

**ΠΑΘΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ  
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΩΝ**

A.Γ. Τζιούφας και I.Γ. Ρούτσιας

Τομέας Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά κυτταροπλασματικών αντιγόνων ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων (ANCA) προσδιορίστηκε αρχικά το 1982 σε μικρό αριθμό ασθενών με άγνωστης αιτιολογίας αγγειίτιδες (1). Η αξία της παρατήρησης αυτής έγινε αντιληπτή το 1985 όταν ένας ειδικός τύπος ανοσοφθορισμού (ονομάστηκε ACPA αρχικά και αργότερα cANCA) συσχετίσθηκε με την κοκκιωμάτωση του Wegener (KW) (2). Τα αμέσως επόμενα χρόνια η συσχέτιση αυτή τεκμηριώθηκε με μία σειρά μελετών και τα ANCA απέκτησαν διαγνωστική αξία για την KW. Το 1988 περιγράφηκε ένας νέος τύπος ανοσοφθορισμού-ANCA (που αργότερα ονομάστηκε pANCA) ο οποίος βρέθηκε να συσχετίζεται με την συστηματική νεφρική αγγειίτιδα (3).

Σήμερα οι διάφοροι τύποι ANCA αποτελούν χρήσιμους διαγνωστικούς δείκτες του ορού του αίματος. Οι δείκτες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη όσον αφορά (I) τη διάγνωση της KW, (II) στη διάκριση ξεχωριστών κλινικών οντοτήτων ανάμεσα σε ευρύ φάσμα από αγγειίτιδες/σπειραματονεφρίτιδες (π.χ. "pauciimmune" necrotizing vasculitis), (III) στην παρακολούθηση της ενεργότητας των ανωτέρω νοσημάτων. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα ANCA και τα αντιγόνα "στόχοι" του υπεισέρχονται στην παθογένεση της αγγειίτιδας.

## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ANCA

Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντίχνευση των ANCA: έμμεσος ανοσοφθορισμός (EA), ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός (RIA), ELISA, Western blot, dot blot, ανοσοκατακρήμνηση. Ο EA είναι η πρώτη ιστορικά μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και αποτελεί την πιό ευρέως διαδομένη τεχνική για την ανίχνευση των ANCA. Η αξιοπιστία της μεθόδου αυτής εξαρτάται από την προέλευση, την μονιμοποίηση και την αποθήκευση των κυττάρων καθώς και από τις επωάσεις, πλύσεις και τον τύπο του υποστρώματος που χρησιμοποιείται.

Με EA σε ουδετερόφιλα δύο ξεχωριστοί τύποι ανοσοφθορισμού μπορούν να διακριθούν: (I) ο κοκκιώδης κυτταροπλασματικός τύπος (cANCA) που συναντάται στην KW, (II) ο περιπυρηνικός τύπος (pANCA) που συσχετίζεται με την νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα και την οζώδη πολυαρτηρίτιδα. Επιπλέον φαίνεται να υπάρχει και ένας τρίτος τύπος που αντιπροσωπεύει μία ιδιάζουσα μίξη μεταξύ cANCA και pANCA και συναντάται στην χρόνια φλεγμονώδη νόσο του εντέρου.

Για να βελτιωθεί η ειδικότητα και ο καθορισμός του τύπου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ανοσοενζυμικού προσδιορισμού στερεάς φάσης όπως η ELISA.

Οι πρώτες ELISA χρησιμοποιούσαν ακατέργαστα εκχυλίσματα αζευροφίλων κοκκιών. Μεγάλη βελτίωση αυτών των τεχνικών επήλθε με τον καθορισμό και την απομόνωση των κυρίων αντιγόνων των cANCA, και pANCA σαν την πρωτεΐναση III και τη μυελουπεροξειδάση αντίστοιχα (3). Ο συσχετισμός αυτών των ELISAs με τον EA είναι καλός όσον αφορά την ποιοτική ανίχνευση θετικών ή αρνητικών για ANCA ορών. Πάσχει όμως στον ποσοτικό προσδιορισμό του τίτλου των ANCA ο οποίος διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις δύο τεχνικές (5).

#### cANCA: ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΦΥΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ

Η KW ανακαλύφθηκε σαν κλινικοπαθολογική οντότητα από τον Friedrich Wegener το 1939 (6). Η πάθηση αυτή στους περισσότερους ασθενείς προκαλεί αρχικά προσβολή του αναπνευστικού συστήματος. Στη φάση αυτή αν δεν επιβληθεί θεραπεία, η κατάσταση οδηγείται σε μία γενικευμένη αγγειίτιδα που καταλήγει σε νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα, και αγγειίτιδα των πνευμονικών τριχοειδών και μπορεί να απειληθεί η ίδια η ζωή του ασθενή. Σήμερα η διάγνωσή της γίνεται με ορισμένα κλινικά ευρήματα και ιστολογικά δεδομένα. Σε ορισμένους ασθενείς και ειδικά σε αυτούς με περιορισμένη μορφή της νόσου η διάγνωση είναι δύσκολο να γίνει. Τα cANCA αποτελούν ένα ειδικό εργαστηριακό διαγνωστικό τεστ για την KW. Η ειδικότητα των cANCA είναι 90% για ασθενείς, με ταυτοποιημένη με βιοψία, KW. Η ευαισθησία των cANCA σχετίζεται με την ενεργότητα της νόσου και είναι 50% για ασθενείς που βρίσκονται στην αρχική φάση ενώ κοντά στο 100% για ασθενείς με γενικευμένη νόσο.

Το αντιγόνο στόχος των cANCA προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1989 από τον Goldschmeding και συνεργάτες (7) σαν μία πρωτεάση της σερίνης η οποία βρίσκεται στα πρωτογενή κοκκιά των ουδετερόφιλων. Στη συνέχεια αυτή ταυτοποιήθηκε σαν την πρωτεΐναση (PR3) (8) ένα ελαστινολυτικό ένζυμο με μοριακό βάρος 29kD, 229 αμινοξέα και ισοηλεκτρικό σημείο 9.5. Η PR3 έχει μια μικρή αντιμικροβιακή δράση και έχει υποτεθεί πως τα αυτοαντισώματα μπλοκάροντας την PR3 κάνουν τα λευκοκύτταρα πιό ευάλωτα σε μόλυνση. Άλλο χαρακτηριστικό της PR3 είναι η πρωτεΐνολυτική της δράση. Οι πρωτεάσες της σερίνης από ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα φαίνονται τουλάχιστον μερικά υπεύθυνα για την ιστική βλάβη στην αγγειίτιδα και σπειραματονεφρίτιδα.

### pANCA: ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΦΥΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΑΝΤΙΓΟΝΟΥ

Πέρα από τον κυτταροπλασματικό τύπο ανοσοφθορισμού ένας δεύτερος περιπυρηνικός τύπος βρίσκεται με EA σε ουδετερόφιλα μονιμοποιημένα με αλκοόλη. Ο τύπος αυτός - που ονομάζεται pANCA οφείλεται στη μονιμοποίηση με αλκοόλη κατά την οποία βασικές (θετικά φορτισμένες) πρωτεΐνες μεταφέρονται προς τον αρνητικά φορτισμένο πυρήνα. Αν η μονιμοποίηση γίνεται με φορμαλδεΰδη τα pANCA δίνουν κυτταροπλασματικό (σαν τα cANCA) τύπο ανοσοφθορισμού. Επειδή παρόμοιος προς τον pANCA τύπος μπορεί να παρουσιαστεί λόγω αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) πρέπει η ύπαρξη των τελευταίων να αποκλείεται με επιπρόσθετη δοκιμασία EA σε υπόστρωμα σε HEP2 κυττάρων.

Τα pANCA σε αντίθεση με τα cANCA δεν είναι ειδικά για μια νόσο αλλά συσχετίζονται με ομάδες ασθενειών με κοινά κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά (9). Τα pANCA βρίσκονται σε (I) συστηματικές αγγειίτιδες όπως η οζώδης πολυαρτηρίτιδα και αλλεργική κοκκιωμάτωση, (II) νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα και σπανιότερα σε άλλες σπειραματονεφρίτιδες, (III) χρόνιες αυτοάνοσες νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, το σύνδρομο Sjogren's και (V) χρόνια φλεγμονώδη νόσο του εντέρου.

Το κύριο αντιγόνο στόχος των pANCA είναι η μυεολούπεροξειδάση (MPO). Τα MPO-ANCA βρίσκονται σε 60% της οζώδους πολυαρτηρίτιδας και νεκρωτικής σπειραματονεφρίτιδας. Ετσι, τα MPO-ANCA διευκολύνουν τη διάγνωση των παραπάνω ασθενειών. Ομως - σε αντίθεση με τα cANCA - δεν είναι καλά τεκμηριωμένη η συσχέτιση των pANCA με την ενεργότητα των παραπάνω νόσων. Η MPO μαζί με το  $H_2O_2$  αποτελεί ισχυρό μικροβιοκτόνο παράγοντα των κοκκίων των ουδετερόφιλων. Επιπρόσθετα, αντιγόνα στόχοι των pANCA είναι η ελαστάση (ΕΛ), η λακτοφερίνη (ΛΦ), η καθεψίνη G και η λυσοζύμη (10). Τα pANCA κατά αντιγόνων άλλων από την MPO παρουσιάζουν επίσης ενδισφέρον. Ετσι τα pANCA κατά της ΛΦ βρίσκονται στο 45% ασθενών με ρευματοειδή αγγειίτιδα, ενώ pANCA με άγνωστη αντιγονοειδικότητα βρίσκονται στο 30% των ασθενών με σύνδρομο του Felty.

### ANCA ΚΑΙ Η ΠΑΘΟΓΕΝΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΑΓΓΕΙΙΤΙΔΑΣ

Οι αγγειακές βλάβες που ανευρίσκονται στην KW και στις πολυαρτηρίτιδες που σχετίζονται με τα pANCA ομοιάζουν μορφολογικά και δεν μπορούν να διακριθούν (11). Επιπλέον, αν εξαιρέσουμε το κοκκίωμα η κλινική εικόνα της KW της οζώδους πολυαρτηρίτιδας είναι παρόμοια εφόσον προσβάλλονται μικρά αγγεία. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ένα κοινό ανοσοπαθολογικό μηχανισμό για τις δύο ασθένειες ο οποίος ο οποίος μπορεί να επάγεται από κοινά αυτοαντισώματα ANCA. Πρόσφατα

προτάθηκε ένα μοντέλο όπου τα ANCA και τα αντιγόνα στόχοι τους φέρονται σαν ο κύριος παθολογικός παράγοντας στην αγγειακή ιστική βλάβη (12,13). Το μοντέλο αυτό βασίζεται στα ANCA, στις κυτταροκίνες, στα μόρια προσκόλλησης, στις πρωτεΐνες των κοκκίων και στα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου. Τα αντιγόνα-στόχοι των ANCA εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και αντιδρούν με τα ANCA οδηγώντας σε ενεργοποίηση των πρωτεΐνων και κοκκίων και κυτταρική λύση η οποία είναι ίσως υπεύθυνη για τη νεκρωτική αγγειίτιδα. Τα επόμενα στάδια φαίνεται να συμβιώνουν στην παθολογική εξέλιξη:

- (I) Μόλυνση (ή κάποιος άγνωστος παράγοντας) προκαλεί παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκίνων (π.χ. TNF-α, IL-1, IL-8). In vitro έκθεση των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων (ΠΜΟ) σε TNF-α/IL-8 οδηγεί σε μετάθεση της PR3 από τον ενδοκοκκιακή της θέση στην κυτταρική επιφάνεια. Ετσι αυτή μπορεί να γίνει διαθέσιμη για τα ANCA in vivo.
- (II) Οι κυτταροκίνες επάγουν έκφραση των μορίων προσκόλλησης (π.χ. LFA-1, ICAM-1) τα οποία οδηγούν σε στενή επαφή των ΠΜΟ και της ενδοθηλιακής μονοστιβάδας. Επιπλέον πρόσφατα έχει δειχθεί in vitro ότι Fab<sub>2</sub> από ANCA αυξάνουν την προσκόλληση των ουδετερόφιλων σε ενδοθηλιακά κύτταρα.
- (III) Η ένωση των ANCA στην PR3 και σε άλλες πρωτεΐνες των κοκκίων που βρίσκονται στην επιφάνεια των ΠΜΟ αυξάνει την προσκόλληση ΜΠΟ-ενδοθηλιακών κυττάρων και προκαλεί ενεργοποίηση των ΠΜΟ να απελευθερώσουν τοξικές ουσίες στο άμεσο περιβάλλον τους. In vitro έχει δειχθεί ότι ουδετερόφιλα ενεργοποιημένα με ANCA προκαλούν βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα (12,14). Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στα ένζυμα των κοκκίων (π.χ. PR3, MPO) που μπορούν να ενωθούν λόγω των φορτίων τους στην μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και να προκαλέσουν βλάβη. Επιπρόσθετα, η ύπαρξη αντιγόνων-στόχων των ANCA στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλεί αναγνώρισή τους από τα ANCA τα οποία μπορούν να παρουσιάσουν κυτταροτοξικότητα μέσω συμπληρώματος.
- (IV) Επιπλέον μέσα στα αγγεία παρατηρείται και κυτταρική λύση των ενεργοποιημένων με ANCA ΠΜΟ.

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Τα ANCA αποτελούν ένα χρήσιμο κλινικό εργαλείο για τη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με KW και συστηματικές αγγειτιδες. Η μελέτη αυτών των αυτοαντισωμάτων υπέδειξε ένα ρόλο τους στην παθογένεση της μικροσκοπικής αγγειτιδας. Ετοι παραπέρα μελέτες τόσο των αυτοαντισωμάτων όσο και των αντιγόνων-στόχων τους μπορει να οδηγήσει σε κατανόηση της πορείας που οδηγει σε αυτοάνοση απόκριση κατά κοκκιωματικών πρωτεΐνων.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Davies DJ, Moran JE, Niall JF et al. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology. *Brit Med J* 1982; 2:606.
2. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 1: 425-9.
3. Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic antibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318: 1651-7.
4. Ludemann J, Utecht B, Gross WL. Laboratories methods for detection of antineutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Immunol News* 1990; 10: 159-66.
5. Wieslander J. How are antineutrophil cytoplasmic antibodies detected?. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 154-8.
6. Wegener F. Über generalisierte septische Gefäßerkrankungen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1936; 29: 202.
7. Goldschmeding R, van der Schoot DE, ten Bokken Huinink D et al. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1577-87.
8. Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM et al. Proteinase 3: a distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest* 1988; 82: 1963-73.
9. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated diseases: a rheumatologists perspective. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 157-79.
10. Lesavre P. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies antigen specificity. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 159.
11. Modesto A, Keriven O, Dupre-Goudable C et al. There is no renal difference between

- Wegener's granulomatosis and micropolyarteritis. *Contrib Nephrol* 1991; 94: 191-4.
12. Ewert BH, Lennette JC, Falk RJ. The pathogenetic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 183-95.
  13. Gross WL, Csernok E, Schmitt WH. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: immunobiological aspects. *Klin Wochenschr* 1991; 69-13: 558-66.
  14. Savage COS, Lockwood CM. Antineutrophil antibodies in vasculitis. *Adv Nephrol* 1990; 19: 225-35.