T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KİNOLON GRUBU ANTİBİYOTİKLERE KARŞI GELİŞEN AŞIRI DUYARLILIK REAKSİYONLARINDA $CD4^+$ T HÜCRE YANITLARI

BELKIS İŞLEYEN

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ESİN ÇETİN

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Belkıs İşleyen (İmza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca her konuda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, sabırlı, sıcakkanlı ve yardımsever tutumundan dolayı tez danışmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Esin Aktaş Çetin'e,

Yardım ve destekleriyle yanımda olan sayın hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e, tezimin laboratuvar çalışmalarında ve istatistiksel hesaplamalarındaki yardım ve desteklerinden dolayı Doç. Dr. Umut Can Küçüksezer, Dr. Leyla Pur Özyiğit'e ve Dr. Yusuf Metin Gelmez'e, desteklerinden ve dostluklarından dolayı tüm İmmünoloji Anabilim Dalı ekibine,

Tezimiin her aşamasında bana destek olan, klinik açıdan verdiği tüm emek ve yardımlardan dolayı Uzm. Dr. Semra Demir'e,

Yardımları, bilgi birikimleri ile bana yol gösteren ve her zaman destek olan değerli hocalarım Doç. Dr. Aslı Gelincik, Prof. Dr. Bahaüddin Çolakoğlu ve Prof. Dr. Suna Büyüköztürk'e,

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, başta hemşirelerimiz Fatma Şenkurt Tavlı ve Emine Özkan olmak üzere tüm İmmünoloji ve Allerji Hastalıkları Bilim Dalı çalışma arkadaşlarım ve doktorlarımıza,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olduklarını bildiğim annem Ayşe Ertek, babam Mesut Ertek, kardeşim Osman Ertek'e, her konuda yanımda olan ve tez çalışmam süresince hiçbir zaman desteğini esirgemeyen eşim M. Zekeriya İşleyen'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41041

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. İlaç Reaksiyonları 3
2.1.1.Sınıflandırma 4
2.1.2. Risk Faktörleri 4
2.2. İlaçların T hücreleri Tarafından Tanınması 5
2.2.1. Hapten hipotezi 5
2.2.2. Pro-hapten hipotezi 6
2.2.3. Pi-kavramı 6
2.2.4. Tehlike Hipotezi 7
2.3. İlaç Aşırıduyarlılık Reaksiyonlarının Sınıflandırılması 7
2.3.1. Tip I (IgE aracılı) Reaksiyonlar 8
2.3.2. IgG aracılı Tip II (Sitotoksik mekanizma) ve Tip III (İmmün Kompleks Birikimi) Reaksiyonlar 9
2.3.3. Tip IV (T hücre aracılı) Reaksiyonlar 10
2.4. İlaç Aşırıduyarlılık Reaksiyonlarında Tanı Yöntemleri 11
2.4.1. Öykü 11
2.4.2. *in Vivo* Testler 12
2.4.2.1. Deri (prik, intradermal, yama) Testleri 12
2.4.2.2. Provokasyon Testleri 12

2.4.3. *in Vitro* Tanı Testleri 12
2.5. T Hücre İmmünitesi 13
2.5.1.T hücre aktivasyonu 13
2.5.2. T hücre çoğalması 14
2.5.3. T hücre gelişimi 14
2.5.4. Yardımcı T hücre fonksiyonları 15
2.5.5. Th1 hücreler 15
2.5.6. Th2 hücreler 16
2.5.7. T hücre aracılı immünitenin baskılanması 16
2.5.7.1. Regülatör T hücreler 17
2.6. Allerjide $CD4^+$ T Hücre Fonksiyonları 17
2.7. Kinolonlara Karşı Aşırıduyarlılık Reaksiyonları 19
3. GEREÇ VE YÖNTEM 21
3.1. Hasta Seçimi 21
3.2. Deri Testi Uygulaması 21
3.3. Provokasyon Testlerinin Uygulanması 21
3.4. Yüzey Molekül Ekspresyonlarının Saptanması 22
3.5. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu 23
3.6. PKMH Hücre Kültür Aşamaları 23
3.7. Hücre İçi Sitokin Tayini 24
3.8. CFSE Dilüsyon Metodu ile Lenfosit Transformasyon Test (LTT) Analizi 25
3.9. ELISA Yöntemiyle IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ Düzeylerinin Saptanması 26
3.9.1. IL-2 ELISA Tayini 26
3.9.2. IFN-γ ELISA Tayini 26
3.9.3. IL-4 ELISA Tayini 27
3.9.4. IL-10 ELISA Tayini 27
3.10. İstatistiksel Analizler 28
4. BULGULAR 29
4.1. Hasta grubunun genel ve klinik özellikleri (SPFX'e karşı oluşan aşırıduyarlılık profilleri) 29
4.2. Lenfosit Alt Grupları ve Aktivasyon Molekül Analiz Sonuçları 30
4.3. B ve T Lenfosit Oranları 30
4.4. Total Lenfosit Aktivasyon ve Kostimülatör Molekül Ekspresyonları 31

4.5. $CD4^+$ Th Hücrelerinde Aktivasyon ve Kostimülatör Molekül Ekspresyonu..... 32
4.6. $CD4^+$ T hücre içi IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10 salınımı..... 33
4.7. Lenfosit Transformasyon Test (LTT) Sonuçları..... 35
4.8. SPFX uyarımlı kültürlerde IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri..... 36
4.9. Plazma IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeylerinin saptanması..... 37
5. TARTIŞMA..... 39
KAYNAKLAR..... 43
FORMLAR..... 51
GÖNÜLLÜ ONAY FORMU..... 55
ETİK KURUL KARARI..... 56
ÖZGEÇMİŞ..... 59

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: İstenmeyen ilaç reaksiyonlarının sınıflaması 3
Tablo 2-2: Antikor (I-III) ve T Hücre Aracılı Aşırıduyarlılık Reaksiyonları (IVa-d) 8
Tablo 3-1: Provokasyon testinde kullanılan SPFX dozları 22
Tablo 3-2: Lenfosit alt grupları ve aktivasyon molekül ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanılan monoklonal antikorların listesi 23
Tablo 3-3: Hücre içi sitokin tayininde kullanılan monoklonal antikorların listesi.....25
Tablo 4-1: SPFX ile aşırıduyarlılık reaksiyon profilleri ve SI (stimülasyon indeksi) olarak LTT sonuçları.....29
Tablo 4-2: LTT sonucu negatif olan hastalarda hücre içi sitokin ölçümlerinin değerlendirilmesi (ortalama ± SD).....30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: İlaçların T hücreleri tarafından tanınması 6
Şekil 2-2: Tehlike hipotezi: İkincil uyaranlar varlığında ilaç molekülünün immün mekanizması 7
Şekil 2-3: SPFX'in kimyasal yapısı 20
Şekil 4-1: Kontrol ve hasta grubunda T lenfosit alt grup oranları 31
Şekil 4-2: Hasta ve sağlıklı bireylerde CD4, CD8, CD3 ve CD19 boyaması sonucunda akan hücre ölçer görüntüleri 31
Şekil 4-3: Total lenfosit aktivasyon ve kostimülatör molekül ekspresyonları 32
Şekil 4-4: $CD4^+$ Th lenfositlerinde aktivasyon ve kostimülatör molekül ekspresyonları 32
Şekil 4-5: Sağlıklı ve hasta grubunda $CD4^+$ T lenfosit popülasyonunda CD28, CD25, CD69 ve HLA-DR ekspresyonlarının akan hücre ölçer görüntüleri 33
Şekil 4-6: SPFX ile uyarım sonrası $CD4^+$ T lenfosit hücre içi IFN-γ, IL-2, IL-4 ve IL-10 salınımları 34
Şekil 4-7: Sağlıklı ve hasta grubunda $CD4^+$ T lenfositlerinde 10 µg/ml SPFX uyarımı sonrasında hücre içi IL-2, IL-4 ve IL-10 salınımının akan hücre ölçer görüntüleri 35
Şekil 4-8: Hasta ve sağlıklılarda 5 µg/ml ve 10 µg/ml SPFX ile uyarım sonrası $CD4^+$ T hücre proliferasyonu 36
Şekil 4-9: PKMH kültür süpernantlarında IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri 37
Şekil 4-10: Hasta ve kontrol grubu plazma örneklerinde IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri 38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AGEP: Akut generalize ekzantematöz püstülozis

APC: Allofikosiyanin

BAT: Bazofil aktivasyon testi

BFA: Brefeldin A

CAP FEIA: Fluoroenzim immün tetkiki

CAST: Hücresel allerjen uyarı testi

D: Dalton

DRESS: Eozinofilinin eşlik ettiği ilaç reaksiyonu ve sistemik semptomlar

EBV: Epstein Barr virüs

FITC: Fluorescein izotiyosiyanat

FoxP3: Forkhead box protein 3

GATA-3: Trans-etkili T hücre spesifik transkripsiyon faktörü

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör

HIV: İnsan immünyetmezlik virüsü

HLA: İnsan lökosit antijeni

IgG: İmmünoglobülin G

IgE: İmmünoglobülin E

IgM: İmmünoglobuülin M

IFN-γ: İnterferon-gamma

IL-2: İnterlökin-2

IL-4: İnterlökin-4

IL-10: İnterlökin-10

LTC4: Lökotrien C4

LTD4: Lökotrien D4

LTE4: Lökotrien E4

LTT: Lenfosit transformasyon testi

MHC: Doku uyumluluk kompleksi (MHC)

MPE: Makülopapüler ekzantem

PAF: Platelet aktive edici faktör

PE: Fikoeritrin

PerCp: Peridinin Klorofil Protein kompleksi

PHA: Fitohemaglütinin

Pi: Farmakolojik etkileşim (pharmacological interaction)

PKMH: Periferik kan mononükleer hücre

RAST: Radio Allergo Sorbent Test

RIA: Radyoaktif immünolojik yöntem

SJS: Steven Johnson sendromu

SPFX: Siprofloksasin

STAT-4: Sinyal İletici ve Transkripsiyon protein aktivatörü-4

TEN: Toksik epidermal nekrolizis

TGF-β: Transforme edici büyüme faktörü-beta

THR: T hücre reseptörü (T cell receptor)

Th1: Yardımcı T hücresi 1

Th2: Yardımcı T hücresi 2

Treg: Regülator (düzenleyici) T hücre

nTreg: Doğal T regülatör hücre

iTreg: İndüklenebilir T regülatör hücre

TNF-α: Tümör nekroze edici faktör-alfa

US: Uyarımsız (Unstimüle)

ÖZET

Ertek B. ***Kinolon Grubu Antibiyotiklere Karşı Gelişen Aşırıduyarlılık Reaksiyonlarında CD4$^+$ T Hücre Yanıtları***. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji AD. Yüsek Lisans Tezi. İstanbul, 2016.

Siprofloksasin (SPFX), en yaygın olarak kullanılan kinolon grubu antibiyotik olup, kullanan hastaların yaklaşık %1-2'sinde kutanöz ters ilaç reaksiyonları oluşturmaktadır. Gecikmiş tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarının (ADR) kesin olarak tanı konulması zor olmakla beraber lenfosit transformasyon testi (LTT), T hücre aracılı geç tip ilaç ADR'da kullanılan *in vitro* tanı testidir. Çalışmamızda aktivasyon molekülleri, SPFX ile uyarılmış CD4$^+$ T hücrelerinde, hücre içi sitokin salınımları ile LTT testi ve buna ek olarak plazma ve SPFX ile uyarılmış kültür üst sıvılarında IL-4, IL-10, IL-2, IFN-γ sitokin düzeyleri araştırılmıştır.

Çalışmaya SPFX ile gecikmiş tip ADR geçiren hastalar (n=8, 45±12 yaş) ve SPFX'i tolere eden sağlıklı kontroller (n=10, 47±13 yaş) dahil edilmiş, LTT testi ile akan hücre ölçerde SPFX spesifik CD4$^+$ T hücre oranları araştırılmıştır. CD4$^+$ T hücre CD25, CD28, CD69 ve HLA-DR aktivasyon molekül ekspresyonları ve ilaçla uyarım sonrası CD4$^+$ T hücre içi IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ içerikleri akan hücre ölçer cihazı ile ölçülmüştür. Plazma ve SPFX uyarımlı kültür sıvılarında IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir.

IL-2 ve IL-4 salgılayan CD4$^+$ T hücre oranlarındaki artış ile birlikte IL-10 salgılayan CD4$^+$ T hücre oranlarında azalma bu hücrelerin kinolonlarla ilişkili geç tip ADR'da rol oynayabileceğini desteklemektedir. Hasta grubunda plazma ve SPFX stimüle kültür üst sıvılarında IL-10 düzeyleri ve IL-10$^+$CD4$^+$ T hücre oranındaki azalma gecikmiş tip ADR'lara bağlı regülasyon bozukluğunu kanıtlamaktadır. Bulgularımız, LTT ve hücre içi sitokin ölçümü, *in vivo* testler negatif olsa bile kinolon ADR tanısında önemli bir tanı testi olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: İlaç allerjisi, CD4$^+$ T hücre, siprofloksasin, LTT, hücre içi sitokin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41041

ABSTRACT

Ertek B . ***CD4$^+$ T cell response in delayed type hypersensitivity reactions due to quinolones.*** Istanbul University, Institute of Health Science, Institute of Experimental Medicine (DETAE), Department of Immunology, Msc Thesis. Istanbul, 2016.

Ciprofloxacin (CPFX) is a widely used quinolone antibiotic which induces cutaneous adverse drug reactions in about 1% to 2% of treated patients. Definite diagnosis of delayed type hypersensitivity reactions (DTHR) may be challenging; however the lymphocyte transformation test (LTT) can be beneficial for *in vitro* diagnosis of drug hypersensitivity reactions. The aim of this study was to evaluate the activation markers, intracellular cytokine secretion, LTT of drug stimulated $CD4^+$ T cells, and additionally IL-4, IL-10, IL-2, IFN-γ levels in plasma and CPFX-stimulated culture supernatants.

Patients who experienced DTHR to CPFX (n=8, mean age: 45 ± 12 years) and healthy subjects (n=10, mean age: 47 ± 13 years) were included in the study. Intradermal tests and patch tests with CPFX were performed, LTT was analyzed in order to determine CPFX-specific $CD4^+$ T cells by flow cytometry. CD25, CD28, CD69 and HLA-DR expression of $CD4^+$ T cells and intracellular IL-2, IL-4, IL-10 and IFN-γ levels were studied in CPFX-specific $CD4^+$ T cells by flow cytometry. IL-2, IL-4, IL-10 and IFN-γ levels in plasma and drug stimulated culture samples were analyzed by ELISA.

Increased IL-2 and IL-4-secreting $CD4^+$ T cells together with decreased IL-10 secreting $CD4^+$ T cells are associated with quinolone-related DTHR. Reduced IL-10 levels in plasma, CPFX-stimulated cultures and also $IL\text{-}10^+CD4^+$ T cells demonstrate the loss of regulation, which may be due to the DTHR. Intracellular cytokine measurement with LTT can support the diagnosis of quinolone hypersensitivity when the *in vivo* tests remain negative.

Key Words: Drug allergy, $CD4^+$ T cells, ciprofloxacin, LTT, intracellular cytokines

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 41041

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlaç aşırıduyarlılık reaksiyonları nadir olmakla birlikte ölümcül seyredebilmektedir. İlaç aldıktan sonra ilk 1 saat içinde gelişen akut ürtiker, nefes darlığı, anafilaksi gibi reaksiyonlar erken tip; 1 saatten daha geç dönemde gelişen daha çok deride görülen reaksiyonlar örneğin makülopapüler döküntü, Steven Johnson sendrom (SJS), toksik epidermal nekrolizis (TEN) geç tip reaksiyonlar olarak tanımlanır.

İlaç allerjilerinde tanı son derece zahmetli ve zor karar verilebilen bir süreçtir. Bu durumun en önemli nedenleri; hastanın aynı anda birden fazla ilaç kullanıyor olabilmesi, altta yatan hastalığın klinik belirtilerinin ilacın oluşturduğu belirtilerle benzerliği, hastanın yanlış veya eksik bilgi veriyor olması ve tanı testlerinin sınırlılığı ve yetersizliğidir. Klinik olarak uygulanan tanı testleri (deri prik, intradermal, yama ve provokasyon testleri) çoğu kez yetersiz kalmaktadır. Çünkü birçok ilaç için deri testine uygun standart ekstre bulunmamaktadır. İlaç allerjisinde altın standart olarak kabul edilen ilaç provokasyon testleri ise ciddi sistemik reaksiyonlara yol açabilmektedir. Bu nedenle *in vitro* tanı testlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Erken tip reaksiyonların tanısında bazofil aktivasyon testi (BAT), geç tip reaksiyonların tanısında ise lenfosit transformasyon testi (LTT) geliştirilmekte olan *in vitro* alternatif tanı testleridir. İlaç-sensitize T hücrelerini belirlemek için kullanılan en yaygın ve en eski yöntem LTT'dir. Bu testin spesifitesi % 90-95 iken, çeşitli faktörlere bağlı olarak sensitivitesi %30-70 arasında değişmektedir.

Edinsel hücresel immün yanıtta rol alan yardımcı T (Th)1 hücreleri interferon gamma (IFN-γ) ve interlökin (IL)-2 sitokinlerinin salgılanmasından sorumludur. Th2 hücreleri ise özellikle allerjik reaksiyonların ortaya çıkmasına neden olan IL-4, IL-5, IL-13 gibi sitokinlerin üretiminde rol almaktadır. İmmünregülasyonda rol oynayan regülatör T hücreleri (Treg) ise IL-10 ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β) gibi sitokinler salgılayarak immün yanıt baskılayıcı etki gösterirler.

Kinolonlara karşı gelişen aşırıduyarlılık reaksiyon sıklığı geçtiğimiz on yıl içinde artmış, günümüzde kinolonların en sık allerjiye neden olan non-betalaktam antibiyotik olduğu gösterilmiştir. Siprofloksasin (SPFX); en yaygın olarak kullanılan kinolonlardan olup, kullanan hastaların yaklaşık %1-2'sinde kutanöz ters ilaç reaksiyonlarına sebep olmaktadır. Kinolonlara karşı gelişen geç tipte raksiyonlara yönelik az sayıda çalışma

bulunmakla birlikte, kinolonlara bağlı geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarının T hücre immün yanıtı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır.

Çalışmamızda SPFX'e bağlı geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonları geçiren hastalarda SPFX ile aktive edilen $CD4^+$ T hücre içi Th1, Th2 ve regülatör sitokin düzeyleri, lenfosit proliferasyonu, plazma ve SPFX stimüle periferik kan mononükleer hücre kültür üst sıvılarında sitokin düzeylerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Reaksiyonları

Günümüzde teşhis ve tedavi amacıyla kullandığımız ilaçların hızla artışına paralel olarak istenmeyen ilaç reaksiyonlarına daha sık rastlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü bir ilacın tanı, tedavi veya koruma amacıyla uygun dozda kullanımı sırasında oluşan istenmeyen ve zararlı yanıtı ilaç ters etkisi olarak tanımlamaktadır (1). İlaç reaksiyonları immün ve immün olmayan mekanizmalarla gelişmektedir. Dünya Allerji Organizasyonu, oluşumunda immünoglobülin (Ig)E veya T hücre aracılı aşırıduyarlılık reaksiyonlarının yer aldığı ilaç reaksiyonlarını ilaç allerjisi olarak tanımlamaktadır (2).

İlaç reaksiyonları yaşamı tehdit edebilecek durumlara neden olabilmesi, hastanede yatış süresini uzatabilmesi, tedavi maliyetini arttırabilmesi nedeni ile önemli bir sağlık sorunudur. İstenmeyen ilaç reaksiyonları hastanede yatan hastaların %10-20'sinde, genel popülasyonun ise %7'sinde oluşmaktadır (3).

Tablo 2-1: İstenmeyen ilaç reaksiyonlarının sınıflaması

Tip A reaksiyonlar	**Örnekler**
Yüksek doz	Karaciğer yetersizliği (asetaminofen)
Yan etki	Baş ağrısı, bulantı (metilksantinler)
Dolaylı etkiler	Antibiyotik kullanımı sonrası ishal gelişimi
İlaç etkileşimi	Makrolidlerin teofilin düzeyini arttırması
Tip B reaksiyonlar	
İntolerans	Tek doz aspirin ile kulak çınlamasının gelişmesi
İdiyosenkrazi (farmakogenetik)	G6PD eksikliğinde antioksidan ilaçlarla anemi
İmmünolojik ilaç reaksiyonları	Beta laktamlar ile anaflaksi

2.1.1.Sınıflandırma

İstenmeyen ilaç reaksiyonlari Tip A (beklenen ya da duyarlı olmaksızın herkeste görülebilen) ve Tip B (sadece duyarlı olan az bir grup insanda görülen ve beklenmeyen) olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır (Tablo 2-1). Tip A reaksiyonlar ilacın farmakolojik etkisiyle ve dozu ile ilişkili olup istenmeyen ilaç reaksiyonlarının %80'ini oluştururlar. İlaçların yüksek doz kullanımı, farmakolojik yan etki, dolaylı etki ve ilaç-ilaç etkileşimi bu gruptandır. Tip B reaksiyonlar ilacın bilinen farmakolojik etkisiyle ilişkili olmayan, dozdan bağımsız olarak meydana gelen reaksiyonlar olup, reaksiyonların %20'sini oluşturur. Allerjik, yalancı allerjik (psödo-allerjik) ve idiyosenkrazik ilaç reaksiyonları bu gruba girmektedir (4).

Daha az görülmesine karşın reaksiyon şiddetlerinin fazla olabilmesi ve hatta ölümle sonuçlanabilmesi nedeni ile bu reaksiyonlar oldukça önemlidir (5). İstenmeyen ilaç reaksiyonlarının yalnızca %15 kadarı ilaç allerjilerine bağlıdır (3). Thong ve arkadaşlarının iki yıllık prospektif çalışmasına göre hastanede yatan hastaların %0,42'sinde allerjik ilaç reaksiyonu gözlemlenmiştir. İlaç allerjisine bağlı mortalite ise 1000 başvuruda 0,09 sıklıkta saptanmıştır (6). İngiltere'de 1992-2001 yılları arasında anafilaksiye bağlı ölümler incelendiğinde birinci sırayı %44 ile ilaçlar almaktadır (7). İstanbul Tıp Fakültesi Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı' nda yapılan retrospektif çalışmaya göre; 1 Ocak 2008 ve 30 Aralık 2011 yılları arasında anaflaksi tanısı almış 516 hasta incelendiğinde, bu reaksiyonların %90.7 gibi büyük bir yüzdeyle ilaçlardan kaynaklandığı görülmüştür (8).

2.1.2. Risk Faktörleri

Tüm ilaçlar allerjik reaksiyona neden olabilmekte ve tedavi rejimi veya kişi ile ilgili faktörler allerjik reaksiyon olasığını etkileyebilmektedir (3). İlacın moleküler büyüklüğünün fazla olması, saf olmaması riskini artırır. Yine tek doz kullanıma göre uzun süreli yüksek doz ilaç kullanımları daha fazla allerjik reaksiyona neden olur. Uzun süreli kullanımlarda ilacın aralıklı ve tekrarlayan dozlarda verilmesi devamlı kullanıma göre daha fazla reaksiyona neden olur. En fazla reaksiyon lokal uygulamalarda izlenirken bunu parenteral ve oral uygulama takip etmektedir (3,9).

Kişisel faktörler değerlendirildiğinde daha az ilaçla karşılaştıklarından dolayı çocuklarda allerjik reaksiyonlar daha az görülmektedir. Kadınlarda risk erkeklerden iki kat daha fazladır. İlaç metabolizmasında görev alan enzimlerdeki kişisel farklılıklar, ailesel genetik yatkınlık ve kişide aynı anda olan enfeksiyöz durumlar riski arttırabilmektedir. Ailede ilaç allerjisi varlığı riski 15 kat arttırmaktadır (10).

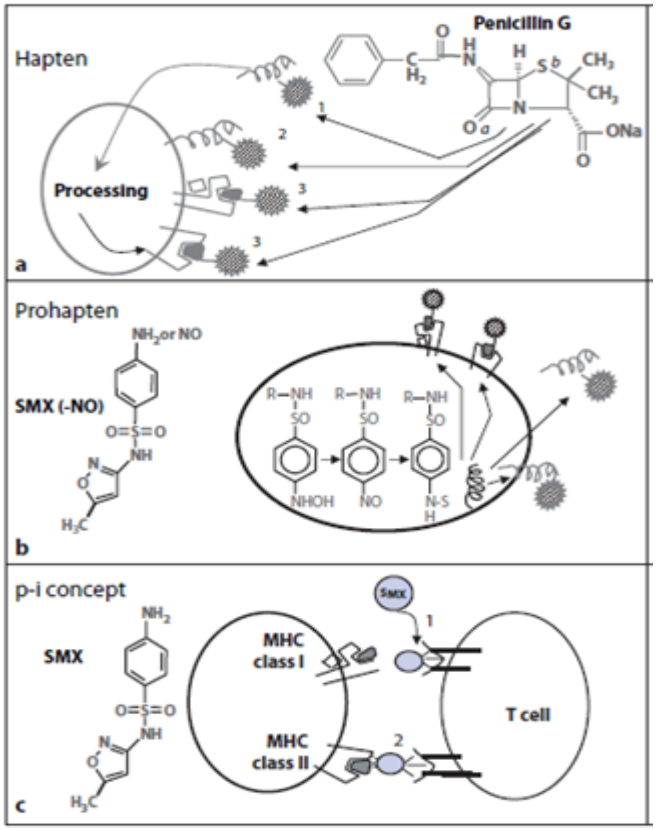
Bugün bazı insan lökosit antijeni (HLA) tipleri ile kesin ve güçlü ilişkisi belirlenmiş ilaç aşırıduyarlılık reaksiyonları bilinmektedir. Yine genetik polimorfizmin ilaç allerjisi oluşumunda önemli bir rolü olduğu kabul edilmektedir (11). İlaç allerjisi ile ilişkisi tanımlanmış Epstein Barr virüs (EBV) ve insan immünyetmezlik virüsü (HIV) gibi viral enfeksiyonlar da reaksiyon riskini artırmaktadır (12). İlaç karşı aşırıduyarlılık reaksiyonlarının gelişiminde kişinin atopik olmasının riski arttırmadığı da gösterilmiştir (13).

2.2. İlaçların T hücreleri Tarafından Tanınması

İlaçların antijenik olma özellikleri kimyasal yapıları ile ilişkilidir. Moleküler ağırlığı 1000 D'den büyük olan ilaçlar, örneğin L-asparaginaz, heterolog antiserumlar ve insülin, doğrudan immün yanıtı uyararak aşırıduyarlılık reaksiyonlarını başlatabilirler. İlaçların çoğu 1000 D'den düşük moleküler ağırlıkta basit organik bileşiklerdir. Küçük moleküller için değişik hipotezler öne sürülmüştür.

2.2.1. Hapten hipotezi

Küçük moleküllerin immünojenik olabilmesi için metabolize olup biyoaktif hale gelmeleri gerekmektedir. Daha sonra bu moleküller plazmadaki yüksek moleküler ağırlıklı taşıyıcı bir protein ya da hücre yüzeylerindeki büyük moleküllü yapılara kovalan olarak bağlanır. Bu olay ''haptenizasyon'' olarak tanımlanır (14,15). Buna en iyi örnek penisilin grubu antibiyotiklerdir (Şekil 2-1a).



Şekil 2-1: İlaçların T hücreleri tarafından tanınması

2.2.2. Pro-hapten hipotezi

İlaçların çoğu için doğrudan haptenizasyon reaksiyonu gerçekleşemez. Bu ilaçların, karaciğer veya başka bir yerdeki metabolizması sonucu oluşan reaktif ara ürünler hapten görevi görür ve büyük molekül ağırlıklı proteinlere bağlanır (4). Bu ilaçlara en iyi örnek sulfonamid grubu antibiyotiklerdir (Şekil 2-1b).

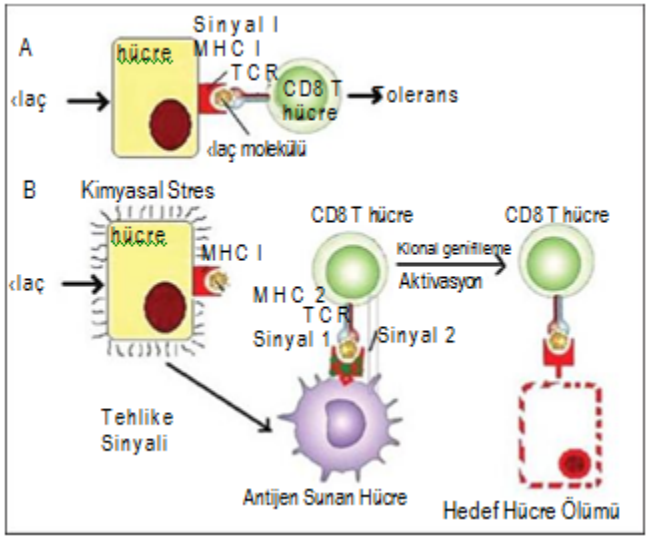
2.2.3. Pi-kavramı

Bunların dışında bazı ilaçlar herhangi bir tanıtıcı ara moleküle ihtiyaç olmadan T hücre reseptörüne (THR) bağlanarak T hücreyi doğrudan uyarır ve immün yanıt oluşturur, farmakolojik etkileşim (pharmacological interaction, Pi) olarak adlandırılan bu durumda ilaçla daha önceden karşılaşma gerekli değildir (16). Bu nedenle kimyasal olarak reaktif olmayan veya bilinen metabolizması olmayan (inert) ilaçlarla gelişen veya ilk karşılaşmada oluşan ani reaksiyonlar bu hipotezle açıklanabilir (5,17,18). Bu hipotez, spesifik doku uyumluluk kompleksi (MHC) molekülü, THR ve ilaç antijeni arasındaki etkileşim sonucu istenmeyen reaksiyonların oluştuğunu savunmaktadır. Bu mekanizma özellikle T hücre aracılıklı deri reaksiyonlarında yer almaktadır (16) (Şekil 2-1c).

2.2.4. Tehlike Hipotezi

Matzinger'in 1998'te öne sürdüğü tehlike hipotezinde ise önemli olan antijenin vücuda yabancı olması değil, oluşturduğu tehlike sinyalleridir. Bu sinyallerin kaynağı kimyasal stres, ilacın veya reaktif metabolitinin sitotoksik etkisiyle hasara uğrayan hücreler, nekrotik hücre ölümü veya ilaçtan bağımsız olarak eşlik eden enfeksiyon gibi başka bir kostimülatör olabilir (5). Normalde oluşmayan bir immün yanıt sayılan stres faktörlerinden herhangi biri varlığında tehlike sinyali oluşturup immün yanıtı başlatabilmektedir (Şekil 2-2).

İlaçların biyoaktivasyonunu sağlayan faz 1 reaksiyonların, detoksifikasyonunu sağlayan faz 2 reaksiyon aşamaları da aşırıduyarlılık yanıtına neden olabilmektedir (19). Bu noktada metabolizmada yer alan bazı enzimlerin değişik nedenlerle azalması veya fonksiyon kaybı da immünojenik yanıta neden olabilir (5,18).



Şekil 2-2: Tehlike hipotezi: İkincil uyaranlar varlığında ilaç molekülünün immün mekanizması

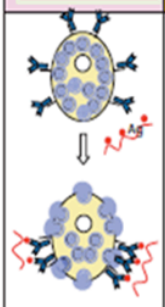
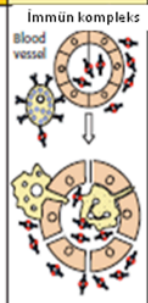
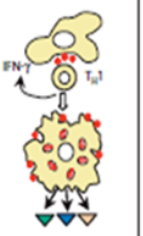
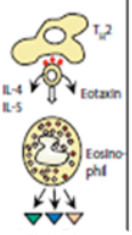
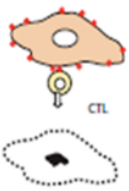
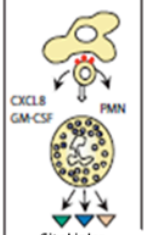
2.3. İlaç Aşırıduyarlılık Reaksiyonlarının Sınıflandırılması

Aşırıduyarlılık reaksiyonları birçok farklı immün mekanizma içerir ve buna bağlı olarak farklı klinik bulgular gösterir (20). Bu heterojeniteyi açıklamak ve *in vivo* meydana gelen kompleks olayları sadeleştirmek için Gell ve Coombs ilaç aşırıduyarlılık reaksiyonlarını Tip I-IV olarak 4 kategoriye sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırma, mast hücre ve bazofiller üzerinde bulunan, yüksek affiniteyIe IgE reseptörüne bağlanan IgE antikorunun oluşumuna, kompleman bağlayıcı antikorlara ve enflamasyonun farklı

formlarını düzenleyen T hücre reaksiyonlarına dayanır. Bu reaksiyonlar birbirleriyle sıkıca ilişkilidir, örn: B hücrelerinin IgG ve IgE üreten plazma hücrelerine dönüşmeleri T hücrelerinin yardımına bağlıdır.

Gell ve Coombs sınıflandırması 1960'lı yıllarda geliştirilmiştir. Günümüzde immün sistemin sadece tek bir çeşit ve spesifik hafızaya sahip olmadığı, farklı tip T hücreleri tarafından düzenlendiği açığa kavuşmuştur. Farklı reaksiyonları tanımlama adına T hücre fonksiyonlarının çeşitliliğini daha iyi açıklamak için bu sınıflandırma genişletilip güncellenerek T hücre aracılı Tip IV reaksiyonlar kendi içinde dört alt tipe ayrılmıştır (Tablo 2-2) (21).

Tablo 2-2: Antikor (I-III) ve T Hücre Aracılı Aşırıduyarlılık Reaksiyonları (IVa-d)

	Tip I	Tip II	Tip III	Tip IVa	Tip IVb	Tip IVc	Tip IVd
İmmün reaktan	IgE	IgG	IgG	IFN-γ, TNF-α (Th1 hücreler)	IL-5,IL-4/IL-13 (Th2 hücreler)	Perforin/ granzim B (CTL)	CXCL8, GM-CSF (T hücreleri)
Antijen	Çözünebilir antijen	Hücre veye matrix ilişkili antijen	Çözünebilir antijen	Hücrelerce antijen sunumu veya direkt T hücre uyarımı	Hücrelerce antijen sunumu veya direkt T hücre uyarımı	Hücre ilişkili antijen veya direkt T hücre uyarımı	Hücrelerce sunulan antijen veye direkt T hücre uyarımı
Efektör	Mast hücre aktivasyonu	FcR+ hücreler (fagositler ve NK hücreleri)	FcR+ hücreler Komplemen	Makrofaj aktivasyonu	Eozinofiller	T hücreleri	Nötrofiller
							
Hipersensitivite reaksiyonuna örnek	Allerjik rinit, astım,sistemik anafilaksi	Hemolitik anemi, trombopeni (örn:penisilin)	Serum hastalığı, Arthus reaksiyonu	Tüberkülin reaksiyonu, kontakt dermatit	Kronik astım, kronik allerjik rinit,eozinofilik makülopapüler	Kontakt dermatit, Makülopapüler ve bülloz döküntü, hepatit	AGEP, Behçet hastalığı

2.3.1. Tip I (IgE aracılı) Reaksiyonlar

IgE aracılığıyla gelişen Tip I reaksiyonlar en sık karşılaşılan reaksiyon grubudur ve ilaç alımını takiben ilk bir saat içinde ortaya çıktıkları için 'erken reaksiyonlar' olarak da adlandırılmaktadır. IgE sistemi küçük miktardaki antijenlere tepki göstermekte ve bu

spesifik IgE reseptörüne bağlanan IgE (Fc-ε-RI) ile başarır. Fc-ε-RI çapraz bağlanmasında, erken semptomlara neden olan ve geç gözlenen allerjik enflamasyonların oluşmasına olanak sağlayan histamin, triptaz, lökotrien, prostaglandin ve tümör nekroze edici faktör (TNF)-α gibi çeşitli mediyatörler salınır. İlaçlara karşı gelişen IgE aracılı reaksiyonların genellikle bir hapten-taşıyıcı komplekse karşı öncelikli olarak gelişen immün yanıta dayalı olduğu düşünülmektedir. B hücreleri, yüzey Ig reseptörleri ile hapten-taşıyıcı kompleksin birbirleriyle etkileşimi sonucu IgE sekrete eden plazma hücrelerine dönüşürler. Bu olgunlaşmaya B hücreleri ile etkileşen T hücreleri hapten taşıcıyı kompleks ve IgE dönüşüm faktörlerinden IL-4 ve IL-13 salınımı yardımcı olur. Bu duyarlaşma fazı normalde semptomsuzdur. İlaçla yeniden karşılaşma durumunda, hapten-taşıyıcı kompleks tekrar oluşup mast hücreleri üzerinde bulunan ilaç spesifik IgE antikorlarına çapraz bağlanır ve mast hücre degranülasyonu ve erken allerjik semptomlara neden olur. IgE aracılı reaksiyonlar duyarlı bireylerde hafiften çok ağır, hatta ölümcül rahatsızlıklara neden olabilirler. Reaksiyonlar oral alımda dakikalar, parenteral uygulamada ise saniyeler içinde gerçekleşebilir. Semptomlar basit bölgesel kaşıntı, yüz, göğüs veya parenteral uygulama bölgesinde kızarıklık ile başlayıp, akut bronkospazma ve yaygın ürtiker ve ödeme kadar ulaşabilir. Daha ağır ve kompleks reaksiyonlar anafilaksi olarak adlandırılır. Genellikle ilk 15 dakikada gerçekleşen anafilaktik şokta yaygın kızarıklık, kaşıntı ve ürtiker ile birlikte larinks ödemine bağlı solunum, dolaşım problemleri ve bilinç kaybı gözlenir (21).

2.3.2. IgG aracılı Tip II (Sitotoksik mekanizma) ve Tip III (İmmün Kompleks Birikimi) Reaksiyonlar

Tip II ve Tip III reaksiyonlar kompleman bağlayıcı IgG antikorlarının formasyonuna dayanır. Nadiren IgM antikoru da bu reaksiyona katılmakta ve reaksiyonlar benzer özellikler göstermektedir. Bu reaksiyonlar, immün komplekslerin formasyonu ile kompleman ile Fc-Fcγ reseptörü taşıyan hücrelerin (makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreler, granülositler, lökositler, eritrositler, trombositler) etkileşimine dayanmakta ancak hedef yapılar ve fizyolojik sonuçlar farklılıklar göstermektedir. Tip II reaksiyonlarda hücre yüzeyinde bulunan protein-ilaç/metabolit yapısına karşı B hücreleri tarafından IgG otoantikorları oluşturulmaktadır. IgG ile bağlanan hücreler kompleman aktivasyonuna, fagositoza ve antikora bağımlı hücresel sitotoksisite gibi yıkıcı olaylara

duyarlı hale gelir. Hem eritrositlerin immün aracılı zarar görmesi sonucunda ortaya çıkan hemolitik anemi hem de trombositlerin zarar görmesi sonucu ortaya çıkan trombositopeni Tip II aşırıduyarlılık reaksiyonları olup, belirli ilaçların yan etkileri sonucu oluşurlar. Penisilin, kinidin ve metildopa bu mekanizma yolu ile hemolitik anemi ve/veya trombositopeni ile ilişkilendirilmiştir (22).

Tip III reaksiyonun oluşumu ise dolaşımda serbest olarak bulunan ilacın antijenik yapısı ile buna karşı oluşan IgG veya IgM sınıfındaki antikorların birleşip immünkompleks oluşturarak postkapiller venüllerde birikmesi esasına dayanmaktadır. Tip III reaksiyonun klinik semptomlarına, serum hastalığı, vaskülitler, ilaç ateşi ve bazı cilt erüpsiyonları örnek gösterilebilir (20).

2.3.3. Tip IV (T hücre aracılı) Reaksiyonlar

Gecikmiş tipte aşırıduyarlılık reaksiyonları olarak da bilinen, Tip IV aşırıduyarlılık reaksiyonları, ilaç-spesifik efektör T hücreleri aracılığıyla meydana gelir. T hücreleri gerek doku içine sızıp organ hasarına yol açarak, gerek antikor dönüşümü için sitokin üretimi yaparak tüm ilaç reaksiyonlarına katılırlar. Diğer aşırıduyarlılık reaksiyonlarından antijenle karşılaşılmasından duyarlılık reaksiyonun gerçekleşmesine kadar geçen sürenin uzunluğu ile ayrılmaktadır. Geç tip reaksiyonlar sitokin paternlerine ve farklı immün sistem hücrelerinin periferik aktivasyonuna göre kategorize edilmiştir.

Tip 4a reaksiyonlarda Th1 hücreler uyarılmakta ve yoğun şekilde IFN-γ ve TNF-α salgılayarak makrofaj ve monositleri uyarmaktadır. Th2 hücrelerin ana rol aldığı **Tip 4b** reaksiyonda ise salgılanan IL-5 eozinofilik enflamasyon oluşturmaktadır. **Tip 4c** reaksiyonda ise CD8 eksprese eden sitotoksik T hücreler perforin ve granzim B gibi enzimler salgılayarak direkt hücre lizisi yapmaktadır. Nötrofilik enflamasyonla kendini gösteren **Tip 4d** reaksiyonda T hücrelerden salınan CXCL-8 nötrofillerin ömrünü arttırırken granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ise nötrofil apoptozunu önleyerek enflamasyona katkıda bulunmaktadır. Aynı ilaç birden fazla immün yanıt mekanizması aracılığı ile aşırıduyarlılık reaksiyonlarına neden olabilmektedir (23).

Allerjik ilaç ile aynı ortama konan hasta lenfositlerinin allerjik olmayan kişilerde görülmeyen şekilde prolifere olması dikkat çekicidir. Birçok ilaç, spesifik T hücre yanıtına neden olabilmektedir. Antijenik yapıdaki ilaç veya ilacın metaboliti hücre içine alınır veya hücre içinde oluşup MHC sınıf I ile sunulur. Reaktif olan ilaç veya metaboliti ise eğer hücre dışında proteinle haptenizasyona uğramışsa MHC sınıf II ile

sunulmaktadır (5). Uyarılan T hücrelerden salınan IL-4, B hücrelerden IgE salgılanmasına neden olurken, IL-5 ise eozinofilleri aktive etmektedir (24). Az sayıda hücre grubu ise IFN-γ üretimi ile olaya katılır. B hücresi olmayan agamaglobulinemili bir çocukta ilaca bağlı akut gelişen maküler döküntülerin patolojik incelemesinde mononükleer hücrelerin gözlemlenmesi bu döküntülerin T hücre aracılı oluşturduğunu desteklemektedir (25).

İlaç alımını takiben ilk 1 saat sonrasında ortaya çıkan Tip IV reaksiyonlar, genellikle makülopapüler döküntü şeklinde kendini gösteren reaksiyonlardır. Daha az olarak fiks ilaç erüpsiyonu, eksfolyatif dermatit, akut generalize ekzantematöz püstülözis (AGEP), eozinofili ve sistemik belirtilerin eşlik ettiği derideki reaksiyonların ağır formları olan eozinofilinin eşlik ettiği ilaç reaksiyonu ve sistemik semptomlar (DRESS), SJS ve TEN de görülebilmektedir (23).

2.4. İlaç Aşırıduyarlılık Reaksiyonlarında Tanı Yöntemleri

İlaç allerjilerinde tanı son derece zahmetli ve zor karar verilebilen bir süreçtir. Bu durumun en önemli nedenleri; hastanın aynı anda birden fazla ilaç kullanıyor olabilmesi, altta yatan hastalığın klinik belirtilerinin ilacın oluşturduğu belirtilerle benzerliği, hastanın yanlış veya eksik bilgi veriyor olması, ayrıca tanı testlerinin sayı ve bu testlerin birçok merkezde yapılabilirliliğinin sınırlı oluşudur. Yapılan bir çalışmada ilaç allerjisi tanısı ile allerji kliniğine gönderilen hastaların sadece %23'ünde gerçek ilaç allerjisi saptanmıştır (26). Çocuklarda yapılan bir calışmada ilaç reaksiyonu öyküsü veren hastalarda ileri değerlendirme yapılmış ve %94'ünün suçlanan ilacı tolere ettiği görülmüştür (27). İlaç allerjisi öyküsünün gerçek ilaç allerjisinden 10 kat daha fazla olduğu düşünülmektedir. İlaçların metabolizmasının ve immün reaktif ürünlerinin bilinmemesi de tanıda zorluklara neden olmaktadır (28).

2.4.1. Öykü

Klinik tablonun ilaç allerjisine ait olup olmadığını saptamak için ayrıntılı bir öykünün büyük önemi vardır. Öykünün uygun ve yeterli bir şekilde alınabilmesini kolaylaştırabilmek için Avrupa İlaç Allerjisi Çalışma Grubu (European Network for Drug Allergy, ENDA), özgül bir anket formu hazırlamıştır (29). Öyküde en önemli temel nokta, hastada oluşan reaksiyonun bilinen aşırıduyarlılık reaksiyonlarından hangisi ile uyumlu olduğuna karar verilmesidir. Bunu, belirlenmesinden sonraki aşama ise tanı için yapılacak teste karar verilmesidir (4).

2.4.2. *in Vivo* Testler

2.4.2.1. Deri (prik, intradermal, yama) Testleri

Testin seçiminde reaksiyonun tipi ve ortaya cıkış süresi önemlidir. İlk bir saat içinde ortaya çıkan reaksiyonlarda "prik" ve "deri içi" (intradermal) testler, bir saatten sonra ortaya çıkan reaksiyonlarda intradermal testler geç okunmalı ve deri yama testi yapılmalıdır. Deri prik ve intradermal testler IgE aracılı erken reaksiyonları gösterirken, daha geç ortaya çıkan reaksiyonlarda deri yama testi veya geç okunan deri içi testler ile T hücre aracılı gelişen reaksiyonlar saptanmaktadır (30). Testler reaksiyondan en erken dört ile altı hafta sonra uygulanmalıdır. Test sırasında ilacın önerilen irritan olmayan dozları uygulanmalıdır. Pozitif deri testi kişinin IgE aracılı reaksiyonlar için risk altında olduğunu belirleyebilir, ancak negatif deri testi reaksiyon gelişme olasılığını dışlayamaz (31).

2.4.2.2. Provokasyon Testleri

Uygulaması hala tartışmalı olan tanı yöntemlerinden biri de şüpheli ilacın kendisi veya farmakolojik benzerinin çok düşük dozlardan başlanarak kontrollü olarak hastaya verilmesi ilkesine dayanan ilaç provokasyon testleridir (32). İlaç provokasyonu ilaç allerjisi tanısında altın standart olarak belirtilse de mutlaka risk-yarar oranı göz önüne alınarak yapılmalıdır (1). Uyarı testleri ciddi anafilaksi, SJS ve TEN gibi ciddi deri lezyonlarının geliştiği hastalarda yapılmaktadır (33). Bir çalışmada beta laktam allerjisi saptanmış 257 hastanın %69,3'üne deri testi ile %30,7'sine oral provokasyon testi ile tanı konulmuş ve öyküde allerji tarifleyen hastaları sadece deri testi ile değerlendirmenin yeterli olmayacağı düşünülmüştür (34).

2.4.3. *in Vitro* Tanı Testleri

Erken tip reaksiyonların tespitinde deri testlerine bir seçenek olarak ilaca özgül IgE ölçümü yapılabilir (35). Spesifik IgE ölçümü hala erken ilaç reaksiyonlarının değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan *in vitro* yöntem olsa da beta laktamlar, kas gevşeticiler ve insülin gibi sınırlı sayıda ilaç için uygulanması mümkündür. Bu testlerin deri testlerine göre duyarlılıkları düşük olsa da deri testi negatif iken spesifik IgE değerleri pozitif olan hastalar bildirildiğinden hızlı ciddi reaksiyon olmuş hastalarda provokasyon sonucu ortaya çıkabilecek riskten kaçınmak amacı ile yapılması yararlı olabilir (36). İlacın sadece kendisinin değil metabolitlerinin de allerjen olabilmesi spesifik IgE ölçümünün değerini azaltmaktadır (37). Bazofil aktivasyonunu göstermek amacı ile

serum triptaz düzeyi ve bazofillerden histamin salınımının değerlendirilmesi, akan hücre ölçer yöntemi ile bazofil uyarı testi (BAT), hücresel allerjen uyarı testi (CAST) yapılabilmektedir (38). Bazofiller aktive olduklarında yüzeylerindeki CD45, CD63, CD69, CD203c gibi belirleyiciler eksprese etmektedir. Bu belirleyicilerin BAT ile ölçümü allerjinin tanınmasında güvenilir bir yöntemdir. İlaç allerjisi değerlendirilmesinde duyarlılığı %36-97,7, özgüllüğü %90-95 olarak bildirilmiştir (39,40).

Geç tip ilaç aşırıduyarlıklık reaksiyonlarının *in vitro* tanısında ilaç-spesifik aktive T hücrelerinin analiz edilmesi esasına dayanmaktadır. LTT ilaç ile duyarlanmış T hücrelerini belirlemede kullanılan en yaygın ve en eski yöntemdir. LTT'nin duyarlılığı ilaca ve reaksiyonun tipine bağlı olarak % 60-70 arasında değişirken, özgüllüğü ise % 85-93 olarak tespit edilmiştir. Günümüzde ilaç-spesifik T hücrelerinin reaktivitesini analiz etmek amacıyla T hücre aktivasyon belirteçleri ve sitokin ölçümleri kullanılmaktadır. T hücre uyarımından sonra eksprese edilen CD25, CD69, CD71 ve HLADR gibi aktivasyon molekülleri spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak akan hücre ölçer cihazında analiz edilebilmektedir. T hücre aracılı ilaç reaksiyonlarında CD69'un ilaçla uyarılmış T hücre analizinde bir *in vitro* belirteç olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bunun yanında hücre içi ya da kültür sıvılarında ELISPOT veya akan hücre ölçer ile IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 ve IFN-γ gibi Th1 ve Th2 sitokinlerin salınımının değerlendirilmesi, geç tip ilaç reaksiyonlarında ilaç duyarlılanmasını belirlemede umut vadeden bir yöntem olabileceği gösterilmiştir (41).

2.5. T Hücre İmmünitesi

Edinsel immün yanıtın hücreleri olan lenfositler, vücutta klonal ekspansiyona sahip her bir antijene spesifik THR eksprese eden hücre grubudur. Sağlıklı bir erişkinde toplam lenfosit sayısı yaklaşık $5x10^{11}$'dir. En büyük T hücre alt grupları αβ antijen reseptörünü eksprese eden yardımcı $CD4^+$ T lenfositleri ve $CD8^+$ sitotoksik T lenfositleridir. $CD4^+$ yardımcı T lenfositler $CD3^+CD4^+CD8^-$ fenotipine sahip olup, insanda kanda, lenf düğümünde, hem de dalaktaki tüm lenfositlerin yarısı oranında bulunmaktadırlar (42).

2.5.1.T hücre aktivasyonu

T hücresi THR aracılığıyla antijen bağlanması ve sinyal iletimi ile aktive olmaktadır. Çözünür antijenlere reaksiyon veren B hücrelerinin aksine, T hücreleri antijen sunucu hücreler tarafından MHC sınıf II protein oluğuna bağlanan küçük peptidlerin antijen sunumu sonrasında uyarılabilmektedir. Peptid-MHC kompleksinin THR'ne bağlanması T hücre aktivasyonuna yol açacak bir seri biyokimyasal olayı tetiklemektedir (43).

2.5.2. T hücre çoğalması

Belirli bir peptid antijene yanıt veren naif T hücre sayısı az olmakla beraber bu hücrelerin patojene karşı immün yanıtı başlatılabilmesi için çoğalıp sayıca artmaları gerekmektedir. Dolayısıyla THR-MHC peptid kompleksi birleşimi ve kostimülatör molekül uyarımı sonucunda klonal çoğalma meydana gelmektedir. THR ve CD28 ile oluşan ikinci uyarı sonrasında aktive olan T hücreleri hem hücre çoğalması için gerekli bir sitokin olan IL-2'yi üretmekte hemde yüzeylerinde α, β ve γ zincirlerinden oluşan yüksek afiniteli IL-2 reseptörünü eksprese etmektedir. IL-2/IL-2 reseptör etkileşimi T hücrelerinin efektör ve hafıza fenotipine farklılaşmasını sağlamakta bu da antijen spesifik immün yanıtlarda T hücre immünitesini arttırmaktadır (43, 44).

2.5.3. T hücre gelişimi

T hücrelerinin antijenle sekonder lenfoid organlarda karşılaşmakta ve bu bölgelerde çok sayıda olgun T hücresinin bulunması hücresel immün yanıtın başlamasında önemli bir basamaktır. T hücresi kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden köken almaktadır. Hematopoetik kök hücreden kökenlenen hematopoetik progenitörler (lenfoid progenitör hücreler) timusa gider ve sayıca artarak olgunlaşmamış timositleri oluşturur. Kemik iliği kökenli timik progenitör hücreler kortikomedüller bölgeden timusa girer ve bu dönemde THR, CD3, CD4 veya CD8 eksprese etmezler ve çift negatif timositler ($CD4^{-}CD8^{-}$) olarak adlandırılırlar. Gelişimin ilk aşamasında diğer hücrelere farklılaşma kapasitelerini kaybederler ve Thy-1, CD44 ve CD25 gibi bazı T hücre yüzey moleküllerini eksprese etmeye başlarlar. TCR αβ lokuslarında THR gen rearranjmanı başlatılır ve korteksten subkapsüler zon bölgesine geçerler. Gelişim süresince hem CD4 hem de CD8 eksprese eden timositler çift pozitif timositler ($CD4^{+}CD8^{+}$) olarak adlandırılmakta ve pozitif ve negatif seleksiyona hazır hale gelmektedir. Timik antijen sunan hücreler tarafından sunulan peptid-MHC kompleksi ile uyarılmayan THR'ne sahip olan T hücreleri apoptozise uğrarlar. Timositler timik epitelyal hücreler ve diğer timik antijen sunan hücreler ile yüksek aviditede THR-peptid MHC kompleksi oluşturuyorsa timositler apoptozise uğrar (negatif seleksiyon). Negatif seleksiyon immün tolerans gelişimi için önemli bir mekanizmadır ancak %100 etkili bir sistem değildir. Timustan ayrılan T hücrelerinin periferde efektör fonksiyonlarını ortadan kaldırılması Treg hücre gelişimi ile sağlanmaktadır. Treg'lerin bir alt grubu da timusta gelişmekte ve yüzeylerinde CD4 ve CD25 eksprese edip Foxp3 transkripsiyon faktörü taşımaktadır. Düşük avidite ve afinite ile peptid-MHC kompleksini tanıyanlar ise tek pozitif olgun T hücresi haline gelmektedir (pozitif seleksiyon). MHC sınıf I molekülü ile uyarılan THR'ne sahip olan olan T hücreleri $CD8^{+}$ T hücre MHC sınıf II molekülü

ile uyarılan THR taşıyan T hücreleri $CD4^+$ T hücrelerine dönüşürler. Olgunlaşmanın bu son aşamasında tek pozitif timositler ($CD4^+CD8^-$ veya $CD4^-CD8^+$) olarak periferik dokulara giderler. Timositlerin %98'i timustaki gelişim sürecinde ya pozitif seleksiyon yada negatif seleksiyonla ölmekte, sağ kalmayı başaran %2 oranındaki hücreler timustan ayrılıp olgun immünolojik özelliklerini tamamlamış T hücresi haline gelmektedir. T hücreleri timustan ayrıldıktan sonra sekonder lenfoid organlara giderler. Antijen ile henüz etkileşime girmemiş bu hücreler naif T hücreleri olarak adlandırılır. Naif T hücresi özgül antijeni ile karşılaşmazsa lenfoid dokuyu terk eder ve tekrar kan dolaşımına katılır. Naif T hücresi antijen sunan hücre ile etkileşime girdiğinde çoğalıp farklılaşarak efektör T hücrelerine dönüşürler ve antijene karşı hızlı yanıt veren hücreler haline gelirler (45,46).

2.5.4. Yardımcı T hücre fonksiyonları

T lenfositlerinin büyük bir çoğunluğunu yardımcı T lenfositleri (Th) oluşturmaktadır. Th hücreleri B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşümü, sitotoksik T hücre ve makrofaj aktivasyonu gibi immünolojik süreçlere katkıda bulunurlar. Bu hücreler yüzeylerinde CD4 glikoproteinini eksprese ettiklerinden dolayı $CD4^+$ T hücreleri olarakta bilinmektedir. Bu hücreler antijen sunucu hücre tarafından MHC sınıf II molekülüyle sunulan peptid antijen sunumundan sonra aktive olmaktadır. Aktivasyon sonrası hızlıca bölünürler ve immün yanıtları regüle eden sitokinleri salgılarlar. Sitokin profillerine göre $CD4^+$ T hücreleri Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ve T foliküler efektör hücre alt tiplerine ayrılmaktadır (47).

2.5.5. Th1 hücreler

Th1 hücreler makrofajları, NK hücreleri ve $CD8^+$ T hücrelerinin aktive ederek hücre içi patojenlerle savaşır. Th1 hücreler B hücrelerinden IgG2a antikor üretimi için immunglobulin sınıf dönüşümünü uyararak virüs ve hücre dışı bakterilerin yokedilmesini de sağlamaktadır. Th1 yolağını güçlendiren faktörler antijenin yapısı, antijen sunan hücredeki kostimülatör sinyaller ve sitokin mikroçevresidir. Th1 farklılaşmasındaki en önemli rol oynayan sitokinlere IL-12, IL-18, IL-21 ve IL-27 örnek gösterilebilir. Th1 hücreleri sinyal iletici ve transkripsiyon protein aktivatörü (STAT)-4 ve T-bet transkripsiyon faktörlerini eksprese ederler ve temel olarak IFN-γ, IL-2 ve TNF-α gibi sitokinler salgılarlar. T-bet, T-box ailesinin bir üyesidir ve Th1 yönüne farklılaşma ve fonksiyon kazanması ile ilişkili anahtar transkripsiyon faktörüdür. $CD4^+$ T hücrelerinden salgılanan IFN-γ makrofajları aktive ederek fagositik fonksiyonlarını arttırmakta ve hücre içi bakterilerin öldürülmesine yardımcı olmaktadır. Th1 hücrelerinin otoantijenlerle aşırı uyarımı Tip 4 gecikmiş tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarına neden olmakta ve aşırı Th1 aktivasyonu enflamatuvar hastalıklar ve doku hasarına yol açabilmektedir (48).

2.5.6. Th2 hücreler

Th2 hücreler hücre dışı parazitlere karşı immün cevapta kritik role sahiptirler. Paraziter enfeksiyonların giriş yeri olan deri, akciğer ve bağırsaklardaki epitelyal hücreler ve doğal immün sistemin hücreleri tarafından parazitlere karşı IL-4, IL-25 ve IL-33 salgılanarak naif T hücrelerinin Th2'e farklılaşmasını sağlar. Allerjik hastalıkların gelişimi süresince efektör Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 üretir. Ayrıca üretilen IL-25, IL-31 ve IL-33'ün Th2 hücre yanıtı ve enflamasyonda rolleri de bulunmaktadır. Th2'ye yönlenmeyi sağlayan IL-4 reseptöre bağlandığı zaman STAT-6'yı aktifleştirmekte ve STAT-6 aktivasyonu Th2 transkripsiyon faktörü olan trans-etkili T hücre spesifik transkripsiyon faktörü (GATA)-3'ün ekspresyonunu arttırmaktadır. GATA-3 Th2 farklılaşmasının ve Th2 tip sitokin üretiminin başlıca düzenleyicisidir. GATA-3 fonksiyonu bozukluğunda Th2 farklılaşması gerçekleşemez. IL-4, Th2 hücre farklılaşması için pozitif uyaran olmasının yanında B hücrelerinden IgE üretimini stimüle etmektedir. IgE mast hücrelerini stimüle ederek bronkokonstrüksiyon, barsak peristalsisi ve helmintlerle mücadele için gastrik sıvı asidifikasyonunu sağlayan lökotrien, serotonin ve histamin salınımına neden olmaktadır. Th2 hücrelerinden üretilen IL-5 eozinofil göçü ve aktivasyonuna neden olmakta ve helmintlerle mücadeleyi arttırmaktadır. Th2 kaynaklı IL-13 ise yine helmintleri yok edilmesi ve havayolu aşırı duyarlılığının artışına neden olmaktadır. Th2 hücrelerinin aşırı aktivasyonları IgE aracılı Tip 1 aşırıduyarlılık ve allerjik rinit, atopik dermatit ve astım gibi allerjik reaksiyonlara neden olmaktadır (49).

2.5.7. T hücre aracılı immünitenin baskılanması

İmmün sistemin efektör hücrelerinin dokulara hasar verme gücü düşünüldüğünde tolerans mekanizmalarının önemi anlaşılabilmektedir. Timusta T hücre olgunlaşması sırasında merkezi tolerans kontrol noktaları bulunmakla beraber yeterli olamamaktadır. Dolayısıyla periferde T hücrelerinin selfe karşı aktif efektör hücreler haline gelmesini engelleyen periferik tolerans mekanizmaları bulunmaktadır. Periferik tolerans otoreaktif T hücrelerinin olgunlaşıp perifere çıkmalarından sonra gelişen immünolojik tolerans mekanizmasıdır. Bu mekanizmada otoreaktif hücreler Treg hücreleri tarafından baskılanmakta ve anerjik lenfosit oluşumu gerçekleşmektedir. Bu hücreler enflamatuvar dönemlerde kostimülatör sinyaller gibi bazı yüzey reseptörlerine bağlı olarak yanıt verme yeteneklerini de kısıtlamaktadır (50).

2.5.7.1. Regülatör T hücreler

Regülatör T hücreler (Treg) baskılayıcı T hücreleri olarakta bilinen $CD4^+$ T hücrelerinin bir alt grubudur. Bu hücreler immün sistemin modulasyonu, self antijenlere karşı toleransın sürdürülmesi ve otoimmün hastalıkların önlenmesinden sorumludur. Genellikle efektör T hücrelerinin çoğalma, aktivasyon ve regülasyonlarının baskılanmasını sağlayarak aşırıya kaçan reaksiyonları önleyerek önemli bir self-kontrol noktası olarak görev yapmaktadır. Bu hücreler CD4, CD25 ve Forkhead box protein 3 (FoxP3) eksprese etmektedir. Periferde Treg'lerin iki farklı grubu bulunmaktadır. Doğal Treg (nTreg) timustaki gelişim sırasında fonksiyon kazanır, indüklenebilir Treg (iTreg) timus dışında periferde naif $CD4^+$ T hücrelerin farklılaşması sırasında gelişirler. Hem nTreg hem de iTreg transkripsiyon faktörü Foxp3 ekspresyonu ve CD25 yüzey ekspresyonu ile karakterizedir. Treg'ler immun baskılayıcı etkilerini IL-10 ve TGF-β gibi baskılayıcı sitokinlerin salınımı, apoptozisin tetiklenmesi ve hücre-hücre temasında hücre döngüsünün durdurulması ile gösterirler (51).

2.6. Allerjide $CD4^+$ T Hücre Fonksiyonları

Allerjik hastalıklarda allerjen spesifik immün yanıtlarda allerjen spesisifik $CD4^+$ T hücrelerinin önemi büyüktür. Bu hücreler yalnızca allerjen duyarlılanması için değil bunun yanında allerjik hastalıkların bütün enflamatuvar süreçlerinde de rol oynamaktadırlar. Aktive olmuş allerjen spesifik T hücrelerinin allerjik hastaların periferik kanlarında, burun, akciğerler, deri ve bağırsaklar gibi hedef organlarda da yoğun biçimde bulunduğu gösterilmiştir (52,53).

Allerjik duyarlanma oluşturulmuş hayvan modellerinde bloke edici antikorlarla bu T hücrelerin etkisizleştirilmesi veya uzaklaştırılması hastalık gelişimini baskılamıştır (54,55). Allerjene spesifik $CD4^+$ T hücreleri tarafından salgılanan IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi sitokinler allerjik enflamasyonu düzenlemekte ve mikroçevrede Th2 tip sitokinlerin yüksek düzeyde bulunması patogenezin allerjik hastalığa doğru yönlenmesine neden olmaktadır (52,56,57). Örneğin; IL-4 ve IL-13, B hücrelerinden allerjide sorumlu antikor olan IgE tipinde antikor üretimi sağlarlar, IL-5 allerjik iltihapta en önemli hücrelerden biri olan eozinofil çoğalmasından ve olgunlaşmasından, enflamasyon bölgesine eozinofil toplanmasından sorumludur; IL-9 ise yine allerjide sorumlu histamin gibi birçok mediyatörün kaynağı olan mast hücreleri ve bazofillerin aktive olmasını tetiklemektedir (57,58). Bunlara ek olarak bazı Th2 tip sitokinler hava yolu aşırı cevaplılığı, mukusun aşırı salgılanması gibi hastalığa özgü bulguları oluşturabilirler (53,59).

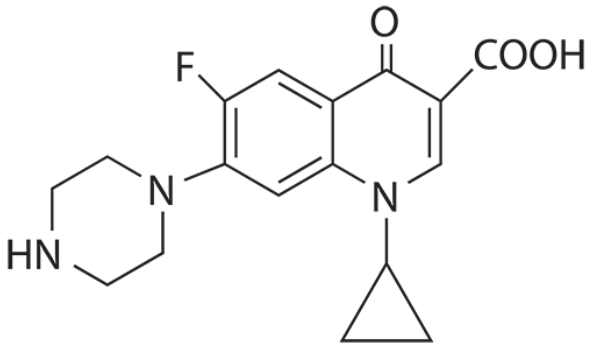
Kemik iliğinden kaynaklanan Th hücrelerin Th2 tipinde hücre grubuna yönlenmesi ve Th2 tip sitokin salgılaması bir takım hücre içi sinyal moleküllerinin karmaşık ağı tarafından düzenlenir. Th2 tipindeki sitokin üretiminin başlatılması için allerjik rinitte örneğin burunda bölgesel olarak IL-4 varlığı mutlaka gereklidir (60). IL-4 reseptörünün uyarılması ile hücre içi bazı moleküller aktive olur ve böylece Th2 sitokin üretimi için gerekli genlerin uyarılması oluşur (60,61). Bu moleküllerden STAT6'nın aktivasyonu etkin bir IL-4 oluşumu ve Th2 dönüşümü için çok önemlidir (61,62). STAT6 geni silinmiş farelerde Th2 hücre gelişimi yetersizdir bu nedenle IL-4 üretiminde de yetersizlik olduğu gösterilmişitir. STAT6 aktivasyonundan sonra Th2 hücrelerde GATA-3 gibi transkripsiyon faktörlerinin artışı sağlanarak Th2 tipinde gelişim sağlanır (63). Th2 tipinde bir yanıtın gelişmesi allerjene özgül IgE yapımının artışı ve böylece allerjik bulguların meydana gelmesi ile sonuçlanır. Yüksek düzeyde IgE'nin bulunması hem akut allerjik reaksiyon hem de kronik enflamasyonun oluşması için gereklidir. Allerjene özgül IgE esasen dokulardaki mast hücreleri ve dolaşan bazofillerdeki IgE reseptörüne (FcεRI) bağlanır. Hücre yüzeyindeki IgE'lerin spesifik allerjenle çapraz bağlanması soucunda bu hücrelerin granüllerinden histamin, lökotrien, prostaglandin ve platalet aktive edici faktör (PAF) gibi enflamatuvar mediyatörlerden salınır. Ardından dakikalar içerisinde bazı sitokinler açığa çıkmakta ve düz kas kasılması, mukus üretimi ve damar dışına sıvı kaçışı gibi akut allerjik reaksiyon cevapları oluşmaktadır. Bunu takiben allerjik mediyatörler aracılığı ile bu bölgelere Th2 hücre, eozinofil, bazofil ve monositlerin göçleri sonucu uzamış allerjik itihabi durum tetiklenir ve salınan yeni mediyatörler ile erken faz reaksiyon semptomları ve lokal dokuda hasar meydana gelir (64). Allerjik reaksiyonların uzaması ve oluşan enflamatuvar değişikler sonucu ciddi doku hasarları ve hedef organ anormallikleri meydana gelir. Allerjenlerin kronik allerjik enflamasyondaki rolleri çok iyi tanımlanmıştır. Allerjik olmayan uyaranların da bu süreçte rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin enfeksiyonlar allerjik semoptomların geçici olarak alevlenmesinin yanı sıra hastalığın ilerlemesi ve doku hasarının artmasına neden olan enflamatuvar yanıtların artmasına da yol açmaktadır. Nonspesifik irritanlar, allerjenle çapraz reaksiyon veren intirinsik proteinler, enflamatuvar hücrelerin kendi kendine uyarılması ve epitel hücrelerindeki hasarlar da enflamasyonun devamlılığına neden olmaktadırlar (65).

Sağlıklı kişilerde allerjik kişilerden farklı olarak allerjene tolerans oluşması nedeniyle sistemik ya da lokal bir reaksiyon gelişmemektedir. Sağlıklı kişilerde allerjen maruziyeti sonrası periferik kanda az miktarda allerjen spesifik Th1 hücresi

bulunmaktadır; ancak, allerjen spesifik reaksiyonların regülasyonunda Treg hücreleri karşımıza çıkmaktadır (66). Allerjen spesifik Treg hücreler çok yoğun miktarda IL-10 ve TGF-β üretmekte ve bu sitokinler immün sistemi baskılamaktadır (67). Allerjisi olan kişilerde bu tür hücrelerin sayı ve fonksiyonlarının arttırılması sonucunda allerjinin üstesinden gelindiği gözlenmiştir. Allerjik kişiler araştırıldığında da bu kişilerin periferik kanlarında çok sayıda allerjene spesifik Treg hücresi olduğu gözlemlenmiştir (68).

2.7. Kinolonlara Karşı Aşırıduyarlılık Reaksiyonları

Kinolonlar çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan gittikçe önemi artan, geniş spektrumlu sentetik antibiyotiklerdir (69). İlk kinolon olan nalidiksik asit (NLDXA), 1964 yılında tanımlanmış ve bunu 1980'lerde orijinal moleküle florid grubunun eklenmesi ile genişletilmiş bir antibakteriyel spektrum gösteren fluorokinolonlar takip etmiştir (70). Günümüzde geniş aktivitesi ve çok dirençli organizmaların tedavisinde daha etkili olan çeşitli yeni kinolonlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. (71). Ayrıca kinolonlar, farklı yapıya sahip oldukları ve dolasıyla çapraz reaksiyon göstermedikleri için diğer antibiyotiklere (örn: penisilin) karşı aşırıduyarlılık reaksiyonları olan hastalarda kullanılabilmektedir. Ancak, kinolonlar da istenmeyen ilaç reaksiyonlarına sebep olabilmektedir. Kinolonlara karşı gelişen geç tipte aşırıduyarlılık reaksiyonlarına yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu reaksiyonların T hücre immünitesi ile ilişkili olduğunu gösteren bir çalışma mevcuttur (72). Geç tip reaksiyonlar erken tiplere oranla daha seyrek görülmektedir. SPFX en yaygın olarak kullanılan kinolonlardan olup, kullanan hastaların yaklaşık %1-2'sinde kutanöz advers ilaç reaksiyonlarına sebep olmaktadır (Şekil 2-3). SPFX ile ilgili olarak en sık tanımlanan reaksiyonlar Tip I IgE aracılı ürtiker, anjioödem, anafilaksi gibi erken gelişen reaksiyonlardır (73). Kinolon tedavisinde gelişen geç tip reaksiyonların özellikle ekzantemin farklı türleri şeklinde T hücre aracılı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Ancak T hücreleri için kinolonların immünojenitesi ve belirgin çapraz reaktiviteleri detaylı olarak incelenmemiştir (74).



Şekil 2-3: SPFX'in kimyasal yapısı

Cilt testleri güvenilir olmadığı için erken tip reaksiyonlarda tanı koymada zorluklar yaşanmaktadır. Cilt testleri bazı kinolon allerjilerinde faydalı olmakla birlikte bazı kinolonlarda yanlış pozitif sonuca sık olarak rastlanmaktadır (75). Erken tip kinolon allerjisinin her ne kadar IgE aracılı olduğu düşünülse de spesifik IgE saptanması oldukça zordur. Radyoaktif immünolojik yöntem (RIA) metodu ile *in vitro* şartlarda kinolonlara karşı spesifik IgE ilk kez Manfredi daha sonra da Aranda ve ark. tarafından değerlendirilmiş ve farklı kinolonlara karşı farklı sıklıklarda pozitif sonuçlar saptanmıştır (75,76). Kinolonlara karşı erken tip aşırıduyarlılık reaksiyonu tanısında altın standart ilaç provokasyon testidir. Bu test ciddi reaksiyon oluşma ihtimaline rağmen tanıyı doğrulamada, alternatif ilaç seçiminde ve çapraz reaksiyon tespitinde kullanılmaktadır. Yama yada intradermal testlerin geç kinolon allerjisi tanısında kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada geç kinolon reaksiyonlarında yama testinde %50 pozitiflik saptanırken diğer bir çalışmada pozitif sonuç saptanmamıştır (72,77). İntradermal testlerin geç okunması da kullanılacak diğer bir metod olmakla birlikte irritan yanıt olasılığı net değildir (78). Tanı için ayrıca lenfosit transformasyon testleri de kullanılabilmektedir. Schmid ve ark.'ları yaptıkları çalışmada geç tip reaksiyon geçiren altı hastada SPFX ve moksifloksasin ile proliferatif yanıt saptamış, kontrol grubunda ise bu test negatif olarak bulunmuştur (72).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Allerji Bilim Dalı Polikliniği'ne SPFX'e karşı geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonu nedeniyle başvuran hastalar alınmıştır. Detaylı anamneze göre SPFX'e bağlı aşırıduyarlılık reaksiyonlarından ilaç kullanımını takiben 1 saatten daha uzun süre sonra gelişenler geç tip reaksiyon olarak sınıflandırılmış ve anamneze göre tarif edilen reaksiyonu şüpheli olan hastalarda SPFX ile kademeli deri ve oral provokasyon testleri uygulanmıştır. Çalışmaya 18-60 yaş aralığında toplamda 8 hasta (yaş ortalaması 50 ± 12.1) ve 10 sağlıklı kontrol (yaş ortalaması 46.5 ± 12.6) dahil edilmiştir. Genel durumda düşkünlüğe yol açan malignite bulgusu olanlar, diyabet, kontrolsüz hipertansiyon ve kardiyolojik hastalığı olduğu gösterilmiş bireyler çalışma dışında bırakılmıştır. Deney aşamaları için her bir hastadan 15 ml heparinize periferik venöz kan alınmıştır.

Çalışma için İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu onayı alınmış, hasta ve sağlıklı kontroller kan verme aşamasında bilgilendirilmiş ve kendilerinden gönüllü rıza formu alınmıştır.

3.2. Deri Testi Uygulaması

Tüm hastalara SPFX'in ticari formunundan (Cipro 400 mg/200 ml IV Flakon, Biofarma İlaç) 5 mg/ml konsatrasyonunda deri prik testi uygulanmıştır. İlaç prik deri testleri ile birlikte histamin (10 mg/ml) pozitif kontrol, serum fizyolojik ise negatif kontrol olarak uygulanmıştır. İlaç testlerinde 20. dakikada ödem çapı negatif kontrole göre 3 mm ve üzerinde olan sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Prik deri test sonuçları negatif saptanan hastalara aynı ilaç konsantrasyonları ile intradermal testler uygulanmıştır. İlk olarak 1/1000 dilüsyon ile intradermal testler yapılmış, negatif bulunması durumunda 1/100 dilüsyonu uygulanmıştır. Tarif edilen geç reaksiyonun saptanması amacıyla intradermal deri testleri 24 saat sonra tekrar değerlendirilmiştir. Bu hastalara ayrıca prik solüsyondaki ilaç konsantrasyonları ile yama testleri uygulanıp, (vazelin) negatif kontrol ile karşılaştırılarak 24. ve 48. saatlerde test bölgesindeki ödem ve vesikülopapüler lezyonlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sağlıklı kontrollere prik, intradermal ve yama testleri aynı konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

3.3. Provokasyon Testlerinin Uygulanması

Provokasyon testleri deri testleri negatif bulunan ve sorumlu ilaç ile hayati tehlike taşımayan geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonu geçiren hastalara tüm acil müdahale

imkanları hazır halde bulundurularak yapılmıştır. Tek kör plasebo kontrollü uygulanan provokasyon yönteminde ilacın 1/100 dozundan başlanarak 30 dakika aralarla doz Tablo 3-1'deki şekilde arttırılarak 5 dozda tam doza ulaşılması hedeflenmiştir. İlaca bağlı anafilaksi, Stevens Johnson sendromu, toksik epidermal nekroliz, akut jeneralize ekzantematöz püstüloz, büllöz ilaç döküntüsü geçirmiş olan hastalara provokasyon yöntemi uygulanmamıştır.

Tablo 3-1: Provokasyon testinde kullanılan SPFX dozları

	SPFX Dozları (mg)
1.	5
2.	50
3.	100
4.	150
5.	200

3.4. Yüzey Molekül Ekspresyonlarının Saptanması

Kontrol ve hasta gruplarından alınan heparinize tam kan örneklerinden elde edilen 100µl ($2x10^5$/ml) hücre süspansiyonu üzerine araştırılacak antikorlar olan anti human-CD3-fluorescein izotiyosiyanat (FITC)/CD19-fikoeritrin(PE) (BD Biosciences, San Diego, USA), anti human-CD4-FITC/CD8-PE (BD Biosciences, San Diego, USA), anti human-CD69-PE (BD Biosciences, San Diego, USA), anti human-CD28-PE (BD Biosciences, San Diego, USA), anti human-CD3-FITC/HLADR-PE (BD Biosciences, San Diego, USA), anti human-CD25-FITC (BD Biosciences, San Diego, USA), anti human-CD4-Peridinin Klorofil Protein kompleksi (PerCp) (BD Biosciences, San Diego, USA) ve izotipik kontrol antikorları olan anti human-IgG1-FITC (BD Biosciences, San Diego, USA), anti human-IgG2-FITC (BD Biosciences, San Diego, USA) ve anti human-IgG1-PerCp (BD Biosciences, San Diego, USA) antikorlarından 5'er µl eklenip ve tüpler 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edimiştir (Tablo 3-2). İnkübasyon sonrasında 2 ml lize edici solüsyon (BD Biosciences, San Diego, USA) eklenerek 10 dk inkübe edilerek ve eritrositler ortamdan uzaklaştırımıştır. İnkübasyon sonrası hücreler

izotonik bir tampon çözelti olan 2 ml fosfat tuz çözeltisi (PBS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) eklenerek 5 dk 2000 rpm'de 1 kez yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine %2 paraformaldehit içeren PBS ilave edilerek akan hücre ölçer cihazı (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) ile yüzey molekül ekspresyonları analiz edilmiştir. Bu analiz sonrasında deney ve hasta grubunda T hücre yüzde oranı, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre alt grupları ve yardımcı T hücre (Th) aktivasyon moleküllerinin ekspresyonları saptanmıştır.

Tablo 3-2: Lenfosit alt grupları ve aktivasyon molekül ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanılan monoklonal antikorların listesi

	FITC	**PE**	**PerCP**
1. Tüp	IgG1	IgG2	IgG1
2. Tüp	CD4	CD8	
3. Tüp	CD3	CD19	
4. Tüp	CD25	CD28	CD4
5. Tüp	CD3	HLA-DR	CD4
6. Tüp		CD69	CD4

3.5. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu

Periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) heparinize kandan steril şartlarda Ficoll (Sigma Chem. Co., St.Louis, MA) yoğunluk gradiyent santrifüjü ile izole edilmiştir. Bu amaçla her bireyden alınan heparinize kan örnekleri, 1:1 oranında PBS ile dilüe edilip ve 1:2 (Ficoll:kan) oranında Ficoll üzerine yayılarak oda ısısında 800 g'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra interfazdan toplanan PKMH'ler 2 kez PBS ile 370 g'de soğutmalı santrifüjde yıkanıp, santrifüjü takiben eritrositler lize edici solüsyon ile patlatılmıştır. Elde edilen PKMH'ler tripan mavisi boyama yöntemi ile boyanıp Neubauer hemositometresinde sayılmıştır. Hücreler deneylerde kullanılana kadar buzda RPMI-1640'lı mediumda muhafaza edilmiştir.

3.6. PKMH Hücre Kültür Aşamaları

Hasta ve kontrol gruplarında *in vitro* ortamda sorumlu ilaç ile uyarım sonrası $CD4^+$ T hücre alt gruplarında hücre içi IFN-γ, IL-2, IL-4 ve IL-10 sitokin salınımları akan hücre ölçer cihazında incelenmiştir. Bu amaçla PKMH izolasyonu sonrasında hücreler plak başına $1x10^6$ hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu steril doku kültürü plaklarında 1:1 oranında RPMI-1640 (%10 fetal calf serum, 1mM sodyum pirüvat, %1 MEM (Minimal

essential medium) non esansiyel aminoasit ve vitamin solusyonu, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 50 µM 2 merkaptoetanol, (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) içeren ortama alınmıştır. İlaçla uyarımda etkin dozajın belirlenmesi amacıyla yaptığımız ön deneylerde SPFX'in ticari formundan 0,1, 1, 5, 10 ve 20 µg/ml olmak üzere beş farklı konsantrasyon ile stimülasyonsuz şartlarda hücre içi sitokin deneyleri ve LTT deneyleri yapılmıştır. En optimal konsantrasyonların 5 ve 10 µg/ml SPFX olduğu gösterilmiştir. Kültür aşamalarında stimülasyonsuz, 5 ve 10 µg/ml SPFX'li koşullar kullanılmış ve PKMH'ler 18 saat 37^0C %5 CO_2'li inkübatörde kültüre alınmıştır. Hücre içi sitokin tayini yapılacak kuyucuklar fitohemaglütinin (PHA, 10µg/ml) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) ve kültürün son 4 saatinde 10 µg/ml Brefeldin A (BFA) ilave edilmiştir.

3.7. Hücre İçi Sitokin Tayini

Kültür sonrası hücreler bir kez PBS ile yıkanarak önce hücre yüzey molekül ekspresyonu için 10 µl anti human-CD4-allofikosiyanin (APC) (BD Biosciences, San Diego, USA), ile boyanıp ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelere 250 µl Cytofix solusyonu (BD Biosciences, San Diego, USA) eklenerek hücre zarlarında por oluşturma aşamasına geçilmiştir. 20 dakika $+4^0$C'de inkübasyonun ardından hücreler Perm/Wash (BD Biosciences, San Diego, USA) solusyonu ile bir kez 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve bunu takiben hücrelere 100 µl Perm/Wash ilave edilmiştir. Hücre içi sitokinlerin belirlenmesi amacıyla anti human- IFN-γ-PE (Diaclone, France), anti human- IL-2-PE (Diaclone, France) anti human- IL4-PE (Diaclone, France) ve anti human- IL-10 (Diaclone, France) monoklonal antikorları eklenmiş ve 20 dakika $+4^0$C'de inkübe edilmiştir (Tablo 3-3). Nonspesifik bağlanmaların önlenmesi amacıyla ilk analiz tüpü olarak otofloresan tüpü kullanılmıştır. İnkübasyonu takiben hücreler 2000 rpm'de 10 dakika PermWash solusyonu ile santrifüf edilmiş ve 500 µL %1'lik paraformaldehitli PBS ilavesinin ardından BD FACS Calibur akan hücre ölçer cihazında analiz yapılmıştır.

Tablo 3-3: Hücre içi sitokin tayininde kullanılan monoklonal antikorların listesi

	PE	APC
1. Tüp	Otofloresan	
2. Tüp	IFN-γ	CD4
3. Tüp	IL-2	CD4
4. Tüp	IL-4	CD4
5. Tüp	IL-10	CD4

3.8. CFSE Dilüsyon Metodu ile Lenfosit Transformasyon Test (LTT) Analizi

Hasta grupları ve sağlıklı kişilerden izole edilen PKMH'lerin proliferatif yanıtları akan hücre ölçer cihazında 5-(ve 6)-karboksifluorescein diasetat süksinimidil ester (CFSE) (Life Technologies, USA) dilüsyon metodu ile analiz edilmiştir. LTT için bu amaçla, gönüllü hasta va sağlıklı heparizine venöz kanlarından Ficoll konsantrasyon gradyan yöntemi ile steril koşullarda izole edilen PKMH'lerin bir kısmı CFSE boyası ile, son kullanım konsantrasyonu 5 mikromolar (Mm) olacak şekilde, 6 dakika süreyle karanlık ve $+4^0$C'de inkübe edilmiştir. RPMI1640 mediumu ile 2 kez 2000 rpm'de 5 dakika yıkama aşamalarını takiben Neubauer hemositometresi kullanılarak Tripan mavisi ile boyanmış hücreler mikroskop altında sayılmış ve $6x10^5$ hücre/ml olacak şekilde hücreler zenginleştirilmiş RPMI-1640 medyumu içerisinde 48 kuyucuklu düz tabanlı kültür plaklarına ekilmiştir. Her bir deneyde toplam 4 şart kullanılmıştır. Hücreler stimülasyonsuz, SPFX (5 ve 10 µg/ml) ve pozitif kontrol olarak PHA'li (10 µg/ml) şartlarda 37^0C'de, %5 CO_2 içeren hücre kültürü inkübatöründe 5 gün boyunca kültüre edilmiştir. Kültür süresinin ardından toplanan hücreler, anti human CD4-PE (BD Biosciences, San Diego, USA) monoklonal antikoru ile 20 dk karanlıkta inkübe edilmiş ve PBS ile yıkamanın ardından akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir. Cell Quest veya WinMDI programı ile veri analizi yapılmıştır. İlgili koşulun uyarılmamış koşulla karşılaştırılması ile stimulasyon indeksi değerleri hesaplanmıştır.

3.9. ELISA Yöntemiyle IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ Düzeylerinin Saptanması

Kontrol ve hasta grubundan izole edilen plazma örnekleri ile LTT deneylerinden alınan kültür üst sıvılarında IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.9.1. IL-2 ELISA Tayini

- Standart ve Örneklerin Konulması: ELISA kiti olarak human IL-2 ELISA kiti (Invitrogen Corporation, CA) kullanılmıştır. İnkübasyon tamponu, biyotinlenmiş anti-IL-2 solusyonu, örnekler ile rekombinant human IL-2 standartları kaplı ELISA kuyularına pipetlenmiş, ve plak 2 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar 4 kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.
- Konjugat ilavesi: 100 µl/kuyu oranında Streptevidin-HRP çalışma solusyonu ilavesini takiben plaklar 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiş ve inkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar ELX50 cihazında 4 kez yıkanmıştır.
- Substrat İlavesi: Bu aşamada 100 µl/kuyu oranında stabilize edilmiş kromojen plağa pipetlenmiş ve 20 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun Durdurulması: Plaklara 100 µl/kuyu oranında stop solüsyon ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- Plakların Okunması: Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. IL-2'nin deteksiyon limiti <4 pg/ml olarak kitte belirtilmiştir.

3.9.2. IFN-γ ELISA Tayini

- Standart ve Örneklerin Konulması: ELISA kiti olarak human IFN-γ ELISA kiti (Invitrogen Corporation, CA) kullanılmıştır. İnkübasyon tamponu, biyotinlenmiş anti-IFN-γ konjugatı, örnekler ile rekombinant human IFN-γ standartları 100 µl/kuyu olacak şekilde kaplı ELISA kuyularına pipetlenmiş, ve plak 1,5 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar 4 kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.

- Konjugat ilavesi: 100 µl/kuyu oranında Streptevidin-HRP çalışma solusyonu ilavesini takiben plaklar 45 dakika oda ısısında inkübe edilmiş ve inkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar ELX50 cihazında 4 kez yıkanmıştır.
- Substrat İlavesi: Bu aşamada 100 µl/kuyu oranında stabilize edilmiş kromojen plağa pipetlenmiş ve 30 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun Durdurulması: Plaklara 100 µl/kuyu oranında stop solüsyon ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- Plakların Okunması: Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. IFN-γ'nın deteksiyon limiti <4 pg/ml olarak bildirilmiştir.

3.9.3. IL-4 ELISA Tayini

- Standart ve Örneklerin Konulması: ELISA kiti olarak human IL-4 ELISA kiti (Invitrogen Corporation, CA) kullanılmıştır. Biyotinlenmiş anti-IL-4 konjugatı, örnekler ile rekombinant human IL-4 standartları 100 µl/kuyu oranında kaplı ELISA kuyularına pipetlenmiş ve plak 2 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar 4 kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.
- Konjugat ilavesi: 100 µl/kuyu oranında Streptevidin-HRP çalışma solusyonu ilavesini takiben plaklar 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiş ve inkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar ELX50 cihazında 4 kez yıkanmıştır.
- Substrat İlavesi: Bu aşamada 100 µl/kuyu oranında stabilize edilmiş kromojen plağa pipetlenmiş ve 30 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun Durdurulması: Plaklara 100 µl/kuyu oranında stop solüsyon ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- Plakların Okunması: Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. IL-4'ün deteksiyon limiti <2 pg/ml'dir.

3.9.4. IL-10 ELISA Tayini

- Standart ve Örneklerin Konulması: ELISA kiti olarak human IL-10 ELISA kiti (Invitrogen Corporation, CA) kullanılmıştır. İnkübasyon tamponu, örnekler, rekombinant human IL-10 standartları 50 µl/kuyu oranında kaplı ELISA kuyularına

pipetlenmiş ve plak 2 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar 4 kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.

- Biyotin ilavesi: 100 µl/kuyu oranında biyotinlenmiş anti-IL-10 biyotin konjugat solüsyonunun ilavesini takiben plaklar 2 saat oda ısısında inkübe edilmiş ve inkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar ELX50 cihazında 4 kez yıkanmıştır.
- Konjugat ilavesi: 100 µl/kuyu oranında Streptevidin-HRP çalışma solusyonu ilavesini takiben plaklar 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiş ve inkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar ELX50 cihazında 4 kez yıkanmıştır.
- Substrat İlavesi: Bu aşamada 100 µl/kuyu oranında stabilize edilmiş kromojen plağa pipetlenmiş ve 30 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir.
- Reaksiyonun Durdurulması: Plaklara 100 µl/kuyu oranında stop solüsyon ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- Plakların Okunması: Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. IL-10'un deteksiyon limiti <1 pg/ml olarak belirtilmiştir.

3.10. İstatistiksel Analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 15 yazılımı kullanılmıştır. Eşli verilerin istatistiksel karşılaştırılmasında Wilcoxon testi, farklı grupların istatistiksel karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta grubunun genel ve klinik özellikleri (SPFX'e karşı oluşan aşırıduyarlılık profilleri)

Çalışmaya alınan 8 hastanın 7'si kadın (yaş ortalaması, 47.5 ± 12.6) olup reaksiyon başlaması için geçen ortalama süre SPFX aldıktan sonra 11,5 saat ve değerlendirme ile öyküdeki reaksiyon arasında geçen süre ortalama 29.3 ± 25.2 ay olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan 8 hastanın 3'ü geç başlangıçlı ürtiker, 4'ü makülopapüler döküntü, 1'i ise fiks ilaç erüpsiyonu tariflemiştir. Yapılan deri testlerinde geç intradermal test sonucu 5 hasta da negatif, 1 hasta da ise pozitif bulunmuştur (Tablo 4-1).

Çalışmamıza dahil edilen iki hastanın prik test sonucu pozitif olduğundan intradermal testler uygulanmamıştır. 5 hastaya uygulanan yama testleri negatif bulunurken, 3 hastaya yama testi yapılmamıştır. Reaksiyonları ciddi olan veya testi kabul etmeyen 5 hastaya provokasyon testi uygulanmamış, provokasyon testi uygulanan, 2 hasta negatif, 1 hasta pozitif sonuç vermiştir.

Tablo 4-1: SPFX ile aşırıduyarlılık reaksiyon profilleri ve SI (stimülasyon indeksi) olarak LTT sonuçları

H	C	YAŞ	SÜRE *	RXN ZAMANI	RXN TİPİ	GEÇ ID	PT	PATCH TEST	LTT (sonuç) (5µg/ml)	LTT (sonuç)(10µg/ml)
1	K	44	25	BİR GÜN SONRA	PRURİTİS, KABARMA, YÜZDE ANJİOÖDEM	1	X	0	1,8 (+)	1,3(-)
2	K	29	60	6 SAAT SONRA	KIZARIKLIK, KAŞINTI, MPE	0	0	0	0,63 (-)	0,54 (-)
3	K	30	6	7-8 SAAT SONRA	TÜM VÜCUTTA DÖKÜNTÜ	0	1	0	X	X
4	E	64	23	BİR GÜN SONRA	KAŞINTI, KABARMA	X	X	X	0,8 (-)	0,4 (-)
5	K	55	36	6 SAAT SONRA	FİKS İLAÇ ER.	0	X	X	3,1 (+)	3,5 (+)
6	K	57	7	GEÇ	DÖKÜNTÜ	X	X	0	0,5 (-)	0,4 (-)
7	K	42	6	GEÇ	DÖKÜNTÜ	0	X	0	2 (+)	1 (-)

MPE: Makülopapüler Ekzantem; **RXN**: Reaksiyon; **X**: Uygulanamadı; ***Süre**: Gelişen reaksiyon ile analiz arasındaki süre, **ID**: İntradermal, **ER**: Erüpsiyon, **PT:** Provokasyon testi, **H:**Hastalar, **C:**Cinsiyet

LTT sonuçları değerlendirilen hastalarda stimülasyon indeksi ≥1,5 pozitif olarak kabul edilmiştir. Buna göre 5 µg/ml konstantrasyonda SPFX ile uyarılan 7 hastanın 3'ünde LTT pozitif; 10 µg/ml ile uyarım sonrası sadece 1 hastada LTT sonucu pozitif

saptanmıştır (Tablo 6). LTT sonucu negatif olan hastalarda (n=3) hücre içi sitokin salınımları değerlendirildiğinde; IL-2 düzeyi 10 µg/ml'de SPFX dozunda, IL-4 düzeyi hem 5 µg/ml hem de 10 µg/ml SPFX dozunda sağlıklı kontrole göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır (p=0,02, p=0,037 ve p=0,000, sırasıyla) (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: LTT sonucu negatif olan hastalarda hücre içi sitokin ölçümlerinin değerlendirilmesi (ortalama ± SD)

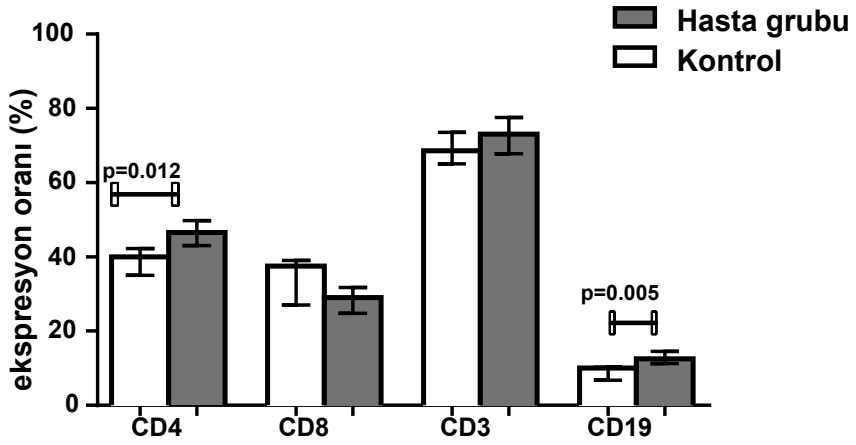
	LTT NEGATİF HASTALAR		SAĞLIKLI KONTROL		p DEĞERİ	
SİTOKİNLER	**5 µg/ml**	**10 µg/ml**	**5 µg/ml**	**10 µg/ml**	**5 µg/ml**	**10 µg/ml**
IFN-γ	13,2 ± 2,2	11,1 ± 4,9	16,6 ± 4,6	17,7 ± 4,5	0,152	0,936
IL-2	12,5 ± 1,7	14 ± 4,08	7,3 ± 1,8	7,9 ± 1,8	0,586	**0,02**
IL-4	17,5 ± 0,5	14,2 ± 3,8	5,1 ± 1,5	5,18 ± 1,4	**0,037**	**0,000**
IL-10	4,1 ± 1,6	8,2 ± 5,3	10,9 ± 3,8	11,1 ± 3,7	0,115	0,309

4.2. Lenfosit Alt Grupları ve Aktivasyon Molekül Analiz Sonuçları

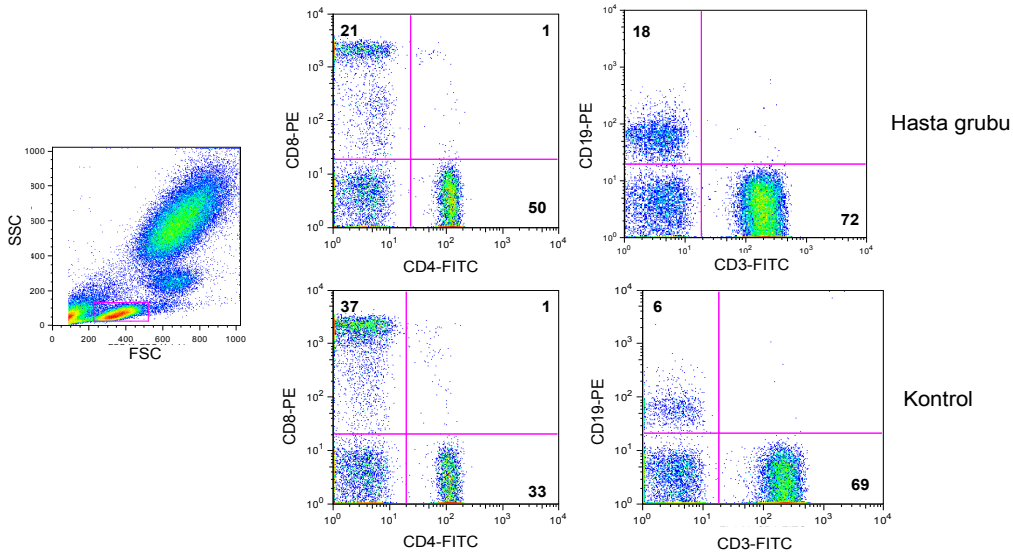
SPFX'e karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu geçiren hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda tam kan lizis yöntemi kullanılarak $CD3^+$ total lenfosit, $CD4^+$ T hücre, $CD8^+$ sitotoksik T hücre (Tc) ve $CD19^+$ B lenfosit oranı akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Ayrıca hem total lenfosit populasyonu hem de $CD4^+$ T hücrelerinde aktivasyon ve kostimülatör molekül belirteçleri olarak CD25, HLA-DR, CD28 ve CD69 ekspresyonları saptanmıştır.

4.3. B ve T Lenfosit Oranları

Hasta grubunda $CD4^+$ T hücre ve B lenfosit oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunurken, $CD8^+$ sitotoksik T hücre ve total T lenfosit oranları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0.012 ve p=0.005, sırasıyla) (Şekil 4-1, Şekil 4-2).



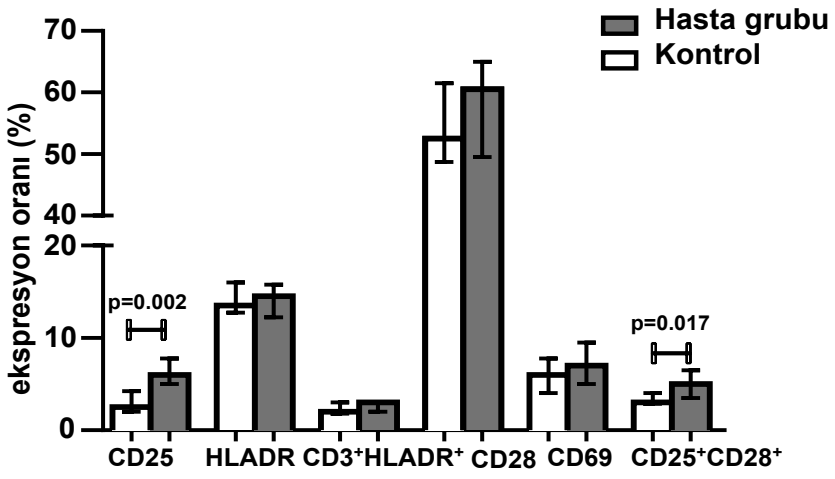
Şekil 4-1: Kontrol ve hasta grubunda T lenfosit alt grup oranları



Şekil 4-2: Hasta ve sağlıklı bireylerde CD4, CD8, CD3 ve CD19 boyaması sonucunda akan hücre ölçer görüntüleri

4.4. Total Lenfosit Aktivasyon ve Kostimülatör Molekül Ekspresyonları

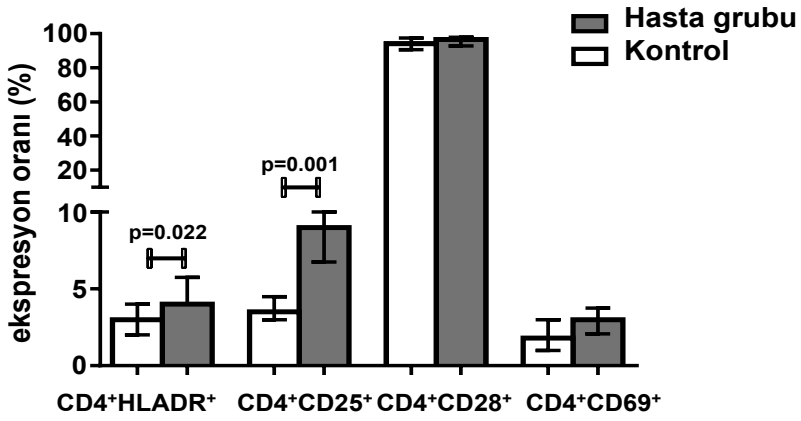
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücre aktivasyonu ile orantılı olarak artış gösteren aktivasyon ve kostimülatör yüzey molekülleri $CD25^+$ ve $CD25^+CD28^+$ lenfosit oranları hasta grubunda yüksek saptanmasına karşılık, CD28, CD69, HLA-DR, $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ ile $CD25^+CD28^+$ lenfosit oranları açısından anlamlılık görülmemiştir ($p=0.002$ ve $p=0.017$, sırasıyla) (Şekil 4-3).



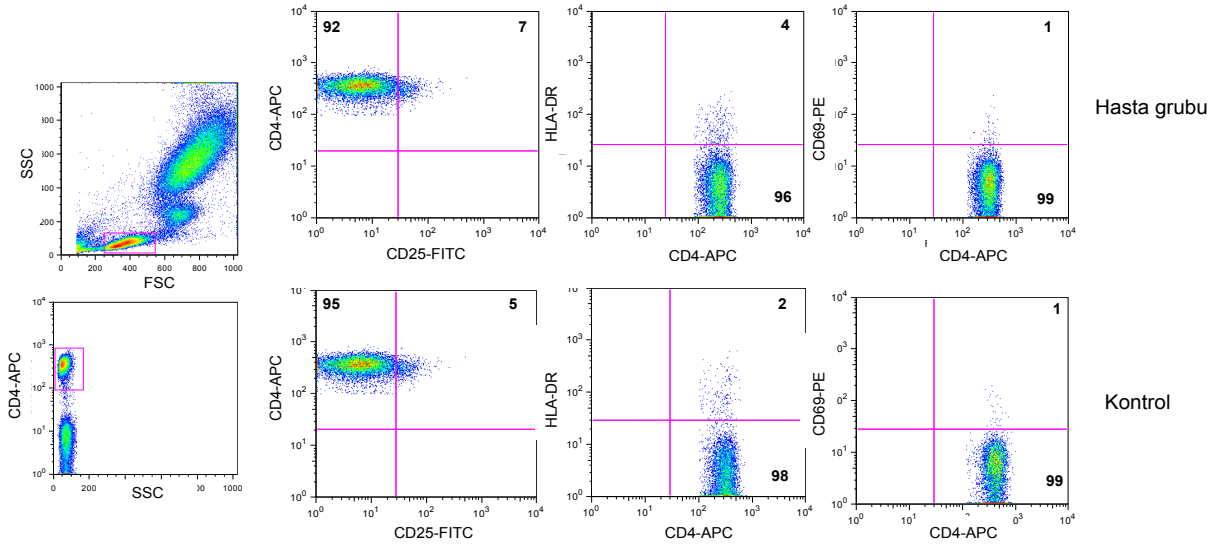
Şekil 4-3: Total lenfosit aktivasyon ve kostimülatör molekül ekspresyonları

4.5. CD4$^+$ Th Hücrelerinde Aktivasyon ve Kostimülatör Molekül Ekspresyonu

$CD4^+HLA\text{-}DR^+$ ve $CD4^+CD25^+$ T lenfosit oranları hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (p=0.022 ve p=0.001, sırasıyla). Buna karşılık, $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CD69^+$ T hücre oranları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4-4, Şekil 4-5).



Şekil 4-4: CD4$^+$ Th lenfositlerinde aktivasyon ve kostimülatör molekül ekspresyonları

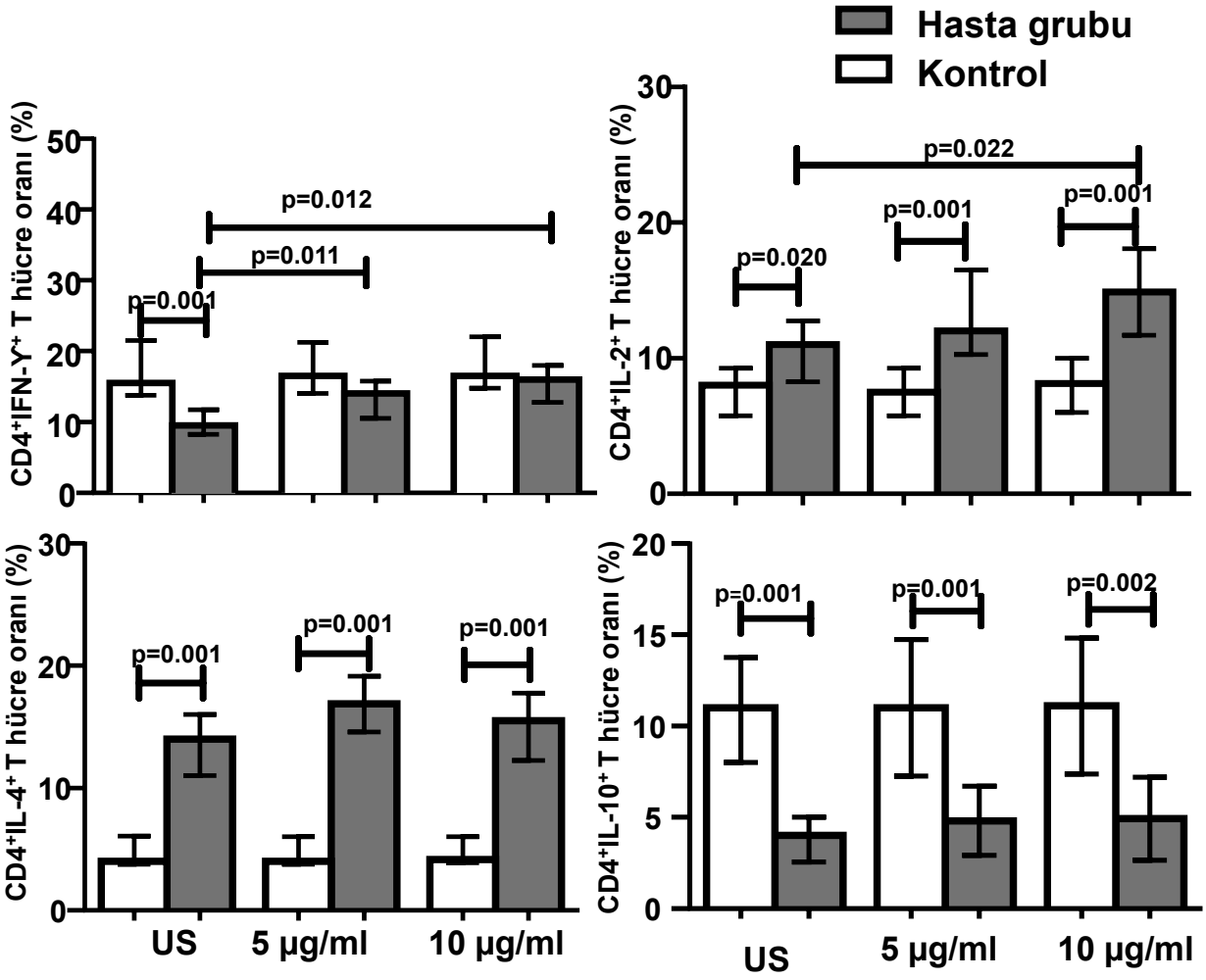


Şekil 4-5: Sağlıklı ve hasta grubunda CD4$^+$ T lenfosit popülasyonunda CD28, CD25, CD69 ve HLA-DR ekspresyonlarının akan hücre ölçer görüntüleri

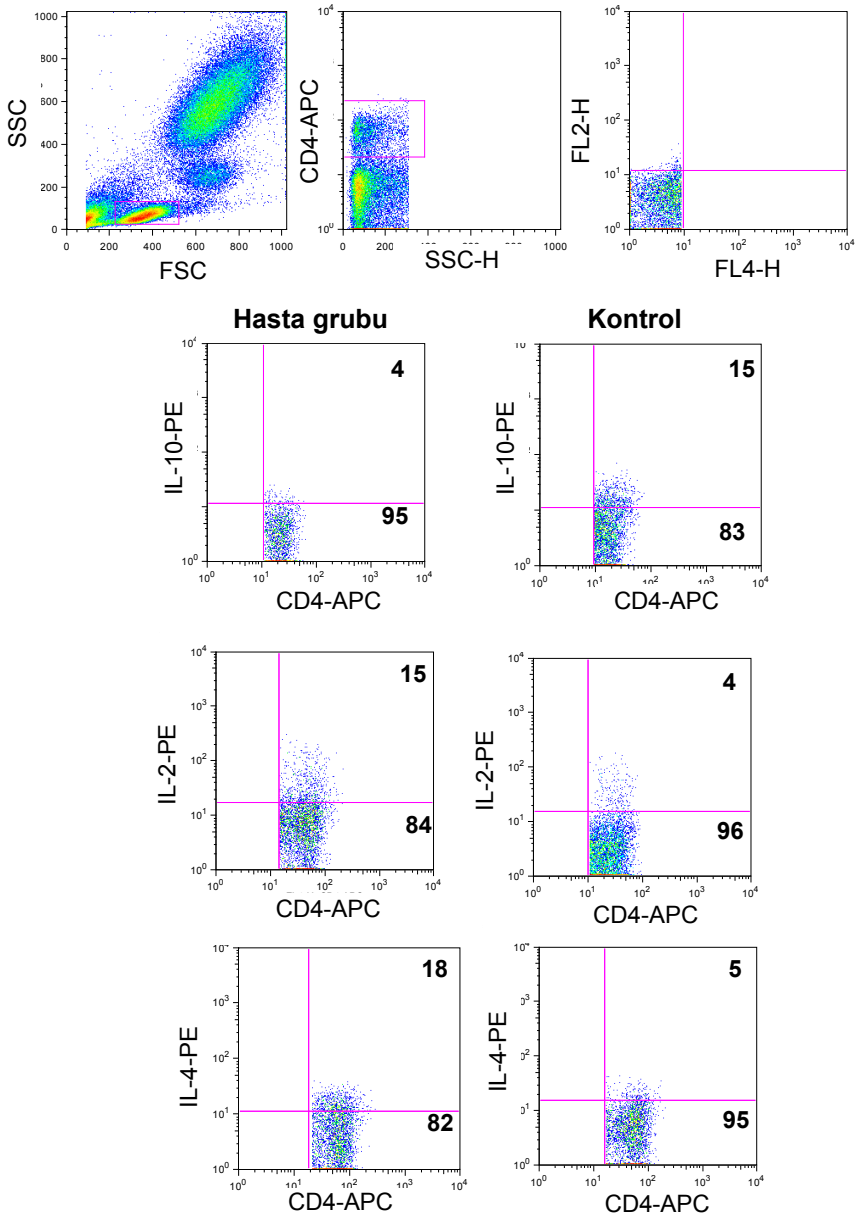
4.6. CD4$^+$ T hücre içi IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10 salınımı

CD4$^+$ T hücrelerinde IFN-γ, IL-2, IL-4 ve IL-10 salınımlarının belirlenmesi amacıyla hastalardan ve sağlıklı kontrollerden izole edilen PKMH'ler, 5 µg/ml ve 10 µg/ml SPFX olmak üzere iki farklı konsantrasyon ve stimülasyonsuz şartlarda kültüre alınmıştır. Kültür aşamaları sonrası CD4$^+$ T hücrelerindeki IFN-γ, IL-2, IL-4 ve IL-10 düzeyleri akan hücre ölçer cihazında incelenmiştir.

Hasta grubunda stimülasyonsuz, 5 µg/ml ve 10 µg/ml SPFX uyarımı sonrası CD4$^+$ T hücre IL-2 (p=0.02, p=0.001 ve p=0.001, sırasıyla) ve IL-4 (p=0.001, p=0.001 ve p=0.001, sırasıyla) ekspresyonlarında artış saptanmasına karşın IL-10 salınımı (p=0.001, p=0.001 ve p=0.002, sırasıyla) kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. CD4$^+$IFN-γ$^+$ T hücre oranı ise sadece stimülasyonsuz koşulda hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur (p=0.001). Stimülasyonsuz kültür şartlarıyla karşılaştırıldığında hasta grubunda CD4$^+$ T hücrelerinde 5 µg/ml SPFX uyarımı sadece IFN-γ ekspresyonunu (p=0.011) 10 µg/ml SPFX uyarımı ise hem IFN-γ hem de IL-2 (p=0.012,ve p=0.022) oranlarını anlamlı derecede yükseltmiştir. Kontrol grubunda SPFX uyarımı uyarım olmayan kültür şartları ile karşılaştırıldığında CD4$^+$IL-2$^+$, CD4$^+$IL-4$^+$, CD4$^+$IL-10$^+$ ve CD4$^+$ IFN-γ$^+$ T hücre oranlarında değişikliğe neden olmamıştır. Hasta grubunda ise SPFX'in 5 µg/ml ve 10 µg/ml'lik uyarım dozları stimülasyonsuz şarta göre hücre içi IL-4 ve IL-10 salınımında farklılık yaratmamıştır (Şekil 4-6, Şekil 4-7).



Şekil 4-6: SPFX ile uyarım sonrası $CD4^+$ T lenfosit hücre içi IFN-γ, IL-2, IL-4 ve IL-10 salınımları

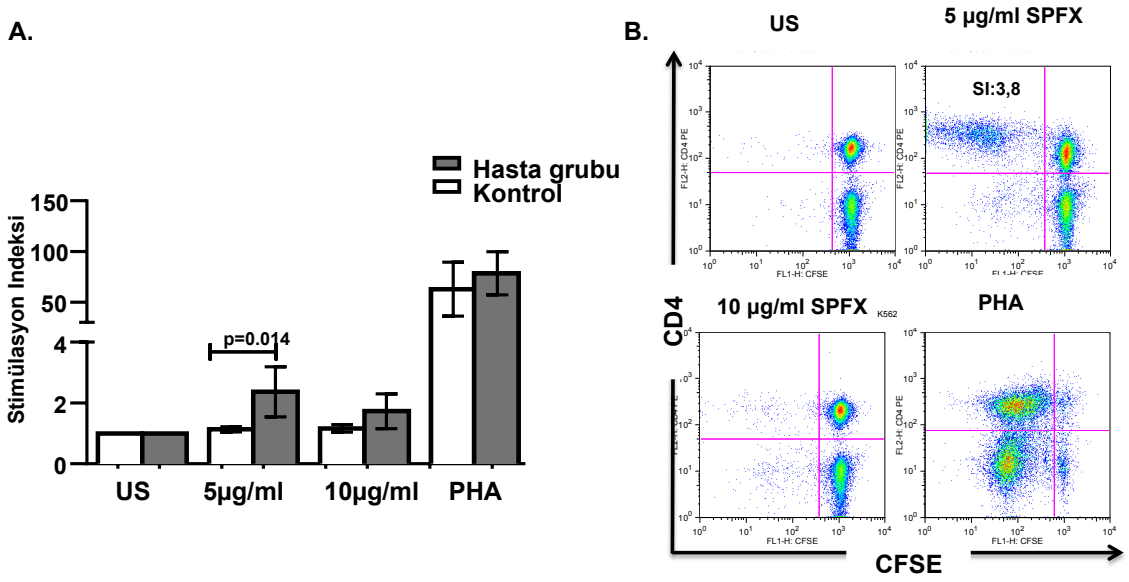


Şekil 4-7: Sağlıklı ve hasta grubunda $CD4^+$ T lenfositlerinde 10 µg/ml SPFX uyarımı sonrasında hücre içi IL-2, IL-4 ve IL-10 salınımının akan hücre ölçer görüntüleri

4.7. Lenfosit Transformasyon Test (LTT) Sonuçları

Hasta grupları ve sağlıklı kişilerden izole edilen PKMH'ler, CFSE boyandıktan sonra stimülasyonsuz, SPFX (5 ve 10 µg/ml) ve pozitif kontrol olarak PHA (10 µg/ml) içeren şartlarda 5 gün kültüre alınmış, $CD4^+$ T hücrelerinin proliferatif yanıtları akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiştir. Stimülasyon indeksi, ilaç spesifik $CD4^+$ T hücre proliferasyon oranının stimülasyonsuz şartlardaki $CD4^+$ T hücre proliferasyon oranına

bölünmesiyle hesaplanmıştır. Hasta ve sağlıklı grup arasında ilaçla uyarım sonrası lenfosit proliferasyonu stimülasyon indeksi açısından değerlendirildiğinde fark saptanmamasına karşılık, hasta grubunda 5 µg/ml dozunda SPFX uyarımı sonrası stimülasyonsuz şarta göre proliferasyonda artışa neden olmuştur (p=0.014) (Şekil 4-8).



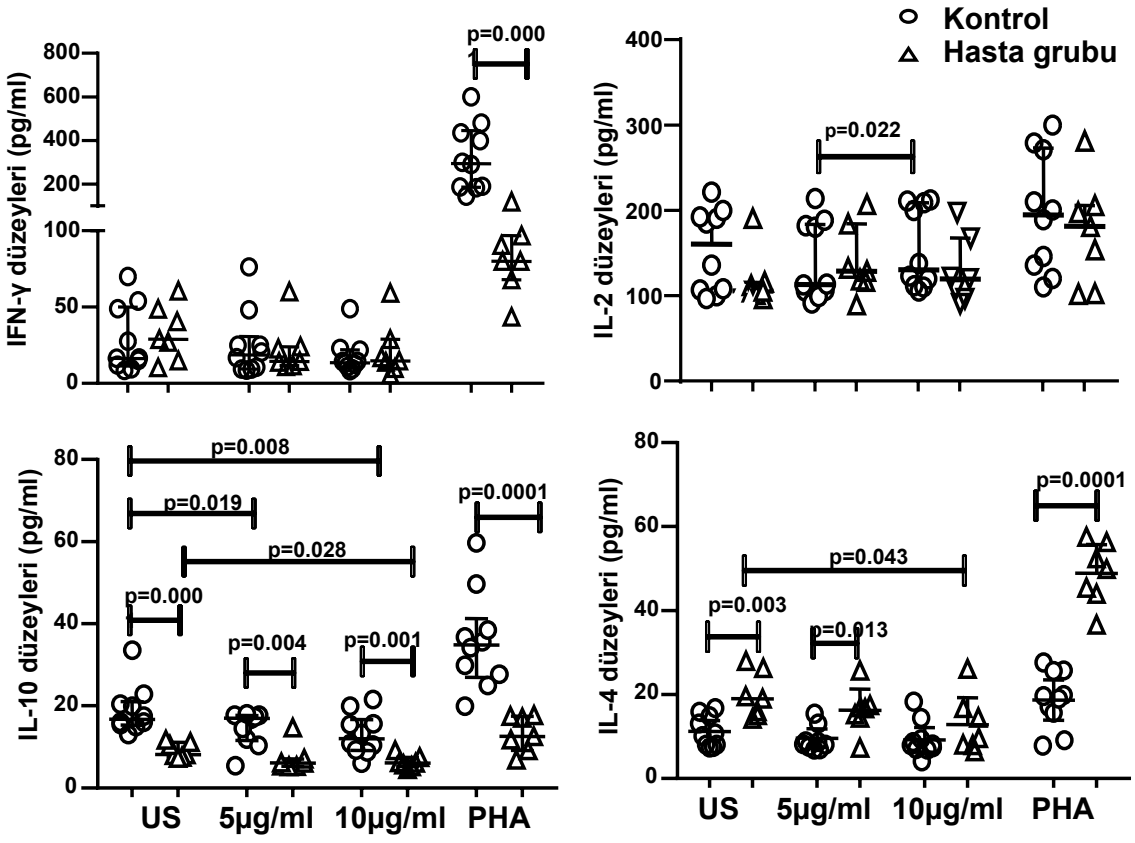
Şekil 4-8: Hasta ve sağlıklılarda 5 µg/ml ve 10 µg/ml SPFX ile uyarım sonrası $CD4^+$ T hücre proliferasyonu

4.8. SPFX uyarımlı kültürlerde IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri

LTT testi için 5 gün stimülasyonsuz, SPFX (5 µg/ml ve 10 µg/ml) ve PHA'lı şartlarda kültüre alınan PKMH'lerden toplanan kültür üst sıvılarında ELISA yöntemiyle IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri saptanmıştır.

Hasta grubunda stimülasyonsuz, 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozda SPFX ve pozitif kontrollerde IL-10 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (p=0.0001, p=0.004, p=0.001, p=0.0001, sırasıyla). Hasta grubunda 10 µg/ml, kontrol grubunda ise hem 5 µg/ml hem de 10 µg/ml ilaç uyarımı IL-10 düzeylerini ilaçsız koşullara göre düşürmüştür (p=0.028, p=0.019 ve p=0.008, sırasıyla). Hasta grubu ve kontrol grubu arasında farklı ilaç dozlarında istatistiksel açıdan IL-2 düzeylerinde farklılık saptanmamasına rağmen, kontrol grubunda 10 µg/ml SPFX uyarım dozu 5 µg/ml uyarım dozuna göre IL-2 salınımını arttırmıştır (p=0.022). Gruplar arasında IL-4 düzeyleri analiz edildiğinde, ilaç allerjisinde stimülasyonsuz, 5 µg/ml SPFX ve PHA'lı şartlarda IL-4 düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır (p=0.003, p=0.013

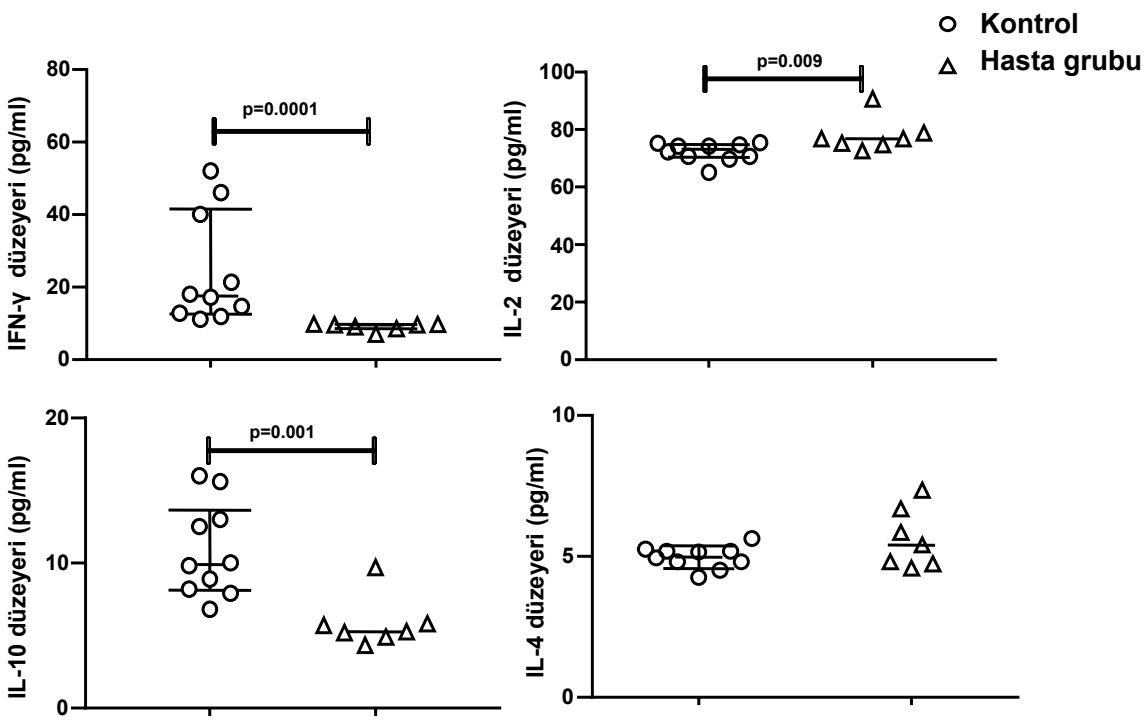
ve p=0.0001, sırasıyla). Sadece hasta grubunda 10 µg/ml SPFX ilaç uyarımsız koşula göre kültür üst sıvısında IL-4 düzeyini azaltmıştır (p=0.043). Hasta ve kontrol gruplarında 5 ve 10 µg/ml SPFX ile uyarılmış ve stimülasyonsuz şartlarda IFN-γ düzeyleri açısından farklılık bulunmazken, hasta grubunda PHA' lı şartta IFN-γ düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük saptanmıştır (p=0.0001) (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: PKMH kültür süpernantlarında IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri

4.9. Plazma IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeylerinin saptanması

Hasta ve kontrollerden alınan plazma örneklerinde IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda hasta grubunda plazma IL-2 seviyesi kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (p=0.009). IL-10 ve IFN-γ plazma düzeyleri incelendiğinde hastalarda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur (p=0.001 ve p=0.0001). Hasta ve kontrol gruplarında plazma IL-4 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlılık saptanmamıştır (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: Hasta ve kontrol grubu plazma örneklerinde IL-2, IL-4, IL-10 ve IFN-γ düzeyleri

5. TARTIŞMA

Florokinolonlardan özellikle SPFX, levofloksasin ve son dönemlerde moxifloksasin gibi belli türevlerin kullanımı yıllar geçtikçe artmaktadır. Buna paralel olarak bu ilaçlara karşı gelişen aşırıduyarlılık reaksiyonlarının da son on yılda artmış olduğu görülmektedir. Günümüzde florokinolonlar muhtemel olarak en sık allerjik reaksiyona sebep olan betalaktam dışı antibiyotiklerdir. Florokinolonlara karşı gelişen aşırıduyarlılık reaksiyonları en çok IgE ve T hücre aracılı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. T hücre aracılı reaksiyonlar IgE aracılı reaksiyonlara göre daha az bildirilmiştir ve makülopapüler döküntü, fiks ilaç erüpsiyonu, AGEP, SJS ve TEN gibi reaksiyonları kapsamaktadır (79).

İlaç allerjisi tanısında amaç ilaç aşırıduyarlılık reaksiyonunun sebep olduğu semptomları doğrulamak ve sorumlu ilacı tanımlamaktır. Günlük klinik uygulamada temel olarak kullanılan *in vivo* cilt testlerinin (yama, prik ve intradermal testler) duyarlılıkları düşüktür. Erken reaksiyonların tanısında altın standart olduğu düşünülen ilaç provokasyon testleri ise risklerinden dolayı hastalarca kabul görmemektedir. Geç reaksiyonlar için provokasyon testleri standardize edilmemiştir. Bu nedenlerden dolayı *in vitro* yöntemler hastalar için daha güvenilir olup ilaç allerji tablosunun patolojik mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayabilir (80).

T hücre aracılı geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarında farklı T hücre alt grupları rol oynamaktadır. Çalışmalar *in vitro* şartlarda T hücre proliferasyon ve aktivasyon testlerinin ilaç allerji tanısında kullanılabilirliğini göstermektedir (81,82). LTT ilaca karşı sensitize T hücrelerini belirlemek amacıyla kullanılan en yaygın *in vitro* testtir. Bunun dışında T hücre aracılı ilaç allerjisinin tanısında T hücre yüzey molekülü olan CD69'un ölçümü ve ilaçla uyarım sonrası sitokin tayininin yararlı olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (80). LTT'nin iyi tanımlanmış ilaç aşırıduyarlılık reaksiyonlarında duyarlılığının %60-70 arasında değiştiğini gösteren çalışmalar vardır. Bu testin sensitivitesi, ilaca ve reaksiyonun tipine bağlı olarak değişmekte ve geç tip reaksiyonlarda diğer cilt testlerine göre kullanılabilir olduğu gösterilmiştir (83-86). LTT'nin MPE, püstülar ve bülloz döküntü, DRESS gibi T hücre aracılı ilaç aşırıduyarlılık reaksiyonlarında yararlı olduğu saptanmıştır (87,88,90). Ancak çeşitli dezavantajlarından dolayı hala tartışmalı olan bu testte pozitif sonuç sorumlu ilacı tanımlamaya yardımcı olurken, çıkan negatif sonuç ilaç allerjisini ekarte ettirmemektedir. Çeşitli kinolanlara

karşı gelişen geç tip ilaç aşırıduyarlılık reaksiyonlarında T hücrelerinin etkileşimini gösteren yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Scmid ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada SPFX, moksifloksasin ve norfloksasin ile geç tip reaksiyon yaşayan 6 hasta çalışmaya dahil edilmiştir (72). Uygulanan yama testlerinde 6 hastanın 3'ünde pozitif sonuç elde edilirken, LTT testi tüm hastalarda ilaçların farklı konsantrasyonlarında (0,1 µg/ml-20 µg/ml) pozitif olarak saptanmıştır. LTT'de 20 µg/ml'nin üstü toksik olarak kabul edilmiş, optimal konsantrasyon 10 µg/ml olarak belirlenmiştir (72). Çalışmamızda yaptığımız ön deneylerimizde de SPFX için en uygun konsantrasyonlar 5 ve 10 µg/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen 8 hastanın 3'ünde LTT testinin pozitif sonuç vermesine karşılık, 5 µg/ml konsantrasyonda SPFX ile uyarılmış T hücrelerinin proliferatif kapasitesi kontrol grubu ile karşılaştırılıdığında hasta grubunda anlamlı derecede arttığı saptanmışıtr.

T hücrelerinin tam olarak aktive olabilmesi için antijen sunucu hücre tarafından MHC yoluyla sunulan antijenin THR ile etkileşime girmesi sonucu antijen-THR etkileşim bölgesinde kostimülatör, adezyon ve sinyal iletiminde rol oynayan molekül ekspresyonu artmaktadır. T hücrelerinde aktivasyon ve antijen tanınmasından sonra yarım saat içinde erken aktivasyon yüzey belirteçleri olan CD40 Ligand (CD40L) ve CD69'un ekspresyonu artarken, CD25, CD71, HLA-DR ve çeşitli adezyon moleküllerinin ekspresyonu 1-2 gün sonra oluşmaktadır. Aktivasyondan 3-5 gün sonra T hücreleri fonksiyonel olarak farklılaşmakta ve immün yanıtları regüle eden sitokinleri salgılayan farklı tipte efektör $CD4^+$ T hücre alt gruplarına ayrılmaktadırlar (80). Allerjik hastalıkların gelişimi süresince efektör Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13 üretirler. Bununla birlikte Th1 hücreleri hücre içi patojenlere karşı koruyucu IFN-γ, Treg hücreleri ise yüksek oranda IL-10 ve TGF-β üreterek immünsupresif fonksiyon gösterirler (47).

T hücre aracılı ilaç aşırıduyarlılık reaksiyonlarında CD69 ekspresyonunun ilaçla stimule T hücre aktivasyonunda *in vitro* bir belirteç olabileceği düşünülmüş ve yapılan akan hücre ölçer analizlerinde ilaçla stimüle MPE, SJS ve DRESS hastalarında T hücrelerinde CD69 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (90,91). Benzer bir çalışmada CD69'un CD71 veya CD25 gibi diğer aktivasyon molekülleriyle karşılaştırıldığında hızlı ve güçlü artışından dolayı ilaç allerjisi tanısında uygun bir *in vitro* belirteç olduğu düşünülmüştür (82). Çalışmamızda SPFX'e karşı geç tip ilaç aşırıduyarlılık reaksiyonu geçiren hastaların periferik kan örneklerinde, $CD4^+CD69^+$ T hücre oranı arasında kontrole göre fark saptamamamıza rağmen, $CD4^+HLA\text{-}DR^+$ ve $CD4^+CD25^+$ T hücre

oranları istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. $CD4^+$ T hücrelerinde erken aktivasyon belirteci $CD4^+CD69^+$ hücre ekspresyonunda fark saptanmaması, geç aktivasyon belirteci $CD4^+$HLA-DR^+ ve $CD4^+CD25^+$ T hücre ekspresyonunda artış gözlenmesi bu hücrelerin fenotipik olarak IL-2 sekrete eden hafıza T hücre fenotipinde olduklarını düşündürmektedir.

Birçok araştırmacı, çeşitli ilaç allerjilerinde Th1 veya Th2 tip immün reaksiyonun, klinik tablo ile korelasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Bazıları geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonunda Th1 tip sitokin paterninin baskın olduğunu gösterirken, birçok çalışmalar karışık bir Th1/Th2 paterninin olduğunu belirtmiştir. Buna göre birçok çalışmada ilaçla uyarım sonrası yapılan sitokin ölçümlerinde, IFN-γ'nın kutanöz ilaç reaksiyonlarında baskın bir sitokin olduğu saptanmış ve patofizyolojilerinde önemli rol oynayabileceği, geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarında sorumlu ilacı tanımlamada uygun bir *in vitro* belirteç olduğu gösterilmiştir (92-98). Aşırıduyarlılık reaksiyonlarının farklı alt tiplerinde tanımlanan bir diğer sitokin ise IL-5'dir. IL-5 ölçümünün çeşitli ilaç reaksiyonlarında (MPE, DRESS) ilaç sensitizasyonunu belirlemede yararlı bir *in vitro* belirteç olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (95, 99-101). Son yıllarda yapılan ve geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarının tanısı için en uygun sitokini bulmayı amaçlayan iki çalışma vardır (98, 102). Khall ve arkadaşlarının çalışmasında penisilinle MPE öyküsü olan hastalarda sorumlu ilaçla uyarım sonrası IL-2, IL-5 ve IFN-γ ekpresyonları değerlendirilmiş, penisilin allerjisinin değerlendirilmesinde ikinci günde IL-2 ve 5. günde IL-5 ve IFN-γ ölçümünün hassas ve spesifik bir metod olabileceği öne sürülmüştür (98). Diğer çalışmada ise amoksisilin veya sulfanomid ile geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonu geçiren hastalardan izole edilen PKMH'lerin ilaçlarla uyarım sonrası kültür üst sıvılarında 17 farklı sitokin ve kemokin düzeyleri değerlendirilmiş, buna göre hasta grubunda sağlıklılara göre IL-2, IL-5, IL-13 ve IFN-γ'nın baskın olarak sekrete edildiği gözlenmiştir. Bu sitokinlerin ölçümünün geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonunda, ilaç sensitizasyonunu belirlemede umut vadeden bir yöntem olduğu düşünülmüştür (102). Bulgularımız, SPFX duyarlılığı olan hastalarda 5 µg/ml ve 10 µg/ml, SPFX ile uyarımın $CD4^+$IL-2^+ ve $CD4^+$IL-4^+ T hücre oranını arttırdığı, $CD4^+$IL-10^+ T hücre oranlarında ise azalmaya yol açtığını göstermektedir. LTT kültür üst sıvılarında sitokin düzeyleri incelendiğinde hasta grubunda SPFX uyarımı sonucu IFN-γ ve IL-2 düzeylerinde farklılık saptanmamasına karşılık, IL-10 düzeyinde azalma, IL-4 düzeyinde ise artışa neden olmuştur. Hastalardaki plazma IL-2 düzeyleri kontrol grubuna oranla yüksek, IL-10 ve

IFN-γ düzeyleri düşük saptanmıştır. Bulgularımız kinolonlara bağlı geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarının periferde IL-2 ve IL-4 salgılayan $CD4^+$ T hücre artışı ile birlikte, azalmış $IL\text{-}10^+CD4^+$ T hücre oranları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Hem plazma ve ilaç uyarımlı kültür sıvılarında hem de IL-10 salgılayan $CD4^+$ T hücrelerinde saptanan azalma ilaca bağlı gelişen gecikmiş tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarında regülatör mekanizmalardaki bozukluğu işaret etmektedir.

Ayrıca LTT testi negatif olan hastalarda hücre içi sitokin değerleri incelendiğinde, SPFX stimüle hücre içi IL-2 ve IL-4 düzeyleri sağlıklı kontrollere göre anlamlı oranda artmıştır. Buna göre LTT testi negatif olan hastalarda akan hücre ölçer cihazı ile sorumlu ilaçla stimüle $CD4^+$ T hücrelerinde hücre içi IL-2 ve IL-4 salınımlarının saptanmasının, SPFX'e bağlı geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonunun tanısında yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda 72 ve 60 ay önce SPFX'e bağlı geç tip hipersensitivite reaksiyonu tarifleyen iki hastanın LTT ve ilaç provokasyon testleri negatif saptanmıştır. LTT'nin negatif sonuçlanması ilaç allerjisini dışlamamaktadır. Provokasyon testi ise, reaksiyonun üzerinden çok fazla süre geçmesi nedeniyle negatif sonuçlanmış olabilir ya da öyküde tarif edilen olaylar ilaç alımına bağlı olmayabilir. Üzerinden uzun süre geçen allerjik reaksiyonlarda provokasyon testleri negatif kalabileceği için, LTT ya da hücre içi sitokin ölçümleri gibi *in vitro* testlerin bu reaksiyonların tanı aşamasında yardımcı olması açısından önem kazanmaktadır. LTT testi negatif saptanan iki hastamızda hücre içi sitokin düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi güvenilir olmayacaktır. Dolayısıyla bu metodun kullanılabilirliğinin test edilmesi için daha fazla hasta içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Beklenmeyen geç tip ilaç reaksiyonlarının *in vivo* tanısı, çoğu zaman hastanın ilaçla yeniden karşılaşmak istememesi ya da yanlış negatif sonuçlar alınabilmesi nedeniyle kısıtlanmaktadır. Bulgularımız, IL-2 ve IL-4 sekrete eden $CD4^+$ T hücrelerinde artış, $IL\text{-}10^+CD4^+$ T hücrelerinde azalmanın SPFX hipersensitivitesi olan hastalarda geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Mevcut sonuçlarımız, LTT ve hücre içi sitokin tayinlerinin SPFX'e karşı aşırıduyarlılık reaksiyonlarının tanısında cilt testlerinin yetersiz kalabildiği bu hasta grubunda *in vitro* test olarak yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. International drug monitoring: the role of the hospital. Geneva: The Organization, 1996.
2. Johansson SG, Bleber T, Dahl R, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. J Allergy Clin Immunol 2004;113**(5)**:832-836.
3. Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensivity drug reactions. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005;5**(4):**309-316.
4. Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis. Middleton's allergy: principles and practice: 7th Ed. China: Elsevier, 2009:1205-1226.
5. Gruchalla RS. Drug metabolism, danger signals, and drug-induced hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol 2001;108**(4)**:475-488.
6. Thong BY, Leong KP, Tang CY, Chng HH. Drug allergy in a general hospital: Results of a novel prospective inpatient reporting system. Ann Allergy Asthma Immunol 2003;90**(3)**:342-347.
7. Pumphrey R. Anaphylaxis: can we tell who is at risk of a fatal reaction? Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004;4**(4)**:285-290.
8. Gelincik A, Demirtürk M, Yılmaz E, Ertek B, Erdogdu D, Çolakoğlu B, et al. Anaphylaxis in a tertiary adult allergy clinic: a retrospective review of 516 patients. Ann Allergy Asthma Immunol. 2013;110**(2)**:96-100
9. Adkinson NF. Drug allergy. In: Middleton E, Reed C, Ellis FE (eds.) Allergy, Principle and Practise. 5th edition. St. Louis: Mosby; 1998. p.1212-1224.
10. Thong Y-H, Teck-Choon T. Epidemiology and risk factors for drug allergy. Br J Clin Pharmacol. 2011;71**(5)**:684-700.
11. Chung WH, Hung SI, Chen YT. Human leukocyte antigens and drug hypersensitivity. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7**(4)**:317-323.
12. Adkinson NF Jr, Essayan D, Gruchalla R, Haggerty H, Ka-wabata T, Sandler JD, et al. Task force report: future research needs for the prevention and management of immune-mediated drug hypersensitivity reactions. J Allergy Clin Immunol 2002;109**(3)**:S461-478.
13. Haddi E, Charpin D, Tafforeau M, Kulling G, Lanteaume A, Kleisbauer JP, et al. Atopy and systemic reactions to drugs. Allergy 1990;45**(3)**:236-239.

14. Pichler WJ. Immune mechanism of drug hypersensivity. Immunol Allergy Clin North Am 2004;24**(3)**:373-397.
15. Levine BB. Immunochemical mechanizms of drug allergy. Annu Rev Med 1966;17:23-38.
16. Pichler WJ. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2002;2**(4)**:301-305.
17. Posadas SJ, Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions-new concepts. Clin Exp Allergy 2007;37**(7)**:989-999.
18. Sanderson JP, Naisbitt DJ, Park BK. Role of bioactivation in drug-induced hypersensitivity reactions. AAPS J 2006;8**(1)**:E55-64.
19. Pirmohamed M, Madden S, Park BK. Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as a pathogenic mechanism. Clin Pharmacokinet 1996;31**(3)**:215-230.
20. Coombs PR, Gell PG. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In:Clinical Aspects of Immunology, ed. Gell RR. Oxford: Oxford University Press, 1968;575-596.
21. Werner J. Pichler. Drug Hypersensitivity Reactions: Classification and Relationship to T-Cell Activation. Drug Hypersensitivity. Basel, Karger, 2007, pp 168-189
22. İmmün Aracılı Doku Hasarının Mekanizmaları ve Aşırıduyarlılık Reaksiyonları.(http://www.alerjiklinigi.com/index.php?option=com_content&view=article&id=139)
23. Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity drug reactions. Ann Intern Med 2003;139**(8)**:683-693.
24. Pichler WJ, Zanni M, von Greyerz S. High IL5 production by drug specific T-cell clones. Int Arch Appl Allergy Immunul 1997;113**(1-3)**:117-180.
25. Kudva Patel V, White E, Karnani E, Collins MH, Assa'ad AH. Drug reaction to ceftriaksone in a child with X-linked agammaglobulinemia. J Allergy Clin Immunol 2002;109**(5)**:888-889.
26. Demoly P, Lebel B, Messaad D, Sahla H, Rongier M, Daures JP, et al. Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy. Allergy 1999;54**(5)**:500-506.

27. Rebelo Gomes E, Fonseca J, Araujo L, Demoly P. Drug allergy claims in children: from self-reporting to confirmed diagnosis. Clin Exp Allergy 2008;38**(1)**:191-198.
28. Warrington R. The truth about drug allergies. The Canadian Journal of CME 2002;188-193.
29. Demoly P, Kropf R, Bircher A, Pichler WJ. Drug hypersensivitiy: questionnaire. EAACI interest group on drug hypersensivity. Allergy 1999;54**(9)**:999-1003.
30. Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring J, Pichler W, Demoly P, et al. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensivity. Allergy 2002;57**(1)**:45-51.
31. Ditto AM. Drug allergy. In: Grammer LC, Greenberg PA (eds). Patterson's allergic diseases. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2002:295-334
32. Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, et al. European Network for Drug Allergy (ENDA); EAACI interest group on drug hypersensitivity. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivityreactions: general considerations. Allergy 2003;58**(9)**:854-863.
33. Greenberger PA. Drug allergies. J Allergy Clin Immunol 2006;117**(2)**:S464-470.
34. Bousquet PJ, Pipet A, Bousquet-Rouanet L, Demoly P. Oral challenges are needed in the diagnosis of betalactam hypersensitivity. Clin Exp Allergy 2008;38**(1)**:185-190.
35. Fontaine C, Mayorga C, Bousquet PJ, Arnoux B, Torres MJ, Blanca M, et al. Relevance of the determination of serum-specific IgE antibodies in the diagnosis of immediate beta-lactam allergy. Allergy 2007;62**(1)**:47-52.
36. Romano A, Demoly P. Recent advances in the diagnosis of drug allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7**(4)**:299-303.
37. Weiss ME, Adkinson NF. Diagnostic test for drug hypersensitivity. In: Tilles SA (ed). Drug hypersensitivity. Immunol and Allergy Clin North Am. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998;18:731-744.
38. Bavbek S. İlaç allerjilerinde in vitro tanısal testler. In: Bavbek S, Mısırlıgil Z (eds). İlaç Alerjileri. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2005. p.65-84.
39. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, et al. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. Int Arch Allergy Immunol 2008;146**(3)**:177-189.

40. Sanz ML, Gamboa PM, De Weck AL. Cellular tests in the diagnosis of drug hypersensitivity. Curr Pharm Des 2008;14**(27)**:803-808.
41. Ebo DG, Leysen J, Mayorga C, Rozieres A, Knol EF, Terreehorst I, et al. The in vitro diagnosis of drug allergy: status and perspectives. Allergy. 2011;66**(10)**:1275-1286.
42. Abul K.Abbas, Andrew H. Lichtman, and S. Pillai. Cellular and Molecular Immunology. 7 ed.2012: Elsevier.527.
43. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5.baskı. Philadephia.Elsevier Saunders; 2005:163-188.
44. Anderton SM, Wraith DC. Selection and fine tuninig of the autoimmune T cell repertoire. Nat Rev Immunol 2002;2**(7)**:487-498.
45. Germain RN. T cell development and the CD4-CD8 lineage decision. Nat Rev Immunol 2002;2**(5)**:309-422.
46. Palmer E. Negative selection-clearing out the ad apples from the T cell repertoire. Nat Rev Immunol 2003;3**(5)**:383-391
47. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by network of cytokines and transcription factors. Immunol Rev 2010;238**(1)**:247-262.
48. Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. Annu Rev Immunol 2007;25:171-192.
49. Wan YY, Flavell RD. How diverse-CD4 effector T cells and their functions. J Mol Cell Biol 2009;1**(1)**:20-36.
50. Schwartz RH. T cell anergy. Ann Rev Immunol 2003;21:305-334.
51. Sakaguchi S. Naturally arising $CD4^+$ regulatory T cells for immunologic self tolerans and negative control of immune responses. Ann Rev Immunol 2004;22:531-562.
52. Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. J. Allergy Clin. Immunol. 2000;105**(3)**: 399-408.
53. Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 2003;111**(3)**: 450-463.
54. Lambert LE, Berling JS, Kudlacz EM. Characterization of the antigen-presenting cell and T cell requirements for induction of pulmonary eosinophilia in a murine model of asthma. Clin. Immunol. Immunopathol. 1996;81**(3)**:307-311

55. De Sanctis GT, Itoh A, Green FH, Qin S, Kimura T, Grobholz JK, et al. T-lymphocytes regulate genetically determined airway hyperresponsiveness in mice. 1997;3**(4)**:460-462.
56. Kay, AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. N Engl. J Med. 2001;344**(1)**:30-37.
57. Brodie, DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. J. Allergy Clin. Immunol. 2001;108**(2 Suppl)**: S65-S71.
58. Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. Mol. Immunol. 2002;38**(12-13)**:881-885.
59. Herrick CA, Bottomly K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. Nat. Rev. Immunol. 2003;3**(5)**:405-412.
60. Li-Weber M, Krammer PH. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. Nat. Rev. Immunol. 2003;3**(7)**:534-543.
61. Pernis AB, Rothman PB. JAK-STAT signaling in asthma. J. Clin. Invest. 2002;109**(10)**:1279–1283.
62. Takeda K, Kishimoto T, Akira S. STAT6: its role in interleukin 4- mediated biological functions. J. Mol. Med. 1997;75**(5)**:317-326.
63. Zhou M, Ouyang W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. Immuno Res.2003;28**(1)**:25-37.
64. Platts-Mills TA. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001;164**(8 Pt 2)**: S1-S5.
65. El Biaze M, Boniface S, Koscher V, Mamessier E, Dupuy P, Milhe F, et al. T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. Allergy 2003;58**(9)**:844-853.
66. Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Mucosal tolerance and immunity: regulating the development of allergic disease and asthma. Int. Arch. Allergy Immunol. 2003;130**(2)**:108-118.
67. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. J. Allergy Clin. Immunol. 2005;116**(5)**:961-968.
68. Robinson DS, Larché M, Durham SR. Tregs and allergic disease. J. Clin. Invest. 2004;114**(10)**:1389-1397.

69. Hooper DC, Wolfson JS. Mode of action of the new quinolones: new data. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991;10**(4)**:223-231.
70. Paton JH, Reeves DS. Fluoroquinolone antibiotics. Microbiology, pharmacokinetics and clinical use. Drugs 1988;36(2):193-228.
71. Larouche G. Les quinolones: des ann´ees soixante a` aujourd'hui. Pharmactuel 2001;34:40-46.
72. Schmid DA, Depta JP, Pichler WJ. T cell mediated hypersensitivity to quinolones: mechanisms and cross reactivity. Clin Exp Allergy 2006;36**(1)**:59-69.
73. Davis H, McGoodwin E, Reed TG. Anaphylactoid reactions reported after treatment with ciprofloxacin. Ann Intern Med 1989 111**(13)**:1041-1043.
74. Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. N Engl J Med 1994;331**(19)**:1272-1285.
75. Aranda A, Mayorga C, Ariza A, Doña I, Rosado A, Blanca-Lopez N, et al. In vitro evaluation of IgE mediated hypersensitivity reactions to quinolones. Allergy 2011;66**(2)**:247-254.
76. Manfredi M, Severino M, Testi S, Macchia D, Ermini G, Pichler WJ, et al. Detection of spesific IgE to quinolones. J Allergy Clin Immunol 2004;113**(1)**:155-160.
77. Seitz CS, Bröcker EB, Trautmann A. Diagnosting testing in suspected fluoroquinolone hypersensitivity. Clin Exp Allergy. 2009;39**(11)**:1738-1745.
78. Venturini Diaz M, Lobera Labairu T, Del Pozo Gil MD, Blasco Sarramián A, González Mahave I. In vivo diagnostic tests in advers reactions to quinolones. J İnvestig Allergol Clin Immunol 2007;17**(6)**:393-398.
79. Blanca-López N, Ariza A, Doña I, Mayorga C, Montañez MI, Garcia-Campos J, et al. Hypersensitivity reactions to fluoroquinolones: analysis of the factors involved. Clin Exp Allergy. 2013;43**(5)**:560-567.
80. Priska Lochmatter, Anna Zawodniak, Werner J. Pichler. In VitroTests in Drug Hypersensitivity Diagnosis. Immunol Allergy Clin North Am. 2009;29**(3)**:537–554.
81. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. Allergy. 2004;59**(8)**:809–820.

82. Beeler A, Zaccaria L, Kawabata T, Gerber BO, Pichler WJ. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. Allergy 2008;63**(2)**:181–188.
83. Luque I, Leyva L, Jos´e Torres M, Rosal M, Mayorga C, Segura JM, et al. In vitro T-cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. Allergy 2001; 56**(7)**:611–618.
84. Hari Y, Frutig-Schnyder K, Hurni M, Yawalkar N, Zanni MP, Schnyder B, et al. T cell involvement in cutaneous drug eruptions. Clin Exp Allergy 2001;31**(9)**:1398–1408.
85. Nyfeler B, Pichler WJ. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. Clin Exp Allergy 1997;27**(2)**:175–181.
86. Neukomm CB, Yawalkar N, Helbling A, Pichler WJ. T-cell reactions to drugs in distinct clinical manifestations of drug allergy. J Investig Allergol Clin Immunol 2001;11**(4)**:275–284.
87. Britschgi M, Steiner UC, Schmid S, Depta JP, Senti G, Bircher A, et al. T-cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis. J Clin Invest 2001;107**(11)**:1433–1441.
88. Hertl M, Geisel J, Boecker C, Merk HF. Selective generation of CD81 T-cell clones from the peripheral blood of patients with cutaneous reactions to beta-lactam antibiotics. Br J Dermatol 1993;128**(6)**:619–626.
89. Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T, Pichler WJ. et al. Activation of drug-specific CD41 and CD81 T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. J Immunol 1995;155**(1)**:462–472.
90. Nishio D, Izu K, Kabashima K, Tokura Y. T cell populations propagating in the peripheral blood of patients with drug eruptions. J Dermatol Sci 2007;48**(1)**:25–33.
91. Torres MJ, Mayorga C, Cornejo-Garcia JA, Lopez S, Chaves P, Rondon C, et al. Monitoring non-immediate allergic reactions to iodine contrast media. Clin Exp Immunol 2008;152**(2)**:233–238.
92. Naisbitt DJ, Britschgi M, Wong G, Farrell J, Depta JP, Chadwick DW, et al. Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype, and cytokine profile of drug-specific T cell clones. Mol Pharmacol 2003;63**(3)**:732–741.

93. Gaspard I, Guinnepain MT, Laurent J, Bachot N, Kerdine S, Bertoglio J, et al. IL-4 and IFN-gamma mRNA induction in human peripheral lymphocytes specific for beta-lactam antibiotics in immediate or delayed hypersensitivity reactions. J Clin Immunol 2000;20**(2)**:107–116.
94. Halevy S, Cohen AD, Grossman N. Clinical implications of in vitro drug-induced interferon gamma release from peripheral blood lymphocytes in cutaneous adverse drug reactions. J Am Acad Dermatol 2005;52**(2)**:254–261.
95. Yawalkar N, Shrikhande M, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ, et al. Evidence for a role for IL-5 and eotaxin in activating and recruiting eosinophils in drug-induced cutaneous eruptions. J Allergy Clin Immunol 2000;106**(6)**:1171–1176.
96. Posadas SJ, Torres MJ, Mayorga C, Juarez C, Blanca M. Gene expression levels of cytokine profile and cytotoxic markers in non-immediate reactions to drugs. Blood Cells Mol Dis 2002;29**(2)**:179–189.
97. Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, Itomi S, Kakami M, Kawamura M, et al. Allergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay. Allergol Int 2007;56**(2)**:149–155.
98. Khalil G, El-Sabban M, Al-Ghadban S, Azzi S, Shamra S, Khalifé S, et al. Cytokine expression profile of sensitized human T lymphocytes following in vitro stimulation with amoxicillin. Eur Cytokine Netw 2008;19**(3)**:131–141.
99. Choquet-Kastylevsky G, Intrator L, Chenal C, Bocquet H, Revuz J, Roujeau JC, et al. Increased levels of interleukin 5 are associated with the generation of eosinophilia in drug-induced hypersensitivity syndrome. Br J Dermatol 1998;139**(6)**:1026–1032.
100. Yawalkar N, Egli F, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ, et al. Infiltration of cytotoxic T cells in drug-induced cutaneous eruptions. Clin Exp Allergy 2000;30**(6)**:847–855.
101. Yawalkar N. Drug-induced exanthems. Toxicology 2005;209**(2)**:131–134.
102. Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT, Gerber BO, Pichler WJ. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. Allergy 2009;64**(9)**:1269-1278.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

İlaç reaksiyonları yaşamı tehdit edebilecek durumlara neden olabilmesi, hastanede yatış süresini uzatabilmesi, tedavi maliyetini artırabilmesi nedeni ile önemli bir sağlık sorunudur. İstenmeyen ilaç reaksiyonları hastanede yatan hastaların %10-20'sinde, genel popülasyonun ise %7'sinde oluşmaktadır. İstenmeyen ilaç reaksiyonlarının yalnızca %15 kadarı ilaç allerjilerine bağlıdır.

İlaç allerjilerinde tanı son derece zahmetli ve zor karar verilebilen bir surectir. Bu durumun en onemli nedenleri; hastanın aynı anda birden fazla ilac kullanıyor olabilmesi, altta yatan hastalığın klinik belirtilerinin ilacın oluşturduğu belirtilerle benzerliği, hastanın yanlış veya eksik bilgi veriyor olması, ayrıca tanı testlerinin sınırlılığı ve bircok merkezde yapılabilirliliğinin sınırlı oluşudur.

Günümüzde tanı amaçlı, hastadan alınan detaylı öyküye göre deri (prik ve intradermal) testleri yapılır. Ancak bu testlerin negatif çıkması tek başına tanı koyucu değildir. Şüpheli ilacın kendisi veya farmakolojik benzerinin çok düşük dozlardan başlanarak kontrollü olarak hastaya verilmesi ilkesine dayanan ilaç provokasyon testleri, ilaç allerjisi tanısını koymada altın standart olarak kabul edilse de ciddi reaksiyonlara sebebiyet verebilmesi nedeniyle riskli bir yöntemdir. Tüm bu bilgiler ışığında ilaç allerjisi tanısı koymada % 100 güvenli bir tanı yöntemi yoktur. Bazofil aktivasyon testleri ve lenfosit transformasyon testleri gibi yeni laboratuvar tanı yöntemlerinin geliştirilmesi durumunda provokasyon testlerine ihtiyaç azalabilir.

Çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan kinolon grubu antibiyotiklere karşı, aşırı duyarlılık reaksiyonlarının artmış olduğu görülmektedir. Bu çalışmada kinolon grubu antibiyotiklere karşı, aşırı duyarlılık reaksiyonlarının tanısında kullanılan klinik yöntemlerin, yeni geliştirilen laboratuvar yöntemleriyle ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

Size bu çalışmada, kinolon grubu antibiyotiklerden reaksiyon yaşadığınız sorumlu ilaçla tanının netleştirilmesi için (eğer öyküde net olarak belirtilmemiş ise) rutinde tanı koyma adına kullanılan cilt prik-intradermal testler, provokasyon ve yama testleri uygulanacaktır.Cilt testlerinde, sorumlu ilaç belirli dozlarda sulandırılarak, belirli aralıklarla cilde lanset ve enjektör yardımıyla uygulanır. Cilt testleri negatifse ve öyküde

ciddi reaksiyonlar tanımlanmıyorsa ilaç yükleme (provokasyon) testi yapılacaktır. İlaç yükleme testinde ilaç hap formunda belirli aralıklarla ağız yoluyla alınacakır.Tüm bu işlemler acil müdahale şartlarının bulunduğu allerji polikliniğimizde, uzman hekimlerimizin gözetimi altında yapılacaktır.

Tarif edilen geç reaksiyonu tanımlamak amacıyla ise deri yama testleri yapılacaktır. Bu testte ise sorumlu ilaç belirli forma getirilerek özel yama test materyaliyle hastanın sırtına yapıştırılır. En az 24 saat hasta ile temas halinde kaldıktan sonra test materyali uzman hekimlerimizce açılır ve sonuç değerlendirilir.

Laboratuvar testleri için de (lenfosit transformasyon testi) heparinli tüpe 15 cc kan alınacaktır.

Tüm bu işlemler esnasında bir takım istenmeyen durumlar oluşabilir;

- Deri prick testleri uygulamasından sonra kolunuzda geçici kızarıklık ve şişlikler olabilir.
- Ilaç yükleme işlemi esnasında ise nefesinizde daralma, hırıltı, göğsünüzde sıkışma hissi, öksürük, gözlerinizde, burun veya boğazınızda kaşıntı, hapşırık, burun tıkanıklığı veya akıntısı, cildinizde kızarıklık, kaşıntı, göz kapaklarınızda, dudaklarınızda şişme, tansiyon düşüklüğü ve allerjik şok gibi durumlardan biri görülebilir.
- Yama testi uygulamasından sonra ilaçla temas edilen bölgede kızarklık, kaşıntı , yanma veya batma tarzında şikayetleriniz olabilir.

Tüm bu istenmeyen durumların oluşması ve engellemesi amacıyla gerekli malzeme ve imkanlarımız bulunmaktadır. Gerekli tıbbi uygulamalar anında yapılacaktır.

Çalışmaya 30 hasta ve 10 sağlıklı gönüllü alınacaktır.

Ayrıca, sizlerden yapılan işlemler nedeniyle ücret alınmayacak ve ödeme yapılmayacaktır. Çalışmaya katılmayı kabul etmezseniz veya ayrılmak isterseniz bu durum olağan tıbbi bakımlarınızı etkilemeyecektir.

Test öncesi ve sonrası tüm sorunlarınızda Uzm.Dr.Semra DEMİR'i 0212 4142000-32458 nolu telefondan arayabilirsiniz.

Bilimsel çalışmalara destek ve katkınız için teşekkür ederiz.

Şahsıma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Allerji Bilim Dalı ve İstanbul Tıp Fakültesi İmmunoloji BD laboratuarında yukarıda adı geçen tüm ilaçlı--ilaçsız tetkik yöntemlerinin (1. ve 2. yöntemler) hepsinin yapılmasını ve her türlü sonucunu kabul ediyorum.

Hastanın adı-soyadı: tarih:
İmza:
Hasta yakının (1.derece) adı soyadı: tarih:
İmza:
Doktor adı soyadı: İmza
tarih:

Tanıklık edenin adı soyadı: tarih:

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Sayın Bio. Belkıs İŞLEYEN tarafından İç Hastalıkları AD/Allerji BD'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte Uzm. Semra DEMİR'i 0506 3092961, İç Hastalıkları/Allerji BD 'ten arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-soyadı,…… Tarih:……

Adresi: …… Telefon no:……..

İmzası……..:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı-soyadı:……. Tarih:……

Adresi: …… Telefon no:……..

İmzası: ……...

Tanıklık edenin adı soyadı: Tarih:

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**
	AÇIK ADRESİ:	**İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL**
	TELEFON	**0 (212) 414 21 53**
	FAKS	**0 (212) 414 21 53**
	E-POSTA	**itfetikkurul@istanbul.edu.tr.**

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Kinolon Grubu Antibiyotiklere Karşı Gelişen Aşırı Duyarlılık Reaksiyonlarında Cd4+ T Hücre Yanıtları"**			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	**Doç.Dr.Esin AKTAŞ ÇETİN**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	**İmminoloji**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	**İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü**			
	DESTEKLEYİCİ	**İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz : Deneysel			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ■	ULUSAL ■	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	07/12/2013		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	OLGU RAPOR FORMU	■		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☐	Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01	Tarih: 10/01/2014
	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde görevli **Doç.Dr.Esin AKTAŞ ÇETİN**'ın sorumluluğunda ve **Bio.Belkıs ERTEK**'in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	**19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik**
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a .maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli iznin alınması gerekmektedir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**
	AÇIK ADRESİ:	**İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL**
	TELEFON	**0 (212) 414 21 53**
	FAKS	**0 (212) 414 21 53**
	E-POSTA	**itfetikkurul@istanbul.edu.tr.**

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Kinolon Grubu Antibiyotiklere Karşı Gelişen Aşırı Duyarlılık Reaksiyonlarında Cd4+ T Hücre Yanıtları"**			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	**Doç.Dr.Esin AKTAŞ ÇETİN**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	**İmminoloji**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	**İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü**			
	DESTEKLEYİCİ	**İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz : Deneysel			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ■	ULUSAL ■	ULUSLARARASI ☐

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	BELKIS	**Soyadı**	İŞLEYEN
Doğ.Yeri	BAKIRKÖY	**Doğ.Tar.**	05/12/1987
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	11348412790
Email	**b_ertek@hotmail.com**	**Tel**	5359797868

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İ.T.F. DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ İMMÜNOLOJİ BÖLÜMÜ	2012-DEVAM
Lisans	BALIKESİR ÜNİ. FEN-EDEBİYAT FAK. BİYOLOJİ	2010
Lise	HABİRE YAHŞİ YABANCI DİL AĞIRLIKLI LİSESİ	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	BİYOLOG	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ	2010-DEVAM
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İNG.	İYİ	ORTA	İYİ	55	

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	67,72287	69,91556	67,72591
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Orta
Graftpad Grafik Programı	Orta

YAYINLAR

- Demirtürk M, Gelincik,Ulusan M, **Ertek B**, Büyüköztürk S, Çolakoğlu B. **The importance of mold sensitivity in nonallergic rhinitis patients**. International Forum of Allergy & Rhinology. 2016 (Accepted)
- Gelincik A, İşsever H, Unal D, Işık E, Demirturk M, Gül H, İliaz R, Kara E, **Ertek B**, Özşeker F, Çolakoğlu B, Büyüköztürk S. **The prevalence of Hymenoptera venom allergy in adults: the results of a very crowded city in Euroasia.** Allergol Int. 2015 Jan;64(1):35-40.
- Gelincik A, Demirtürk M, Yılmaz E, **Ertek B**, Erdogdu D, Çolakoğlu B, Büyüköztürk S. **Anaphylaxis in a tertiary adult allergy clinic: a retrospective review of 516 patients.** Ann Allergy Asthma Immunol. 2013 Feb;110(2):96-100.

- Büyüköztürk S, Gelincik A, Karlioğlu N, Uçar E, Erten G, Demirtürk M, Çetereisi D, Erdoğdu D, **Ertek B**, Akdeniz N, Akkemik Ü, Deniz G, Çolakoğlu B, Arda N. **Morus Alba Is Possibly An Important Allergen N Tree Pollen Allergic Rhinitis Patients**. Allergy 2012;67:421-421.

SÖZLÜ VE POSTER BİLDİRİLERİ

- Büyüköztürk S, Gelincik A, Karlıoğlu N, Önay Uçar E, Erten G, Demirtürk M, Çetereisi D, Erdoğdu D, Ertek B, Akdeniz N, Akkemik U, Deniz G, Colakoglu B, Arda N. ***Morus alba*** **is possibly an important allergen in tree pollen allergic rhinitis patients.** XXXI. Congress of The European Academy of Allergology and Clinical Immunology, 16-20 June 2012, **(Poster Presentation)** Geneva-Swiss.

- Büyüköztürk S., Gelincik A., Karlioğlu N., Uçar E., Erten G., Demirtürk M., Çetereisi D., Erdoğdu D., **Ertek B**., Akdeniz N., Akkemik Ü., Deniz G., Çolakoğlu B., Arda . **Morus alba is possibly an important allergen in tree pollen allergic rhinitis patients**. 31st Congress of the European-Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 16-20 June 2013, P-1104 **(Poster Presentation)**, 421, Geneva, Switzerland.
- Demir S, Olgac M, Unal D, Demirturk M,Ertek B,Gelincik A, Colakoglu B, Buyukozturk S. **The Usefulness of In Vivo Diagnostic Tests in Quinolone Allergy and in Evaluation of Cross-reactivity.**. XXXIII. Congress of The European Academy of Allergology and Clinical Immunology, 7-11 June 2014 (**Poster presentation)** Copenhag Denmark.
- Demir S, Olgac M, **Ertek B**, Kucuksezer U, Aktaş Çetin E, Gelincik A, Colakoglu B, Deniz G, Buyukozturk S. **Farklı kinolonlara karşı gelişen fiks ilaç döküntüsü;nadir bir olgu sunumu.** XXI. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi, 25-29 Ekim 2014, P222**(Poster Sunumu)**, 122-123, Bodrum.
- **Ertek B**, Demir S, Kucuksezer UC, Gelincik A, Buyukozturk S, Deniz G, Pur Ozyigit L, Cetin Aktas E. **Siprofloksasin'e Bağlı Geç Tip Hipersensitivite Reaksiyonlarında $CD4^+$ T Hücre Fonksiyonları.** 6. DETAE Günleri;DETAE'nin 70. Yaşında Hastalık ve Sağlığa Bakış'**,** 24-25 Kasım 2014, P-04 **(Poster sunumu)**, 31, İstanbul.
- **Ertek B,** Kucuksezer UC, Demir S, Gelincik A, Pur Ozyigit L, Buyukozturk S, Deniz G, Cetin Aktas E. **Siprofloksasine Bağlı Geç Tip Hipersensitivite Reaksiyonlarında $CD4^+$ T Hücre Yanıtları.** 23. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 26-30 Nisan 2015, SS-009 **(Sözlü sunum),**18, Antalya.
- Demir S**,** Olgac M, Unal D, Akdeniz N, Aktas Cetin E, **Ertek B**, Gelincik A, Colakoglu B, Deniz G, Buyukozturk S. **Immadiate and non-immadiate hypersensitivity reaction to single dose moxifloxacin.** European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI), 06-10 June 2015, P-1306 **(Poster Presentation)**, 198, Barcelona, Spain
- Demir S, Akdeniz N, Aktaş Çetin E, **Ertek B**, Olgac M, Unal D, Coskun R, Colakoglu B, Gelincik A, , Deniz G, Buyukozturk S.**Kinolon hipersensitivite reaksiyonlarının tanısında in vitro tanı testlerinin yeri.** XXII. Ulusal Allerji ve

Klinik İmmünoloji Kongresi, 28 Kasım-02 Aralık 2015, P146**(Poster Sunumu)**, 78, Antalya.

- **Ertek B**, Demir S, Kucuksezer UC, Gelincik A, Colakoglu B, Buyukozturk S, Deniz G, Pur Ozyigit L, Cetin Aktas E. **Cytokine secretin and proliferative capacity of $CD4^+$ T cells in delayed type hypersensitivity reactions due to ciprofloxacin.**European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI), 06-10 June 2015, OP-50 **(Oral Presentation)**, 53, Barcelona, Spain

ÖDÜLLER

- European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI), 06-10 June 2015, 143. Demir S**,** Aktas Cetin E, Olgac M, **Ertek B**, Unal D, Kucuksezer U, Gelincik A, Deniz G, Buyukozturk S. **Early presenting fixed drug eruption with different quinolones in patient.** Başlıklı bildiri ile en poster ödülü alınmıştır.

- Demir S, Akdeniz N, Aktaş Çetin E, **Ertek B**, Olgac M, Unal D, oskun R, Colakoglu B, Gelincik A, , Deniz G, Buyukozturk S.**Kinolon hipersensitivite reaksiyonlarının tanısında in vitro tanı testlerinin yeri.** XXII. Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi, 28 Kasım-02 Aralık 2015, , P146(Poster Sunumu), 78, Antalya. Başlıklı bildiri ile en poster ödülü alınmıştır.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Müzik dinlemek, kitap okumak