

DERMATOFAGOİD ALLERJEN SPESİFİK İMMUNOTERAPİ VE BÖBREK

Hasan YÜKSEL*, İpek AKİL**, Semin AYHAN***, Işıl ERGÜDER****, Gülşen GİRAY*****

ÖZET

Glomerülde tutulan eksojen makromoleküller, immun mekanizma aracılığı ile glomerüler hasara neden olan antikorlar için antijenik hedef olabilmelerinin yanında elektrostatik, fiziksel veya fizikokimyasal özellikleri nedeniyle non-immun hasara da neden olabilmektedir. Bu çalışmada dermatofagoid allerjeni kullanılarak yapılan immunoterapinin sıçanlarda immun veya non-immun glomerüler hasar oluşturma riski taşıyıp taşımadığının araştırılması planlandı. Çalışmada yedişer erkek sıçandan oluşan 3 grup kullanıldı. Birinci gruba 1/2 dozda dermatofagoid antijeni, ikinci gruba 1/4 dozda dermatofagoid antijeni ve üçüncü gruba aynı volümde serum fizyolojik, ikişer hafta arayla, toplam üç kez deri altına uygulandı. Böbrekler ışık mikroskopik olarak incelendi. Bazı sıçanlarda az da olsa mesangial proliferasyon, mesangial matrikste artış ve tubulointerstisyel inflamasyon saptandı. Ancak gruplar arasında gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (Mezangial proliferasyon, mezangial matriks artışı ve tubulointerstisyel inflamasyon için sırasıyla $p=0,368$, $p=0,5$, $p=0,7$). Sonuç olarak, bu çalışmada, derialtı allerjen spesifik immunoterapide olduğu gibi tekrarlanan dermatofagoid allerjen uygu-lamasının non-immun veya immun kompleks aracılı glomerüler hasara neden olmadığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Dermatofagoid, allerjen spesifik immunoterapi, böbrek, glomerül.

DERMATOPHAGOIDES ALLERGEN SPECIFIC IMMUNOTHERAPY AND KIDNEY

SUMMARY

Exogenous macromolecules trapped or planted within the glomerulus may become antigenic targets for antibodies resulting immune glomerular injury, they also may cause non-immune glomerular injury by electrostatic, physical or physicochemical properties. We aimed to investigate whether immunotherapy with dermatophagoides allergen has the risk of immune or non-immune glomerular injury. Three groups, each containing 7 male rats, 10 weeks of age, were constituted. Dermatophagoides allergen injection 1/2 doses was administered three times, at 2-week intervals via subcutaneous injection to the group 1, 1/4 doses was administered to the group 2, isotonic saline solution equal in volume to the antigen was administered to the control rats. The kidneys were examined by light microscopy. Mesangial proliferation, increases in mesangial matrix and tubulointerstitial inflammation were obtained in some cases of groups. However, the differences about these observed changes among groups were statistically insignificant ($p= 0.368$, $p=0.5$, $p=0.7$ respectively for mesangial proliferation, increase in mesangial matrix and tubulointerstitial inflammation). In conclusion, this study demonstrated that repeated inoculation of dermatophagoides allergen, like in allergen subcutaneous allergen specific immunotherapy procedure, resulted in any non-immune or immune complex induced glomerular injury. Thus, despite dermatophagoides allergen are exogenous macromo-

* Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Manisa Doçent Doktor, Pediatrik Allerji Bilim Dalı, Manisa

** Yardımcı Doçent Doktor, Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı, Manisa

*** Yardımcı Doçent Doktor, Patoloji Anabilim Dalı, Manisa

**** Pediatri Araştırma Görevlisi, Manisa

***** Tıbbi Biyolog, Manisa

lecules, allergen subcutaneous allergen specific immunotherapy with these purified allergens may not have any risk for glomerular injury.

Key Words: Dermatophagoides, allergen immunotherapy, kidney

GİRİŞ

Glomerüller yapıda tutulan eksojen makromoleküller, antikor oluşumunu uyarmak yoluyla immun mekanizmayı başlatarak veya kimyasal, fiziksel veya elektrostatik özellikleri ile glomerül bazal membranıyla (GBM) ilişkiye girerek non-immun glomerüller hasara yol açabilir. İmmun mekanizmanın harekete geçmesi sonucu antijen ve antikorlar in situ immun kompleks (İK) oluşumuna neden olur. İnsanlarda bu mekanizma sonucunda, bazı aşılarda, ilaçlar, parenteral kullanılan immunoterapötik ilaçlar, mikroorganizmalar ve bazı kanserlerde immun kompleks nefriti gelişebilmektedir (1-4). Parenteral olarak verilen antijenlerin glomerüllerde tutulduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (5-8).

Sistemik derialtı allerjen spesifik immunoterapi (SİT) özellikle allerjen maruziyetin ortadan kaldırılamadığı astım bronşiyale, allerjik rinit, böcek allerjisi gibi bazı allerjik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. SİT, immun sistemi doğal allerjen ve makromoleküllerin varlığına alıştırmak için uygulanan bir duyarsızlaştırma yöntemidir. Allerjen immunoterapi vücudun allerjik yanıtını, düzenleyici T helper (Th) lenfositleri aktive ederek, aktive T lenfositlerden interlekin-10 salınımını arttırarak, Th2 lenfosit anerjisi oluşturarak ve allerjik reaksiyonu tetikleyen diğer olası mekanizmalar ile önler (9). Bu yöntem, allerjenle karşılaşınca semptom oluşturmayınca kadar, allerjenin giderek artan dozlarda uygulanması ile uygulanır. Allerjen immunoterapi çimen, yabani ot ve ağaç poleni, ev tozu akarı, küf, arı allerjileri için uygulanabilir (10). İmmunoterapötik materyal içeriğindeki allerjenler, yüksek moleküler ağırlıklı eksojen makromoleküller olduklarından glomerül kapiller duvarına tutunarak yukarıda söz edilen mekanizmalar aracılığı ile glomerüller hasara neden olabilirler. Ancak, allerjen immunoterapinin immun veya non-immun glomerül hasarına neden olduğunu gösteren bir çalışma bilinmemektedir. Bu çalışmada dermatofagoid allerjen immunoterapinin Wistar-Albino sıçanlarda immun veya non-immun glomerüller

hasar oluşturma riski olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

MATERYAL VE METOD

Çalışma Yöntemi

Her birinde on haftalık yedi erkek sıçandan oluşan üç çalışma grubu oluşturuldu. Birinci gruba 1/2 dozda, ikinci gruba 1/4 dozda dermatofagoid allerjen enjeksiyonu, üçüncü gruba (kontrolü gruba (kontroljen ile eşit miktarda serum fizyolojik enjeksiyonu uygulandı. Her üç gruba da allerjen enjeksiyonu iki hafta ara ile toplam üç kez, abdominal bölgeye derialtı yolla yapıldı. Tüm sıçanlar enjeksiyondan iki hafta sonra eter anestezi ile uyutulduktan sonra dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

Deney hayvanları, allerjenler, idrar analizi

Çalışmada kullanılan Wistar-Albino cinsi sıçanlar, Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edildi. Sıçanların ağırlıkları 220-245 gr arasındaydı. Tüm hayvanlar stabil ortamda (22±1°C'de, 12 saat gün ışığı sağlanarak) barındırıldı ve standart laboratuvar diyeti ile beslendi.

Bu çalışmada sıçanlara allerjen olarak Dermatofagoides pteronissinus (Der p 1) ve Dermatofagoides farinea (Der f 1) allerjen karışımı (Kod 708 ve 725) (Allergopharma, Reinbek, Almanya) uygulandı.

Tüm sıçanlardan çalışmanın başında ve sonunda alınan idrar örnekleri ışık mikroskopik ve strip testler ile proteüri ve hematüri açısından incelendi.

Histolojik Değerlendirme

Böbrekler ışık mikroskopi ile incelendi. Sıçanların sakrifiye edilmesinden sonra böbrekler çıkartıldı ve rutin konvansiyonel ışık mikroskopik inceleme için bir saat boyunca fosfat tampon solüsyon içinde fiske edildi. Değerlendirme için longitudinal böbrek kesitleri alındı. Preparatlar ışık mikroskopik inceleme için %10 nötral tamponlu formalin ile fiske edildi ve parafin içine yerleştirildi. Dört-beş mm kalınlığında preparatlar Hematoksileneosin, PAS ve Masson trichrome ile boyandı. Biyopsi materyalleri körlleme olarak değerlendirildi ve glomerüller proliferasyon, mezangial genişleme, glomerüller bazal membran kalınlaşması, interstisyel hücre infiltrasyonu, tübüler atrofi ve interstisyel

fibrozis varlığı açısından hafif, orta, ağır olarak skorlandı.

İstatistiksel Değerlendirme

Tedavi grupları arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Tedavi ve kontrol grupları arasındaki farklılığın istatistiksel önemi, Fisher ki-kare testi ile belirlendi. 0,05'ten küçük p değeri anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

SONUÇLAR

İdrar Analizi

Kontrol veya tedavi gruplarının hiçbirinde çalışmanın başlangıç yada sonunda (3. enjeksiyon sonrası) hematüri veya proteinüri saptanmadı.

Işık Mikroskopi

Üç grubun ışık mikroskopi bulguları birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel farklılık bulunmadı. Tüm ışık mikroskopi değerlendirmeleri Tablo 1, 2 ve 3'te gösterilmiştir. Bazı sıçanlarda hafif derecede mezangial proliferasyon, mezangial matriks artışı ve tubulointerstisyel inflamasyon saptandı. Bununla birlikte, gruplar arasında gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (mezangial proliferasyon, mezangial matriks artışı ve tubulointerstisyel inflamasyon açısından sırasıyla $p=0,368$, $p=0,5$, $p=0,7$). Çalışmada hiçbir sıçanda bazal membran kalınlaşması, vasküler değişiklik ve fokal tubuler atrofiye ait herhangi bir bulgu saptanmadı.

TARTIŞMA

Eksojen terapotik makromoleküller, plazmadan filtre olarak glomerüler yapıda tutulabildiğinden, immun veya non-immun glomerüler hasar için potent ajanlardır (2). Önceden yapılan pek çok çalışmada IgA nefropatisi gibi immun hasar, mezangial matriks depolanması ve dejenerasyonu gibi non-immun hasar oluşumu bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli ilaç, toksin, aşı, mikroorganizma gibi makromoleküllere karşı oluşan miks tipte glomerüler hasar bildirilmektedir (1, 2, 11). Moleküler ağırlıkları ortalama olarak 170.000 dalton olan Der p 1 ve Der f 1 gibi SİT'de kullanılan allerjenler makromoleküler yapılar ve glomerüler hasar için önemli bir risk oluşturabilirler (12, 13). Bu çalışmada, 1/2 ve 1/4 dozlarda tekrarlanan dermatofagoid allerjen inokülasyonları ile glomerüler hasarın ışık mikroskobik bulguları ortaya çıkmamıştır.

Eksojen makromoleküller ile oluşan non-immun glomerüler hasar, reabsorbe edilen makromoleküllerin elektrostatik veya fizikokimyasal özellikleri nedeniyle GBM ile ilişkiye girmesi, glomerüle ulaşmış makromoleküllerin matriks ile ilişkiye girmesi veya bu moleküllerin mezangial tutulumu gibi birçok mekanizma ile oluşabilmektedir (1-4, 14). Yine tüm bu mekanizmalar, sistemik veya lokal immun yanıt ile immun glomerüler hasara neden olabilmektedir. Non-immun glomerüler hasarda, sıklıkla mezangial proliferasyon, mezangial matriks artışı, tubulointerstisyel inflamasyon, GBM kalınlaşması, vasküler değişiklikler veya fokal tubuler atrofiyi gösteren ışık mikroskopi bulguları gözlenebilir. Bu bulgulardan bazıları makromoleküller tarafından oluşturulan immun glomerüler hasarda da ortaya çıkabilmektedir (1,2). Çalışma sonucunda, ışık mikroskobik inceleme ile Dermatofagoid allerjen SİT'in non-immun glomerüler hasara neden olmadığı görülmüştür. Eksojen makromoleküllerin GBM ile olan elektrostatik ilişkisi non-immun glomerüler hasarı oluşturan temel mekanizma olabilir. Çünkü katyonik antijen veya moleküller GBM'nın anyonik bölümlerine bağlanabilmekte ve bu da mezangial proliferasyon, matriks artışı veya tubulointerstisyel dejenerasyon ile sonuçlanmaktadır (2, 4, 8). Dermatofagoid allerjenleri 170.000 Dalton'dan daha büyük moleküler ağırlığa sahip nötral makromoleküllerdir (12, 13). Bu yüzden GBM'nın anyonik bölümlerine bağlanamadıklarından non-immun glomerüler hasara neden olamayacakları öne sürülebilir. Non-immun glomerüler hasarın diğer önemli mekanizması eksojen makromoleküller ile glomerülün lektin bağlayan bölgesi arasındaki fizikokimyasal ilişkidir. Helix pomatia aglutini yada Concovalin-A gibi pek çok patojenik mikroorganizma ve antijen, lektin bağlayan bölümlere sahip olabilir ve böylece GBM'nın subendotelial bölgesinde yerleşmiş immun kompleksler oluşturarak glomerülde hasara neden olabilirler (2, 5). Ancak, Der p 1 ve Der f 1 gibi pürifiye Dermatofagoid allerjenlerinin lektin bağlayıcı veya lektin benzeri bölgeleri yoktur (12, 13). GBM'in kollojen IV veya heparan sülfatı ile makromoleküller arasında da benzer bir ilişki düşünülebilir (2). Sonuç olarak eksojen makromoleküller mezangial hücreler tarafından fagosite edilip mezangiumda tutulurlar. Buna rağmen son mekanizmalar kesin olarak ispatlanmamıştır ve

patogenetik önemleri henüz bilinmemektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar Dermatofagoid allerjenlerin eksojen makromoleküller gibi glomerül mesengiumunda tutulmadıklarını ve matriks ile etkileşime girmediklerini göstermiştir. Birkaç sıçanda mezangial ve tubulointerstisyel değişiklikler gözlenmiştir. Ancak, sıçanlarda yaşa bağlı gelişen glomerüler değişiklikler bildirilmektedir. Çalışmada gözlenen ve anlamlı olmayan non-spesifik değişikliklerin tümü kullanılan sıçanların yaşları ile açıklanabilir (6).

İmmun sistem, organizma savunmasında gerekli olan ve kendinden olanı olmayandan ayırt etme fonksiyonlarında önemli bir role sahiptir. Eksojen antijenlere karşı oluşan immun yanıt çeşitli doku ve organlarda özellikle de böbrekte inflamatuvar reaksiyonu başlatır. Eksojen antijenler Ig depozitleri ile antikor bağımlı immun kompleks oluşumuna yol açarak renal hastalık oluşturabilir (1, 2). Dermatofagoid allerjenler SİT enjeksiyon yerlerinden dolaşıma geçer ve glomerüllere ulaşarak immun kompleks oluşumuna neden olabilir. Ancak dolaşımdaki antijenlerin biyokimyasal özellikleri immun komplekslerin yapı ve biyolojik aktivitelerini belirlemede önemli role sahiptirler. Bu özellikler, antijenin yükü, antijenin büyüklüğü ve valansı, antijen klirens kinetiği ve eksojen antijene karşı oluşan antikor yanıtının tipi gibi özelliklerdir (1, 2). GBM, içeriğindeki heparan sülfat nedeniyle

negatif elektriksel yüke sahiptir. Eksojen makromoleküller ancak pozitif yüklü olduklarında GBM'na tutunabilmektedirler. Katyonik eksojen antijenler, IgA nefropatisi, membranöz glomerulonefrit, membranoproliferatif veya hızlı ilerleyen glomerulonefrit gibi GBM'da immun kompleks hastalıklarına neden olarak GBM'a karşı en potent cevabı oluştururlar. IgA, IgM, C3 ve diğer immun globulinler de mezangiumda depolanabilir (1-4). Daha önce yapılan pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışmada ilaçlar, toksinler, aşılardan veya enfeksiyöz ajanlar gibi eksojen makromoleküller tarafından oluşturulan immun kompleks hastalıkları bildirilmiştir (1-8). Örneğin, Kavukçu ve ark. iki hafta aralarla 6 doz yapılan konjuge Haemafilus influenza tip b aşısının farelerde sekonder IgA nefropatisi oluşturduğunu göstermiştir (11). Dermatofagoid allerjen ekstreleri ise nötral yüzey yüküne sahiptirler. Bu nedenle GBM'a tutunarak immun kompleks cevabı oluşturma potansiyelleri bulunmadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada allerjen SİT'de olduğu gibi tekrarlanan dermatofagoid allerjenlerinin immun komplekse bağlı veya non-immun glomerüler hasara neden olmadığı bulunmuştur. Dermatofagoid allerjenleri eksojen makromoleküller olmalarına rağmen bu pürifiye allerjenlerle uygulanan allerjen SİT glomerüler hasar için risk oluşturmamaktadır.

Tablo 1. Grup 1'in histopatolojik bulguları

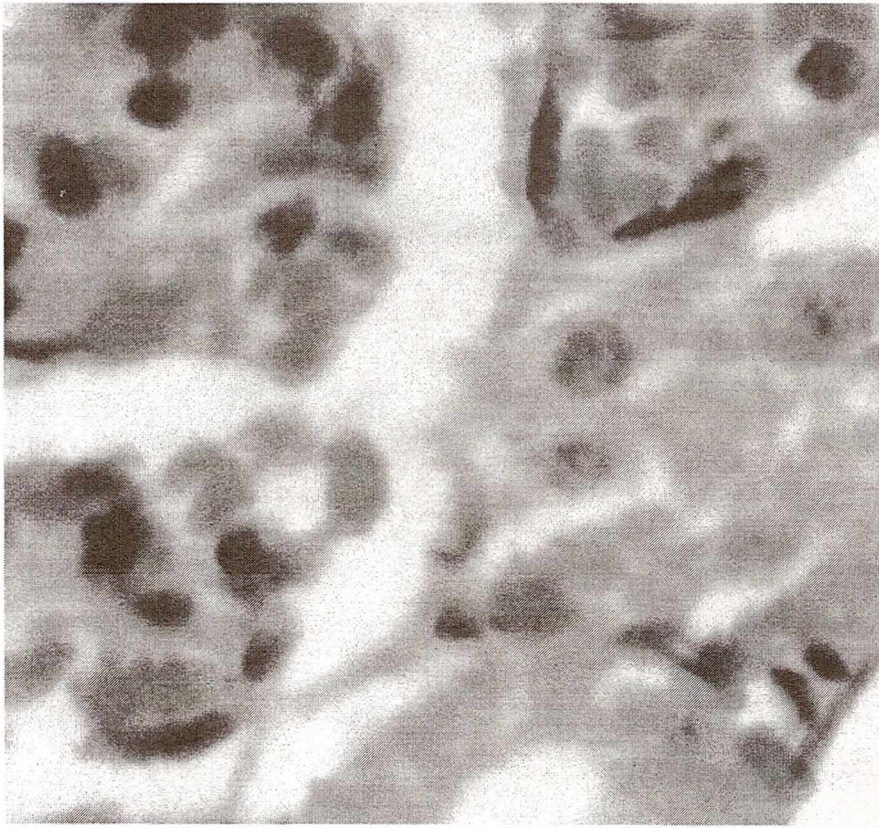
Sıçan No	Mezangial proliferasyon	Mezangial matriks artımı	Bazal membran kalınlaşması	Tübülointerstisyel inflamasyon	Vasküler değişiklikler	Fokal tübüler atrofi
1	+	+	-	++	-	-
2	+	+	-	++	-	-
3	-	+	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-	-
5	-	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-

Tablo 2. Grup 2'nin histopatolojik bulguları

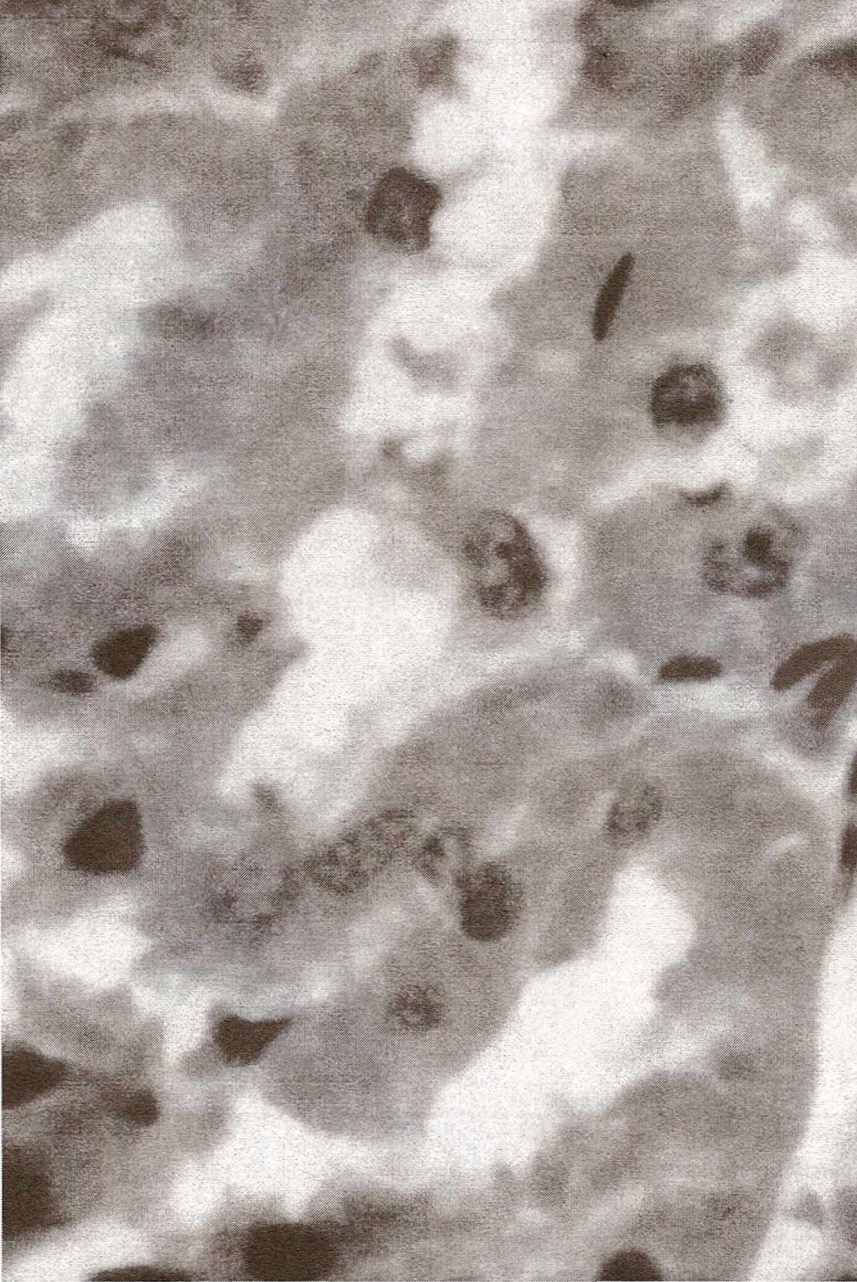
Sıçan No	Mezangial proliferasyon	Mezangial matriks artımı	Bazal membrane kalınlaşması	Tübülointerstisyel inflamasyon	Vasküler değişiklikler	Fokal tübüler atrofi
1	-	+	-	-	-	-
2	-	+	-	+	-	-
3	+	+	-	-	-	-
4	+	-	-	++	-	-
5	-	-	-	+	-	-
6	+	-	-	+	-	-
7			(Exitus)			

Tablo 3. Grup 3'ün histopatolojik bulguları

Sıçan No	Mezangial proliferasyon	Mezangial matriks artımı	Bazal membran kalınlaşması	Tübülointerstisyel inflamasyon	Vasküler değişiklikler	Fokal tübüler atrofi
1	-	+	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	+	-	-
7	+	-	-	++	-	-



Şekil 1. İkinci gruptaki sıçanlardan birinin ışık mikroskopik görünümü: Normal bir glomerül (x 400 büyük büyütme)



Şekil 2. Üçüncü gruptaki sıçanlardan birinin ışık mikroskopik görünümü: Normal bir glomerül (x 400 büyük büyütme)

KAYNAKLAR

1. Abrass CK. Mechanisms of immune complex formation and deposition in renal structures. In *Immunologic Renal Diseases*, Neilson EG, Couser WG. 1997. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia pp: 291-307.
2. Eddy AA. Immune mechanisms of glomerular injury. In *Pediatric Nephrology*, Barratt TM, Avner ED, Harmon WE (eds). 1999 4th edition. Lippincott Williams Wilkins. Baltimore, Maryland pp:641-668.
3. Garella S. Immunopathologic mechanism of glomerular injury an overview of current concepts. *J Clin Apheresis*. 1985;2(4):387-395.
4. Adler S, Couser W. Immunologic mechanisms of renal disease. *Am J Med Sci*. 1985 Feb;289(2):55-60.
5. Matsuo S, Yoshida F, Yuzawa Y, Hara S, Fukatsu A, Watanabe Y, Sakamoto N. Experimental glomerulonephritis induced in rats by a lectin and its antibodies. *Kidney Int*. 1989 Dec;36(6):1011-1021.
6. Endo Y, Kanabayashi H, Hara M. Experimental IgA nephropathy induced by gram negative bacteria. *Nephron* 1993;65:196-205.
7. Fries JW, Mendrick DL, Rennke HG. Determinants of immune complex-mediated glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1988 Sep;34(3):333-345.
8. Batsford SR, Mihatsch MJ, Rawiel M. Surface charge distribution is a determinant of antigen deposition in the renal glomerulus: studies employing "charge-hybrid" molecules. *Clin Exp Immunol* 1991;86:471-477.
9. Wuthrich B, Gumowski PL, Fah J, Hurlimann A, Deluze C, Andre C, Fadel R, Carat F. Safety and efficacy of specific immunotherapy with standardized allergenic extracts adsorbed on aluminium hydroxide. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001;11:149-156.
10. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2003 May;33(5):1205-1214.
11. Kavukcu S, Soylu A, Sarioglu S, Turkmen M, Kupelioglu A, Pekcetin C, Gure A. IgA nephropathy in mice following repeated administration of conjugated Haemophilus Influenza Type B vaccine. *Tokai J Exp Clin Med* 1997;22(4):167-174.
12. Andersson K, Lindholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130:87-107.
13. Thomas WR, Smith W-A, Hales BJ, Mills K, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mice allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:1-18.
14. Kanwar YS. Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. *Lab Invest* 1984;51:7-21.