

ÇOCUKLARDAKİ EKSTRENSEK ASTMANIN İMMUNOTERAPİSİNDE EV TOZU AKARLARI (D.Pteronyssinus, D.Farinae)'NİN SPESİFİK IgG4'LERLE DEĞERLENDİRİLMESİ (Ön rapor)

Leyla TURAL(1), Mualla AYYILDIZ(2)

Astım bronşiyale tanısı konan 44 çocuk hastanın spesifik immunoterapisi yapıldı. Spesifik immunoterapi yapılan hastaların bu tedaviden in vitro olarak yararlandıklarını araştırmak için bir çalışma yapılmasına başlandı.

İki yıl süreli ve altı aylık aralıklarla yapılan tetkiklerde tedavi sonucunu değerlendirmek amacıyla ev tozu akarlarından Dermatophoides Pteronyssinus (M1) ve dermatophoides Farinea (M2) gibi akarlar karşı blokan antikor olarak adlandırılan spesifik IgG4 değerleri araştırıldı.

Bu çalışma sonunda spesifik immunoterapide spesifik IgG4 değerlerinin ilk altı ayda in vitro olarak yeterli bir değerlendirme olmadığı sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Astım bronşiyale, spesifik immunoterapi, ev tozu akarları, spesifik IgG4 değerleri.

Specific immunotherapy is done to the 44 children with the diagnosis of Bronchial asthma. An in vitro study is planned to investigate the mechanism of the specific immunotherapy.

The outcome of the therapy is evaluated by the IgG4 levels obtained in 6 -month- intervals for 2 years after the therapy. The blocker antibodies (IgG47 against various types of house dust mites like Dermatophoides Pteronyssinus (M1) and Dermatophoides Farineas (M2) are studied.

As a result of this study. It's concluded that for in vitro evaluation of specific immunotherapy IgG4 levels are not reliable in the first 6 months of therapy.

GİRİŞ

Bu yüzyılın başından beri A.rinit ve A.astmalı hastalarda S.immunoterapi uygulanmaktadır. Fakat son senelerde, buna taraftar olan ve olmayanlar arasında zaman zaman tartışmalar olmaktadır. Biz bu yoldan hareketle KARTAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ ÇOCUK ASTIM ALLERJİ Bölümü'nde S.immunoterapi yapılan hastaların İNVİTRO nasıl yararlandığını gösterebilmek amacı ile 44 A.Bronşiyale teşhisi konulan hastaların iki sene süre ve 6 aylık aralıklarla tedavi neticesini değerlendirmek amacı ile ev tozu akarlarından D.Pteronyssinus (M1) ve D.Farinae (M2) karşı literatürde blokan antikorlar olarak adlandırılan spesifik IgG4 değerlerini takip etmeye çalıştık. Ev tozu miteları, astım bronşiyale de içeren çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (1). S.İmmunoterapinin klinik etkisi IgG blokan antikorların üretilmesi ve/veya IgE reaktif antikorun artmasına bağlanmaktaydı. Son zamanlarda yapılan araştırmalar IgG alt sınıfının hangisinin en etkin antikor blokeri olduğu incelenmiş ve bizim de içinde bulunduğumuz birçok grup (1,2,3,4,5) bunun IgG4 alt sınıfı olduğunda birleşmiştir.

Bazı yazarlar ise IgG1'in IgG4'e göre daha önemli olduğunu vurguladılar (3,4). Bu durumda IgG alt sınıflarının hipersensitivite konusundaki rollerinin açığa çıkartılması için çalışmalar gerekmektedir.

MATERYAL VE METOD

KARTAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ çocuk astım allerji bölümüne müracaat eden. A.bronşiyale öyküsü olan ve klinik olarak E.astma düşündüğümüz 1990-91 seneleri arasında, 2.5-14 arası 44 çocukta (23 kız 21 erkek) çeşitli labaratuvar testleri uyguladık.

Bunlar total IgE, s.IgE(mite1) s.IgE(mite2) Eliza, alfa, bir antitripsin-R.I.d., IgG sub grupları, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ve ev tozu mitelerine spesifik antijenle S.P.T. uygulanan ve neticesi pozitif olan hastalar çalışma grubuna alındı. Bu hastalarda S.immunoterapiye başlamadan serumlarında s.IgG4 (M1), s.IgG4 (M2) değerleri ölçüldü. Bu ölçümler Farmacia firmasının elıştirdiği R.I.D. metodu ile gerçekleştirildi. Bu metodla insan serumunda sirküle eden allerjen spesifik IgG antikorunu rölatif konsantrasyonunu ölçme amacı ile geliştirilmiştir.

(1) Kartal Devlet Hastanesi Çocuk Allerjisi Uzmanı

(2) Kartal Devlet Hastanesi Biyokimya Şef Muavini

Allergen spesifik IgG antikorunu aynı zamanda bloke eden antikor diye tanımlanır ve hepsisensitivite reaksiyonlarına karşı koruyucu olmak üzere oluşur. İmmunoterapi gören hasta tedavide kullanılan allergene karşı artan miktarda spesifik IgG antikor seviyesi ile immunolojik cevap gösterir. Böylece spesifik IgG antikor seviyesindeki değişik hastanın tedaviye cevabına ait bir işaret olarak kullanılabilir. Farmacia IgG RAST kiti prosedürü ve prensibi şöyledir.

İlgili allergen, tüp cidarlarına kovalen olarak bağlanmıştır. Hasta serumundaki spesifik IgG ile reaksiyona girer.

Non spesifik IgG'nin yıkanarak uzaklaştırılması sonucu enzim işaretli IgG spesifik antikor, bir kompleks oluşturmak üzere tüpe eklenir. Bu reaktifin fazlası da yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra indirgeyen substans ve substrat eklenir. Enzim, substans etkisiyle serbest kalır. Ve substrat ile reaksiyona girerek sarı renkte bir ürün ve renksiz galaktoz oluşturur. Enzimatik hidrolik sodyum karbonat eklenmesi ile durdurulur. Absorbans 420 nm'de okunur. Sonucu değerlendirmek için hastanın absorbans değerleri direkt olarak paralel çalışan referans serumun absorbans değeri ile mukayese edilir. Referans serum (birch=kayın ağacı) na karşı standardize edilmiştir.

Test numunesinin hazırlanması

Serum örneği "sample diluent" ile 1:50 oranında sulandırılır ve karıştırılır.

Test prosedürü

1- Referans ve uygun allergen tüpler test düzenine göre etiketlenir ayarlanır. 2.5 ml yıkama solüsyonu eklenip 5 dakika bekletilir ve tamamen aspire edilir.

2- 100 ml referans serum ve 100 ml dilue edilmiş numuneler tüplerin cidarlarına pipetlenir.

3- Tüpler plastik film ile kapatılıp, 3 saat oda ısısında bekletilir.

4- 2.5 ml yıkama solüsyonu, tüm tüpler eklenir ve 10 dk. bekletilir. Bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlanır. Tamamen aspire edilir.

5- 100 ml enzim-anti-IgG bland dışında tüm tüpler pipetlenir.

6- Test tüpleri ağız kapalı bir şekilde oda ısısında gece boyu (16-20 st.) inkübasyona bırakılır.

7- 3 kez yıkama işlemi tekrarlanır.

8- 200 ml devolopman solüsyonu blank da dahil olmak üzere tüm tüplere eklenir.

9- Ağızları kapalı olarak 37 derecede 30 dk. enkübe edilir.

10- 1000 ml stop solüsyonu eklenir.

11- 420 nm'deki ürünün absorbans değeri ölçülür ve blank 0 ayarı için kullanılır.

Sonuçların hesaplanması

1- Referans cevabı % olarak aşağıdaki gibi hesaplanarak belirlenir.

Hasta numunesine ait absorbans ortalaması x 100 referans absorbans ortalaması.

2- Sonuç, daha önceki çalışmalar ve tedavi öncesi değerler ile mukayese edilir. Çalışmanın kalite kontrolü için serum değeri çek edilir. Referans serumun absorbans değeri 0.4'ten büyük olmalıdır. Spesifik IgG antikor test sonucunun doğmatikdeğerlendirilmesi mümkün değildir. Buna rağmen IgG antikor düzeylerinin allergen immunoterapi sırasında yükselmesi tedaviye cevabın bir belirtisidir. Sensivitenin düştüğünü gösterir.

Ayrıca hastalarda s.immunoterapiyi allergeo farma firmasının refere ve standardize ettiği düşük dozdan başlayarak bir haftalık aralıklarla ve hastanın klinik cevabına göre doze ederek subcutar enjeksiyonlara yürüttük.

BULGULAR

Hikayesinde E.astma olan ve çalışmaya alınan 44 hastada bulunan değerler şöyledir.

TARTIŞMA

Ev tozu akarları ve özellikle D.Pteronyssinus, D.farinae majör allerjenler olduğu, allerjik reaksiyonları provoke ettikleri çeşitli araştırmacılar tarafından saptanmıştır (1,2,4,6,7).

Voorhost ve çalışma arkadaşları ev tozu ile dermatopagoides'lerin allerjenik olarak eşit olduğunu ileri sürmelerinden sonra pek çok araştırmacı aynı sonucu varmıştır. Ev tozu ile D.farinae arasında eşit allerjeniteyi ilk olarak K.Miyamoto ve ark. ortaya koydu (1). D.farinae Japonya'daki total mitelerin küçük bir yüzdesini oluşturmasına rağmen güçlü bir allerjendir. Bizce çeşitli klinik gözlemlerimizde bunun böyle olduğunu gözlediğimiz için S.immunoterapiye D.Pteronyssinus D.Farinae karşı uyguladık.

S.immunoterapi mekanizmasında IgG blokan antikorların meydana gelmesi önemli bir rol oynar. Blokan antikorlar ilk olarak Lovaless ve ark. (11) tarafından ortaya kondu. Daha sonra blokan antikorların insan lokositlerinden allerjene bağlı olarak salınan histamini engellediği ve IgG yapısında olduğunu ispatladılar. Önceleri blokan antikor seviyesini tespit için lokositlerden salınan histamin düzeyleri çalışıldı (2). Daha önceki çalışmalar astmatik hastalarda S.immunoterapi sırasında ve arıcılarda, arı sokmasında, arı zehrine spesifik IgG4 antikorlarının insan bazofillerini pozitif olarak sensitize ettiği ve böylece bazofil düzeyinde çok miktarda IgG4 antikorunu oluşturduğu, arı zehiri tarafından tetiklenen IgE ile ilişkili bazofil degranilasyonunu süprese ettiği gösterilmiştir (8). Bu çalışmalar hay fever'lı hastalarda S.immunoterapi sırasında IgG4 antikorlarının baskın olarak arttığını gösteren diğer raporlarla uyumludur.

Bu bulgularla immunoterapi sırasında artan IgG4 antikorları bir anlamda IgE ile ilişkili, anti allerjik reaksiyon oluşmasını önleyen blokan antikor gibi davrandığını gösterdiler (12). Buna rağmen Djrup ve arkadaşları S.immunoterapi başında artan IgG1 ve antikorları IgG antikorların azalmasında IgG4'e göre daha fazla etkili olduğunu rapor etmişlerdir (10). Daha sonra allerje spesifik IgE ve IgG4 varlığı arasındaki ilişkiyi bunların bronşiyal provokasyon testlerindeki etkilerini, candida albicans ve ev tozları zerelerine hassas 10 astımlı hastada Takemasa Nakagawa ark. değerlendirdiler. IgE antikorlarının varlığında erken ve iki kat tepki görülmesi ile ilişkisi olduğunu vurguladılar. Fakat IgG4 antikorlarının geç astmatik reaksiyonu meydana getirdiğini gösteren Gwyn ve ark. (6) ilk açıklamaların tersine olarak IgG4 antikorlarının varlığının bronşiyal antijen reaksiyonu mücadelesi üzerine geç astmatik cevabın görülmesi ile ilişkisi olmayabilir. Ayrıca IgG4 antikor seviyelerinin tüm bronşiyal provokasyon testleri sırasında etkilenmediği de ortaya çıktı. Yine Takemasa ve ark. arı yetiştiricilerde toplanan serumlardan arı zehirindemanor bir allerjen madde olan phospholipase-A'yı solid faza eşlik eden antijen olarak çalıştılar ve phospholipase-A'ya spesifik IgG4 antikor değerlerinin (IgE değil) arı yetiştiricilerde allerjik olmayan kimselerden belirgin yüksek P.L.A.'ya spesifik IgG4 antikorların artmaya eğilimi olduğunu rapor ettiler (5). Ek olarak astmada olduğu gibi arı yetiştiricilerde IgE ve IgG4 antikor düzeyleri arasında be-

lirgin bir ilişki saptanmazken total IgG ve IgG4 arasında belirgin bir korelasyon düzeyleri buldular. Bununla beraber IgG4 antikorunu bloke edici olarak rolünün net olmadığını ve daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğunu rapor ettiler.

Bazı yazarlar da, immun cevabının parenteral verilen antijen miktarına bağlı olduğunu rapor etmektedirler.

Biz çalışmamızdan çok iyi standardize edilmiş ve hastanın kişisel klinik toleransına göre ayarladığımız ve S.immunoterapinin klinik iyileşmeüzere en az 2.5-3 sene gibi bir sürenin geçmesi gerektiği için bu konudan bahsetmedik.

Bizim bu devam eden çalışmamızda bulduğumuz spesifik IgG4 (M1) ve IgG4 (M2) değerlerini literatürle karşılaştırdığımızda bir çok yazarla aynı neticeye vardığımızı gördük. S.IgG4 değerleri ilk 6 ayda hasta takibinde in vitro olarak yetmediğine inanıyoruz.

SONUÇ

S.immunoterapide çeşitli çalışmacılar spesifik IgG4 değerlerinin yeterli olduğunu rapor ettiler.

Yine bu araştırmacılar gibi, IgG4 değerlerinin invitro değerlendirmede yetmediğini biz de bu çalışmada tespit ettik. Ve literatür değerleri ile bu bulguların paralellliğini gördük. Ve 6 aylık aralıklarla iki yıl öngördüğümüz çalışmalarımıza devam etmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1- Nakagawa, T., Tkaishi, T., Sakamoto, Y., Ito, K., Miyamoto, T., Skvaril, F.: IgG4 antibodies in patients with housedust mite-sensitive bronchial asthma: Relationship with antigen-specific immunotherapy. *Int. Archs Allergy ppl. Immun.* 71: 124-125 (1983).
- 2- Nakagawa, T., Weck, A.L. de: Membrane receptors for the IgG4 subclass on human basophils and mast cells. *Clin. Rev. Allergy* 1: 197-206 (1983).
- 3- Van der Giessen, M., Homan, W.L., Kernebeczek, G. van, Aalberse, R.C., Dieges, P.H.G.: Subclass typing of IgG antibodyformed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. *Int Archs Allergy apply. Immun.* 50: 625-640 (1976).
- 4- Nakagawa, T., Takaishi, T., Sakamoto, Y., Miyamoto, T., Makazawa, T., Kobayashi, S.: Allergen-specific IgG4 anti-bodies and late asthmatic response. *Jap. J. Allergol* 33: 879-883 (1984).
- 5- Takaishi, T., Nakagawa, T., Yoshinoya, S., Ito, K., Miyamoto, T., Miyachi, S.: IgG4 antibody response to phospholipase A in bee keepers. *Jap. J. Allergol.* 32: 1106-1112 (1983).
- 6- Gwynn, C.M., Ingram, J., Almosawi, T., Stanworth, D.R.: Bronchial provocation tests in atopic patients with allergen-specific IgG4 antibodies. *Lancet* i: 254-256 (1982).
- 7- Woorhorst, R., Spieksma, FThM, Varekamp, L., Leupen M.J., and Lyklema, A.W.: The house-dust mite (*Dermatophagoides Pteronyssinus*) and the allergens it produces. Identity with housedust allergen. *J. Allerg.* 39: 325 (1967).
- 8- Ishizaka, T., De Bernardo, R., Tomioka, H., Lichtenstein, L.M., Ishizaka, K.: Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release. *J. Immun.* 108: 1000-1008 (1972).
- 9- Nakagawa, T., Miyamoto, T.: The role of IgG4 as blocking antibodies in asthmatics and in bee keepers. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 77: 204-205 (1985).
- 10- Djrup, R., Osterrbale, O.: IgG subclass antibody response in grass pollen-allergic patients undergoing specific immunotherapy. *Allergy* 39: 433-441 (1984).
- 11- Loveless, M.H.: Immunological studies of pollinosis. I. The Presence of two antibodies related to the same pollen-antigen in the serum of treated hay fever patients. *J. Immunol* 38: 25 (1940).
- 12- Alberse, R.C., Gaag, R. van der, Leeuwen, J. van: Serologic aspect of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4 restricted response. *J. Immun.* 130: 722-726 (1983).