

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.

THE EVALUATION OF THE IMMUNOTHERAPY OF HOUSE DUST MITES WITH SPESİFİK IgG4 IN EXTRENSEC ASTHMA OF CHILDRIEN

Specific immunotherapy has been applied 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 (IgG4) against various types of house dust mites like Dermatophoides Pteronyssinus (M1) and Dermatophoides Farineas (M2) are studied. As a result of this study it is concluded that for in vitro evaluation of specific immunotherapy IgG4 levels are not reliable in the first 6 months of therapy.

Bu yüzyılın başından beri akut rinit ve akut astmalı hastalarda spesifik immunoterapi uygulanmaktadır. Fakat son senelerde, buna taraftar olan ve olmayanlar arasında zaman zaman tartışmalar olmaktadır. Biz bu yoldan hareketle Kartal Devlet Hastanesi Çocuk Astım ve Allerji Bölümün'de S.immunoterapi yapılan hastaların in vitro nasıl yararlandığını gösterebilmek amacı ile 44 A.Bronşiyale teşhisi konulan hastaların iki sene süre ile 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 mite'lerinin astım bronşiyale de içeren çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında ve ilerlimesinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (1). S.İmmunoterapinin klinik etkisi IgG blokan antikorların üretilmesi ve/veya IgE reagnik antikorun artmasına bağlanmaktaydı. Son zamanlarda yapılan araştırmalar IgG alt sınıfın hangisinin en etkin antikor blokeri olduğu incelenmiş ve bizim de içinde bulunduğumuz birçok grup (1,2,3,4,5) bunun IgG4 alt sınıfı olduğunda birleşmişlerdir.

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

GEREÇ VE YÖNTEM

Kartal Devlet Hastanesi Çocuk Astım ve Allerji bölümüne müracaat eden A.bronşiyale öyküsü olan ve klinik olarak Ekstrinsik astma düşündüğümüz 1990-91 seneleri arasında 2.5-14 yaş arası 44 çocukta (23 kız, 21 erkek) çeşitli labaratuvar testleri uyguladık.

Bunlar total IgE, s. IgE (mite1), s. IgE (mite 2), Eliza, alfa - 1 antitripsin -R.I.d., IgG sub grupları (IgG1, IgG2, Ig G3, Ig G4) 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 geliştirdiği R.I.D. metodu ile gerçekleştirildi. Bu metodla insan serumunda sirküle eden allerjen spesifik IgG antikorü rölafif konsantrasyonun ölçme amacı ile geliştirilmiştir.

Allerjen spesifik IgG antikorü aynı zamanda bloke eden antikor diye tanımlanır ve hipersensivite reaksiyonlarına karşı koruyucu olmak üzere oluşur. İmmunoterapi gören hasta tedavide kullanılan allergene karşı artan miktarda spesifik IgG antikorü 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 alergen , tüp cidarlarına kovalent olarak bağlanmıştır. Hasta serumundaki spesifik IgG ile reaksiyona girer.

Nonspesifik IgG'nin yıkanarak uzaklaştırılması sonucu enzim işaretli IgG spesifik antikor, bir kompleks oluşturmak üzere tüpe eklenir. Bu reaktifin fazlasıda yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra indirgeyen subtrans ve subtrat eklenir. Enzim, substans etkisi ile serbest kalır. Ve substrat ile reaksiyona girerek sarı renkte bir ürün ve renksiz galaktoz oluşturur. Enzmatik hidrolik sodyum karbonat eklenmesi ile durdurulur. Absorbans 420 mm'de okunur. Sonucu değerlendirmek için hastanın absorbas değerlerini direkt olarak paralel çalışan referans serumun absorbas 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 ağzı kapalı bir şekilde oda ısısında gece boyu (16-20 st.) inkübasyona bırakılır.

7. 3 kez yıkama işlemi tekrarlanır.

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

9. Ağızları kapalı olarak 37 derece de 30 dk. enkübe edilir.

10. 1000 ml. stop solüsyonu eklenir.

11. 420 mm'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 doğmatik değerlendirilmesi mümkün değildir. Buna rağmen IgG antikor düzeylerinin allergen immünoterapi sırasında yükseltilmesi tedaviye cevabın bir belirtisidir. Sensivitenin düştüğünü gösterir. Ayrıca hastalarda s.immünoterapiye allergeo farma firmasının refere ve standardize ettiği düşük dozdan başlayarak bir haftalık aralıklarla ve hastanın klinik cevabına göre doze ederek subcutan enjeksiyonlara yürüttük.

BULGULAR

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

Tablo I

44 Olgu		
Yaş	7,71 ± 2,90	23 Kız 21 Erkek
Total Ig E	88,11 ± 14,34	40 Hastada Yüksek 4 Hastada düşük
alfa-1 antitripsin	168 ± 645,2	Normal Değerler
Spesifik Ig E (m1-m2)	Pozitif	Çeşitli Değerlerde

Tablo II: IgG Sub Gruplar

Ig G 1	3,239 ± 1,019	16 Hastada Düşük
Ig G 2	2, 129 ± 0,385	Normal
Ig G 3	0,460 ± 0,226	Normal
Ig G 4	0,315 ± 0,152	Normal

Tablo III: S.P.T. test M1 ve M2 histamin (++++)

	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası
Spesifik IgG 4	14,70 ± 10, 70	12,20 ± 9,40 P> 0,5
D. petronyssinus (m1)		anlamsız
Spesifik IgG 4	15,70 ± 8,57	14,20 ± 3,65 P> 0,5
D. farinea (m2)		anlamsız

TARTIŞMA

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

Voorhost ve çalışma arkadaşları ev tozu ile dermatophagoides'lerin allerjenik olarak eşit olduğunu ileri sürmelerinden sonra pek çok araştırmacı aynı sonuca varmıştır. Ev tozu ile D.Farinea 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. Bizde çeşitli klinik gözlemlerimizde bunun böyle olduğunu gözlediğimiz için S.immünoterapiyi D.Pteronyssinus ve D.Farinae karşı uyguladık.

S.İmmünoterapi 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 lökositlerinden allerjenlere bağlı olarak salınan histamini engellediği ve IgG yapısında olduğunu ispatladılar. Önceleri blokan antikor seviyesini tespit için lökositlerden salınan histamin düzeyleri çalışıldı (2). Daha önceki çalışmalar asmatik hastalarda S. immünoterapi sırasında ve arıcılarda, arı sokmasında, arı zehrine spesifik IgG4 antikorlarının insan bazofillerini pozitif olarak sentize ettiği ve böylece bazofil düzeyinde çok miktarda IgG4 antikorlu olduğu, arı zehri tarafından tetiklenen IgE ile ilişkili bazofil degranulasyonunu süprese ettiğini göstermiştir (8). Bu çalışmalar hay fever'lı hastalarda S.İmmünoterapi sırasında IgG4 antikorlarının baskın olarak arttığını gösteren diğer raporlarla uyumludur. Bu bulgularla immünoterapi 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. immünoterapi başında artan IgG1 ve an-

tikorları IgG antikorların azalmasında IgG4'e göre daha fazla etkili olduğunu rapor etmişlerdir (10). Daha sora allergospesifik IgE ve IgG4 varlığı arasındaki ilişkiyi bunların bronşiyal provakasyon testlerindeki etkilerini, candida albicans ve ev tozları zerrelere 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 reaksiyonunun 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 olmayabileceğini bildirdi. Ayrıca IgG4 antikor seviyelerinin tüm bronşiyal provakasyon testleri sırasında etkilenmediği de ortaya çıkmıştır. Yine Takemasa ve ark. arı yetiştiricilerde toplanan serumlardan arı zehrinde major bir allerjen madde olan phospholipase -A'yı solid fazda eşlik eden antijen olarak çalıştırdılar ve phospholipase -A'ya spesifik IgG4 antikor değerlerinin (IgE değil) arı yetiştiricilerde allerjik olmayan kimselerden belirgin yüksek PLA'ya spesifik IgG4 antikorlarının artmaya eğilimi olduğunu rapor ettiler (5). Ek olarak astmada olduğu gibi arı yetiştiricilerde IgE ve IgG4 antikor düzeyleri arasında belirgin bir ilişki saptanmazken total IgG ve IgG4 arasında belirgin bir korelasyon düzeyleri buldular. Bununla beraber IgG4 antikor bloke edici olarak rolünün net olmadığını ve daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğunu rapor ettiler.

Bazı yazarlarda da, immün cevabın 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 iyileşmesi üzerine 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 invitro olarak yetmediğine inanıyoruz.

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

Yine bu araştırmacılar gibi, IgG4 değerlerinin invitro değerlendirmede yetmediğini biz de bu çalış-

mada tespit ettik. Ve literatür değerleri ile bu bulguların paralellliğini gördük. Ve 6 aylık aralıklarla iki yıl öngördüğümüz çalışmalarımızda devam etmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Nakagawa T., Tkaishi T., Sakamoto Y., Ito K., Miyamoto T., Skvaril F.: IgG4 antibodies in patients with house-dust mite-sensitive bronchial asthma: Relationship with antigen-specific immunotherapy. *Int. Arch 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. Va der Giessen M., Homan W.L., Kernebeczek G. van, Aalbere R.C., Dieges P.H.G.: Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. *Int Arch allergy appl. Immun* 50: 625-640, 1976.
4. Nakagawa T., Takaishi T., Sakamoto Y., Miyamoto T., Makazawa T., Kobayashi S.: Allergen-specific IgG4 antibodies 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 antibodies response to phospholipase A in bee keepers. *Jap J Alleergol* 32-1106-1112, 1983.
6. Gwynn C.M., Ingram J., Almosawi T., Stanworth D.R.: Bronchial provocation test atopic patients with allergen-specific IgG4 antibodies *Lancet.*: 254-256, 1982.
7. Woorhorst R., Spijksma FTHM, Varekamp L., Leupen M.J., and Lykleema 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 asthmatic and a bee keepers. *Int. Arch Allergen appl. Immun* 77: 204-205, 1985.
10. Durup R., Osterrbale O.: IgG subclass antibody response in grass pollen-allergics patients undergoing specific immunotherapy *Allergen* 39: 433-441, 1984.
11. Loveless M.H.: Immunological studies of pollinosis. 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.