

Diagnostische en pathofysiologische betekenis van autoantistoffen tegen cytoplasmatische bestanddelen van myeloïde cellen (ANCA)

C.G.M. KALLENBERG

In 1985 beschreven Van der Woude e.a. (1) het voorkomen van autoantistoffen gericht tegen cytoplasmatische bestanddelen van granulocyten en monoccyten bij patiënten met de ziekte van Wegener. Deze antistoffen, gedetecteerd m.b.v. indirecte immunofluorescentie (IIF) op cytopspins van met ethanol gefixeerde, geïsoleerde granulocyten of "buffy coats" als substraat, bleken in hoge mate gevoelig en specifiek voor de diagnose "ziekte van Wegener". Deze ziekte wordt gekenmerkt door necrotiserende granulomateuze ontsteking in de luchtwegen, systemische vasculitis, en necrotiserende glomerulonefritis met zgn. halve maanvorming ("crescents"; derhalve ook genoemd: necrotizing crescentic glomerulonephritis (NCGN)). Later bleek dat, naast deze antistoffen die een cytoplasmatische aankleuring van met ethanol gefixeerde granulocyten geven (c-ANCA: cytoplasmatische antineutrofiële cytoplasmatische antistoffen), sommige sera een perinucleaire aankleuring laten zien op dit substraat. De in deze sera aanwezige antistoffen werden p-ANCA (perinucleaire ANCA) genoemd. Verder onderzoek liet zien dat het antigeen herkend door c-ANCA in vrijwel alle gevallen proteïnase 3 was, een derde serine protease uit de azurofiële korrels naast elastase en cathepsine G. Het antigeen herkend door p-ANCA bleek in een aantal gevallen myeloperoxidase te zijn. Daarnaast bleken echter ook p-ANCA positieve sera voor te komen die gericht zijn tegen elastase, lactoferrine, cathepsine G en andere, veelal nog niet gekarakteriseerde antigenen uit de neutrofiel. Deze laatste antistoffen blijken nu bij verschillende ontstekingsziekten voor te komen. Naar analogie van de antinucleaire antistoffen (ANA) kunnen ANCA dus opgevat worden als een klasse van autoantistoffen welke, afhankelijk van hun antigene specificiteit, geassocieerd zijn met omschreven klinische ziektebeelden.

Detectie

ANCA worden gedetecteerd m.b.v. IIF op een substraat van met ethanol gefixeerde granulocyten. Via dichtheidscentrifugatie geïsoleerde granulocyten worden m.b.v. cytopinning op objectglaasjes gebracht en vervolgens gefixeerd met ethanol. Hetzelfde kan ook met de "buffy coat" gebeuren, wat het voordeel heeft dat in het preparaat ook lymfocyten aanwezig zijn. Dit maakt onderscheid tussen ANCA en ANA mogelijk.

Afdeling Klinische Immunologie, Academisch Ziekenhuis Groningen

Correspondentie: Prof. dr. C.G.M. Kallenberg, Afdeling Klinische Immunologie, Academisch Ziekenhuis, Oostersingel 59, 9713 EZ Groningen.

lijk: ANCA kleuren lymfocyten niet aan, in tegenstelling tot ANA. Bij IIF kunnen 3 patronen onderscheiden worden: een karakteristiek cytoplasmatisch patroon met de hoogste fluorescentie intensiteit in het gebied tussen de kernlobben (c-ANCA), een perinucleair patroon (p-ANCA) en een atypisch cytoplasmatisch patroon. Het p-ANCA is een artefact van de fixatie met ethanol: tijdens deze fixatie bewegen kationische eiwitten zoals myeloperoxidase (MPO) naar de anionische kernmembraan. Wanneer de cellen gefixeerd worden met formaline laten sera met antistoffen tegen MPO een cytoplasmatisch fluorescentiepatroon zien. Bij de IIF-test wordt tevens de titer bepaald.

Een positieve test dient gevolgd te worden door antigeen-specifieke assays, m.n. voor antistoffen tegen proteïnase 3 (Pr3) en MPO (zie verder). Veelal wordt hierbij gebruik gemaakt van ELISA. Daarbij wordt ofwel het gezuiverde antigeen direct op de plaat gecoat ofwel gebruik gemaakt van een zgn. sandwich ELISA. De eerste methode wordt meestal toegepast voor MPO dat commercieel verkrijgbaar is. Voor detectie van antistoffen tegen Pr3 maken wij gebruik van een sandwich ELISA waarbij een monoclonale antistof tegen Pr3 via een polyclonale geit anti-muis antistof op de plaat gebracht wordt. Hierna wordt een ongezuiverd extract van azurofiële korrels toegevoegd waaruit de monoclonale antistof het Pr3 specifiek bindt. Vervolgens wordt de ELISA op de gebruikelijke wijze verder ontwikkeld.

Op grond van ervaringen van vele laboratoria blijkt een positieve c-ANCA test in vrijwel alle gevallen overeen te komen met antistoffen tegen Pr3. Een positieve p-ANCA berust echter slechts in een beperkt aantal gevallen op antistoffen tegen MPO. Aangezien de klinische betekenis van andere ANCA-specificiteiten nog niet is uitgekristalliseerd, is routinematige bepaling hiervan vooralsnog niet aangewezen.

Diagnostische betekenis

Tabel 1 geeft de diagnostische betekenis weer van anti-Pr3 en anti-MPO antistoffen. Anti-Pr3 zijn met name geassocieerd met de ziekte van Wegener, anti-MPO meer met idiopathische NCGN (nierafwijkingen zonder systemische verschijnselen) en met de ziekte van Churg en Strauss (granulomateuze vasculitis in combinatie met eosinofilie en (een anamnese van) asthma). Bij de zgn. microscopische polyangiitis, een vorm van vasculitis die de nieren en de longen betreft doch waarbij granulomateuze ontsteking ontbreekt, komen ofwel anti-Pr3 of anti-MPO voor. De aanwezigheid van één van beide autoantistoffen is betrekkelijk specifiek voor één van de in de tabel genoemde ziektebeelden.

Tabel 1. Het voorkomen van autoantistoffen tegen proteïnase 3 en myeloperoxidase in relatie tot ziekten

Ziekte	prevalentie van	
	anti-proteïnase 3 (%)	anti-myeloperoxidase (%)
Ziekte van Wegener	85	10
Microscopische polyangiïtis	45	45
Idiopathische crescentische glomerulonefritis	25	65
Ziekte van Churg en Strauss	10	60
Polyarteriïtis nodosa	5	15

De eerder genoemde vasculitiden, m.n. de ziekte van Wegener, wordt gekenmerkt door remissies en exacerbaties. Bij de ziekte van Wegener is gebleken dat exacerbaties in vele gevallen voorafgegaan worden door een stijging van het gehalte aan ANCA in het bloed. Gemiddeld bedroeg de tijdsperiode tussen het moment van stijging van ANCA en het tijdstip van de exacerbatie 49 dagen. Bepaling van de c-ANCA titer kan derhalve een bijdrage leveren bij de follow-up van patiënten met de ziekte van Wegener. Een stijgende titer kan de klinicus wijzen op een naderende exacerbatie. Recent is ons gebleken dat in die gevallen waarin een ANCA-stijging niet gevolgd werd door een exacerbatie er geen stijging optrad van de IgG3-subklasse van ANCA, terwijl een ANCA-stijging die wel gevolgd werd door een exacerbatie steeds gepaard ging met een stijging van het gehalte aan specifieke IgG3-subklasse antistoffen. De mogelijke pathofysiologische betekenis hiervan komt later ter sprake.

Zoals eerder vermeld komen p-ANCA en atypische ANCA ook voor bij patiënten met idiopathische ontstekingsziekten en bij (sommige) infectieziekten. De meeste aandacht is hierbij de laatste jaren uitgegaan naar de inflammatoire darmziekten, nl. de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa. P-ANCA blijken met name voor te komen bij colitis ulcerosa ($\pm 75\%$) en in veel mindere mate bij de ziekte van Crohn ($\pm 20\%$). Ze kunnen mogelijk een rol spelen bij de differentiële diagnostiek.

P-ANCA komen daarnaast voor bij chronische leveraandoeningen. Bij primaire scleroserende cholangitis, wat vaak geassocieerd is met colitis ulcerosa, komen p-ANCA bij $\pm 75\%$ van de patiënten voor. Hetzelfde geldt voor chronische actieve hepatitis ($\pm 75\%$) en in mindere mate bij primair biliare cirrhose ($\pm 30\%$). Ook bij reumatoïde artritis komen p-ANCA voor in $\pm 60\%$ van de patiënten. Al deze aandoeningen worden gekenmerkt door chronische ontsteking. Voorlopige gegevens wijzen erop dat de prevalentie van ANCA bij deze ziekten toeneemt met de ziekteduur. Dit doet vermoeden dat deze autoantistoffen eerder een gevolg dan een oorzaak van de ziekte zijn. Hun eventuele bijdrage aan het onderhouden van het ziekteproces komt later ter sprake. ANCA bij deze chronische ontstekingsziekten zijn gericht tegen diverse antigenen waaronder lactoferrine. In veel gevallen is de antigene structuur echter nog niet opgehelderd. De associatie tussen anti-lactoferrine antistoffen en vasculitis bij patiënten met reumatoïde artritis

welke in één studie werd gevonden, kon in andere studies niet bevestigd worden.

Pathofysiologische betekenis

De hechte relatie tussen anti-Pr3 antistoffen en de ziekte van Wegener, m.n. ook de relatie tussen stijging in antistofgehalte en het vervolgens optreden van ziekte-activiteit, doet vermoeden dat de antistoffen betrokken zijn bij de pathofysiologie van de aandoening. Een aantal bevindingen ondersteunen deze hypothese.

De eerste bevinding betreft de waarneming dat ANCA in vitro in staat zijn granulocyten te activeren. Hiertoe dienen deze granulocyten eerst "geprimed" te zijn, d.w.z. een zeer geringe mate van activatie te vertonen. Dit kan tot stand komen door contact met zeer geringe hoeveelheden endotoxine, tumor necrosis factor (TNF), of andere cytokines. Bij "priming" verschijnen de doelwitantigenen, zoals Pr3, MPO en lactoferrine, op de celmembraan van de granulocyt, mogelijk als gevolg van een zeer geringe degranulatie. Binding van ANCA aan de zo tot expressie gekomen antigenen leidt tot verdere activatie van de granulocyt waarbij toxische zuurstofradicalen en lysosomale enzymen vrijkomen. Bij deze activatie zijn ook Fc-receptoren op de granulocyt betrokken welke een binding aangaan met de Fc-fragmenten van genoemde ANCA. Met name de tweede Fc-receptor (Fc γ RIIa) is hierbij betrokken. Deze receptor heeft affiniteit voor de IgG2- en, in iets hogere mate, voor de IgG3-subklasse van IgG moleculen. De bevinding dat de relatieve toename van het granulocyt activerend vermogen in sera van patiënten met de ziekte van Wegener gepaard gaat met de relatieve toename van het gehalte aan IgG3-subklasse ANCA, is in overeenstemming met een belangrijke rol voor IgG3-subklasse ANCA bij het ontstaan van ziekte-activiteit. Dit zou te verklaren zijn door de interactie van deze subklasse met de tweede Fc-receptor op de granulocyt die betrokken is bij de door ANCA geïnduceerde activatie van deze cel. Op deze wijze zouden ANCA een ontstekingsreactie kunnen versterken en onderhouden.

De tweede bevinding die wijst op een pathofysiologische rol van ANCA betreft m.n. antistoffen tegen Pr3. Deze antistoffen kunnen de inactivatie van Pr3 door antiproteases zoals α 1-antitrypsine inhiberen. De mate van inhibitie blijkt parallel te lopen met de ziekte-activiteit bij patiënten met de ziekte van Wegener. Mogelijk kunnen anti-Pr3 door remming van de irreversibele binding van Pr3 en α 1-antitrypsine er toe bijdragen dat het enzym zijn krachtige proteolytische werking uitoefent op plaatsen waar het anders onmiddellijk geïnactiveerd zou worden.

Recente onderzoeken hebben laten zien dat endotheelcellen, vooral wanneer deze door cytokines geactiveerd worden, Pr3 op hun oppervlak tot expressie kunnen brengen. Dit maakt deze cellen toegankelijk als doelwit voor ANCA met specificiteit voor Pr3.

Tenslotte bestaan er dierexperimentele gegevens die een rol toeschrijven aan anti-MPO antistoffen bij het ontstaan van de typische nierafwijkingen zoals deze in associatie met deze antistoffen voorkomen (NCGN, zie eerder). Wanneer in ratten een immuun-

respons wordt opgewekt tegen humaan MPO d.m.v. immunisatie en één nier van deze ratten vervolgens geperfundeed wordt met de produkten van geactiveerde granulocyten, nl. lytische enzymen, MPO en H₂O₂, ontstaan in de geperfundeerde nier van deze ratten histologische afwijkingen die identiek zijn aan de afwijkingen die bij patiënten met anti-MPO antistoffen in de nieren worden gezien. Deze experimenten hebben het inzicht in de ontstaanswijze van de ziekteverschijnselen bij patiënten met vasculitis in associatie met ANCA vergroot. Het lijkt dat er een tweetal factoren nodig zijn: enerzijds de autoimmunrespons, anderzijds een externe prikkel, bv. een infectie, die tot "priming" van granulocyten aanleiding geeft. Wat dit laatste betreft, is het opvallend dat die patiënten met de ziekte van Wegener die in de loop van de tijd exacerbaties van hun ziekte ontwikkelden, vrijwel steeds drager van *Staphylococcus aureus* bleken te zijn.

Conclusie

ANCA gericht tegen proteïnase 3 en myeloperoxidase zijn waardevolle hulpmiddelen bij de diagnostiek en

follow-up van vasculitiden. In vitro en in vivo gegevens doen vermoeden dat de antistoffen een rol spelen bij het ontstaan van de ziekteverschijnselen (voor andere overzichtsartikelen zie ref. 2-4).

Literatuur

1. Woude FJ van der, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, Es LA van, Giessen M van der, Hem GK van der, The TH: Autoantibodies to neutrophils and monocytes: a new tool for diagnosis and a marker of disease activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1985; ii: 425-429.
2. Kallenberg CGM, Cohen Tervaert JW, Woude FJ van der, Goldschmeding R, Borne AEGKr von dem, Weening JJ. Autoimmunity to lysosomal enzymes: new clues to vasculitis and glomerulonephritis? *Immunol Today* 1991; 12: 61-64.
3. Kallenberg CGM, Mulder AHL, Cohen Tervaert JW. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: a still growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *Am J Med* 1992; 93: 675-682.
4. Kallenberg CGM, Brouwer E, Weening JJ, Cohen Tervaert JW. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int* 1994; 46: 1-15.

Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 89-91

De toepassing van hematopoïetische groeifactoren bij de neutropenische patiënt

E. VELLENGA

In de afgelopen jaren is veel informatie verkregen over de werking van de verschillende hematopoïetische hormonen die betrokken zijn bij de proliferatie en differentiatie van hematopoïetische cellen in beenmerg en perifeer bloed. Onder de hematopoïetische hormonen worden zowel cytokines, lymfokines als koloniestimulerende factoren verstaan die op een subtiele manier zorgdragen voor de stimulatie alswel remming van verschillende hematopoïetische cellen. De belangrijkste die momenteel in de kliniek worden toegepast zijn: granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) en granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). Hoewel G-CSF en GM-CSF in de kliniek uitwisselbaar zijn omtrent hun toepasbaarheid zijn er fysiologisch gezien grote verschillen in aanmaak en werking.

G-CSF

G-CSF wordt door verschillende hematopoïetische cellen gemaakt zoals monocytten, endotheelcellen en fibroblasten (1-4). Deze celtypen maken G-CSF; niet spontaan maar uitsluitend na blootstelling aan een activatiesignaal waaronder endotoxine en IL-1. Na stimulatie komt de eiwitproductie binnen 12 tot 24

uur op gang. De werking van G-CSF is beperkt tot de granulocytaire reeks en stimuleert zowel de proliferatie van de granulocytaire voorlopercel als de functionele activiteit van de uitgerijpte granulocyt. Dit komt o.a. tot uiting in de toegenomen zuurstof radicaal vorming en in de verandering van adhesie moleculen.

GM-CSF

GM-CSF wordt evenals G-CSF door meerdere hematopoïetische cellen gemaakt (1-4). Endotheelcellen, fibroblasten, T-cellen en monocytten kunnen onder verschillende condities deze groeifactor tot expressie brengen. Endotoxine en IL-1 stimuleren endotheelcellen en fibroblasten tot de produktie van GM-CSF terwijl activatie van het T-cel receptor complex eveneens leidt tot GM-CSF produktie. De werking van GM-CSF is breder als die van G-CSF en omvat zowel de granulocytaire, de monocyttaire als de eosinofiele reeks. De werking van de groeifactor strekt zich uit van de vroege hematopoïetische stamcel tot de uitgerijpte cel. De werking op uitgerijpte hematopoïetische cellen omvat met name activatie van een aantal cellulair processen, zoals superoxide produktie, expressie van de adhesieve antigenen en produktie van verschillende cytokines.

Beide factoren zijn in de afgelopen periode uitvoerig gebruikt als ondersteunende behandeling bij patienten met een hemato-oncologische maligniteit. De toediening van deze factoren heeft tot doel de periode van

Afdeling Hematologie, Academisch ziekenhuis Groningen

Correspondentie: Dr. E. Vellenga, Afdeling Hematologie AZG, Oostersingel 59, 9713 EZ Groningen.