



The Effect of IVIG on Superoxide Generation in Primary Humoral Immunodeficiencies

Humoral İmmün Yetmezlikli Hastalarda IVIG Tedavisinin Süperoksid Üretimine Etkisi

İmmün Yetmezlik / Immune Deficiencies

Gulay Sezgin, İlhan Tezcan, Fügen Ersoy, Özden Sanal, İzzet Berkel
Hacettepe University Medical School, Division of Pediatric Immunology, Ankara, Turkey

15.Ulusal İmmünoloji Kongresi 13-16 Ekim 1999, Antalya, Türkiye.
Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (LUT 98/5-12,19.11.1998).

Özet

Primer antikor eksiklikleri (genel değişken immün yetmezlik (GDİY); hiper IgM, X-linked agammaglobulinemi (XLA) ve selektif Ig A eksikliği gibi) çeşitli fizyopatolojik mekanizmalarla meydana gelen heterojen bir hastalık grubudur. Bu immün yetmezliklerden özellikle GDİY'li hastalarda monosit ve makrofajlardan salınan reaktif oksijen ürünlerinde artış olduğu, XLA olan bir grup hastada bu artışın olmadığı görülmüştür. Üretilen çeşitli reaktif oksijen ürünlerinin bu hastalarda inflamasyon, doku hasarı, akut ve kronik akciğer hastalıkları, otoimmünite ve malignite gelişmesinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu hastalara verilen intravenöz immünglobulin (IVIG) tedavisinin çeşitli immunomodülatör etkileri vardır. Sağlıklı insanların polimorf nüveli lökositlerinde (PMNL) yapılan bir in vitro çalışmada, ortama IVIG eklenmesinin süperoksid anyon üretimini, metabolik aktivasyonu, hücre içi stafilokok ölümünü artırdığı gözlenmiştir. Primer antikor eksikliği olan erişkin hastalarda yapılan bir çalışmada ise IVIG'in granulositlerin süperoksid üretimine etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada Hiper IgM sendromu, XLA, GDİY ve Ig A eksikliği olan 35 çocuk hasta ve sağlıklı 13 çocukta PMNL'den süperoksid üretimi araştırılmıştır. Ayrıca IVIG alan olgularda tedavi öncesi, tedavinin 24. saatine ve tedaviden sonra nötrofil süperoksid üretimi, beyaz küre sayısı, absolü lenfosit sayısı, absolü nötrofil sayısı ve kantitatif CRP değerleri açısından değerlendirilmiştir. XLA, GDİY ve IgA eksikliği olan hastaların süperoksid üretiminde kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede artış bulunmuştur. IVIG tedavisinden 24 saat ve 1 hafta sonra süperoksid üretiminde minimal değişiklik saptanmış, ancak bunlar istatistiksel olarak önem göstermemiştir. GDİY'li hasta grubunda IVIG öncesi ve IVIG'den 24 saat sonra kantitatif CRP değerleri açısından istatistiki olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Diğer parametreler açısından farklılık bulunmamıştır. Bu bulgular klinik olarak bulgu vermeyen fagositler sistemi de ilgilendiren bir immün aktivasyon ile açıklanabilir. IVIG alan hastalarda elde edilen veriler; in vivo olarak kullanılan IVIG'nin (mevcut serum konsantrasyonları içerisinde) vakaların nötrofillerinin süperoksid üretimine önemli bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler

Granulosit; Süperoksid Anyonu; İntravenöz İmmünoglobulin

Abstract

Primary antibody deficiency (common variable immunodeficiency, Hyper IgM, X-linked agammaglobulinemia and selective Ig A deficiency) is a group of heterogeneous diseases characterized by defective antibody production. In primary hypogammaglobulinemias, particularly in patients with common variable immunodeficiency there is an increased generation of reactive oxygen species from monocytes which may be important for both immunopathogenesis and clinical manifestations. The generation of toxic oxygen metabolites may contribute to inflammation and tissue damage associated with phagocytic infiltration, and play role in the pathogenesis of malignancies, autoimmune disorders, acute and chronic pulmonary diseases seen in these patients. In primary immunodeficiencies and functional antibody deficiencies, IVIG act as replacement therapy and several mechanisms of IVIG action have been postulated. In vitro studies with human granulocytes showed stimulation of respiratory burst and promotion of bacterial killing by IVIG. In adult patients with primary humoral immunodeficiency, treated with IVIG showed that IVIG does not affect superoxide generation. We investigated superoxide generation from PMNL in 35 children with hyper IgM syndrome, XLA, CVID and IgA deficiency and 13 healthy children. We also explored the effect of IVIG administration on superoxide generation from granulocytes, white cell count, absolute neutrophil count, absolute lymphocyte count and quantitative CRP levels. There was a substantial increase in superoxide generation from PMNL in patients with XLA, CVID and IgA deficiency. Comparison of the superoxide generation before, 24 hours and one week after IVIG treatment showed no difference. In patients with CVID, quantitative CRP levels before and 24 hours after IVIG revealed significant difference. Other parameters were not changed. It can be concluded that enhanced superoxide generation in patients with XLA, CVID, Ig A deficiency may result from silent activation of the phagocytic system which does not give clinical symptoms; and administration of IVIG in vivo (within the serum concentrations) has no impact on superoxide generation of granulocytes in patients with primary antibody deficiencies.

Keywords

Granulocyte; Superoxide Generation; Intravenous Immunoglobulin

DOI: 10.4328/JCAM.2702

Received: 17.09.2014 Accepted: 30.09.2014 Printed: 01.06.2015 J Clin Anal Med 2015;6(suppl 3): 261-6

Corresponding Author: Gulay Sezgin, Division of Pediatric Oncology/BMT Unit, Cukurova University Medical School, Balcali, 01330, Adana, Turkey.

E-Mail: gulaysezgin@yahoo.com

Giriş

Primer antikor eksiklikleri (genel değişken immün yetmezlik (GDİY); hiper IgM, X-linked agammaglobulinemi (XLA) ve selektif Ig A eksikliği gibi) çeşitli fizyopatolojik mekanizmalarla meydana gelen heterojen bir hastalık grubudur. Bu immün yetmezliklerden özellikle GDİY'li hastalarda monosit ve makrofajlardan salınan reaktif oksijen ürünlerinde artış olduğu, XLA olan bir grup hastada bu artışın olmadığı görülmüştür. Primer antikor eksikliklerinde fagositer sistem hücrelerinden üretilen reaktif oksijen ürünlerinin, bu hastalarda inflamasyon, doku hasarı, akut ve kronik akciğer hastalıkları, otoimmünite ve malignite gelişmesinde rolü olabileceği düşünülmektedir[1]. Bu hastalara verilen intravenöz immünglobulin (IVIG) tedavisinin çeşitli immünomodulatör etkileri vardır[2]. Sağlıklı insanların polimorf nüveli lökositlerinde ve mononükleer hücrelerinde yapılan bir in vitro çalışmada; ortama IVIG eklenmesinin süperoksit anyonu üretimini, metabolik aktivasyonu, hücre içi stafilokok ölümünü artırdığı gözlenmiştir[3]. Primer antikor eksikliği olan erişkin hastalarda IVIG'nin granulositlerin süperoksit üretimine etkisinin olmadığı görülmüştür[4].

Bu çalışmada amaç; çocukluk yaş grubu primer hümmoral immün yetmezlikli hastalarda nötrofil süperoksit yapımının incelenmesi; IVIG tedavisinin nötrofillerinin süperoksit yapımı üzerindeki in vivo etkisinin bu hasta grubunda incelenmesi ve IVIG tedavisinin hastaların beyaz küre sayısı, absolü nötrofil sayısı, absolü lenfosit sayısı ve kantitatif CRP değerlerine etkisinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatrik İmmünoloji Ünitesinde takip edilen ve tanıları Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği kriterlere göre konulmuş hiper IgM sendromu (n=6), X-linked agammaglobulinemi (n=9), genel değişken immün yetmezlik (n=12), IgA eksikliği (n=8) olan yaşları 2-23 yaş arasında değişen son 3 hafta içerisinde akut bir enfeksiyon tariflemeyen 27 erkek ve 8 kız hasta çalışmaya alındı. Hastalardan hiper IgM, XLA, GDİY olanlar 3 veya 4 haftada bir IVIG tedavisi almakta idiler. İntravenöz immünglobulin alan hastaların hepsi beraberinde trimetoprim-sulfametaksazol profilaksisi almakta idi. Kontrol grubu ise, yaşları 5-25 arasında değişen 6 erkek 7 kız toplam 13 sağlıklı bireyden oluşmaktaydı. Çalışmaya başlamadan önce her çocuğun ailesine çalışma hakkında bilgi verildi ve bilgilendirme formu imzalatıldı. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu'nun onayını aldı (LUT 98/5-12,19.11.1998).

Süperoksit ölçümü hiper IgM sendromu, XLA, GDİY, IgA eksikliği olan 35 hastada ve 13 kontrolde yapıldı. IVIG tedavisi alan (hiper IgM sendromu, XLA, GDİY) 21 hastada IVIG tedavisi öncesi ve tedavinin 24. saatinde süperoksit üretimi, beyaz küre sayısı, absolü nötrofil ve absolü lenfosit sayısı, kantitatif CRP düzeyleri ölçüldü. Bu hastaların yedisinde (hiper IgM: 5 hasta, XLA: 2 hasta) 1. haftadaki süperoksit üretimleri; aynı kişilerin beşinde de (hiper IgM: 3 hasta, XLA: 2 hasta) beyaz küre sayısı, absolü nötrofil, absolü lenfosit sayısı ve kantitatif CRP değerlerine bakıldı.

Süperoksit ölçümü

Çalışmada nötrofillerden süperoksit anyonu üretimi süperoksit dismutaz ile inhibe edilebilen ferrisitokrom C yöntemi ile ölçüldü (Bu metod literatürdeki çalışmalardan modifiye edilmiştir [1,3]). Periferik venden heparinli enjektöre alınan 4cc kandan dekstran sedimantasyon ile granulositden zengin plazma elde edildi. Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077,61H-4354,Sigma pharmaceuticals,M.A) dansite gradient ile polimorf nüveli lökositler elde edilerek 2 kez PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkandıktan sonra kalan eritrositler % 1,8 NaCl ile lizis edildi. Lizis sonrası 1 kez daha PBS ile yıkanarak 0.5X10⁶ granulosit/ml olacak şekilde ayarlandı. Granulositlerin canlılığı trypan mavisi ile kontrol edildi ve %96'nın üzerinde ise çalışmaya alındı. Doku kültür plakalarında altılı çukurcuğa 50µl nötrofil konuldu. Sitokrom C (Cytochrome C, 25mg, C-3006, 84H7140, bovine heart, Sigma Pharmaceuticals, M.A) 2mg/ml, süperoksit dismutaz (SOD, 15000 US-2515, 9H7603, bovine erythrocytes, Sigma Pharmaceuticals, M.A) 600U/ml ve PMA(Phorbol myristat asetat) 2000ng/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Her hasta için 100µl sitokrom C ve 10µl PMA eklendi. Aynı hastaya ait çukurcukların üç tanesine 50µl süperoksit dismutaz,diğer üç çukurcuğa 50µl fenol red içermeyen HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, H-8264, 106H2337, Sigma Pharmaceuticals, M.A) eklendi. Bir ELİSA okuyucusu ile 550 dalga boyunda 0,15, 30 ,60, 90. dakikalarda okuma yapıldı. Bu süre zarfında kültür plakası 37oC ve %5 CO2 ortamında inkübe edildi. Sitokrom C reduksiyonu, SOD ihtiva eden ve etmeyen çukurcuklardan elde edilen optik dansite değerleri çıkartılarak, belirtilen formül (sitokrom C extinction coefficient =21x10⁶ M1cm1) kullanılarak hesaplandı. Değerler, belirtilen sürelerde önce nmol/kuyucuk (well) cinsinden, daha sonra da 106 nötrofil için hesaplandı. Sonuçlar, IVIG öncesi hasta grupları arasında ve gerek IVIG öncesi gerekse de sonrasında hasta grubu içerisinde istatistiki olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler

Veri analizleri istatistiksel paket programı kullanılarak yapıldı (SPSS for MS Windows Release 7.0). Gruplar ve farklı zamanlardaki sonuçlar arasındaki farklılıklar Wilcoxon-Mann Whitney U testi ve Kruskal-Wallis 1-Way Anova testi kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak gösterildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan hastaların yaş ortancası 11 yıl ve IVIG kullanma süresi, ortalama olarak: 55.6±35.8ay (minimum-maksimum:3ay-11yıl) bulunmuştur. Hastaların klinik ve immünolojik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Süperoksit anyonu üretimi

Hiper IgM sendromu, XLA, GDİY hastaların IVIG öncesi ve IgA eksikliği olan hastaların PMNL'lerinin inkübasyonun 30. dakikasında ortalama süperoksit üretimleri sağlıklı kontrol grubuna göre artmış olarak saptandı. Bu artış XLA, GDİY, ve IgA eksikliği olan hastalarda istatistiki olarak önem gösteriyordu (Şekil 1). Hasta grupları deney inkübasyonunun 60. dakikasında değerlendirildiğinde süperoksit üretiminin artarak devam ettiği gözlemlendi, ancak istatistiksel olarak anlam taşııymıyordu (p>0.05). IVIG tedavisi uygulanan hastalar, IVIG öncesi ve IVIG verilmesinden 24 saat sonra değerlendirildiğinde IVIG öncesine göre minimal yükselmeler saptandı. İnkübasyonun 30. dakika ve 60. dakikadaki bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 2). Grupların kendi aralarında, yapılan ça-

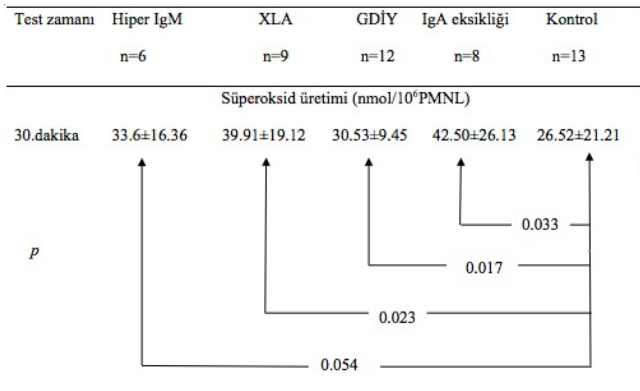
ışmanın 15, 30, 60, 90 dakikalarındaki okuma sürelerinde (in-

Tablo 1. Hastaların klinik ve immünolojik özellikleri

Özellikleri	Hasta Grupları			
	Hiper IgM	XLA	CVID	IgA eksikliği
Hasta sayısı	6	9	12	8
Yaş(yıl)				
ortalama	13.8	8.0	11.7	12.5
ortanca	13	7	12.5	10.5
aralık	6-22	2-16	3-17	5-23
Erkek/Kız	5/1	9/0	10/2	3/5
Kr.rinosinüzit	6/6	8/9	8/12	2/8
Bronşektazi	1/6	1/9	5/12	0/8
Kr.Hepatit	0/6	0/9	1/12	0/8
Splenomegali, LAP	0/6	0/9	1/12	1/8
IVIG kullanma süresi (ortanca,ay)	66	60	30	-
Serum Ig değerleri				
IgG (mg/dl)	475* (350-590)	378.8* (240-500)	676* (340-2020)	1812.5 (1170-2880)
IgM (mg/dl)	629.6* (8-2130)	8.5* (7-11)	44* (11-128)	160.7 (58-480)
IgA (mg/dl)	22.6* (17-31)	20* (14-50)	22.8* (6-55)	18.8 (5-38)

*IVIG tedavisinde ve son IVIG verilmesinden 3-4 hafta sonraki değerler

Şekil 1. Hasta gruplarının IVIG öncesi 30.dakikadaki süperoksid üretiminin (ortalama±standart hata) kontrol grubu ile karşılaştırılması



Tablo 2. Hastaların IVIG tedavisinin 24. saatinde 30. ve 60. dakikalarındaki süperoksid anyonu (ortalama ± standart hata) üretimi

Test zamanı	Hiper IgM n=6	XLA n=9	GDİY n=12	IgA eksikliği n=8	Kontrol n=13
Süperoksid üretimi (nmol/10 ⁶ PMNL)					
30.dakika	37.20±21.09	40.98±17.45	39.53±28.38	-	-
60.dakika	44.80±21.74	48.00±21.55	53.67±34.24	-	-

kübasyon süreleri) değerlendirmeleri sonucunda istatistik olarak farklılık gözlenmedi.

Kantitatif CRP düzeyi

Kantitatif CRP düzeyi normal sınırlar içerisinde olmasına rağmen XLA'da, GDİY ve Hiper IgM'den daha yüksek saptandı, ancak istatistiksel olarak farklılık bulunmadı (p>0.05). GDİY'li hastalarda kantitatif CRP değerleri normal sınırlar içerisinde kal-

makla birlikte; tedavi öncesi ve tedavinin 24.saati arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. (GDİY p>0.05); diğer gruplarda saptanmadı (Tablo 3). Gruplar arasında IVIG tedavisi öncesi ve 24. saatinde farklılık bulunmadı (p>0.05). Tedaviden 1 hafta sonra kantitatif CRP düzeyi 5 hastada (Hiper IgM:3;

Tablo 3. Hastaların tedavi öncesi ve tedavinin 24. saatinde ve tedaviden 1 hafta sonra (ortalama±standart hata) CRP değerleri

Grup	Hiper IgM	XLA	GDİY	
	CRP değerleri* (mg/dl)			
IVIG öncesi	0.39±0.29(n=6)	0.83±1.02(n=7)	0.44±0.48(n=10)	
IVIG 24. saat	0.51±0.37(n=6)	0.71±0.66(n=7)	0.94±0.81(n=10)	p=0.028
IVIG 1.hafta	0.78±0.72(n=3)	0.40±0.26(n=2)		

*Normal 0-0.8 mg/dl

XLA:2) bakıldı. Bu değerlerin 24. saat ve tedavi öncesi CRP ile karşılaştırılması sonucunda farklılık saptanmadı (p>0.05).

Beyaz küre sayısı

Hastaların IVIG öncesinde beyaz küre sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (p>0.05). Grup içerisinde de tedavi öncesi ve tedavinin 24. saati arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. (p>0.05) (Tablo 4). Beş hastanın (Hiper IgM :3; XLA : 2) 1. haftadaki beyaz küre değerleri 24.

Tablo 4. IVIG tedavisi öncesi ve sonrasında beyaz küre sayısının gruplara göre ortalama ± standart hata (minimum-maksimum) değerleri

Grup	n	Beyaz küre sayısı/mm ³		p
		IVIG öncesi	24. saat	
Hiper IgM	4	10150±2176 (7000-12000)	8550±1864 (6100-10100)	0.068
XLA	7	11142±3754 (7000-19100)	11500±5325 (6700-20000)	1
GDİY	10	10670±5579 (4700-20500)	8320±2762 (5600-14300)	0.12

saat ve tedavi öncesi değerlerle karşılaştırılmış ve p>0.05 bulunmuştur.

Absolü nötrofil sayısı ve absolü lenfosit sayısı

Tedavi öncesinde ve sonrasında absolü nötrofil ve lenfosit değerleri arasında; istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

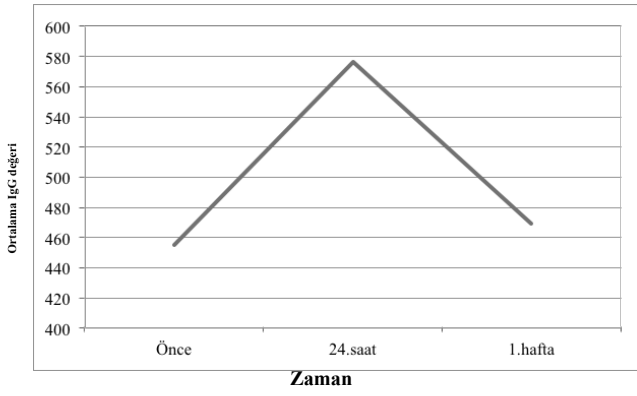
Serum IgG düzeyi

Bu hastalardan sadece Hiper IgM sendromlu hastaların serum Ig G düzeyleri IVIG öncesi, IVIG sonrası 24.saatinde ve bir hafta sonrasında bakıldı. Hiper IgM sendromlu hastaların, IVIG öncesinde ortalama 455±68 mg/dl olan serum IgG düzeyinin 400mg/kg IVIG infüzyonundan sonra ortalama olarak 576±30 mg/dl'ye çıktığı, daha sonra 469±44 mg/dl'ye indiği saptanmıştır (Şekil 2).

Tartışma

Polimorf nüveli lökositler immün sistemin en önemli bileşenlerinden birisidir. Bu hücreler mikroorganizmaları çeşitli mekanizmalar kullanarak ve değişik ürünler üreterek öldürürler. Bu

Şekil 2.Hiper IgM sendromu olan hastaların IVIG öncesi, tedavinin 24.saati ve 1.haftasındaki serum IgG değerleri (n=4)



ürünler lizozom, peroksidaz, elastaz ve reaktif oksijen ürünlerinden oluşur. Serbest oksijen radikallerinin çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir [5]. Bunun yanında, reaktif oksijen ürünlerinin immün yetmezliklerin ve komplikasyonlarının patogenezinde de rol oynayabileceği düşünülmektedir. Aukrust ve ark.[1] GDİY olan hastalarda monosit ve makrofaj sisteminde artmış bir aktivasyon saptamışlar ve monosit/makrofaj disfonksiyonunun bu hastalardaki immünopatogeneizde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu araştırmacılar tarafından yapılan primer hipogamaglobülinemisi olan erişkin 33 hastada monositlerden reaktif oksijen ürünlerinin üretimi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak GDİY'li hastalarda reaktif oksijen üretiminin XLA ve konjenital hipogamaglobülinemisi olan hastalara göre artmış olduğunu saptamışlardır. Bu artışın genel değişken immün yetmezliği olup splenomegalisi, CD4+ lenfositleri düşüklüğü ve artmış immün aktivasyonun bir göstergesi olan serum neopterin düzeyi yüksek olan altgrubunda daha fazla olması bu hastalarda ortaya çıkan malignite, otoimmünite ve akut veya kronik akciğer hastalıklarının patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür[1,6]. Yine aynı araştırmacılar genel değişken immün yetmezlikli hastaların plazma ve CD4+ lenfositlerinde azalmış total ve indirgenmiş glutation düzeyi ile beraber inflamasyonun bir göstergesi olan TNF- α sisteminin aktivasyonunu saptamıştır[7]. Başka bir çalışmada da (aynı hasta grubunda) lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehidde artma ve antioksidan vitamin E ve β -karotende azalma ile beraber indirgenmiş homosistein düzeyinde artma saptamıştır[8]. Bütün bunlar artmış oksidan stresin sonucu antioksidanların tüketiminin artmasına ve bunu telafi edecek mekanizmaların çalışmasına bağlanmaktadır. Bizim hastalarımızın tedavi öncesi değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında XLA,IgA eksikliği ve GDİY olan hastalardan sadece birinde splenomegali mevcut olup (Tablo 1), bu hastanın da süperoksid üretiminde artış saptanmıştır. Bu hastanın CD4+ lenfosit düzeyi düşük bulunmuştur. Hastaların hiçbirisinde son 3 hafta içerisinde aktif enfeksiyon öyküsü olmadığından; hastaların artmış süperoksid anyonu üretimini enfeksiyonlar ile ilişkilendirmek zordur. Metoddan kaynaklanan endotoksin kontaminasyonunun reaktif oksijenlerin üretimini bazı çalışmalarda baskıladığı, bazı çalışmalarda ise uyardığı gösterilmiştir[1]. Bizim çalışmamızda endotoksin kaynağı olabilecek fetal calf serum kullanılmamıştır. Bu durumda klinik olarak belirti vermeyen bir immün sistem aktivasyonundan bahsedilebilir ve bu hastalardaki artmış reaktif oksi-

jen ürünleri bu hastalarda gelişebilecek komplikasyonlarda rol oynayabilir.

IVIG tedavisi günümüzde primer immün yetmezliklerin yanında otoimmün hastalıklar ve malignitelere kullanılmaktadır. Bu hastalıklardaki etkileri ile ilgili çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür ve bağışıklık sisteminin farklı komponentleri ile yapılmış çalışmalar vardır. İçerdiği anti-idiopatik antikorların B-hücrelere negatif sinyal ileterek antikor oluşumunu engellediği; yine içerdiği antikorlar sayesinde süperantijenler tarafından uyarılmış sitotoksik T-hücrelerin aktivasyonunu önlediği bilinmektedir. Ayrıca kompleman komponentlerinden C3b ve C4b ile kompleks oluşturup, C5 konvertaz oluşumunu engelleyerek hedef hücrelerde membranolitik atak kompleksinin çökmesini önlediği düşünülmektedir[9]. Gamaglobülinin opsonizasyon üzerindeki pozitif etkisi de önceden bilinmekte olup, primer immün yetmezliklerdeki kullanımının en önemli nedenlerinden biridir[10-13]. Fakat IVIG tedavisinin, immün yetmezlikli hastalarda polimorfonükleer sistem ve mononükleer sistemin diğer savunma fonksiyonları üzerindeki etkisi konusunda çok fazla bilgi yoktur. In vitro yapılan bir çalışmada; farklı konsantrasyonlardaki (bu konsantrasyon 250-500 mg/dl arasındadır) IVIG konsantrasyonlarına maruz bırakılan sağlıklı insan PMNL ve mononükleer hücrelerinde fagositik aktivite, hücre içi bakterisidal aktivite ve süperoksid anyonu üretiminin arttığı saptanmıştır[3,14]. IVIG preparatlarının normal insan granülositlerini nasıl aktive ettiği bilinmemektedir. Fakat bu etkinin, IgG'nin nötrofiller üzerinde bulunan Fc reseptörler aracılığı ile olduğu düşünülmektedir[15,16]. Her ne kadar IVIG preparatları üretilirken kimyasal ve enzimatik modifikasyona uğrasa da minimal de olsa bunlar IgG dimerleri ve agregatları içermektedirler ve bunlar granülositlere bağlanarak onları aktive edebilir. Yapılan bir in vitro çalışmada immün komplekslerin Fc γ RIIIb varlığında hücre içi Ca $^{2+}$ düzeyini artırarak NADPH oksidaz enziminin aktivasyonu için gerekli sinyali ilettiği ve oksidatif üretimin başladığı; Fc γ RIIIb ortadan kaldırıldığında bu etkinin görülmediği bulunmuştur[17]. Öne sürülen bir başka hipotezde, IVIG preparatları içindeki IgE ve IgE komplekslerinin nötrofilleri uyardığına ilişkindir. Fakat nötrofillerde IgE için Fc reseptör bulunmaması sebebiyle bu görüşe kuşkuyla bakılmaktadır[1]. IVIG preparatlarının granülositler üzerindeki in vitro etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir; bununla beraber in vitro çalışmalar in vivo olayların tam bir göstergesi değildir. Van ve ark.[4] primer hipogamaglobülinemisi olan 12 erişkin hastada düşük doz (200 mg/kg/ay) ve yüksek doz (600 mg/kg/ay) IVIG tedavisi öncesi ve sonrasında (4. ve 14. günlerde) fagositer sistemin (monosit ve PMNL'de) fonksiyonlarını (fagositoz, fagositik indeks, hücrel bakterisidal aktivite, kemotaksis ve süperoksid üretimi) değerlendirmişlerdir. Yüksek doz IVIG tedavisi alan hastaların serum IgG düzeyleri tedavi öncesine göre 4. ve 14. günlerde düşük doz alan gruba göre anlamlı olarak yükselmiştir. Her iki gruptaki hastaların fagositik fonksiyonlarında normal hücrelere göre artış bulunmuş olup; yüksek doz alan grupta kemotaksisin daha iyi olduğu ve her iki grupta da süperoksid üretiminde artış olmadığı görülmüştür. Monosit fonksiyonlarında her iki grupta farklılık bulunmamıştır. Literatürde çocukluk yaş grubu hümmoral immün yetmezliklerinde nötrofil süperoksid üretim ve buna IVIG'in etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Primer hipogamaglobülinemisi olan 12 vakalık bir başka çalışmada da monositlerde reaktif

tif oksijen ürünlerinin oluşumu IVIG öncesi ve tedaviden 20 saat sonra zymosan ve PMA ile uyarılarak değerlendirilmiş; zymosan ile uyarılanlarda NBT redüksiyonunda azalma saptanırken PMA ile uyarılan grupta farklılık saptanmamıştır[18]. Bizim çalışmamızda hastaların IVIG tedavisi öncesi, tedavinin 24. saatinde ve 1. haftada süperoksit üretiminde farklılık bulunmamıştır. Hastaların tedavinin 24. saatindeki IgG düzeyleri 576 ± 30 mg/dl, 1 hafta sonraki düzeyi ise 469 ± 44 mg/dl olarak saptanmıştır ve bu düzeyler yapılan in vitro çalışmanın konsantrasyonlarından farklı değildir. Bu durumda aynı konsantrasyonlardaki IVIG preparatlarının polimorf nüveli lökositlerden süperoksit üretimine etkisinin in vitro ve in vivo koşullarda farklılık gösterebildiği görülmektedir.

IVIG tedavisinin beyaz küre sayısı üzerindeki etkisi ile yapılmış çalışmalar vardır. Tekrarlayan düşükleri olan 13 kadında yapılan bir çalışmada da IVIG sonrasında beyaz küre sayısında artma bulunmuş; fakat bu artış polimorf nükleer lökositlerde ve monositlerde olup lenfosit sayısında farklılık gözlenmemiştir[17]. Erken dönemde sepsis olan bebeklerin nötrofil kinetiğinin incelendiği 22 vakalık bir çalışmada ise IVIG öncesi nötrofenisi olan 11 bebekten altısında nötrofeninin düzeldiği immatür / total nötrofil oranında artma olduğu tespit edilmiştir[19]. Kawasaki hastalığı olan 40 vakalık bir çalışmada, 10 hastaya 100 mg/kg/gün, 14 hastaya 400 mg/kg/gün IVIG tedavisi ile aspirin ve 16 hastaya da sadece aspirin tedavisi 5 gün süreyle verilmiş; tedavi sonrasında nötrofillerin sayılarının sadece aspirin tedavisi verilen gruba göre oldukça düşük olduğu görülmüştür[20]. Bizim çalışmamızda hiper IgM sendromu olan 4 hastada, XLA olan 7 hastada GDİY olan 10 hastanın IVIG öncesi ve tedaviden sonra 24. saatinde beyaz küre sayısı, absolü nötrofil sayısı, absolü lenfosit sayısı değerlendirilmiştir. Bu hastalardan beşinde aynı değerlendirme 1. haftada da yapılmıştır. Hastaların hiçbirisinde IVIG tedavisi öncesinde nötrofeni, lenfopeni mevcut değildir. GDİY, aynı zamanda otoimmün lenfoproliferatif hastalık olan bir hastanın beyaz küre sayısı 20,500 saptanmış, IVIG tedavisi sonrasında (24. saat) ise 7600 olarak bulunmuştur. GDİY olan bir başka hastada ise tedaviden sonra 24. saatte absolü lenfosit sayısı sınırdadır (Hasta:980, Normal:1000-2800) bulunmuştur. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirme sonrasında tedavi öncesi ve tedavinin 24. saati arasında farklılık bulunmamıştır. IVIG tedavisinden 1 hafta sonra beş hastada yapılan değerlendirmede absolü nötrofil sayısı ve beyaz küre sayısı ile tedavinin 24. saatindeki değerlendirme arasında farklılık bulunmuştur. Hastaların beyaz küre sayısı 7680 ± 1546 /mm³ iken tedaviden 1 hafta sonra 9920 ± 3350 /mm³'e çıkmıştır. Absolü nötrofil sayısı ise IVIG tedavisinden 24 saat sonra 4227 ± 1562 /mm³ iken tedaviden 1 hafta sonra 5478 ± 2608 /mm³ olarak saptanmıştır. Fakat aynı etki absolü lenfosit sayısı üzerinde görülmemektedir. Bu etki, IVIG üzerindeki geç etkisinden kaynaklanabilir. Burada hasta sayısının az olması da bu konuda yorum getirmeyi güçleştirmektedir.

CRP bir akut faz reaktanı olup; anemi, polistemi, konjestif kalp yetmezliği ve hipergamaglobülinemiden etkilenmemektedir. İnflamatuar olaylarda, doku hasarı veya nekrozunda ve enfeksiyonlarda yükselir, özellikle romatoid artrit ve romatizmal ateş varlığında hastalığın aktivitesini gösteren önemli bir bulgudur[21]. Sistemik vaskülit sendromunda IVIG tedavisi sonrasında CRP düzeyinde belirgin düşme saptanmıştır[22]. Rekrakter

romatoid artrit olan hastalarda ise düşük doz IVIG tedavisi sonrasında CRP düzeyinde değişiklik olmadığı görülmüş ve IVIG'nin bu tip hastalarda faydasının olmayacağı (hayvan modelinde etkili olmasına rağmen) düşünülmüştür[23]. Bizim çalışmamızda sadece GDİY olan hastalarımızda IVIG öncesi ve sonrasında CRP düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Bu sonucu enfeksiyona bağlamak diğer hasta gruplarında bu sonucun bulunmamasından dolayı yanlış olacaktır. Bu durumun immünglobulinin içerisindeki çeşitli vasoaktif aminler ve her hasta için farklı zamanlarda farklı IVIG preparatı kullanılması neden olmuş olabilir. Diğer hasta gruplarında aynı duruma rastlanmaması ise, GDİY olan hastaların immün sistem aktivasyonuna ve inflamasyona daha fazla yatkın olmalarıyla izah edilebilir.

Çalışmamız kapsamında primer antikor eksikliği olan hiper IgM sendromu, XLA, GDİY ve IgA eksikliği olan hastalarda fagosit sistemin önemli bir komponenti olan PMNL'nin süperoksit üretimi değerlendirilmiş ve XLA, GDİY ve IgA eksikliği olanlarda kontrol grubuna göre önemli artış saptanmış olup, bu durum subklinik nötrofil aktivasyonu ile izah edilmiştir. IVIG'nin bu hastalarda nötrofil süperoksit üretimine etkisi değerlendirildiğinde (ulaşılan serum IgG konsantrasyonu ile) dikkat çeken değişiklikler saptanmamıştır. Bu durum daha önce belirtilen in vitro çalışmada elde edilen bulgu ile uyumlu değildir. Bu da immünomodülatör etkilerin in vivo koşullarda farklılıklar gösterebileceğini göstermektedir. Ayrıca bu hastalarda tanı sonrası IVIG tedavisine başlanmadan önce ilk IVIG dozundan sonra nötrofil süperoksit yapımı, kemotaksis, fagositler indekse bakılması konuya açıklık getirebilir.

Çıkar Çakışması ve Finansman Beyanı

Bu çalışmada çıkar çakışması ve finansman destek alındığı beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

1. Aukrust P, Müler F, Froland SS. Enhanced generation of reactive oxygen species in monocytes from patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 1994;97(2):232-8.
2. Rameash S, Schwartz SA. Therapeutic uses of intravenous immunoglobulin in children. *Pediatr Rev* 1995;16(11):403-16.
3. Marodi L, Kamilar A, Karmazsin L. Stimulation of the respiratory burst and promotion of bacterial killing in human granulocytes by intravenous immunoglobulin preparations. *Clin Exp Immunol* 1990;79(2):164-9.
4. Van T, Susman G, Pruzanski W. Impact of intravenous infusions of low and high doses of gammaglobulins on phagocytic functions in adults with primary humoral immunodeficiency. *Inflammation* 1994;18(4):419-26.
5. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 1995;9(2):200-9.
6. Aukrust P, Froland SS, Müller F. Raised serum neopterin levels in patients with primary hypogamaglobulinemia; correlation to other immunological parameters and to clinical and histological features. *Clin Exp Immunol* 1992;89(2):211-16.
7. Aukrust P, Svardsdal AM, Müller F, Lunden B, Berge RK, Froland SS. Decreased levels of total and reduced glutathione in CD4+ lymphocytes in common variable immunodeficiency are associated with activation of the tumor necrosis factor system: possible immunopathogenic role of oxidative stress. *Blood* 1995;86(4):1383-91.
8. Aukrust P, Berge RK, Müller F, Ueland PM, Svardsdal AM, Froland SS. Elevated plasma levels of reduced homocysteine in common variable immunodeficiency—a marker of enhanced oxidative stress. *Eur J Clin Invest* 1997;27(9):723-30.
9. Dalakas M. IVig in other autoimmune neurological disorders: current status and future prospects. *J Neurol*. 2008;255(Suppl 3):12-6.
10. Ono Y, Ito T, Watanabe T, Koshio O, Tansho S, Ikeda T, et al. Opsonic activity assessment of human intravenous immunoglobulin preparations against drug-resistant bacteria. *J Infect Chemother* 2004;10(4):234-8.
11. Marodi L, Kalmár Á, Szabó I. Opsonic activity in serum from septic infants treated with intravenous immunoglobulin. *Arch Dis Child* 1989;64(4):530-4.
12. Nazzari C, Gaeta A, Lun MT, Raponi G, Antonelli M, Mancini C, et al. Effect of intravenous immunoglobulin on opsonic activity and TNF production in patients at high risk for sepsis syndrome. *New Microbiol* 1993;16(3):251-8.
13. Tono-Oka T, Matsumoto T, Imai K, Matsumoto S. Effect of gamma-globulin

- preparations on phagocytic function of whole blood. *Biomed Pharmacother* 1985;39(9-10):477-81.
14. Pruzanski W, Saito S. Modulation of functional activity of human polymorphonuclear and mononuclear phagocytes by intravenous gamma globulin. *Inflammation* 1989;13(3):341-57.
15. Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK. Phagocytosis mediated by three distinct Fcγ receptor classes on human leucocytes. *J Exp Med* 1990; 171(4):1333-45.
16. Edwards SW, Watson F, Gasmi L, Moulding DA, Quayle JA. Activation of human neutrophils by soluble immune complexes: Role of FcγRII and FcγRIIIb in stimulation of the respiratory burst and elevation of intracellular Ca²⁺. *Ann NY Acad Sci* 1997;832(1):341-57.
17. Rigal D, Desroches V, Heitz S, Bernaud J, Alfonsi F, Monier JC. Effects of intravenous immunoglobulins on peripheral blood B, NK, and T cell subpopulations in women with recurrent spontaneous abortions: Specific effect on LFA-1 and CD 56 molecules. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71(3):309-14.
18. Aukrust P, Müller F, Nordoyl, Haug CJ, Frøland SS. Modulation of lymphocyte and monocyte activity after intravenous immunoglobulin administration in vivo. *Clin Exp Immunol* 1997;107(1):50-6.
19. Christensen RD, Brown MS, Hall DC, Lassiter HA, Hill HR. Effect on neutrophil kinetics and serum opsonic capacity of immune globulin to neonates with clinical signs of early-onset sepsis. *J Pediatr* 1991;118(4 Pt 1):606-14.
20. Okada M, Satoh T, Hayashi T. Effect of intravenous gamma-globulin on neutrophil function in Kawasaki disease. *Acta Paediatr Jpn* 1991;33(6):785-90.
21. Wallach, J. Interpretation of diagnostic tests: a synopsis of laboratory medicine, Little, Brown & Co. Boston, Mass, 1992.
22. Jayne DR, Davies MJ, Fox CJ, Black CM, Lockwood CM. Treatment of systemic vasculitis with pooled intravenous immunoglobulin. *Lancet* 1991;337(8750):1137-9.
23. Kanik KS, Yarboro CH, Naparstek Y, Plotz PH, Wilder RL. Failure of low dose intravenous immunoglobulin therapy to suppress disease activity in patients with treatment-refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39(6):1027-9

How to cite this article:

Sezgin G, Tezcan İ, Ersoy F, Sanal Ö, Berkel İ. The Effect of IVIG on Superoxide Generation in Primary Humoral Immunodeficiencies. *J Clin Anal Med* 2015;6(suppl 3): 261-6.