkama sıvıları toplanarak IFN γ , IL-4, IL-10, TGF- β çalışıldı.



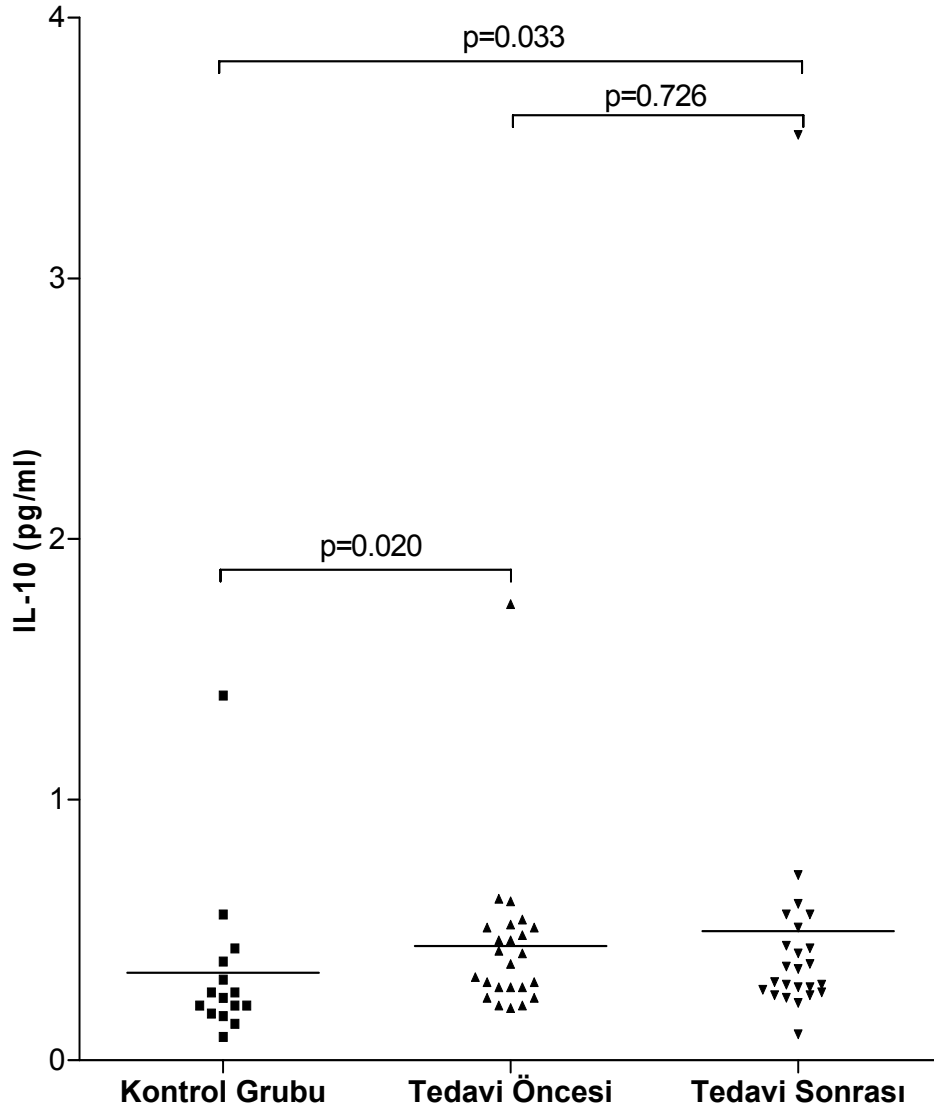
Grafik 1: IFN- γ değerlerinin kontrol grubu ve tedavi öncesi, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, kontrol grubu ve tedavi sonrası karşılaştırılması

IFN- γ değerleri; tedavi öncesi dönemde kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman AR' li hastalarda anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0.012$). IFN- γ değerleri tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.597$). Tedavi sonrası, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman IFN- γ değerleri anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0.012$).



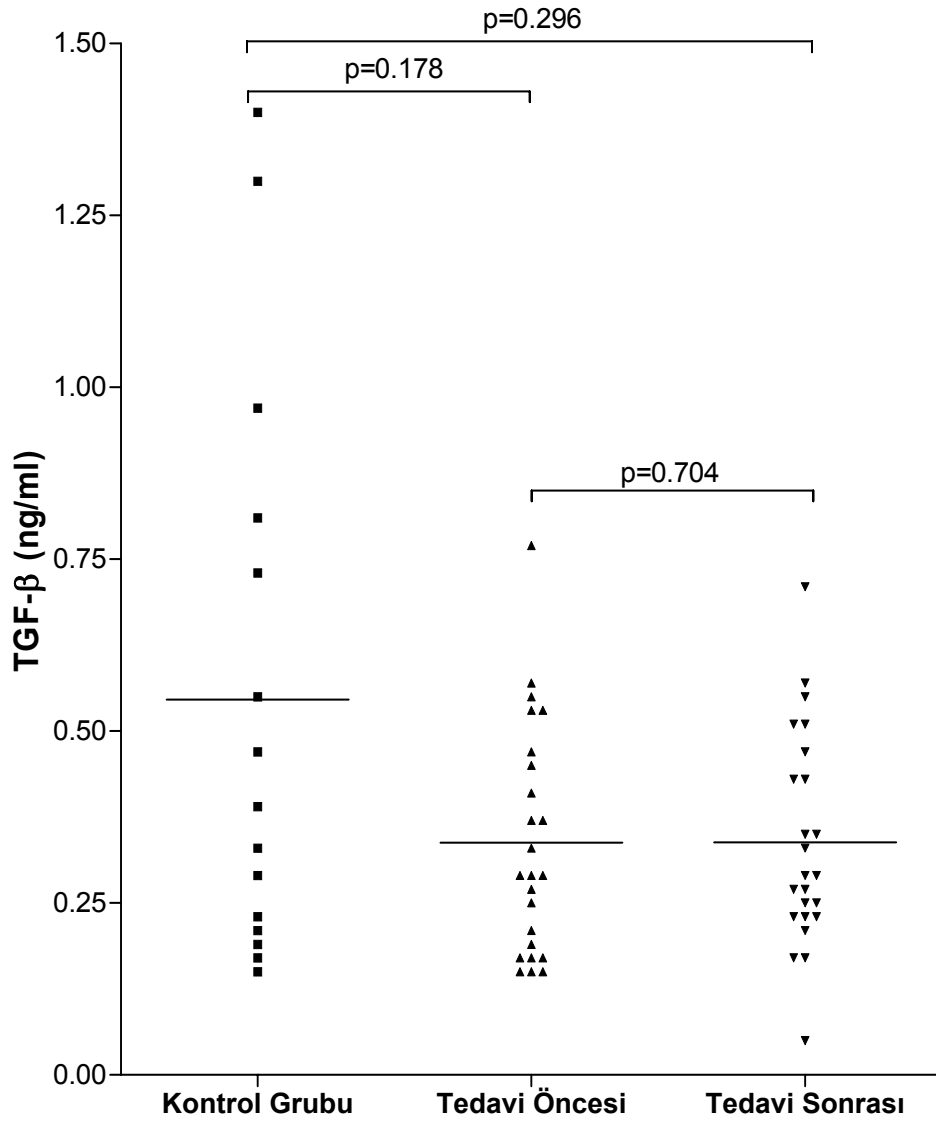
Grafik 2. IL-4 değerlerinin kontrol grubu ve tedavi öncesi, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, kontrol grubu ve tedavi sonrası karşılaştırılması

IL-4 değerleri tedavi öncesi ve kontrol grubu, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, tedavi sonrası ve kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla; p=0.558, p=0.668, p=0.721)



Grafik 3. IL-10 değerlerinin kontrol grubu ve tedavi öncesi, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, kontrol grubu ve tedavi sonrası karşılaştırılması

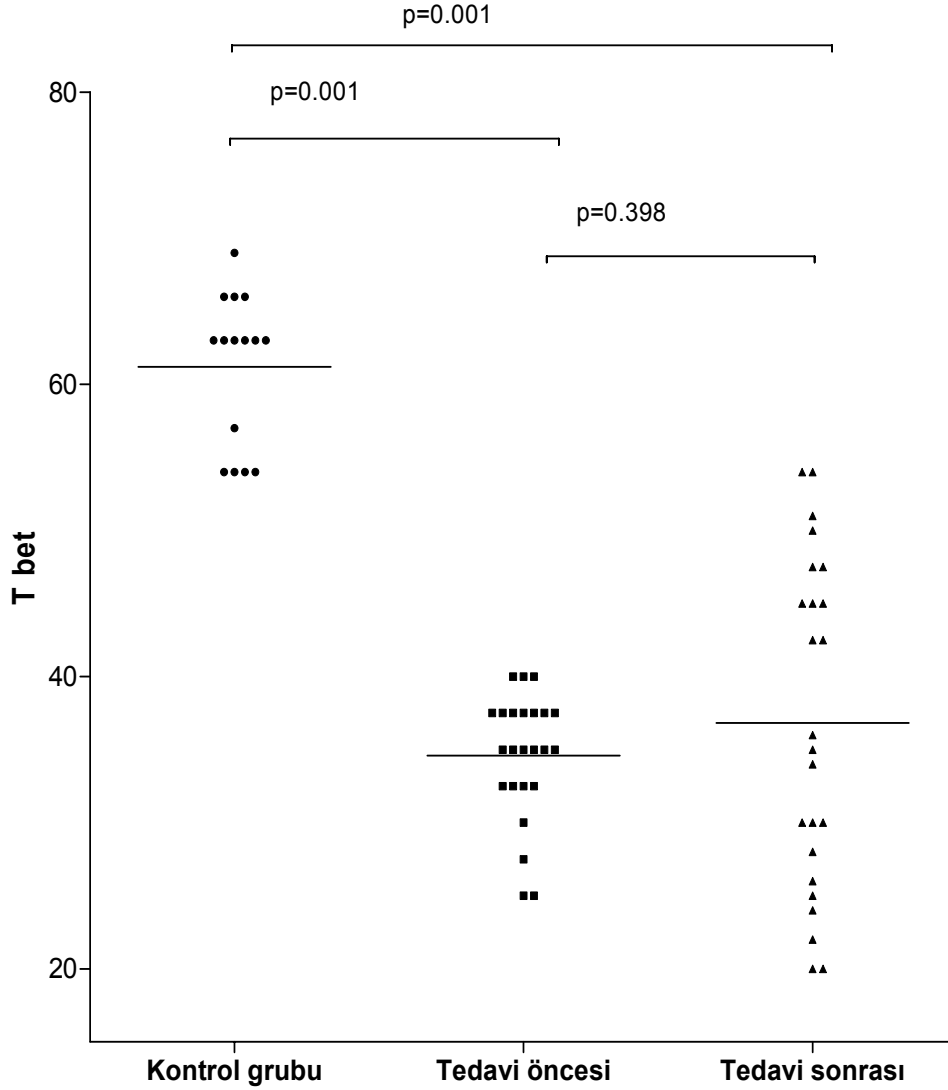
IL-10 değerleri tedavi öncesinde kontrol grubu vakalarının değerlerinden anlamlı ölçüde yüksek saptandı ($p=0.020$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p=0.726$). Tedavi sonrası IL-10 değerlerinin de kontrol grubu değerlerinden anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0.033$).



Grafik 4. TGF- β değerlerinin kontrol grubu ve tedavi öncesi, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, kontrol grubu ve tedavi sonrası karşılaştırılması

Tedavi öncesindeki TGF- β değerlerinin kontrol grubu vakalarındaki değerlerden istatistiksel anlamlılık olmasa da düşük olduğu saptanmıştır ($p=0.178$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.704$). Tedavi sonrasında da istatistiksel anlam ifade etmese de TGF- β değerlerinin kontrol grubu vakalarından düşük olduğu izlenmiştir ($p=0.296$).

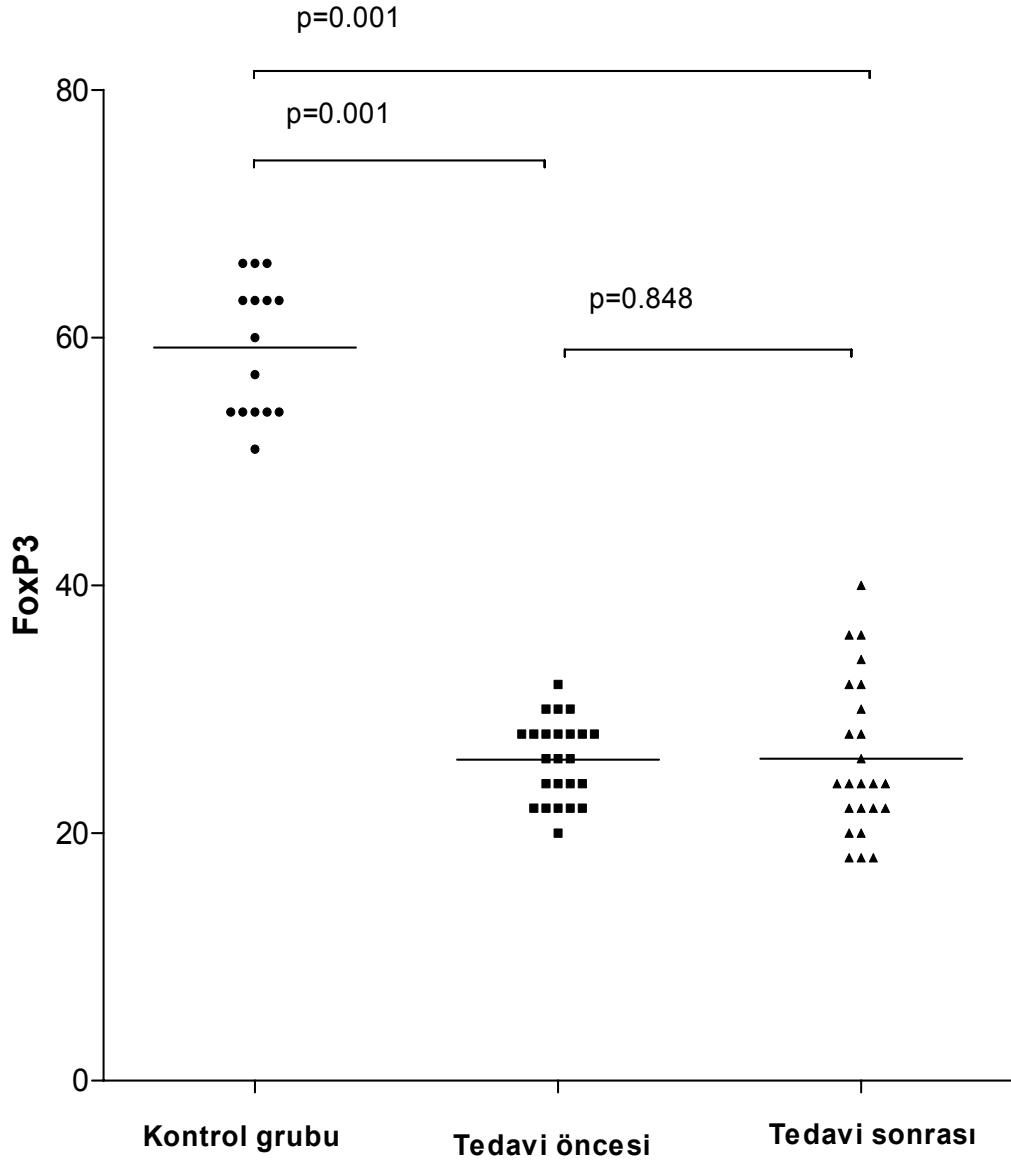
Tedavi öncesi ve tedavi sonrası dönemlerinde olmak üzere hastalarımızdan ve kontrol grubumuzdan nazal biyopsi materyalleri alınarak T-bet, FoxP3, GATA 3 çalışıldı.



Grafik 5. T-bet değerlerinin kontrol grubu ve tedavi öncesi, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, kontrol grubu ve tedavi sonrası karşılaştırılması

T-bet değerlerinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptanmıştır

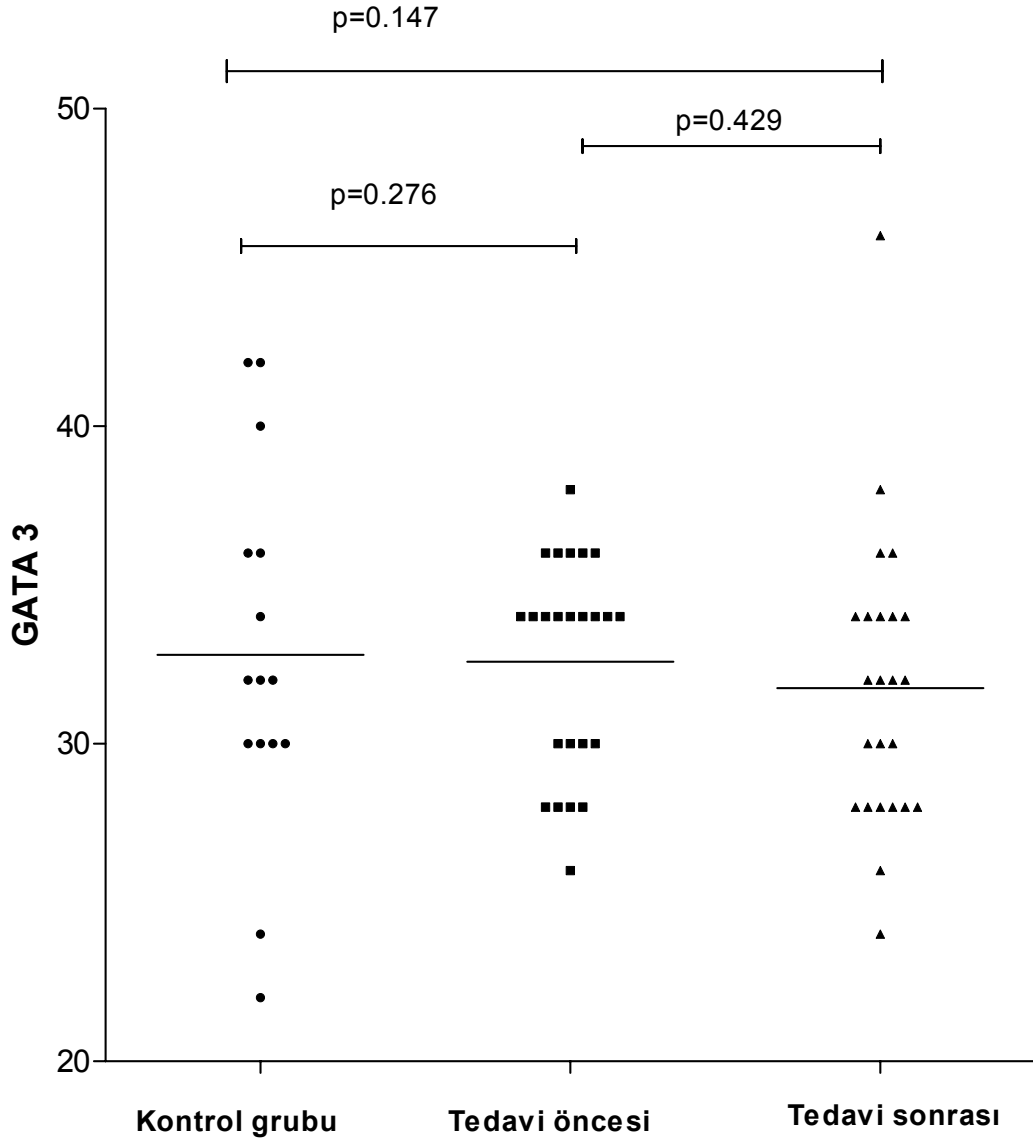
($p=0.001$). Tedavi sonrası değerlerinde tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış saptanmıştır ($p=0.398$).



Grafik 6. FoxP3 değerlerinin kontrol grubu ve tedavi öncesi, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, kontrol grubu ve tedavi sonrası karşılaştırılması

FoxP3 değerlerinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası dönemlerde kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı düşüklük saptanmıştır

(p=0.001). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.848).



Grafik 7. GATA-3 değerlerinin kontrol grubu ve tedavi öncesi, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, kontrol grubu ve tedavi sonrası karşılaştırılması

GATA-3 değerlerinde tedavi öncesi, tedavi sonrası dönemlerde kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır

($p=0.276$, $p=0.147$). Ancak tedavi sonrası dönemde istatistiksel anlamlı bir fark olmasa da tedavi öncesi döneme göre düşüklük saptanmıştır ($p=0.429$).

5 TARTIŞMA

AR, genetik olarak atopik olan bireylerde özellikle solunumsal alerjenlere maruziyet sonrası ortaya çıkan duyarlanma periyodu ardından tekrar maruziyetle oluşan nazal mukozanın inflamasyonu ile karakterize bir hastalıktır (97). Hastalık, giderek artan sıklığını özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülke popülasyonunda göstermektedir (6-14). Ülkemiz de gelişmekte olan ülkeler için de yer almakta olup, alerjik hastalık insidansında son yıllarda artış gözlenmektedir (15-33). Bu sebeple ülkemiz için önemli bir sağlık sorunu olan bu hastalık için immünoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak artan sayıda çalışma yapılmaktadır. Biz de çalışmamızda bu hastalığın patogenezinde rol oynayan hücreler ve onların ürünleri olan sitokinlerin düzeylerini nazal mukozal yüzeyde göstermeyi amaçladık. Bu hastalarda küratif tedavi adayı olan alerjen spesifik immünoterapinin yukarıda bahsi geçen hücre ve ürünlerinde meydana getirdiği değişiklikleri gözlemleyerek; bu tedavinin etki mekanizmaları hakkında bilgi sahibi olmayı hedefledik.

Hasta ve kontrol grubu vakalarımızın demografik verileri arasında bir tek kadın hasta sayısının kontrollerden fazla olması dışında bir fark yoktu. Bu da değerlendirdiğimiz parametreler açısından göz ardı edilebilecek bir durum olarak görülmektedir (Tablo 1).

Yaşadığımız bölge olan Ege Bölgesi' nde AR' e en fazla sebep olan alerjenlerden birinin zeytin poleni olmasından dolayı (34-36) çalışmamıza AR semptomları olan ve deri prick testinde zeytin polen duyarlılığı saptanan hastalar dahil edildi. Literatürde zeytin polenizasyon sezonu Mayıs başı Haziran sonu olarak belirtilse de (36) Manisa bölgesinde polenizasyon dönemi Mart ayı ortasından Haziran ayı ortasına kadar sürmektedir (98). Bizim çalışmamızda Manisa ilinde polen sayımı Mart-Temmuz ayları arasında haftalık olarak yapıldı. Nisan, Mayıs, Haziran aylarında

polenizasyonun pik yaptığı, Temmuz başında giderek azaldığı saptandı (Şekil 5). Bölgemizde yapılan daha önceki bir çalışmada da zeytin poleni duyarlı solunumsal alerjisi olan vakalarda polenizasyon dönemi dışına taşan alerjik semptomlar gözlenebildiği bildirilmiştir. Çalışmamız sonucunda 2007 ve 2008 yılları karşılaştırıldığında zeytin polenizasyonu zamanı ve yoğunluğu açısından fark saptanmaması, dışsal alerjen kaynağı açısından çalışmamıza etki edebilecek olan bir faktörün olmadığını göstermiştir. Hasta grubumuzda tedavi öncesi ve tedavi sonrası çalışma örnekleri aynı sezon döneminde alındığı için alerjen uyaranları değişmemiş gözükmektedir.

Çalışmamız sonucunda yoğun alerji semptomlarının olduğu dönemlerde tedavi öncesi ve tedavi sonrası grubumuzda, (T_{reg} göstergesi olan sitokinlerden) TGF- β' nin ve (T_{reg} transkripsiyon faktörü olan) FoxP3 ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük değerlerde olduğu saptandı (Grafik 4-Grafik 6-Resim 3). Bu durum Akdiş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada saptanan, alerjik kişilerde alerjene özgü T_{reg} hücre sayısında azalma ile uyumlu bulunmuştur (87) . Ancak 1 yıllık immunoterapi sonrasında, aynı gruplar arasında TGF- β , FoxP3 değerlerinde anlamlı bir yükselme saptanmazken, IL-10 değerlerinde anlamlı yükseklik saptanmıştır (Grafik 3-Resim 4). Aslında alerjen spesifik immunoterapi sonrasında alerjenle indüklenmiş IL-10 sekrete eden T_{reg} hücre sayılarında artış beklenmektedir (94,95); Ancak bu artış 1 yıllık immünoterapi uygulaması sonucunda pek olası değildir (99). Bu tür bir değişimin oluşması içim immünoterapi alan vakalarının 2.-3. yıllarını değerlendirmek gerekmektedir (100). Bizim çalışmamız 1 yıllık immünoterapi vakalarının değişimlerini gözlemlediği için bu tür bir değişimin şimdiden meydana gelmemiş olması sürpriz değildir.

Th2 yanıtı göstergesi olan IL-4 tedavi öncesi, tedavi sonrası, kontrol grubu karşılaştırılmasında anlamlı fark göstermezken transkripsiyon faktörü olan GATA-3 (101), tedavi sonrası gruplarında istatistiksel anlamlı olmasa da tedavi öncesine göre düşük değerlerde saptandı (Grafik 2-Grafik 7-Resim 5). Literatürde, alerjik olmayan kişiler ile karşılaştırıldığı zaman alerjik bireylerde IL-4 sekresyonunda (87) ve nazal biyopsi spesimenlerinde GATA-3

ekspresyonunda (101) artış saptanmaktadır. Oysa bizim çalışmamızda IL-4 değerinde ve GATA-3 değerlerinde tedavi öncesi dönemde söz konusu bu yükseklik saptanmamıştır. IL-4 son derece düşük düzeylerde bile etkili olabilen bir sitokin olduğu için (87) bizim kısıtlı sayıdaki hastamızdan elde ettiğimiz düzey farklılıkları anlam ifade etmemiş olabilir. GATA-3 değerlerinde tedavi sonrasında ise tedavi öncesine göre anlamlı azalma tespit edilmiştir (Resim 6). Bu durum alerjen immunoterapi ile baskın olan Th2 yanıtının azalması ile ilişkilidir (94,95).

Th1 yanıtı göstergesi olan IFN- γ (101) ve transkripsiyon faktörü olan T bet (101) değerleri; tedavi öncesi ve tedavi sonrası grubumuzda kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman anlamlı olarak düşük bulundu (Grafik 1-Grafik 5). Bu durum alerjik rinitli hastalarda azalmış Th1 yanıtı ile uyumludur (102). IFN- γ değerlerinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırılmasında anlamlı bir fark saptanamazken T-bet değerlerinde tedavi sonrasında tedavi öncesi döneme göre bir artış saptandı (Resim 7-8). Burada ortaya çıkan transkripsiyon faktörü değişikliğine eşlik edemeyen bir IFN- γ düzeyi mevcuttur. IFN- γ esas kaynağı Th1 hücreler gibi gözükse de, hem makrofajlar hem de doğal öldürücü hücreler gibi hücreler de bu sitokini sekrete etmektedir. Alerjen spesifik immünoterapi sonucunda nazal mukozal antijen sunan hücrelerin (Makrofaj gibi) ve doğal öldürücü hücrelerinin azaldığını gösteren çalışmalar vardır (103). Bu nedenle aslında hem başlangıçtaki hem de tedavi sonrası IFN- γ ' nın kaynağının yalnız Th1 tipi hücreler olmadığı, transkripsiyon faktörü artışına rağmen IFN- γ düzeyinin artmaması bu değişikliklere bağlanabilir. Alerjen spesifik immünoterapi ile amaç Th1 yanıtının baskınlığını arttırmaktır (104). Bizim çalışmamızda da immünoterapi sonucunda elde edilen Th1 tipi sitokinlerin transkripsiyon faktörü artışı bu çalışmalar ışığında beklenen bir sonuçtur.

Alerjik riniti olan hastalarımızda alerjik dönemde düşük değerlerde olmasını beklediğimiz Th1 ve T_{reg} sitokin ve transkripsiyon faktörlerinde düşüklük saptadık. Yüksek değerlerde olmasını beklediğimiz Th2 sitokin değerlerinin kontrollerden farklı olmadığını ancak transkripsiyon faktörlerinde

yükseklik olduğunu saptadık. Ancak alerjen spesifik immünoterapi sonrasında hastalarımızda klinik açıdan iyileşme saptarken, sitokin paterni ve transkripsiyon faktörleri açısından incelediğimiz zaman uzun süreli immünoterapilerin sonuçlarını gözlemek açısından erken bir zamanda olduğumuzu gördük.

Literatürlerde 5 yıllık immunoterapi süreci sonrasında gerek sitokin gerek transkripsiyonel faktörleri ile Th1, Treg, Th2 hücrelerinin değişimi hakkında çalışma bulunmamaktadır. İlerleyen zamanlarda bu konu ile ilgili yapılacak çalışmalar alerjik hastalıkların tedavisine ışık tutacaktır.

6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda AR patogenezinde rol oynayan hücreler ve onların ürünleri olan sitokinlerin düzeylerini nazal mukozada göstermek ve alerjen spesifik immünoterapi sonrasında bu ürünlerin değişimini göstermeyi amaçladık.

Bu çalışmada Manisa ilinde haftalık polenizasyon sayımı yapıldı. Şehrimizde Mart ayında başlayan polenizasyonun Nisan, Mayıs, Haziran aylarında gittikçe artarak pik yaptığı ve Haziran ayı sonu, Temmuz ayı başında giderek azaldığı gözlemlendi.

Nazal yıkama materyallerinde ELISA yöntemi ile IFN- γ , IL-4, IL-10, T-bet sitokinleri çalışıldı. IFN- γ değerleri; tedavi öncesi dönemde kontrol grubuna göre anlamlı düşük saptanırken ($p=0.012$), tedavi sonrası dönemde anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.597$). Tedavi sonrası, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman IFN- γ değerleri anlamlı olarak düşük saptandı ($p=0.012$).

IL-4 değerleri tedavi öncesi ve kontrol grubu, tedavi öncesi ve tedavi sonrası, tedavi sonrası ve kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla; $p=0.558$, $p=0.668$, $p=0.721$)

IL-10 değerleri tedavi öncesi dönemde kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek saptandı ($p=0.020$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası IL-10 düzeyleri karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0.726$). Tedavi sonrası IL-10 değerlerinde kontrol grubu değerlerine göre anlamlı ölçüde yükseklik olduğu saptandı ($p=0.033$).

Tedavi öncesindeki TGF- β değerlerinin kontrol grubu vakalarındaki değerlerden istatistiksel anlamlılık olmasa da düşük olduğu ($p=0.178$), tedavi öncesi ve tedavi sonrası değerleri arasında ise anlamlı bir fark olmadığı

saptanmıştır (p=0.704). Tedavi sonrasında da istatistiksel anlam ifade etmese de TGF- β değerlerinin kontrol grubu vakalarından düşük olduğu izlenmiştir (p=0.296).

T-bet değerlerinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptanırken (p=0.001), tedavi sonrası değerlerinde tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış saptanmıştır (p=0.398).

FoxP3 değerlerinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası dönemlerde kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı düşüklük saptanmıştır (p=0.001). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.848).

GATA-3 değerlerinde tedavi öncesi, tedavi sonrası dönemlerde kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.276, p=0.147). Ancak tedavi sonrası dönemde istatistiksel anlamlı bir fark olmasa da tedavi öncesi döneme göre düşüklük saptanmıştır. (p=0.429).

Spesifik alerjen immünoterapisi AR hastalarında esas tedavi yöntemidir. Başarılı bir alerjen immünoterapisi alerjene özgü Th2 yanıtındaki düşüş ve alerjenle indüklenmiş IL-10 sekrete eden T_{reg} hücrelerinin artışı ile ilişkilidir. Bizim çalışmamızda alerjen spesifik immünoterapinin 1 yılının sonunda hastalarımızda klinik açıdan iyileşme saptarken sitokin paterni ve transkripsiyon faktörleri açısından henüz 1 yıllık sürenin yeterli olmadığını saptadık. Bu konu ile ilgili daha uzun süreli çalışmaların yapılması veriler açısından daha sağlıklı bilgilerin elimize geçmesini sağlayacaktır.

7 ÖZET

Alerjik Rinitte Reglatuvar T Hücrelerin Rolü

Alerjik Rinit (AR); nazal mukozanın inflamasyonu sonucu ortaya çıkan bir tablodur. Biz çalışmamızda bu hastalık patogenezinde rol oynayan hücreler ve onların ürünleri olan sitokinlerin düzeylerini nazal mukozada göstermek ve alerjen spesifik immünoterapi sonrasında bu ürünlerin değişimini göstermeyi amaçladık.

Bu çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilimdalı, İmmünoloji Bilimdalı ve Alerji Birimine 2007-2008 tarihleri ve Mart-Temmuz ayları arasında başvuran klinik ve deri testi ile zeytin pozitif alerjik rinit tanısı alan 24 hasta dahil edildi. Kontrol grubu olarak da herhangi bir nedenden dolayı opere edilecek olan klinik ve deri testi ile non-atopik 15 kişi çalışmaya alındı. Her hastaya tedavi öncesi ve 1 yıllık immünoterapi sonrasında deri prick testi, semptom skorlaması, rinomanometre ile nazal hava akımı ölçümü, nazal yıkama ve nazal biyopsi uygulandı. Kontrol grubuna ise deri prick testi, nazal yıkama ve nazal biyopsi uygulandı. Nazal yıkama materyalleri ELISA yöntemi ile ve nazal biyopsi materyalleri immünohistokimyasal yöntemle incelendi. 2007-2008 yılları ve Mart-Temmuz ayları arasında Manisa ilinde Durham aracı ile haftalık polen sayımı yapıldı.

Çalışmamıza İç Hastalıkları Alerji-İmmünoloji Polikliniği' ne başvuran AR tanısı almış 19' u kadın (% 79.1), 5' i erkek (% 20.8), yaş ortalamaları 35.5 ± 12 olan toplam 24 hasta alındı. Kontrol grubu olarak 8' i kadın (% 53.3), 7' si erkek (% 46.6) yaş ortalaması 29 ± 10 arasında değişen toplam 15 kişi çalışmaya dahil edildi. Manisa ilinde Nisan, Mayıs, Haziran aylarında

polenizasyonun pik yaptığı, Temmuz başında giderek azaldığı saptandı. Tedavi öncesi grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman TGF- β , FoxP3, IFN- γ , T-bet değerlerinde düşüklük, IL-10 değerinde yükseklik saptanırken, GATA-3, IL-4 değerinde anlamlı bir fark saptamadık. Tedavi sonrası grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman ise TGF- β , FoxP3, IFN- γ değerlerinde anlamlı düşüklük saptanırken IL-10 değerlerinde anlamlı artış saptandı. IL-4, GATA-3 değerlerinde anlamlı fark saptanmadı.

Alerjen spesifik immünoterapi sonrasında hastalarımızda klinik açıdan iyileşme gözlemlenmemize rağmen, sitokin paterni ve transkripsiyon faktörleri açısından incelediğimiz zaman uzun süreli immünoterapi sonuçlarını gözlemek açısından erken bir zamanda olduğumuzu saptadık.

Anahtar kelimeler: IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β , FoxP3, T-bet, GATA-3, alerjen spesifik immünoterapi.

8 SUMMARY

Role of Regulatory T cells in Allergic Rhinitis

Allergic Rhinitis (AR) is a disease which is characterized by nasal mucosal inflammation. In this study, we aimed to observe the cells involved in the pathogenesis of the disease, levels of the cytokines, products of these cells. We also sight the nasal mucosal inflammatory cells and cytokines changes during allergen specific immunotherapy.

Twenty-four patients applying to Celal Bayar University, Medical Faculty, Department of Internal Medicine, Division of Immunology and diagnosed with olive positive allergic rhinitis by clinical and skin test findings between March and June in 2007-2008 were included in the present study. Fifteen patients to be operated for any reason and found to be non-atopic by clinical and skin test findings were included as control group. Skin prick test, symptom scoring, measurement of nasal airway flow by rhinomanometry, nasal lavage and nasal biopsy were performed before treatment and during one year immunotherapy in each patient. Skin prick test, nasal lavage and nasal biopsy were also performed in the control group. Nasal lavage cytokine contains were studied by ELISA method and nasal biopsy materials were studied by immunohistochemical method. A weekly pollen count was carried out in Manisa by Durham apparatus between March and July in 2007-2008.

Twenty-four patients (mean age 35.5 ± 12 years) applying to Internal Diseases Allergy-Immunology Out-patient Clinic were included in our study, and 19 (79.1 %) of these patients were female and 5 (20.8%) were male. Fifteen patients, including 8 females (53.3 %) and 7 male (46.6 %), with a

mean age of 29 ± 10 years were included in the study as the control group. Pollenization was found to be at peak level in April, May and June and start to decrease gradually at the beginning of July in Manisa. In the patient group, when compared with the control group before treatment, TGF- β , FoxP3, IFN- γ , T-bet values were found to be lower and IL-10 value was found to be higher, while there was no significant difference in GATA-3, IL-4 values. When the patient group was compared with the control group after treatment, there was a significant decrease in TGF- β , FoxP3, IFN- γ values and IL-10 values were significantly increased. No significant difference was found in IL-4 and GATA-3 values.

Although we did not observe any improvement in our patients during allergen-specific immunotherapy, we examined cytokine pattern and transcription factors and found that we were at an early stage to observe long term immunotherapy results.

Key words: IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β , FoxP3, T-bet, GATA-3, allergen-specific immunotherapy.

9 KISALTMALAR

AR- Alerjik Rinit

ARIA- Alerjik Rinit ve Astım Üzerine Etkisi

CysLTs- Sisteinil Lökotrien

ECP- Eozinofil katyonik protein

GM-CSF- Granulosit-Makrofaj koloni stimulan faktör

IL-2- İnterlökin 2

IL-4- İnterlökin 4

IL-5- İnterlökin 5

IL-6- İnterlökin 6

IL-10- İnterlökin 10

IFN- γ - İnterferon gama

Ig E- İmmunglobulin E

MBP- Major bazik protein

PAF- Platelet aktivatör faktör

PG- Prostoglandin

Th2- T helper 2

Th1- T helper 1

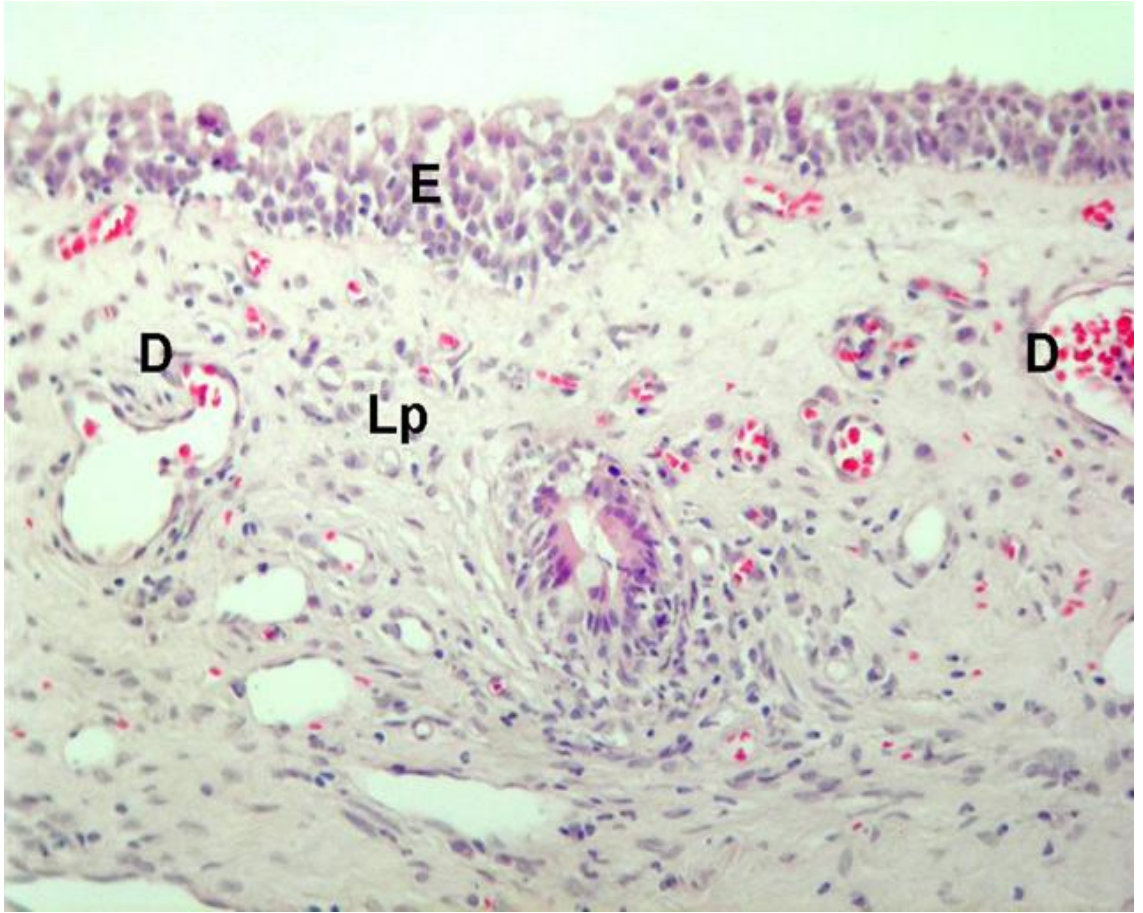
T_{reg}- T regulatuar

TGF- β - Transformig growth faktör beta

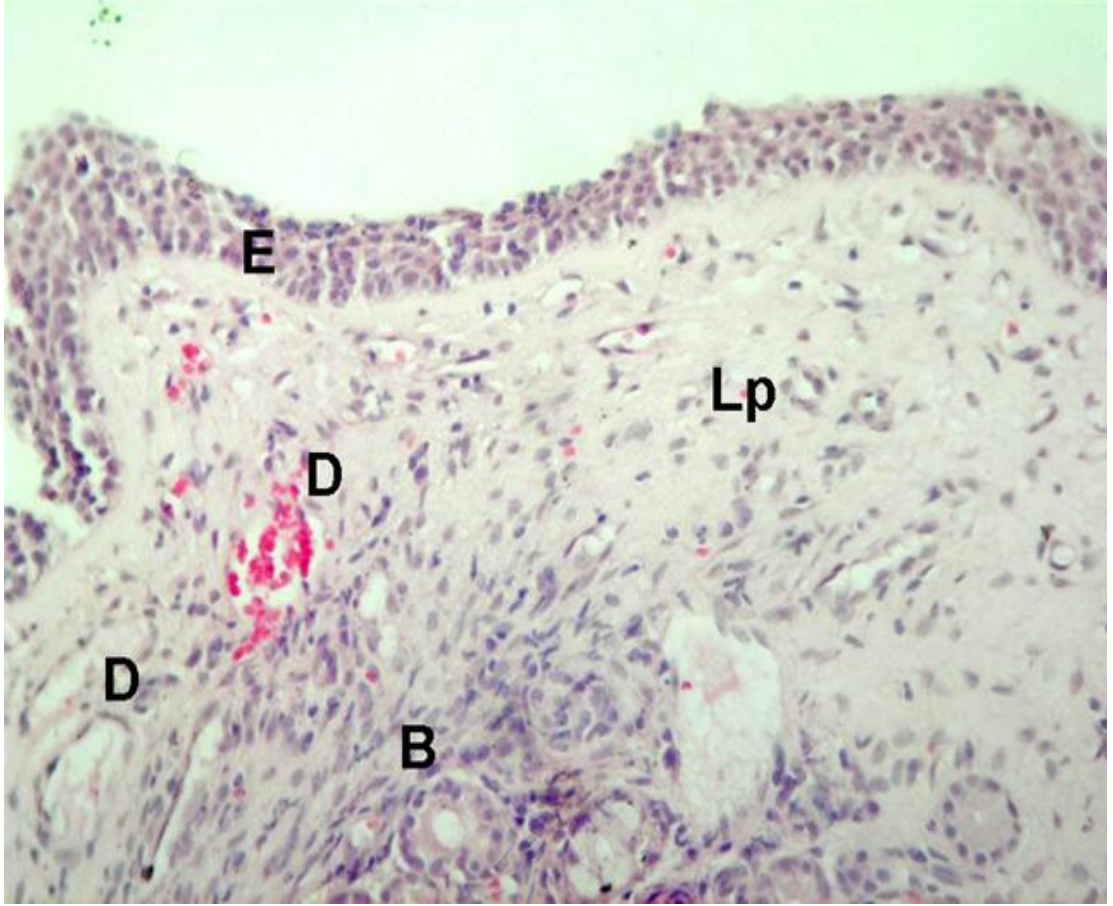
TNF- α - Tümör nekrozan faktör alfa

10 EKLER

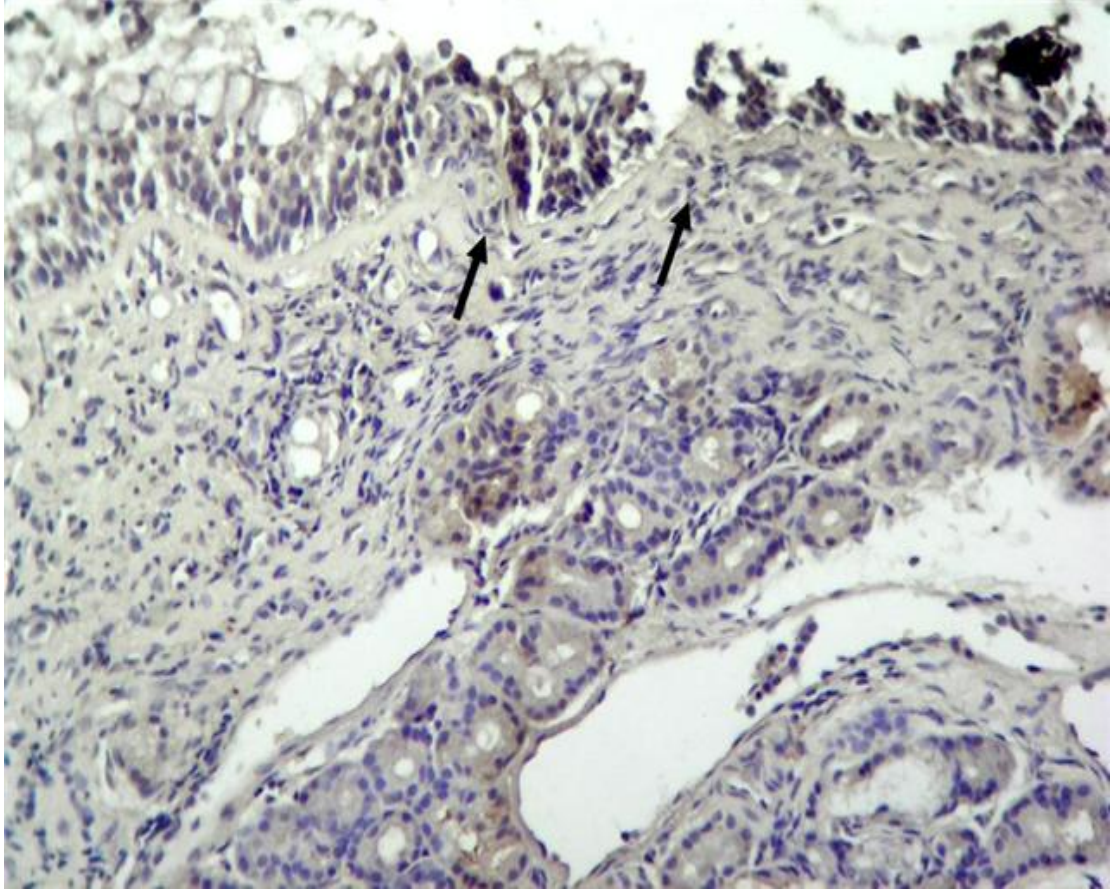
Histolojik Kesit Bulguları



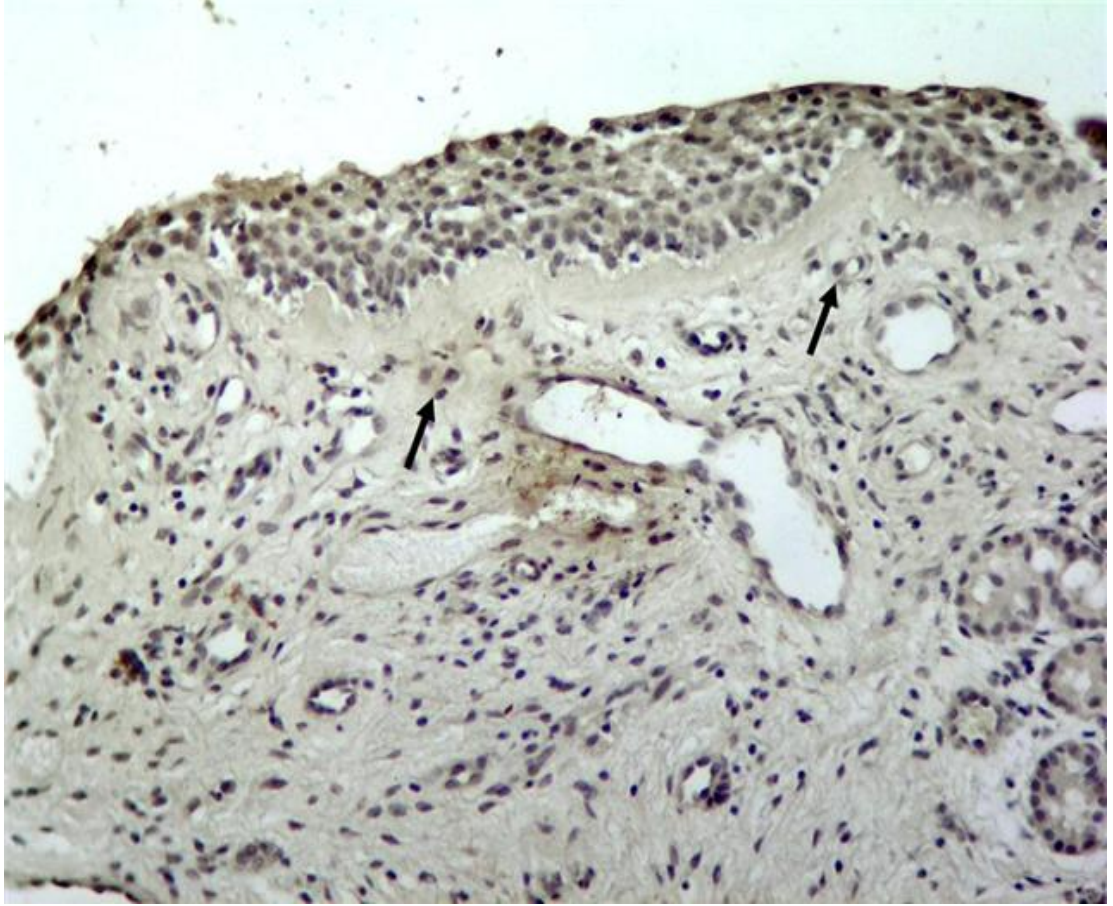
Resim 1. Tedavi öncesine ait doku örneğinde nazal mukozanın çok katlı yalancı çok katlı prizmatik epitel (E) ile örtülü olduğu görülmektedir. Epitel içerisinde çok sayıda lenfositik infiltrasyon bulunmaktadır. Epitelin altında kollegen liflerden ve hücrelerden oluşan lamina propria (Lp) gözlenmektedir. Lamina propriada çok sayıda kan damarı (D) bulunmaktadır. Hematoksilen Eozin. Orginal büyütme X200 (HE).



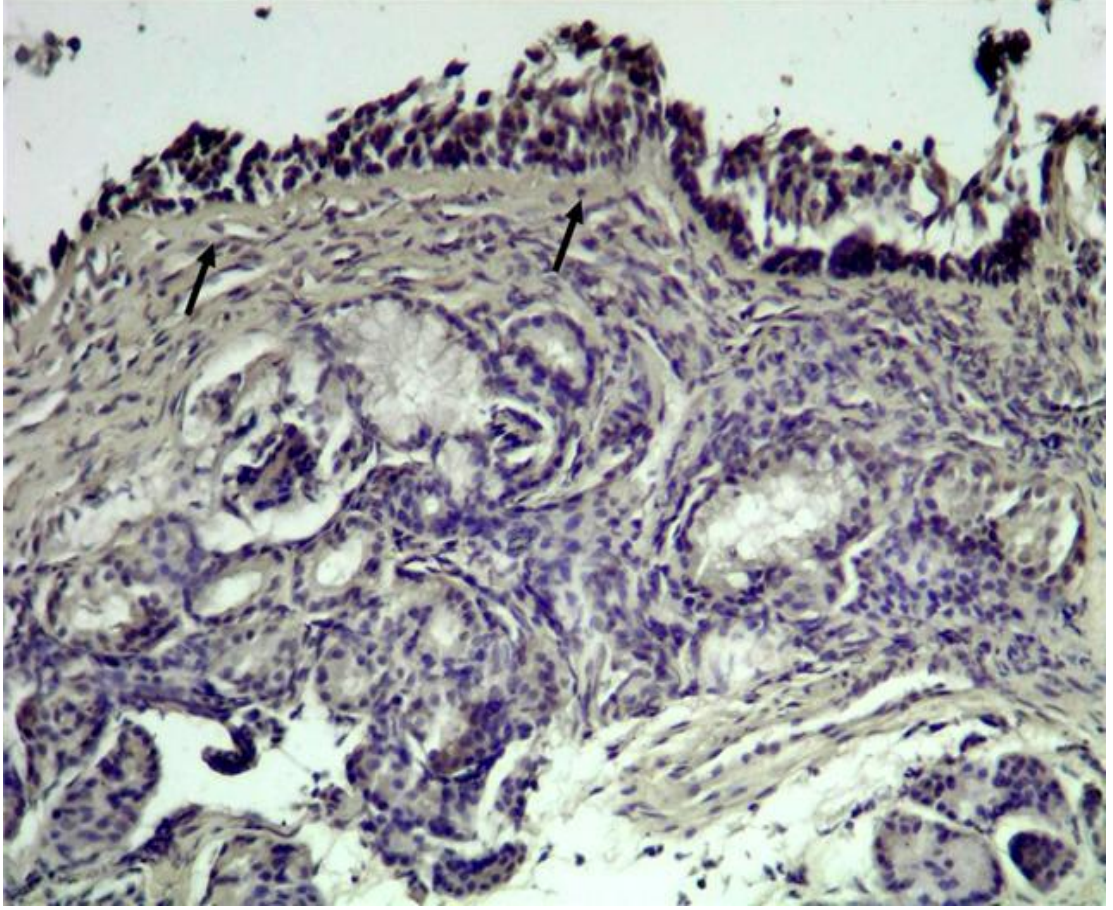
Resim 2. Tedavi sonrasına ait nazal mukoza doku örneğinde yalancı çok katlı prizmatik epitel ile örtülü olduğu, lamina poprianın (LP) ve (Oklar) görülmektedir. D: Kan damarı, B: Bez Hematoksilen Eozin. Orginal büyütme X200. (HE)



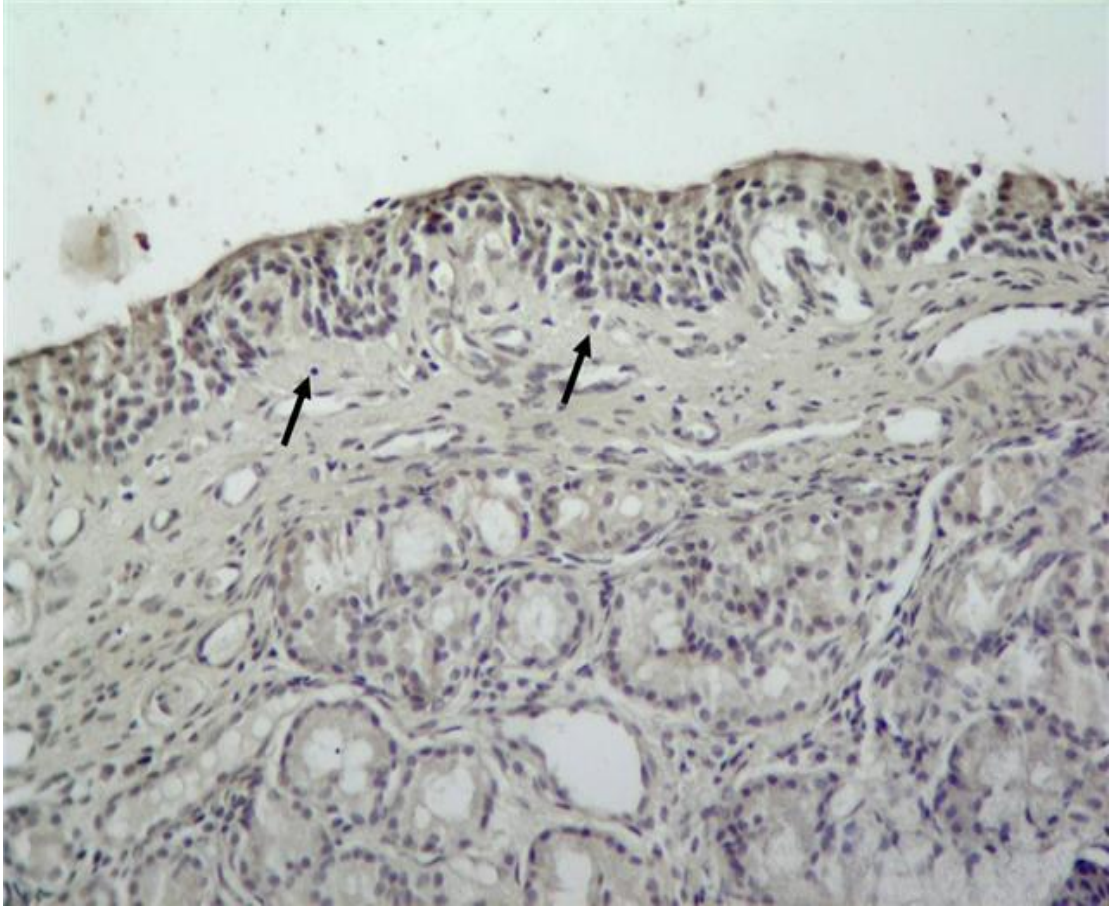
Resim 3. (Tedavi öncesi FoxP3) İmmunohistokimyasal teknikle boyanmış seri kesit örneklerinde Fox pozitif hücreler (oklar) görülmektedir. Orginal büyütme X200.



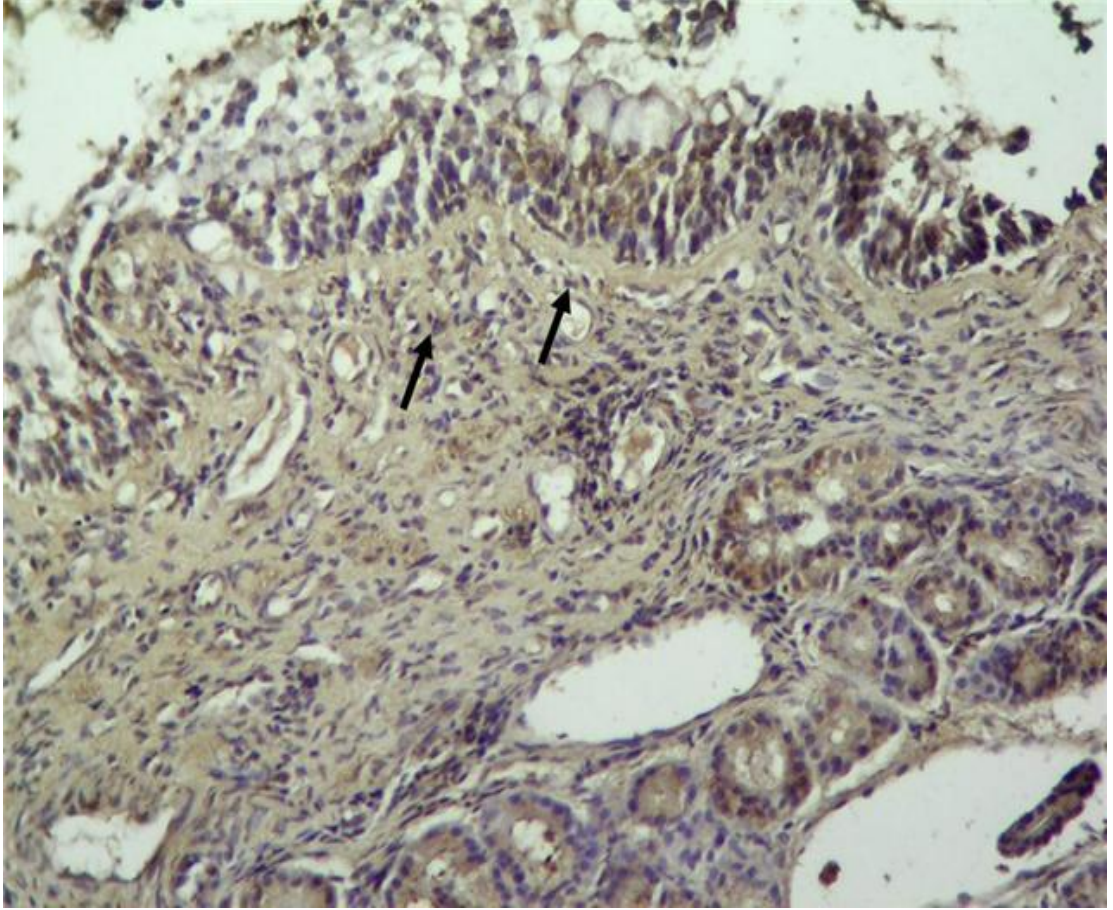
Resim 4. (Tedavi sonrası FoxP3) İmmunohistokimyasal teknikle boyanmış seri kesit örneklerinde sayıda Fox pozitif hücreler (oklar) görülmektedir. Original büyütme X200.



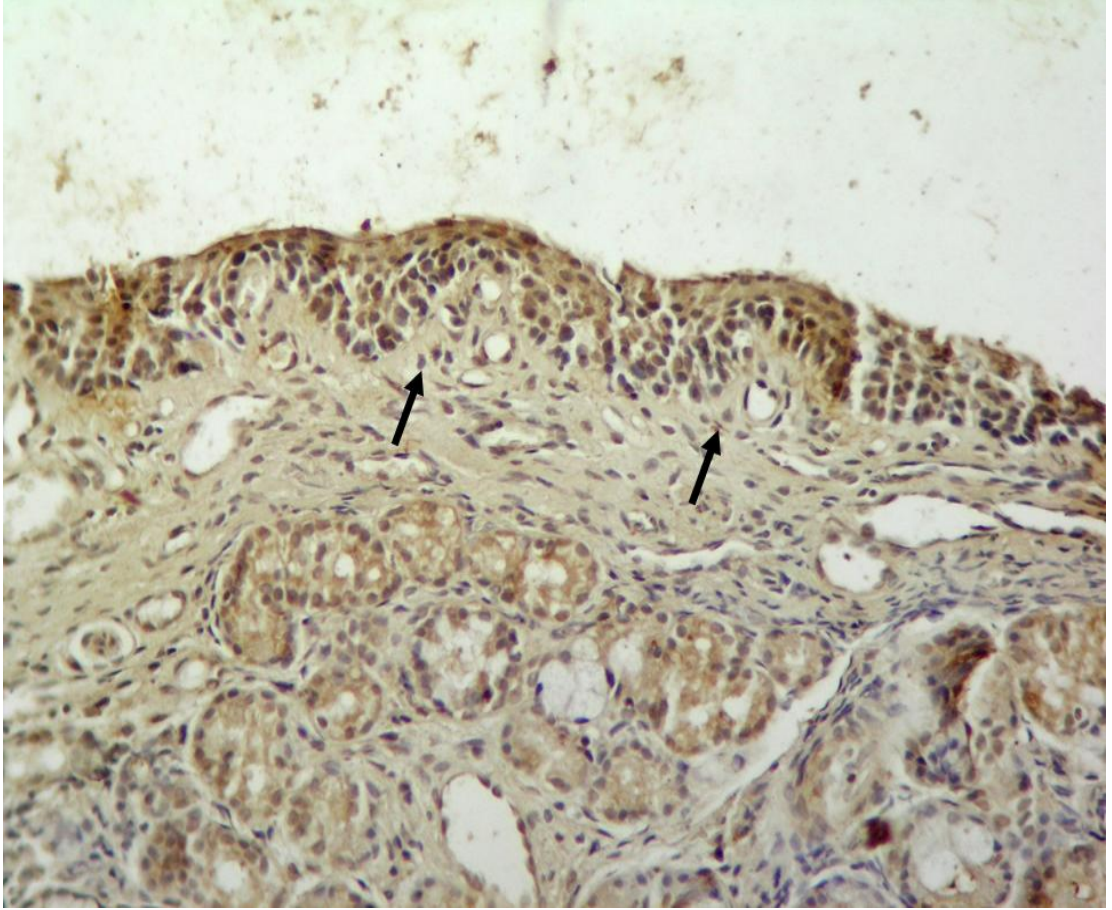
Resim 5. (Tedavi öncesi GATA-3) İmmunohistokimyasal teknikle boyanmış seri kesit örneklerinde az sayıda GATA pozitif hücreler (oklar) görülmektedir. Original büyütme X200.



Resim 6. (Tedavi sonrası GATA-3) İmmunohistokimyasal teknikle boyanmış seri kesit örneklerinde çok sayıda GATA pozitif hücreler (oklar) görülmektedir. Original büyütme X200.



Resim 7. (Tedavi öncesi T-bet) İmmunohistokimyasal teknikle boyanmış seri kesit örneklerinde az sayıda T-bet pozitif hücreler (oklar) görülmektedir. Original büyütme X200.



Resim 8. (Tedavi sonrası T-bet) İmmunohistokimyasal teknikle boyanmış seri kesit örneklerinde çok sayıda T bet pozitif hücreler (oklar) görülmektedir. Original büyütme X200.

11 REFERANSLAR

- 1- Canonica GW, Bousquet J, Mullol J, et al. A survey of the burden of allergic rhinitis in Europe. *Allergy* 2007; 62 (Suppl 85): 17-25.
- 2- Van Oene CM, van Reij EJ, Sprangers MA, Fokkens WJ. Quality-assessment of disease-specific quality of life questionnaires for rhinitis and rhinosinusitis: A systematic review. *Allergy* 2007; 62: 1359-71.
- 3- Schatz M. A survey of the burden of allergic rhinitis in the USA. *Allergy* 2007; 62 (Suppl 85): 9-16.
- 4- Walker S, Khan-Wasti S, Fletcher M, et al. Seasonal allergic rhinitis is associated with a detrimental effect on examination performance in United Kingdom teenagers: Case-control study. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 381-7.
- 5- Maurer M, Zuberbier T. Under treatment of rhinitis symptoms in Europe: Findings from a cross-sectional questionnaire survey. *Allergy* 2007; 62: 1057-63.
- 6- Bousquet J, Dahl R, Khaltaev N. Global alliance against chronic respiratory diseases. *Allergy* 2007; 62: 216-23.
- 7- Bousquet J, Khaltaev N. Global surveillance, prevention and control of Chronic Respiratory Diseases. A comprehensive approach. Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. World Health Organization. 2007: 148.
- 8- Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006; 368: 733-43.
- 9- Ait-Khaled N, Odhiambo J, Pearce N, et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis and eczema in 13- to 14-year-old children in Africa: The

International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase III. *Allergy* 2007; 62: 247-58.

10- Pekkarinen PT, von Hertzen L, Laatikainen T, et al. A disparity in the association of asthma, rhinitis, and eczema with allergen-specific IgE between Finnish and Russian Karelia. *Allergy* 2007; 62: 281-7.

11- Majkowska-Wojciechowska B, Pelka J, Korzon L, et al. Prevalence of allergy, patterns of allergic sensitization and allergy risk factors in rural and urban children. *Allergy* 2007; 62: 1044-50.

12- Viinanen A, Munhbayarlah S, Zevgee T, et al. The protective effect of rural living against atopy in Mongolia. *Allergy* 2007; 62: 272-80.

13- Van Ree R, Yazdanbakhsh M. Allergic disorders in African countries: Linking immunology to accurate phenotype. *Allergy* 2007; 62: 237-46.

14- Salib RJ, Drake-Lee A, Howarth PH Allergic rhinitis: past, present and the future. *Clin Otolaryngol.* 2003; 28 (4):291-303.

15- Kalyoncu AF, Selcuk ZT, Karakoca Y, et al. Prevalence of childhood asthma and allergic diseases in Ankara, Turkey. *Allergy* 1994; 49: 485-8.

16- Kucukoduk S, Aydin M, Cetinkaya F, et al. The prevalence of asthma and other allergic diseases in a province of Turkey. *Turk J Pediatr* 1996; 38: 149-53.

17- Selcuk ZT, Caglar T, Enunlu T, Topal T. The prevalence of allergic diseases in primary school children in Edirne, Turkey. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 262-9.

18- Karaman O, Turkmen M, Uzuner N. Allergic disease prevalence in Izmir. *Allergy* 1997; 52: 689-90.

19- Saraclar Y, Sekerel BE, Kalayci O, et al. Prevalence of asthma symptoms in school children in Ankara, Turkey. *Respir Med* 1998; 92: 203-7.

20- Celik G, Mungan D, Bavbek S, et al. The prevalence of allergic diseases and atopy in Ankara, Turkey: A two-step population-based epidemiological study. *J Asthma* 1999; 36: 281-90.

- 21- Akcakaya N, Kulak K, Hassanzadeh A, et al. Prevalence of bronchial asthma and allergic rhinitis in İstanbul school children. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 693-9.
- 22- Turktas I, Selcuk ZT, Kalyoncu AF. Prevalence of asthmaassociated symptoms in Turkish children. *Turk J Pediatr* 2001; 43: 1-11.
- 23- Ece A, Ceylan A, Saraclar Y, et al. Prevalence of asthma and other allergic disorders among schoolchildren in Diyarbakir, Turkey. *Turk J Pediatr* 2001; 43: 286-92.
- 24- Saraclar Y, Kuyucu S, Tuncer A, et al. Prevalence of asthmatic phenotypes and bronchial hyperresponsiveness in Turkish schoolchildren: An International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 2 study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91: 477-84.
- 25- Demir AU, Karakaya G, Bozkurt B, et al. Asthma and allergic diseases in schoolchildren: Third cross-sectional survey in the same primary school in Ankara, Turkey. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 531-8.
- 26- Bayram I, Guneser-Kendirli S, Yilmaz M, et al. The prevalence of asthma and allergic diseases in children of school age in Adana in southern Turkey. *Turk J Pediatr* 2004; 46: 221-5.
- 27- Dinmezel S, Ogus C, Erengin H, et al. The prevalence of asthma, allergic rhinitis, and atopy in Antalya, Turkey. *Allergy Asthma Proc* 2005; 26: 403-9.
- 28- Demir E, Tanac R, Can D, et al. Is there an increase in the prevalence of allergic diseases among schoolchildren from the Aegean region of Turkey. *Allergy Asthma Proc* 2005; 26: 410-4.
- 29- Ones U, Akcay A, Tamay Z, et al. Rising trend of asthma prevalence among Turkish schoolchildren (ISAAC phases I and III). *Allergy* 2006; 61: 1448
- 30- Kurt E, Metintaş S, Başyigit İ, et al. Prevalence and risk factors of allergies in Turkey (PARFAIT Study): Results of a multicentric cross-sectional study in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 566-574.

- 31- Kalyoncu AF, Demir AU, Ozcakar B, et al. Asthma and allergy in Turkish university students: Two cross-sectional surveys 5 years apart. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2001; 29: 264-71.
- 32- Kuyucu S, Saraçlar Y, Tuncer A, et al. Epidemiologic characteristics of rhinitis in Turkish children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 2. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17: 269-77.
- 33- Şakar A, Yorgancıoğlu A, Dinç G, Yüksel H. The prevalence of asthma and allergic symptoms in Manisa, Turkey. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2006 Mar; 24(1):17-25.
- 34- Guneser S, Atici A, Cengizler I, Alparslan N. Inhalant allergens: as a cause of respiratory allergy in east Mediterranean area, Turkey. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1996;24:116-119.
- 35- Kalyoncu AF, Coplu L, Selcuk ZT, Emri AS, Kolacan B, Kocabas A, Akkoçlu A, et al. Survey of the allergic status of patients with bronchial asthma in Turkey: a multicenter study. *Allergy* 1995;50:451-455.
- 36- Liccardi G, D'Amato M, D'Amato G. Oleaceae pollinosis: a review. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111:210-217.
- 37- Kirmaz C, Yuksel H, Bayrak P, Yilmaz O. Symptoms of the olive pollen allergy: do they really occur only in the pollination season? *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2005; 15(2):140-5.
- 38- Young MC. *Allergy Asthma Proc.* 1998;19:211-218.
- 39- Kavuru MS et al. In: *Diagnosis and Management of Rhinitis and Sinusitis.* West Islip, NY: Professional Communications; 2001:19-24.
- 40- Ledford DK, Lockey RF. *J Respir Dis.* 1998; 19:576-584.
- 41- American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *The Allergy Report. Overview of Allergic Diseases: Diagnosis, Management, and Barriers to Care. Volume 1.* Milwaukee, Wis: American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, Inc; 2000:1-97.
- 42- White M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103: S378-S381.

- 43- Naclerio R. Clinical manifestations of the release of the histamine and other inflammatory mediators. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103: S382-S385.
- 44- Bascorn R et al. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 138:406-412.
- 45- Bascorn R et al. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;81:580-589.
- 46- White M. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:S378-S381.
- 47- American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *The Allergy Report. Overview of Allergic Diseases: Diagnosis, Management, and Barriers to Care. Volume 1.* Milwaukee, Wis: American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, Inc; 2000:1-97.
- 48- White M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103: S378-S381.
- 49- Naclerio R. Clinical manifestations of the release of the histamine and other inflammatory mediators. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103: S382-S385.
- 50- Bisgaard H, Olsson P, Bende M. Effect of leukotriene D4 on nasal mucosal blood flow, nasal airway resistance and nasal secretion in humans. *Clin Allergy.* 1986; 16: 289-297.
- 51- Miadonna A, Tedeschi A, Leggieri E, Lorini M, Folco G, Sala A, et al. Behavior and clinical relevance of histamine and leukotrienes C4 and B4 in grass pollen- induced rhinitis. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136:357-362.
- 52- Okuda M, Watase T, M ezawa A, Liu CM. The role of leukotriene D4 in allergic rhinitis. *Ann Allergy.* 1988; 60: 537-540.
- 53- Meltzer EO. Role for cysteinyl leukotriene receptor antagonist therapy in asthma and their potential role in allergic rhinitis; based on the concept of 'one linked airway disease'. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000; 84: 176-187.
- 54- Philip G, Malmstrom K, Hampel FC, Weinstein SF, LaForce CF, Ratner PH, at al. Montelukast for treating seasonal allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial performed in the spring. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32:1020-1028.

- 55- Doyle WJ, Boehm S, Skoner DP. Physiologic responses to intranasal dose-response challenges with histamine, methacholine, bradykinin, and prostaglandin in adult volunteers with and without nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 86: 924-935.
- 56- Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, et al. Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, s-5751. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298: 411-419.
- 57- Naclerio RM, Proud D, Togias AG, Adkinson NF Jr, Meyers DA, Kagey-Sobotka A, et al. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N Engl J Med.* 1985; 313: 65-70.
- 58- Proud D, Reynolds CJ, Lacapra S, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Naclerio RM. Nasal provocation with bradykinin induces symptoms of rhinitis and a sore throat. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 137:613-616.
- 59- Devillier P, Dessanges JF, Rakotosihanaka F, Ghaem A, Boushey HA, Lockhart A, et al. Nasal response to substance P and methacholine in subjects with and without allergic rhinitis. *Eur Respir J.* 1988; 1: 356-361.
- 60- White MV, Kaliner MA. Mediators of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1992; 90: 699-704.
- 61- Howarth PH. Mediators of nasal blockage in allergic rhinitis. *Allergy.* 1997; 52:12-18.
- 62- Klementsson H, Venge P, Andersson M, Pipkorn U. Allergen-induced changes in nasal secretory responsiveness and eosinophil granulocytes. *Acta Otolaryngol.* 1991; 111: 776-784.
- 63- Montefort S, Roche WR, Howarth PH, Djukanovic R, Gratziau C, Carroll M, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in the bronchial mucosa of normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J.* 1992;5:815-823.
- 64- Wegner CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science.* 1990; 247:456-459.

- 65- Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Anu Rev Immunol*. 1989; 7: 145-173.
- 66- Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, et al. Cytokine Messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol*. 1992; 148: 2390-2394.
- 67- Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 271-283.
- 68- Sakaguchi S. Naturally arising FoxP3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6:345-352.
- 69- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor FoxP3. *Immunity* 2005; 22:329-341.
- 70- Schubert L, Jeffery E, Zhang Y, et al. Scurfin (FoxP3) acts as a repressor of trnascrption and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; 276:37672-37679.
- 71- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330-336.
- 72- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. *Science* 2003; 299:1057-1061.
- 73- Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor FoxP3. *Nat Immunol* 2005; 6:331-337.
- 74- Van Santen H, Benoist C, Mathis D. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* 2004; 200:1221-1230.

- 75- Watanabe N, Wang Y, Lee H et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005; 436:1181-1185.
- 76- Ling EM, Smith T, Nguyen XD, et al. Relation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363:608-615.
- 77- Grindebacke H, Wing K, Andersson AC, et al. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1364-1372.
- 78- Umetsu D, McIntire J, Macaubas C, et al. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 2002; 3:715-720.
- 79- Thorstenson K, Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25⁺CD4⁺ T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 2001; 167:188-195.
- 80- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265:1237-1240.
- 81- Bynoe MS, Evans JT, Viret C et al. Epicutaneous immunization with autoantigenic peptides induces T suppressor cells that prevent experimental allergic encephalomyelitis. *Immunity* 2003; 19:317-328.
- 82- Apostolou I, Von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004; 199:1401-1408.
- 83- Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-Ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002; 8:1024-1032.
- 84- Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Oriss TB, et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4⁺ T cells expressing membrane-bound TGF- β and FoxP3. *J Clin Invest* 2004; 114:28-38.
- 85- Stock P, Akbari O, Berry G et al. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that Express FoxP3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol* 2004; 5:1149-1156.

- 86- Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-Ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002; 8:1024-1032.
- 87- Akdiş M, Verhagen J, Taylor A, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199:1567-1575
- 88- Prioult G, Nagler-Anderson C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation. *Immunol Rev* 2005; 206:204-218.
- 89- Hawrylowicz CM, O' Gara A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:271-283.
- 90- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy: review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55:241-269.
- 91- Wilson DR, Lima MT, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and metaanalysis. *Allergy* 2005; 60:4-12.
- 92- Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81:401-405.
- 93- Norman PS. Immunotherapy: 1999-2004. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1013-1023; quiz 1024.
- 94- Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1025-1034; quiz 1035
- 95- Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, et al. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 2004; 172:3252-3259.
- 96- Elsh PW, Stricker WE, Chu CP, Naessens JM, Reese ME, Reed CE, et al. Efficacy of beclomethasone nasal solution, flunisolide, and cromolyn in relieving symptoms of ragweed allergy. *Mayo Clin Proc* 1987;62:125-34.
- 97- Salib RJ, Drake-Lee A, Howarth PH. Allergic rhinitis: past, present and the future. *Clin Otolaryngol.* 2003; 28(4): 291-303

- 98- Abaylica E, Ay G, Urk V, Yuksel H. Aeropalynological polen count in Akhisar region of Manisa, Turkey. III. Balkan Congress of Allergy and Clinical Immunology. 11-14th October 2003; Istanbul. Abstract book, pp. 109.
- 99- Reza F, Ramin G, Mahmood B-R. Evaluation of six years allergen immunotherapy in allergic rhinitis and allergic asthma. Iran J Allergy Asthma Immunol. March 2006; 5(1): 29-31.
- 100- Stokes JR, Casale TB. Allergy immunotherapy for primary care physicians. Am J Med. 2006 Oct; 119 (10) : 820-3.
- 101- D. Prefontaine, Pierre-Olivier Fiset and Qutayba Hamid. Transcription factors in allergic diseases. Journal of Allergy and Clinical Immunology. Volume 119. Issue 3, March 2007, Pages 761-764.
- 102- Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production. J Allergy Clin Immunol. 2003 Apr; 111 (4): 862-8.
- 103- Nivesnka P.J, Tudor P.T, Andrew W, K.Rajakulasingam. Mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis. Biomedicine & Pharmacotherapy 61 (2007)29-33.
- 104- C. Ebner , U. Siemann , B. Bohle , M. Willheim , U. Wiedermann , S. Schenk , F. Klotz, H. Ebner, D. Kraft O. Scheiner. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phi p 1, a major grass pollen allergen. Clinical and experimental allergy, 1997, volume 27, pages 1007-1015.