

## Ev Tozu Akarı Duyarlı Astımlı Çocuklarda Subkutan Allerjen İmmünoterapi Üzerine Vitamin D Desteğinin Etkisi

### The Effect of Vitamin D Supplementation on Subcutaneous Allergen Immunotherapy in House Dust Mite Sensitive Asthmatic Children

Safa Barış,<sup>1</sup> Ahmet Özen,<sup>1</sup> Hasret Çağan,<sup>1</sup> Ayça Kıyıkım,<sup>1</sup> Aysin Tulunay,<sup>2</sup> Elif Karakoç-Aydiner,<sup>1</sup> Işıl Barlan<sup>1</sup>

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Pediatrik Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Hematoloji ve İmmünoloji Bilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye

#### İletişim adresi:

Dr. Safa Barış  
Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim  
ve Araştırma Hastanesi, Pediatrik  
Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı, 34899,  
Üst Kaynarca, Pendik, İstanbul  
Tel: 0216 - 625 45 45 / 7811  
e-posta: safabarıs@hotmail.com

©2015 Turkish Journal of Immunology.  
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2015.425

Geliş tarihi: 08 Ağustos 2015

Kabul tarihi: 18 Ağustos 2015

**Amaç:** Bu çalışmada allerjen spesifik immünoterapi (ASI) ile eş zamanlı uygulanan vitamin D desteği tedavisinin etkinliği, güvenilirliği ve düzenleyici T hücre yanıtı değerlendirildi.

**Gereç ve yöntemler:** Ev tozu akarına duyarlı astım nedeni ile farmakoterapi alan 50 hasta (29 kız, 21 erkek; ort. yaş 8.8±2.4 yıl) randomizasyon ile üç farklı tedavi grubundan birine alındı: subkutan immünoterapi ile eş zamanlı vitamin D desteği (650 Ü/gün; n=17) grubu; subkutan immünoterapi (n=15) grubu ve farmakoterapi grubu (n=18). Tüm hastalar çalışma başında ve 6. ve 12. aylarda semptom sıklığı, ilaç ihtiyacı, cilt prik testi, serum vitamin D düzeyi, total immünglobulin E (IgE), spesifik IgE ve Der p 1 spesifik IgG4 düzeyleri açısından değerlendirildi. *Dermatophagoides pteronyssinus* ile uyarılmış CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> düzenleyici T hücre oranı, intrasellüler Foxp3 ekspresyonu ve periferik kan mononükleer hücrelerinin interlökin 10 (IL-10) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta yanıtları araştırıldı.

**Bulgular:** Allerjen spesifik immünoterapi ile eş zamanlı vitamin D kullanan grupta altıncı ayda astım semptomlarında diğerlerine kıyasla azalma gözlemlendi. Farmakoterapi grubuna kıyasla, kortikosteroid ihtiyacı da azaldı. Bazal vitamin D düzeyleri izleyen yılda gözlenen astım atak sayısı ile ters ilişkili idi. Birinci yılda vitamin D desteği alan kişilerde Der p 1 ile uyarılmış CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> düzenleyici T hücre yüzdesi ve lenfositlerde IL-10 düzeyi diğer gruplara kıyasla artmış bulundu. Der p 1 spesifik IgG4 düzeyleri de her iki ASI grubunda arttı ve bu artış vitamin D desteği alan grupta daha erken bir zamanda, altıncı ayda gözlemlendi.

**Sonuç:** Allerjen spesifik immünoterapi ile eş zamanlı vitamin D kullanımı astım kontrolünü iyileştirdi ve inhale kortikosteroid ihtiyacında daha erken bir azalma sağladı. Bu yararlı klinik etkilere Der p 1 ile uyarılmış düzenleyici T hücre yüzdesinde ve Foxp3 ekspresyonunda artış eşlik etti.

**Anahtar sözcükler:** Allerji; astım; immünoterapi; vitamin D.

**Objectives:** This study aims to investigate the efficacy, safety, and T regulatory cell response of vitamin D supplementation concomitantly used with allergen specific immunotherapy (SIT).

**Materials and methods:** Fifty children (29 girls, 21 boys; mean age 8.8±2.4 years) with asthma sensitized to house dust mite receiving pharmacotherapy were randomized into three groups as: subcutaneous immunotherapy in combination with vitamin D supplementation group (650 U/day; n=17), subcutaneous immunotherapy group (n=15) and pharmacotherapy group (n=18). All patients were evaluated at baseline, 6 and 12 months for the symptom frequency, medication need, skin prick test, levels of serum vitamin D, total immunoglobulin E (IgE), specific IgE, and Der p 1-specific IgG4 levels. *Dermatophagoides pteronyssinus* induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell ratio, intracellular Foxp3 expression, and peripheral blood mononuclear cell interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor beta responses were assessed.

**Results:** Concomitant use of vitamin D as an adjunct to allergen SIT reduced asthma symptoms compared to the others at six months. The need for corticosteroids also decreased, compared to the pharmacotherapy group. The baseline vitamin D levels were inversely correlated with the asthma attack number of the subsequent year. At one year, vitamin D supplemented subjects demonstrated a higher percentage of Der p 1-induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell ratio and IL-10 levels in lymphocytes, compared to other groups. Der p 1-specific IgG4 increased in both SIT groups and the increase was observed as an earlier surge at six months in vitamin D supplemented group.

**Conclusion:** Concomitant use of SIT and vitamin D improved asthma control and reduced the inhaled corticosteroid need at an earlier stage. This beneficial clinical effects were accompanied by an increased ratio of Der p 1-induced T regulatory cells and expression of Foxp3.

**Key words:** Allergy; asthma; immunotherapy; vitamin D.

Allerjen-spesifik immünoterapi (ASİ) allerjen duyarlı rinit ve astımlı hastalarda hastalığın seyrini değiştirebilen tek tedavi yöntemidir. Bu tedavi allerjen-spesifik immüoglobulin G 1 (IgG1) ve IgG4 düzeylerini artırır, düzenleyici T hücrelerini uyarır ve periferik tolerans gelişimini sağlayarak klinik düzelmeye yol açar.<sup>[1,2]</sup> Allerjen-spesifik immünoterapinin allerjen duyarlı rinit ve astım hastalarında gerek semptomları gerekse ilaç ihtiyacını azaltarak klinik etkinlik sağladığı gösterilmiştir.<sup>[3]</sup> Diğer tedaviler ile karşılaştırıldığında, ASİ hastalığın seyrini de değiştirir ve uzun dönem bir etkinlik sağlar.<sup>[4,5]</sup> Allerjen-spesifik immünoterapinin yararlı etkilerini daha da artırabilmek amacı ile mineral adjuvanlar, zayıflatılmış mikobakteriler ve TLR ligandları gibi maddelerin eklenmesi denenmiştir.<sup>[6,7]</sup>

Vitamin D immünmodülatör etkiye sahip bir moleküldür ve antiinflamatuvar ve kemik metabolizmasından bağımsız olarak doğal ve ikincil immünitede düzenleyici rol oynayan anti-proliferatif etkileri vardır.<sup>[8]</sup> Vitamin D reseptörü (VDR) 1988 yılında saptanmış ve nükleer reseptör ailesinin bir üyesi olduğu gösterilmiştir.<sup>[9]</sup> Hücre çekirdeği içinde yer alan bu reseptör vitamin D'nin çeşitli iskelet dışı fonksiyonlarından sorumludur. Aktive olmuş T lenfositler, makrofajlar ve dendritik hücreler (DH) alfa-1-hidroksilaz enzimi prohormon olan 25-hidroksivitamin D3'ü (25-OH-VitD3) aktif formuna 1,25-dihidroksivitamin D3'e [1,25(OH)2D3] dönüştürür ve bu da VDR'lere bağlanarak antimikrobiyal peptidlerin (AMP) üretimini uyarır.<sup>[10,11]</sup> Katelisinidin *Mycobacterium tuberculosis*, gram negatif ve pozitif bakteriler ile virüs ve mantarlar üzerine etki eden bir AMP'dir.<sup>[12]</sup> 1,25 (OH) D insan DH'lerinin diferansiyasyonu ve maturasyonunu engeller, interlökin 10 (IL-10) salınımını uyarır, T hücre fonksiyonlarını baskılar ve böylece immün fonksiyonları düzenler.<sup>[13]</sup> Vitamin D'nin DH farklılaşmasını baskılaması ve tip 1 T regülatör (Tr1) hücreler tarafından IL-10 üretimini artırmasındaki etkisi sayesinde, allerjik hastalıklarda immünoterapinin etkinliği artırılabilir.<sup>[14,15]</sup> Daha önce yapılan astım modeli fare çalışmasında 1,25 (OH) D'nin yararlı etkileri; bronkoalveolar lavaj sıvısında IL-5, IL-13, serum OVA-spesifik IgE düzeylerinde azalma ve akciğer dokusunda IL-10'da artış olarak gösterilmiştir.<sup>[16]</sup> Ancak vitamin D'nin insanlarda ASİ'deki rolü bugüne kadar araştırılmamıştır.

Bu çalışmada ASİ ile eş zamanlı uygulanan vitamin D desteği tedavisinin etkinlik, güvenilirlik ve düzenleyici T hücre yanıtına etkisi değerlendirildi.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### Hastalar ve çalışmaya alım kriterleri

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Polikliniği'nde izlenmekte olan ve yaşları

5 ile 15 arasında değişen ev tozu akarlarına duyarlı hafif/orta persistan astımlı ( $\pm$  rinit) 55 çocuk alındı. Hastaların çalışma öncesi poliklinikte takip süreleri  $3.1 \pm 1.4$  yıl idi. Randomizasyonu takiben SKİT+vitamin D grubundan ve SKİT grubundan birer hasta ve farmakoterapi grubundan iki hasta izleme uyum sağlayamadıkları için ve yine SKİT grubundan bir hasta anafilaksi geçirdiği için toplamda beş hasta çalışma dışı bırakıldı. Böylece çalışma protokolünü net olarak 50 hasta (29 kız, 21 erkek; ort. yaş  $8.8 \pm 2.4$  yıl) ile tamamladı. SKİT+vitamin D grubunda 17 hasta, SKİT grubunda 15 hasta ve farmakoterapi grubunda 18 hasta yer aldı.

Astım tanısı ve ağırlık derecesi GINA (The Global Initiative for Asthma) konsensus raporunda tanımlandığı gibi tıbbi öykü, fizik inceleme bulguları, FEV<sub>1</sub>'de bronkodilatör sonrası değişim yüzdesi ile belirlendi.<sup>[17]</sup> Çalışma için Marmara Üniversitesi Etik Komitesi'nden etik onayı alınmıştır (BAPKO no. TIP/ SAG-C-TUP-070211-0037). Tüm hastaların ebeveynlerinden yazılı onam alınmıştır.

### Çalışma protokolü

Çalışmaya uygun olan tüm hastalar altı haftalık bir ön değerlendirmeye alındı ve başlangıç klinik özellikleri semptom ve ilaç skorları, görsel analog ölçeği (GAÖ), akciğer fonksiyonları, metakolin bronş hiperreaktitesi ve cilt prik testi ile değerlendirildi. Hastalar 2010 yılının Kasım ayında çalışmaya alındı ve bir yıl boyunca izlendi. Tablo randomizasyon yöntemi kullanılarak hastalar üç gruptan birine randomize edildi: Subkutan immünoterapi (SKİT)+vitamin D desteği ve farmakoterapi grubu (n=18); SKİT+farmakoterapi grubu (n=17); tek başına farmakoterapi grubu (n=20). Çalışma tasarımı Şekil 1'de verilmiştir.

Hastaların klinik durumu günlük çetele kartları tutularak (total ilaç skoru (TMS), total semptom skoru (TSS), görsel analog ölçeği (GAÖ), inhale kortikosteroid dozu ve astım atak sayısı hesaplanarak her değerlendirme basamağında incelendi (-1, 0, 1, 3, 6, 8, ve 12. aylarda). Ön değerlendirme döneminde ve çalışma sonunda tüm hastalardan serum eozinofil sayısı, 25-OH-VitD3, total serum IgE, Der p 1 ve Der p 2-spesifik IgE düzeyleri ölçüldü. Ek olarak serum Der p 1-spesifik IgG4 düzeyleri değerlendirildi. Tam kan örnekleri kullanılarak periferik mononükleer hücreler (PMNH) izole edildi ve kültür ortamında Der p 1 ile uyarılı ve uyarısız çalışmalar yapıldı (-1, 6, ve 12. aylarda). Kültür süpernatantları düzenleyici T hücre sitokinleri interlökin 10 ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) için analiz edildi. Kültüre edilmiş PMNH'lerin CD4, CD25 ve Foxp3 ekspresyonu akan hücre ölçer ile ölçüldü.

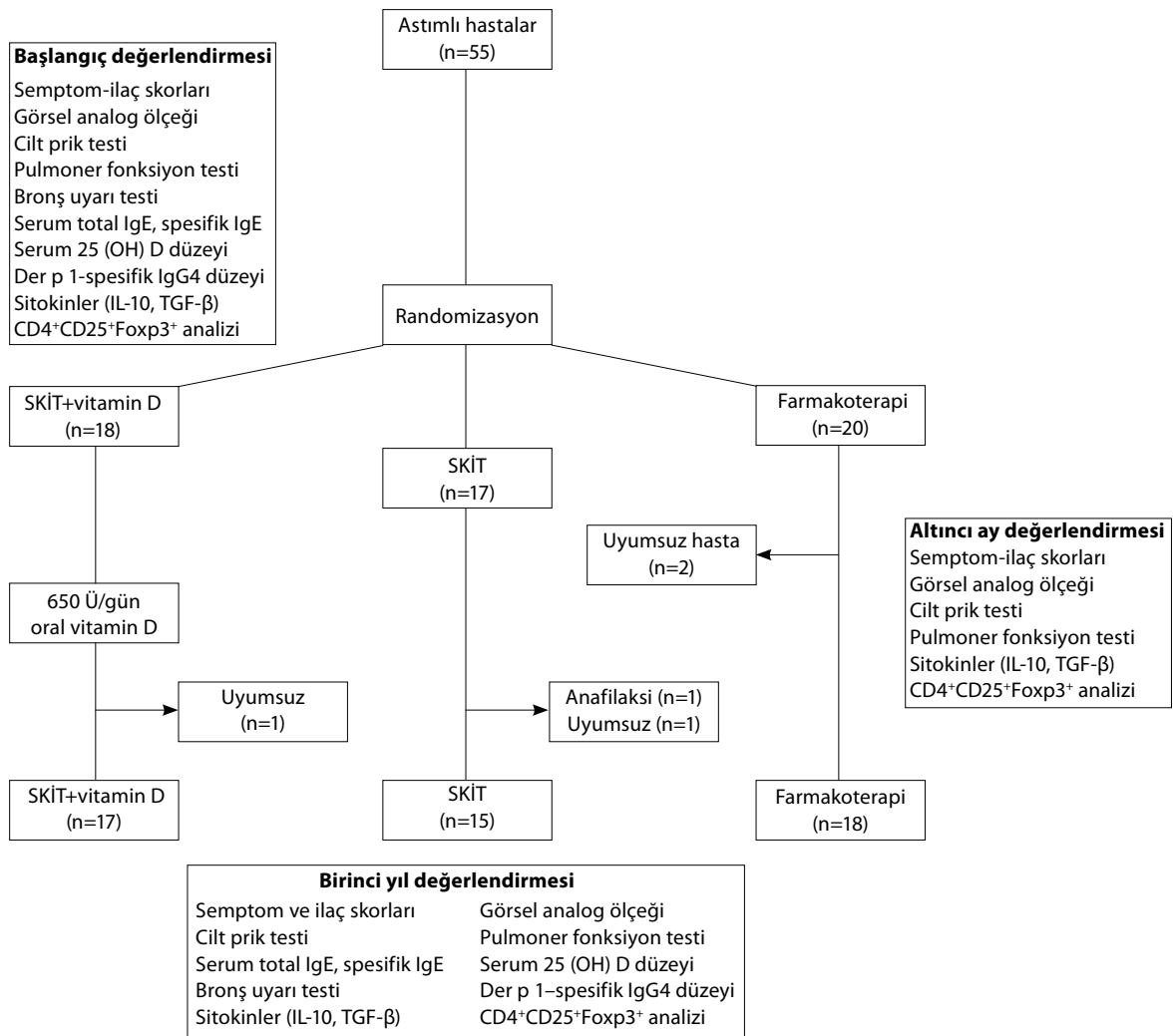
### Tedavi

Çalışmada alüminyum hidroksit çözeltisinde 1:1 oranında *Dermatophagoides pteronyssinus* ve

*Dermatophagoides farinae* karıştırılarak standardize ekstrakt kullanıldı (SKİT; Alutard SQ, ALK-Abello, Madrid, İspanya). Subkutan immünoterapi tedavisi 16 haftalık (haftada bir enjeksiyon) indüksiyon fazı ve ardından aylık enjeksiyonlardan oluşan idame fazı şeklinde uygulandı. Der p 1 indüksiyon fazında 16.2 µ ve idame fazında 44.1 µ dozunda uygulanır iken, Derf-1 indüksiyon fazında 22.9 µ ve idame fazında 62.1 µ dozunda uygulandı. Tedaviye bağlı yan etkiler Dünya Allerji Organizasyonu (WAO) derecelendirme sistemine göre sınıflandırıldı.<sup>[18]</sup> Allerjik reaksiyon gözlenen hastalarda doz %20 ile %40 oranında azaltıldı. Çalışma boyunca her üç gruptaki hastaların ihtiyaç halinde kurtarıcı ilaç kullanmasına izin verildi ( $\beta$ 2-agonistler ve antihistaminikler). İnhalasyon/intranasal kortikosteroid ilaçlar rehberlerde önerildiği üzere semptomların ağırlık derecesi ve sürekliliği göz önünde bulundurularak basamak tedavisi şeklinde verildi.<sup>[17]</sup>

### Semptom ve ilaç skorlaması

Tüm hastalara izlem süresince astım ve rinit semptomlarını kaydedeceği bir form verildi. Skorum sistemi kullanılarak günlük semptomlar (öksürük, hışıltı, nefes darlığı, hapşırma, burun akıntısı, kaşıntı ve burun tıkanıklığı) skorlandı. Bu skorlamada semptomuz durum 0, hafif semptomlar 1, orta derecede semptomlar 2 ve ağır semptomlar 3 olarak puanlandırıldı. Tüm rinit ve astım semptomları toplam rinit semptom skoru (TRSS) ve toplam astım semptom skoru (TASS) olarak adlandırıldı. Toplam rinit semptom skoru ve TASS'nin birleştirilmesi ile toplam semptom skoru (TSS) elde edildi. Hastaların kullandıkları ilaçlar günlük formuna kaydedildi (1:  $\beta$ -2 agonist ve antihistaminikler, 2: inhale/intranasal steroidler, 3: bir tablet kortikosteroid) ve toplam ilaç skoru (TİS) hesaplandı. Üç ay boyunca elde edilen skorların ortalaması final semptom ve medikasyon skorunu oluşturdu. Ek olarak



**Şekil 1.** Çalışma dizaynı. 25 (OH) D: 25-hidroksivitamin D; IgE: İmmunoglobulin E; IL-10: İnterlökin 10; TGF- $\beta$ : Dönüştürücü büyüme faktörü beta; SKİT: Subkutan immünoterapi.

ortalama günlük inhale kortikosteroid (İKS) dozu ( $\mu\text{g}$  budesonid/gün olarak) hesaplandı.

### Görsel analog ölçeği

Hastalara semptom şiddetini temsil eden 10 cm uzunluğunda bir çizgi gösterildi (semptomsuz durum 0; en şiddetli semptom durumu 10 şeklinde puanlandırıldı) ve her soru için bu ölçek üzerinden puan vermeleri istendi. "Astım ve rinit semptomlarınızın geçen hafta boyunca şiddeti ne kadar idi?" sorusuna bu ölçeğe göre verdikleri yanıt kaydedildi. Her üç ayda bir geriye dönük olarak son bir haftalık şikayetlerini değerlendirmeleri istendi. Bu ölçekler çalışma başlangıcında, 6. ayda ve 12. ayda incelendi.

### Cilt prik testi

Hastaların atopi durumu yaygın aeroallerjenler kullanılarak tanı esnasında ve izlem sonunda cilt prik testi ile değerlendirildi (Alk-Abello, Lainate, İtalya). Histamin pozitif kontrol, dihidroklorid salin ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Salin yanıtının olmaması ve 3 mm'nin üzerindeki papül çapı saptanması durumunda test pozitif kabul edildi.<sup>[19]</sup>

### Pulmoner fonksiyon ve spesifik olmayan bronş uyarı testleri

Pulmoner fonksiyon testleri maksimum ekspiratuvar volüm eğrileri kullanılarak gerçekleştirildi (Zan Flowhandy II; Zan Messgerate GmbH, Oberthulba, Almanya). Her bir parametre, art arda uygulanan üç solunumsal manevradan en iyisi kaydedilerek yaş, cinsiyet ve boy uzunluğuna göre öngörülen yüzdesi değerler olarak hesaplandı. Bir saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm ( $\text{FEV}_1$ ), zorlu vital kapasite (FVC), zorlu ekspiratuvar ortası akım hızı (FEF25-75%) ve tepe ekspiratuvar akım hızı ölçülerek kaydedildi.<sup>[15]</sup> Non-spesifik uyarı testine 0.0625 mg/mL metakolin dozu ile başlandı. Bir saniyedeki zorlu ekspiratuvar volümde %20'lik bir düşüş sağlayan doza ulaşana kadar (PC20) veya düşüş olmaz ise maksimum 8 mg/mL dozuna ulaşana kadar metakolin dozu 2'ye katlanarak artırıldı.<sup>[20]</sup>

### Serum 25-OH-VitD3, total IgE, spesifik IgE ve Der p 1-spesifik IgG4 düzeyleri

Serum 25-OH-VitD3 vücutta vitamin D yeterliliğini yansıtan dolaşımdaki en iyi gösterge olarak kabul edilmektedir. Serum 25-OH-VitD3 düzeyi HPLC (High-Performance Liquid-Chromatographic) yöntemi ile ölçüldü. Serumda total Der p 1 ve Der p 2-spesifik IgE düzeyleri immulite yöntemi ile belirlendi (Euro/DPC, Llnberis, İngiltere). Vitamin D düzeyleri 20-100 ng/mL aralığında ise normal kabul edildi.<sup>[21]</sup>

### Periferik kandan lenfosit eldesi ve hücre kültürü, sitokin ölçümleri ve düzenleyici T hücre yanıtları

Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu yapılacak olan deneklerden heparinli tüplere 4 mL venöz kan alındı ve 3 mL ficol üzerine yayılarak 20 dakika 2040 rpm'de santrifüj edildikten sonra lenfositten zengin tabaka plastik pasteur pipeti yardımı ile alındı ve üç kere fosfatlı tampon ile 1500 rpm'de 10 dakika yıkandı. Son yıkamadan sonra hücreler kültür medyumunu karışımı (RPMI-1640, 2 mmol/L L-glutamine (Gibco, invitrogen NY, USA) ve 100 U/mL Penisilin/Streptomisin ve 56 derece 30 dakika inaktive edilmiş %1 FCS) ile 1 mL'ye sulandırıldı. 1 mL'deki canlı lenfosit sayısı tayini için lenfosit süspansiyonundan 10  $\mu\text{L}$  alınarak 10  $\mu\text{L}$  tripan mavisi ile karıştırıldı. Daha sonra thoma lamında dokuz büyük kare 40x'lik büyütme altında sayıldı. Çıkan sayı  $2 \times 10^4$  ile çarpılarak 1 mL'deki lenfosit sayısı belirlendi. Lenfositler ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) ev tozu allerjeni Der p 1 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Indoor Biotechnologies Ltd., Cardiff, UK.) ile uyarıldı. Kültür plakları %5'lik  $\text{CO}_2$ 'li etüvde beş gün inkübe edildi. Kültür süresi sonunda Der p 1 ile uyarılan kuyulardaki ve uyaransız kuyulardaki kültür toplandıktan sonra 1500 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Dönüştürücü büyüme faktörü beta düzeyi ELISA yöntemi ile ölçüldü (Invitrogen®, Camarillo, CA, USA). Ölçüm işlemleri üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Üst sıvı alındıktan sonra çökmüş olan hücre pelletleri 2 mL fosfatlı sıvı ile yıkanarak 1500 rpm'de beş dakika yıkama sonrası monoklonal CD4 ve CD25 antikorları ile hücreler işaretlendi. Karanlıkta 30 dakikalık bekleme sonrası, hücre membranı delici ve fiksator solüsyonu kullanılarak monoklonal antikorun bağlanması güçlendirildi. Son aşamada hücre içi boyama için Foxp3'e özgü monoklonal antikor kullanıldı. Daha sonra, akan hücre ölçer cihazında (BD Biosciences, FACSCanto II, San Diego, CA, USA) uyaransız ve uyaranlı ortamda T regülatuar hücreler çalışıldı. Antikor olarak, CD4-APC, CD25-FITC ve hücre içi Foxp3-PE boyası kullanıldı (BD Biosciences, San Diego, CA, ABD).

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistiksel yöntemler olarak frekans, yüzde, ortalama ve standart sapma'dan faydalanıldı. Normal dağılımın incelenmesi için Kolmogorov-Smirnov dağılım testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Pearson Ki-kare testi uygulandı. İki grup arasındaki niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerde bağımsız örnekler (Independent samples) t testi, normal dağılım göstermeyen parametrelerde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren parametrelerin

TABLO 1

Başlangıç demografik veriler

	SKİT+vitamin D (n=17)		SKİT (n=15)		Farmakoterapi (n=18)		p
	Sayı	Ort.±SS	Sayı	Ort.±SS	Sayı	Ort.±SS	
Cinsiyet*							>0.05
Kadın	12		8		9		
Erkek	5		7		9		
Yaş (yıl)**		9.2±2.6		8.8±1.1		7.9±2.6	>0.05
Tanı yaşı (yıl)**		78±1.6		7.6±2.8		6.4±3.7	>0.05
Yalnız astımı olan hastalar**	11		9		11		>0.05
Astım ve riniti olan hastalar**	6		6		7		>0.05
Başvuru vitamin D düzeyleri (ng/mL)**		19±9		20±12		16±8	>0.05
Başvuru inhale kortikosteroid (mcg/gün)**		428±67		477±128		442±89	>0.05

SKİT: Subkutan immünoterapi; Ort.±SS: Ortalama ± standart sapma; \* Ki-kare test; \*\* One-Way ANOVA test.

grup içi karşılaştırmalarında eşlenik örnekler (Paired samples) t testi, normal dağılım göstermeyen parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında Wilcoxon işaret testi kullanıldı. Zaman içinde tekrarlanan parametrelerin grup karşılaştırmaları tekrarlı ölçüm varyans analizi (Repeated Measures Anova) testi ve Friedman testi ile yapıldı. Korelasyon için Sperm test kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

## BULGULAR

Üç grup arasında cinsiyet, yaş, tanı aldığı yaş, bazal vitamin D düzeyi ve İKS düzeyi açısından fark yok idi. Bazal demografik özellikler Tablo 1'de gösterilmiştir.

### Klinik Etkinlik

#### Semptom ve ilaç skorları

Çalışmanın altıncı ayında TASS'ler SKİT+vitamin D grubunda SKİT ve farmakoterapi gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p=0.01$ ). SKİT ve

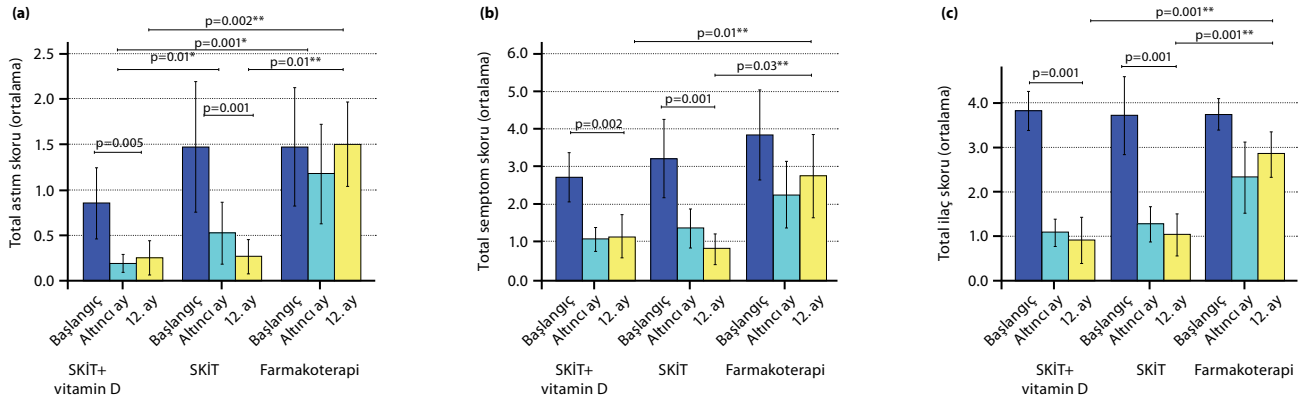
farmakoterapi grupları arasında ise böyle bir fark saptanmadı. On ikinci ayda TASS, TSS ve TİS'lerde her iki immünoterapi grubunda da farmakoterapi grubuna kıyasla bir düşme saptandı (Şekil 2). On ikinci ayda TAS, TRS, TSS ve TİS'lerde farmakoterapi grubu baz alınarak hesaplanan medyan yüzde iyileşme oranları sırası ile SKİT+vitamin D grubunda %80, %60, %100 ve %100; SKİT grubunda ise %70, %60, %86 ve %100 bulundu.

### Görsel analog ölçeği

On ikinci ayda her iki immünoterapi grubunda da astım ve rinit GAÖ skorlarında anlamlı düşüş saptanır iken (sırası ile  $p=0.002$ ,  $p=0.001$ ) altıncı ayda astım GAÖ skoru yalnızca SKİT+vitamin D grubunda anlamlı olarak düşüş göstermekte idi ( $p=0.01$ ).

### İnhale kortikosteroid dozları ve İKS kesilme oranları

Her iki immünoterapi grubu da 12. ayda İKS dozunda azalma sağlar iken altıncı ayda İKS dozu yalnızca



Şekil 2. Grupların semptom ve medikasyon skorları çalışma başında, altıncı ayda ve 12. ayda. Gruplar arası farklılık: \* SKİT+vitamin D grubunda astım semptom skoru 6. ayda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük; \*\* Immünoterapi gruplarının skorları belirtilen inceleme anında farmakoterapi grubuna göre anlamlı olarak daha düşük. SKİT: Subkutan immünoterapi.

SKİT+vitamin D grubunda farmakoterapi grubuna kıyasla anlamlı düşüş göstermekte idi (Şekil 3). İn hale kortikosteroid kesilme oranı vitamin D alan grupta (n=6, %35) diğer iki gruba kıyasla (SKİT grubunda n=3, %20; farmakoterapi grubunda ise fark gözlenmedi) daha yüksek idi.

### Yıllık astım atak sayısı

Bazal vitamin D düzeyleri ile sonraki yıldaki atak sayısı ters ilişki göstermekte idi (p=0.03, r= -0.03). Her iki immünoterapi grubu arasında anlamlı fark saptanmaz iken vitamin D alan grupta atak sayısı en düşük idi (SKİT+vitamin D grubunda: 1.6±1.3/yıl; SKİT grubunda: 2.1±1.3/yıl; farmakoterapi grubunda 3.3±1.6/yıl). Ayrıca her iki immünoterapi grubunda yıllık atak sayıları farmakoterapi grubuna göre anlamlı olarak daha düşük idi (sırası ile p=0.001, p=0.001).

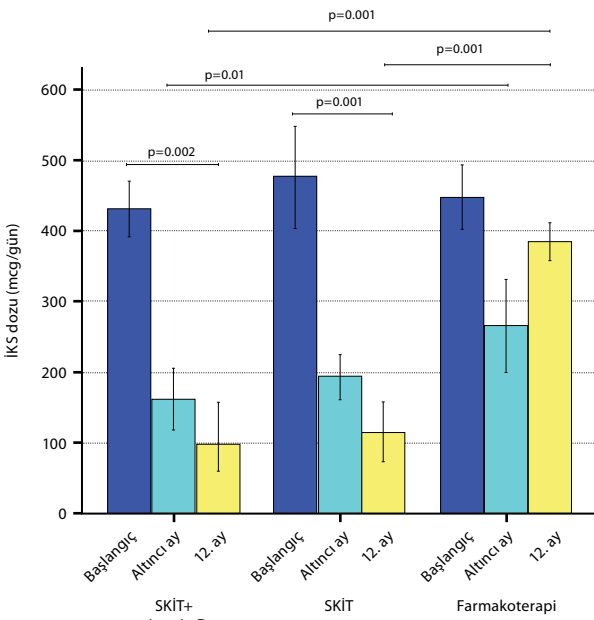
### Laboratuvar İncelemeleri

#### Cilt prik testi

*D. farinae* ve *D. pteronyssinus* ile elde edilen reaksiyon papül çapı başlangıca göre SKİT+vitamin D grubunda (p<0.01) ve SKİT grubunda (p<0.01) anlamlı olarak daha düşük bulundu. Ayrıca 12. ayda her iki immünoterapi grubunda ölçülen papül çapı farmakoterapiye göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (p<0.01, Tablo 2). Çalışma sonunda gruplarda yeni allerjen duyarlanması saptanmadı.

#### Pulmoner fonksiyon testi ve spesifik olmayan bronş aşırı duyarlılığı

Pulmoner fonksiyon testleri ve log PC20 değerleri gerek başvuruda gerekse birinci yılın sonunda gruplar



Şekil 3. Çalışma başında, altıncı ve 12. aylarda inhale kortikosteroid dozu. IKS: İn hale kortikosteroid; SKİT: Subkutan immünoterapi.

TABLO 2  
Laboratuvar bulguları

Parametreler	SKİT+vitamin D (n=17)			SKİT (n=15)			Farmakoterapi (n=18)		
	Başuru			Başuru			Başuru		
	Ort.±SS	Medyan	Dağılım	Ort.±SS	Medyan	Dağılım	Ort.±SS	Medyan	Dağılım
Cilt prik testi Df. (mm)	7.9±2.0			6.7±1.9			7.0±2.0		
Cilt prik testi Dp. (mm)	8.1±2.9			7.1±2.2			7.3±2.7		
Total İgE. (IU/mL)	478±545	370	20-2300	381±275	325	80-1209	668±734	451	22-3000
S-İgE Df. (KU/L)	50.0±34.1			49.6±34.0			54.1±38.6		
Eozinofil (/mm <sup>3</sup> )	551±453			500±342			661±517		
Vitamin D (ng/mL)	19±9.0			20±12			16±8.0		
logPC20 (mg/mL)	2.4±0.6			2.5±0.5			1.5±1.0		
PEV <sub>1</sub> (%)	92±14			89±14			87±18		
PEF (%)	83±17			88±18			82±19		
FEF25/75 (%)	100±21			103±21			101±22		
1. yıl	Ort.±SS	Medyan	Dağılım	Ort.±SS	Medyan	Dağılım	Ort.±SS	Medyan	Dağılım
	5.3±1.3*			6.7±1.9			7.0±2.0		
	5.2±1.3*			7.1±2.2			7.3±2.7		
	35.8±33.4†			381±275			668±734		
	369±328			49.6±34.0			54.1±38.6		
	31.2±10.1††			20±12			16±8.0		
	1.3±0.9			2.5±0.5			1.5±1.0		
	98±15			89±14			87±18		
	83±17			88±18			82±19		
	103±21			103±21			101±22		
	5.1±1.2**			6.7±1.9			7.0±2.0		
	4.7±2.0**			7.1±2.2			7.3±2.7		
	568±761			381±275			668±734		
	41.7±33.4†			49.6±34.0			54.1±38.6		
	419±332			500±342			661±517		
	20±6.0††			20±12			16±8.0		
	1.2±1.0			2.5±0.5			1.5±1.0		
	90±9			89±14			87±18		
	82±19			88±18			82±19		
	112±25			103±21			101±22		
	7.8±4.2			7.0±2.0			7.3±2.7		
	7.1±2.9			7.1±2.2			7.3±2.7		
	770±832			381±275			668±734		
	72.7±33.4†			49.6±34.0			54.1±38.6		
	482±277			500±342			661±517		
	20±6.0††			20±12			16±8.0		
	1.6±1.0			2.5±0.5			1.5±1.0		
	93±11			89±14			87±18		
	98±17			88±18			82±19		
	105±25			103±21			101±22		

SKİT: Subkutan immünoterapi; Ort.±SS: Ortalama ± standart sapma; Df.: *Dermaophagoides farinae*; Dp.: *Dermaophagoides pteronyssinus*; logPC20: Metakolin uyarı doz konsantrasyonu log dönüştürülmüş değer. İstatistiksel olarak anlamlı p değerleri kalın karakterle yazılmıştır; \* SKİT+vitamin D ve farmakoterapi arasında, bağımsız örnekler T testi (p<0.01); \*\* SKİT ve farmakoterapi arasında, bağımsız örnekler T testi (p<0.01); † One Way ANOVA testi (p<0.01); †† One Way ANOVA testi (p<0.01); ††† One Way ANOVA testi (p<0.01); PEV<sub>1</sub>: Bir saatindeki zorlu ekspiratuvar akım hızı; FEF25/75: zorlu ekspiratuvar ortası akım hızı 25/75.

arasında anlamlı farklılık göstermemekte idi (Tablo 2). Vitamin D alan grupta 14 hastanın altısında başlangıçta bronş aşırı duyarlılığı saptanır iken, 12. ayda bunların hiçbirinde bronş aşırı duyarlılığı saptanmadı. SKİT grubunda 14 hastanın beşinde, farmakoterapi grubunda ise altı hastanın birinde bronş aşırı duyarlılığı var idi.

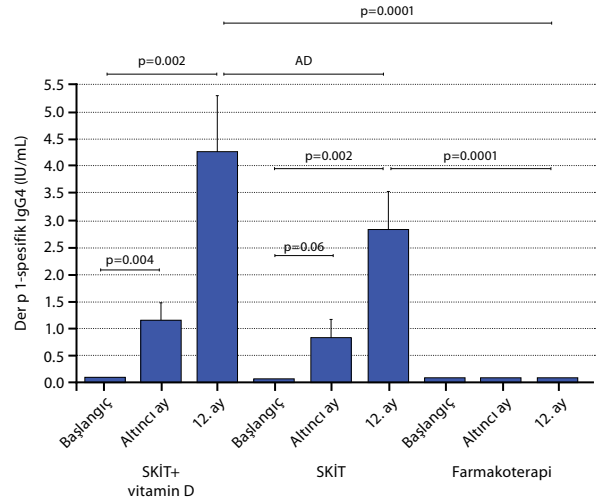
### Serum 25-OH-VitD3, total IgE, spesifik IgE düzeyleri ve Der p 1-spesifik IgG4

Bazal vitamin D düzeyleri incelendiğinde hastaların %58'inde vitamin D yetersizliği saptandı (n=29, ortalama  $16 \pm 4$  ng/mL). Bekleneceği üzere vitamin D3 desteği (650 U/gün) uygulanan grupta serum 25-OH-VitD3 düzeyleri anlamlı olarak artış gösterdi ( $19 \pm 9$ 'e karşılık  $31.2 \pm 10.1$  ng/mL,  $p=0.007$ , Tablo 2). On ikinci ayda serum spesifik IgE düzeyleri (*D. farinae*) diğer gruplar ile karşılaştırıldığında vitamin D alan grupta daha düşük bulundu ( $p=0.03$ ).

Der p 1-spesifik serum IgG4 düzeyleri her iki immünoterapi grubunda da birinci yılın sonunda anlamlı artış göstermekte iken, bu artış vitamin D alan grupta altıncı ayda gözlenmekte idi (Şekil 4).

### Sitokin ölçümleri ve düzenleyici T hücre yanıtları

Der p 1-uyarılı IL-10 düzeyleri SKİT+vitamin D grubunda başlangıç seviyesine göre altıncı ayda daha yüksek bulunur iken 12. ayda en üst düzeye çıkmış idi ( $p=0.01$ ). SKİT ve farmakoterapi gruplarında ise farklılık yok idi. Der p 1-uyarılı TGF- $\beta$  seviyeleri çalışma sonunda her üç grupta da artış göstermiş idi (Şekil 5). Birinci yılın sonunda SKİT+vitamin D grubunda CD4+CD25+Foxp3+ hücre yüzdesi SKİT grubuna göre anlamlı artış göstermekte idi ( $p=0.03$ , Şekil 6).

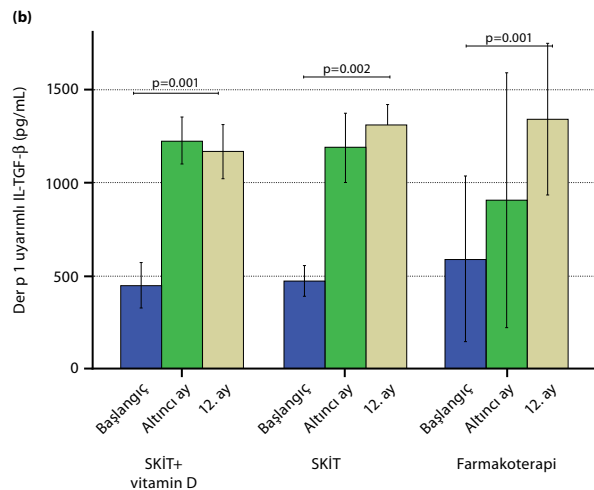
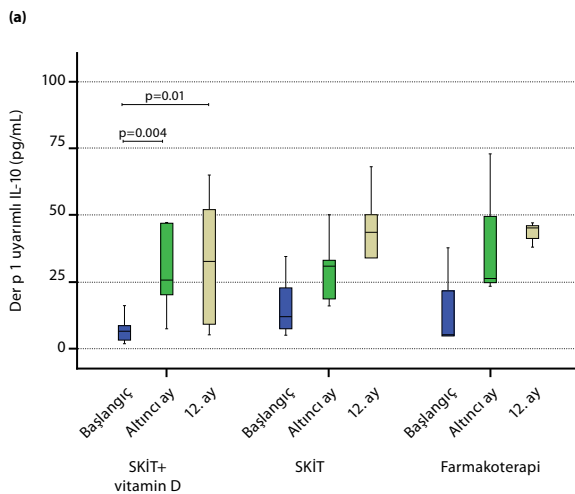


**Şekil 4.** Çalışma başında, altıncı ve 12. aylarda ortalama Der p 1-spesifik serum IgG4 düzeyleri. AD: Anlamli değil; SKİT: Subkutan immünoterapi.

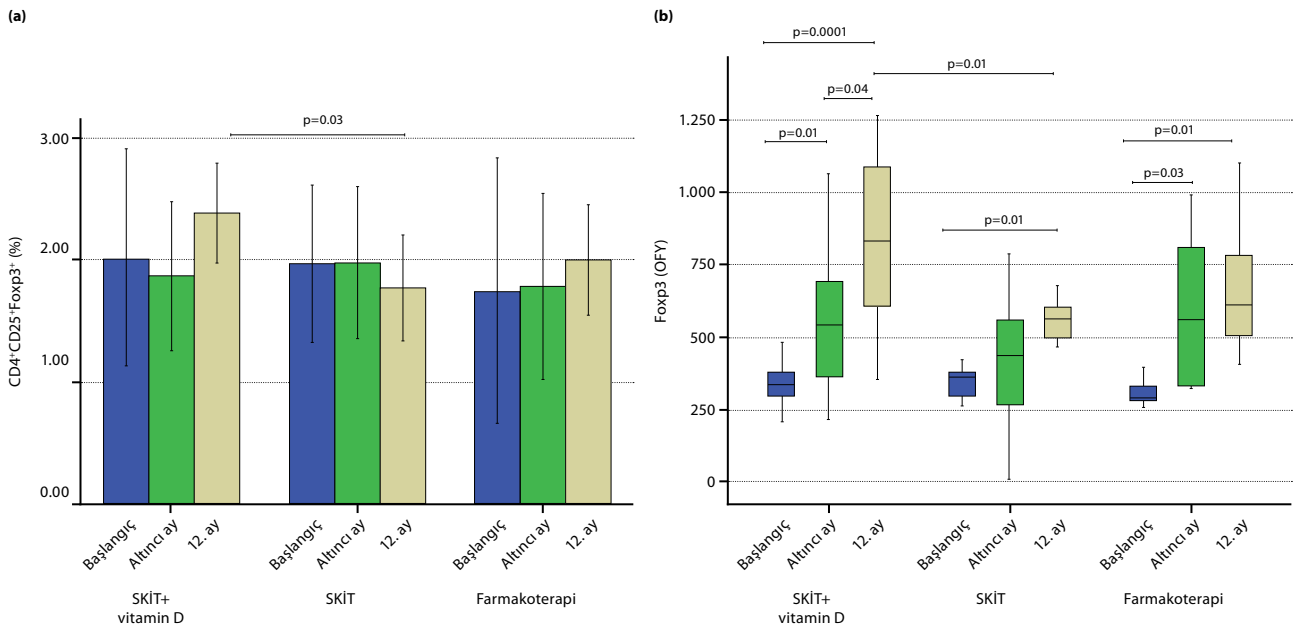
Lenfositlerde Foxp3+ ekspresyonu tek başına değerlendirildiğinde ortalama floresans yoğunluğu (OFY) tüm gruplarda başlangıçta göre birinci yılın sonunda artış göstermekte idi ve bu değer vitamin D alan grupta en yüksek düzeyde idi. Bu grupta lenfosit Foxp3+ ekspresyonu başlangıçta göre altıncı ayda ( $p=0.01$ ) anlamlı olarak artmakta ve 12. ayda ( $p=0.0001$ ) tepe noktasına erişmekte idi. Ayrıca 12. ayda vitamin D alan grupta Foxp3+ ekspresyonu yalnızca SKİT alanlara göre anlamlı olarak farklı bulundu ( $p=0.01$ , Şekil 6).

### İstenmeyen etkiler

SKİT grubunda bir hastada indüksiyon fazında 4 numaralı şişeden enjeksiyon yapıldıktan sonra 20 dakika içerisinde sistemik reaksiyon gelişti ve adrenalin



**Şekil 5.** SKİT+vitamin D grubunda, subkutan immünoterapi grubunda ve farmakoterapi grubunda çalışma başında, altıncı ve 12. aylarda sitokin düzeyleri. Periferik mononükleer hücreler Der p 1 ile uyarılmıştır. Sitokinler kültür süpernatantlarında ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. (a) Der p 1-uyarılı IL-10. (b) Der p 1 uyarılı TGF- $\beta$ . IL: Interlökin; TGF- $\beta$ : Dönüştürücü büyüme faktörü beta; SKİT: Subkutan immünoterapi.



**Şekil 6. (a)** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> hücre yüzdeleri. **(b)** Lenfositlerde Fxp3+ ekspresyonunun ortalama floresan yoğunluğu. Veriler çalışma başlangıcı, altıncı ay ve 12. aya aittir. SKİT: Subkutan immünoterapi; OFY: Ortalama floresans yoğunluğu.

ile başarılı bir şekilde tedavi edildi. SKİT+vitamin D grubunda iki hastada hafif astım atağı gelişti ve inhale β2-agonist ile tedavi edildi. SKİT+vitamin D grubunda altı hastada ve SKİT grubunda yedi hastada enjeksiyon bölgesinde lokal ürtikeryal plaklar gözlemlendi ancak tedavinin sonlandırılması gerekmedi. Serum kalsiyum, fosfor ve paratiroid hormon düzeyleri ve idrarda kalsiyum analizi sonuçları vitamin D alan grupta çalışma boyunca herhangi bir anormallik göstermedi.

## TARTIŞMA

Bu prospektif, randomize, kontrollü çalışmada allerjen-spesifik immünoterapiye vitamin D eklenmesinin semptomları azaltarak ve inhale kortikosteroidlerin daha erken dönemde kesilmesini sağlayarak daha iyi astım kontrolü sağladığı gösterildi. Birinci yıl sonunda İKS kesilme oranı vitamin D alan grupta anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Ayrıca bazal vitamin D düzeyleri takip eden yıldaki atak sayısı ile negatif ilişki gösterdi. Serum spesifik IgE (*D. farinea*) düzeyleri yalnızca vitamin D alan grupta düşüş gösterdi. Ev tozu spesifik IgG4 düzeyleri her iki immünoterapi grubunda da artış gösterir iken, vitamin D alanlarda bu artış daha erken ve yüksek düzeylere ulaştı. Bu yararlı etkilere Der p 1 uyarılı IL-10 düzeyleri, düzenleyici T hücre yüzdesi ve Fxp3 ekspresyonunda artış eşlik etti. Vitamin D insan DH'lerinin farklılaşma ve çoğalmasını baskılar, IL-10 salınımını uyarır ve T hücre fonksiyonlarını baskılayarak immün fonksiyonu düzenlemede rol oynar.<sup>[13]</sup> Vitamin D'nin immünoterapide ek yarar sağlayacağı daha önceki bir fare astım

modelinde gösterilmiştir.<sup>[16]</sup> Majak ve ark.<sup>[22]</sup> ETA duyarlı astımlı çocuklarda vitamin D3'ün rolünü araştırmış ise de immünoterapideki rolü henüz bilinmemektedir. Bu çalışma şu ana kadar immünoterapide vitamin D'nin etkisini araştıran ilk çalışmadır. Çalışmamızın sonuçları vitamin D'nin daha erken astım kontrolü ve daha az İKS ihtiyacı sağlamada etkin olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda çocukların %58'inde vitamin D yetersizliği saptandı. Bu durum dünya genelindeki bir sağlık sorununun yansıması olabilir (ABD'de astımlı çocukların %47'si ve Katar'daki çocukların %68'i). Bu bulgular vücut sağlığı için vitamin D desteğinin yalnızca süt çocukluğu döneminde değil aynı zamanda çocukluk çağı ve ergen döneminde de uygulanmasının yararlı olabileceğine işaret etmektedir.<sup>[23-25]</sup> Yakın zamanda astımlı çocuklarda düşük vitamin D düzeylerinin artmış kortikosteroid kullanımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Vitamin D'nin "Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1" ve IL-10 salınımını artırma yolu ile astımlı hastalarda kortikosteroidlerin antiinflamatuvar etkisini kuvvetlendirdiği düşünülmektedir.<sup>[23]</sup> Benzer şekilde, Xystrakis ve ark.<sup>[14]</sup> vitamin D3'ün kortikosteroid dirençli astım hastalarında T hücrelerinin IL-10 salınımını artırdığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda SKİT'e vitamin D eklenmesi steroid dozunu azaltıcı etki sağladı ve bu etki IL-10 salınımında ve lenfositlerde Fxp3 ekspresyonunda artışla ilişkili bulundu. Çalışmamızda vitamin D'nin atak sayısını azaltıcı etkisi, daha önceki çalışmalarda gösterilen (kateolisidin gibi antimikrobiyal peptidlerin sentezinin uyarılması, epitelial hücrelerde virüs tarafından uyarılmış



NFkB ilişkili kemokin (CXCL10) ve IFN- $\beta$  salınımının azalması gibi birkaç farklı mekanizma ile ortaya çıkmış olabilir.<sup>[10,26,27]</sup> Son olarak Brehm ve ark.<sup>[28]</sup> serum vitamin D düzeyleri ile astıma bağlı hastaneye yatış veya acil başvuru arasında ters ilişki olduğunu göstermiştir. Bu bulgular eşliğinde vitamin D'nin astım ataklarını azaltıcı etkisi olduğu sonucuna varılabilir.

Allerjen spesifik immünoterapi antijen-spesifik T hücrelerin gelişiminde değişikliklere yol açar, IL-4 üreten T hücrelerinin sayısını azaltır ve IL-10 üreten CD4+CD25+ T hücrelerinin (Tr1) sayısını artırır. Yakın zamanda doğal CD4+CD25+Foxp3+ düzenleyici T hücrelerinin (n Treg) nazal mukozada local Foxp3+ T hücrelerinde artış ve beraberinde polen immünoterapisi sonrası klinik iyileşme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.<sup>[29]</sup> Başka bir çalışmada ETA-SİT'nin T hücrelerinde Foxp3 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir.<sup>[30]</sup> *In vitro*, aktif 1,25 (OH) D ile kombine olarak IL-2, Foxp3 ve sitotoksik T lenfosit antijen-4 ifade eden düzenleyici T hücrelerinin gelişimini uyarır ve istirahat halindeki CD4+ T hücre proliferasyonunu baskılar.<sup>[31]</sup>

Daha önce bildirilen çalışmalar ile uyumlu olarak çalışmamızda da SKİT ile CD4+CD25+Foxp3+ ekspresyonunda ve IL-10 üretiminde özellikle vitamin D desteği yapılan grupta daha belirgin olmak üzere bir artış saptandı. Daha önceki çalışmalar spesifik immünoterapi ile serum allerjen-spesifik IgG4 ve IgG1 üretiminin 5 ila 100 kat arttığını ortaya koymuştur.<sup>[32]</sup> Bu da allerjen-spesifik Th2'den düzenleyici T hücre baskın bir immün yanıtı doğru bir kaymayı yansıtmaktadır. Benzer şekilde çalışmamızda vitamin D alan grupta allerjen-spesifik IgG4 düzeylerinin daha erken dönemde, altıncı aydan itibaren bir artış gözlenmiştir. Bu gözlem, bu gruptaki klinik ve immünolojik değişikliklerde rol oynamış olabilir.

Sonuç olarak, çalışmamız allerjen spesifik immünoterapide eşzamanlı vitamin D desteğinin daha erken dönemde astım kontrolüne olanak sağladığını ve konvansiyonel immünoterapiye göre steroid azaltıcı etki sunduğunu ortaya koymuştur. Farklı serum vitamin D düzeyine sahip hastalarda ve farklı (daha yüksek) dozda vitamin D kullanımının nasıl bir etki sağlayacağı ileri çalışmalar ile araştırılmalıdır.

### Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

### Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Khinchi MS, Poulsen LK, Carat F, André C, Hansen AB, Malling HJ. Clinical efficacy of sublingual and subcutaneous birch pollen allergen-specific immunotherapy: a randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy study. *Allergy* 2004;59:45-53.
2. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:780-91.
3. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Injection allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 4;CD001186.
4. Eng PA, Reinhold M, Gnehm HP. Long-term efficacy of preseasonal grass pollen immunotherapy in children. *Allergy* 2002;57:306-12.
5. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Høst A, et al. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 2007;62:943-8.
6. Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M, Akdis CA. Role of bacillus Calmette-Guérin as an immunomodulator for the prevention and treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:552-7.
7. Larché M. Peptide and recombinant immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2011;31:377-89.
8. Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 1984;224:1438-40.
9. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3294-8.
10. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-3.
11. Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, Floto RA, Norman AW, Skolimowska K, et al. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol* 2007;178:7190-8.
12. Searing DA, Leung DY. Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010;30:397-409.
13. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000;164:2405-11.
14. 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;116:146-55.
15. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, McDonald J, Sattar Z, Cousins DJ, et al. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J Clin Invest* 2009;119:387-98.
16. Taher YA, van Esch BC, Hofman GA, Henricks PA, van Oosterhout AJ. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 2008;180:5211-21.
17. National Institutes of Health. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention Revision, 2010. Available from: <http://www.ginaasthma.org>

18. Canonica GW, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Bousquet PJ, Lockey RF, Malling HJ, et al. Recommendations for standardization of clinical trials with Allergen Specific Immunotherapy for respiratory allergy. A statement of a World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy* 2007;62:317-24.
19. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993;48(14 Suppl):48-82.
20. Hargreave FE, Ramsdale EH, Sterk PJ, Juniper EF. Advances in the use of inhalation provocation tests in clinical evaluation. *Chest* 1985;87(1 Suppl):32S-35S.
21. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008;122:398-417.
22. Majak P, Rychlik B, Stelmach I. The effect of oral steroids with and without vitamin D3 on early efficacy of immunotherapy in asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1830-41.
23. Searing DA, Zhang Y, Murphy JR, Hauk PJ, Goleva E, Leung DY. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:995-1000.
24. Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, et al. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:765-71.
25. Bener A, Ehlayel MS, Tulic MK, Hamid Q. Vitamin D deficiency as a strong predictor of asthma in children. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157:168-75.
26. 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;181:7090-9.
27. Hansdottir S, Monick MM, Lovan N, Powers L, Gerke A, Hunninghake GW. Vitamin D decreases respiratory syncytial virus induction of NF-kappaB-linked chemokines and cytokines in airway epithelium while maintaining the antiviral state. *J Immunol* 2010;184:965-74.
28. Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AL, Hollis BW, Strunk RC, Zeiger RS, et al. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:52-8.e5.
29. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1467-72.
30. Lin YL, Shieh CC, Wang JY. The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy* 2008;63:67-74.
31. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009;183:5458-67.
32. Keles S, Karakoc-Aydiner E, Ozen A, Izgi AG, Tevetoglu A, Akkoc T, et al. A novel approach in allergen-specific immunotherapy: combination of sublingual and subcutaneous routes. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:808-815.e7.