

Anti-Notrofil Sitoplazmik Antikorlar (ANCA) ve ilişkili Hastalıklar

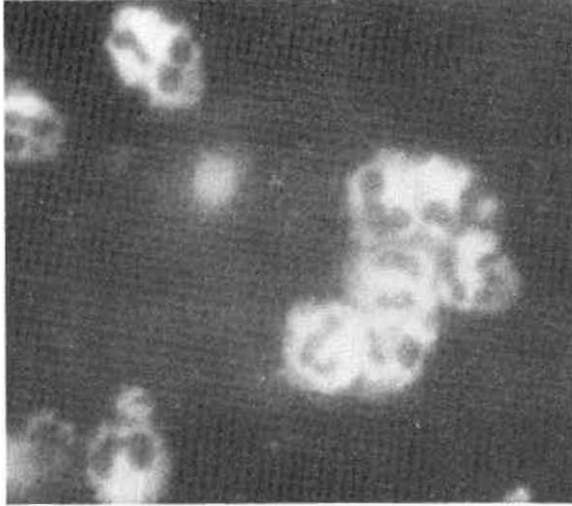
Yrd.Doç.Dr.A. Olcay AYDINTUĞ*

Anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar (ANCA), nötrofil granülosit ve monositlerin sitoplazmik elemanlarına karşı gelişmiş dolaşan otoantikorlardır. İlk defa 1964'de indirekt immün floresans (İİF) tekniğiyle normal insan granülositlerine spesifite gösteren bir antinükleer antikor (ANA) tanımlandı (1). Granülosit-spesifik ANA (GS-ANA) olarak adlandırılan bu otoantikorlar başlıca romatoid artritli hastalarda görülüyor ve lenfosit ya da HEP-2 hücreleriyle reaksiyon vermiyordu (2,3). Granülositlerde sitoplazmik boyanma (C-ANCA) ise ilk defa 1982'de segmental nekrotizan glomerülo nefritli 8 hastada bildirildi (4). Kısa bir süre sonra bu antikorların nekrotizan glomerülit yanısıra sistemik vaskülitli hastalarda da müsbet olduğu yayınlandı (5). Hollanda ve Danimarka'da yapılan ortak çalışmalar sonucunda, 1985 de ANCA'nın aktif Wegener granülomatozu (WG) için yüksek oranda sensitif olduğu ve hastalık aktivitesi için bir belirleyici olarak kullanılabileceği ileri sürüldü (6). Daha sonraki yıllarda, ANCA'nın, poliarteritis nodosa (PAN)'da ve ekstremitel tutulum olmadığı idiopatik nekrotizan kresentik glomerülo nefritlerde de müsbet bulunduğu bildirildi (7,8). Pek çok araştırmacının dikkatini çeken bu otoantikorlar değişik kollajen vasküler hastalıklarda araştırılmaya başlandı. Elde edilen verilerin sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi, ortak bir nomenklatür ve standart saptanması amacıyla 1988 (Kopenhag, Danimarka), 1989 (Leiden, Hollanda) ve 1990 (Washington DC, Amerika Birleşik Devletleri)'da, ANCA üzerinde 3 uluslararası simpozium düzenlendi. Bu makalenin amacı ANCA hakkında en son bilgileri aktarmak ve ANCA ile ilişkili hastalıkları gözden geçirmektir.

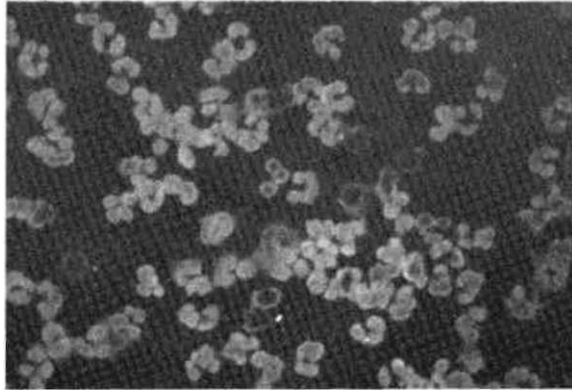
Alkolde fikse edilmiş normal insan nötrofilleri kullanılarak yapılan İİF mikroskopide ANCA, diffüz sitoplazmik (C-ANCA) ve perinükleer (P-ANCA) olmak üzere 2 değişik boyanma örneği gösterebilir (4,8,9) (Şekil 1,2). Perinükleer boyanma örneği, görünüm olarak GS-ANA'ya benzer ve aslında sun'i olup, substrat olarak alkolde fikse edilmiş nötrofiller yerine aseton-formalinde fikse edilmiş nötrofiller kullanılırsa, İİF mikroskopide tıpkı C-ANCA'da olduğu gibi diffüz sitoplazmik örnek gözlenir (8). Bu olayın sebebi, nötrofiller lam üzerinde kurutulurken, granül membranlarının permeabl hale geçmesidir. Alkolde batırılmadan önce formalin gibi proteinleri oldukları yerde fikse eden bir fiksatif konmazlarsa, miyeloperoxidaz (MPO), laktoferrin, elastaz, katepsin G ve bazik proteinler gibi solübl nükleofilik granül elemanları nükleusa doğru kayarak bağlanırlar ve sun'i perinükleer boyanmaya yol açarlar. Formalin fiksasyonuna rağmen devam eden perinükleer görünüm muhtemelen GS-ANA'ya bağlıdır. Gerçek bir ANCA örneği için lenfositlerde boyanma olmaması gerekir.

Sitoplazmik boyanmaya yolaçan ANCA'nın başlıca 29kd molekül ağırlığında bir serin proteinaz olan ve azürofilik granüllerde bulunan nötrofil proteinaz 3 (PR3) e karşı (10,11), perinükleer boyanmaya yolaçan ANCA'nın ise başlıca yine azürofilik granüllerde bulunan MPO'a karşı (8,9,12) spesifite gösterdiği bildirilmiştir. Proteinaz 3 literatürde myeloblastin, p29 veya AGP 7 olarak da bilinir (13). Referans laboratuvarına göre değişmek üzere C-ANCA'nın %70-100'ünün PR3 le reaksiyon verdiği bildirilmiştir (13). Üçüncü Uluslararası ANCA Workshop'ında bu antikorların PR3-ANCA olarak adlandırılmalarına karar verilmiştir (13). Proteinaz 3 ve MPO dışın-

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji BD, ANKARA



Şekil 1. Diffüz sitoplazmik boyanma örneği gösteren antinötrofil sitoplazmik antikorlar (C-ANCA)'m indirekt immün floresans mikroskopik görünümünü



Şekil 2. Perinükleer boyanma örneği gösteren antinötrofil sitoplazmik antikorlar (P-ANCA)'m indirekt immün floresans mikroskopik görünümü

da, başka granül elemanlarına karşı reaksiyon veren C-ANCA ve P-ANCA da vardır. Bunlar muhtemelen ANCA'nın %5'inden azını oluşturduklarından, diyagnostik ve patojenik rolleri çok iyi bilinmemektedir. Bu nadir antijenler içinde elastaz, katyonik antimikrobiyal protein 57 (CAP57), lactoferrin, katepsin G ve eozinofil peroksidaz sayılabilir (14,15). ANCA-müsbet serumların büyük çoğunluğu tek bir antijen için monospesifiktir. Dörtü ANCA pozitif serumun gözden geçirilmesi sonucunda bir olgu dışında, C-ANCA ve P-ANCA'nın birlikte mevcut bulunmadığı izlenmiştir (16). Nadir antijenlere karşı gelişen ANCA, nadiren PR3-ANCA veya anti-MPO ANCA ile beraber bulunabilmektedir (15). GS-ANA'larm antijen spesifitesi henüz tam olarak anlaşılacakla birlikte genel olarak ANCA aile-

sine ait oldukları kabul edilmektedir (15). ANCA boyanma örneği daha sonra üzerinde ayrıntılı olarak durulacağı gibi vasküler hasarın dağılımı ve tabiatıyla korelasyon gösterir. Klinik ve patolojik olarak saptanmış nekrotizan granümatöz hastalıkta C-ANCA sıklığı yüksekken, pauciimmün nekrotizan glomerulonefritlerde P-ANCA sıklığı yüksek olarak bildirilmektedir (9,17).

Anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar, İİF mikroskopisi (18) yanısıra, (RIA) (19), ELISA (8), flow sitometri (20), Western blotting, dot blotting ve immün nopenesipitasyon (21) ile de gösterilebilirler. RIA ve ELISA, İİF tekniğe göre daha sensitif ve daha az subjektiftir. Ancak nötrofil granülosit ekstralelerini elde etme yöntemine bağlı olarak, RIA ve ELISA'da, başka sitoplazmik ve bulaşmış nükleer elemanlarla reaksiyon veren otoantikorların da yakalanabilmesi ya da test edilen serumda mevcut olan ANCA'nın spesifitesinin plak kaplamada kullanılan farklı bir antijene karşı olabilmesi bir dezavantaj teşkil edebilir. Normalde İİF tekniğinde ANCA müsbet olan serumların %80-90'ının ELISA'da da, ELISA'da müsbet olan serumların, yaklaşık %90'ının İİF tekniğinde de müsbet olacağı, ancak hastalık aktivitesiyle ANCA arasındaki korelasyonun ELISA'da daha iyi olduğu bildirilmiştir (21).

Genel olarak pek çok laboratuvarında ilk tarama İİF ile yapılmakta ve müsbet olgularda antijenik spesifite ELISA ile kanıtlanmaktadır. Bu durum özellikle P-ANCA müsbet olgularda çok önemlidir çünkü P-ANCA örneği gerçek bir C-ANCA örneğini maskeliyor olabilir veya durum gerçek bir GS-ANA ya da tam bir ANA müsbetliği de olabilir. Böyle durumlarda ANCA'nın negatif olması gereken lenfositler kontrol edilmeli ve İİF, formalin fiksasyonu ile tekrarlanmalıdır. Formalin fiksasyonu ile MPO-ANCA örneği, P-ANCA'dan C-ANCA'a geçmiyor ve hala nükleer boyanma gözleniyorsa, gerçekten GS-ANA olma olasılığı yüksektir.

İndirekt immün floresans tekniği ANCA'nın tayini için önerilen standart yöntem aşağıdaki şekilde özetlenebilir (18):

Heparinli normal insan kanı, eşit miktarda methylcellulose (8 kısım, %2)-Hypaque (5 kısım, %34) karışımı üzerine tabakalandırılarak 40 dakika oda ısısında bekletilir. Supernatant, PBS içinde %1 insan serum albumini ile santrifüj edilerek 2 defa yıkanır. Kalan eritrositler 0.16M NH₄Cl ile eritildikten sonra, %2'lik trypan blue ile hücre canlılık oranının %90'ın üstünde olduğu kanıtlanır. 0.2-0.6X10⁶ hücre/ml olarak hazırlanan solüsyondan sitosantrifüj ile lamplara

nakledilen hücreler, 4°C'de, 5 dakika süreyle, %98 ethanol içinde tutulduktan sonra oda ısısında kurutulur. Tercihan 1/20(1/8-1/32 arasında değişebilir) oranında olmak üzere, PBS içinde dilüe edilmiş hasta serumları eklenen lamalar, 30 dakika süreyle rutubet çemberinde tutulur. İki kez PBS ile yıkanan lamalara, PBS içinde 1/25-1/50 dilüe edilmiş tavşan anti-insan polivalan immün globulin konjugat eklenerek 30 dakika beklenir. İki kez PBS içinde yıkanan lamalar, 2:1 gliserol-PBS karışımı ile kaplanıp, cam ile kapatıldıktan sonra, epiillüminasyonlu floresans mikroskopta, 400-700x'de değerlendirilir. Birlikte, bir pozitif kontrol ve bir de ANCA negatif olduğu saptanmış normal insan serumu çalışılır. Pozitif bulunan serumlar titrasyon takibine alınır. Her laboratuvar kendi standart pozitif kontrolünü Staten Serum Institute, Kopenhag, Danimarka'dan elde edilebilen bir standart kontrol ile karşılaştırarak saptayabilir.

Anca ile ilişkili Hastalıklar

Anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar, başlıca Wegener granülomatozu, klasik poliarteritis nodosa, mikroskopik poliarteritis (MPA), Churg-Strauss sendromu (CSS) ve idiopatik nekrotizan kresentik glomerülonefritli hastaların kanlarında müsbet olarak bulunur (4-6,8,9,19,22,23,24). Bir bütün olarak bakıldığında, ANCA ile ilişkili hastalıkların vasküler lezyonları, sadece böbreğe sınırlı hastalıktan çeşitli ekstrarenal katılımların gözlemlendiği WG, PAN, MPA ve CSS gibi sistemik vaskülitlere kadar ilerleyen bir dağılım göstermektedir (4-9, 17). ANCA ile ilişkili hastalıklar, tıpkı immün komplekslerle oluşan hastalıklar gibi, bazı ortak özelliklere sahip fakat birbirlerinden nisbeten farklı klinik ve patolojik özellikleri olan varyantlardır. Bu hastalıkların ortak patolojik özellikleri vasküler lezyonlar nerede olursa olsun (böbrek, akciğer, barsak, kas, deri vb) ve hangi damar tutulursa tutulsun (kapiller, venül, arteriol, arter, ven) aşağıdaki 4 özelliği taşıyan nekrotizan vaskülitin varlığıdır (9,25):

1. Damar boyunca segmental dağılım
2. Fibrinoid nekroz
3. Nötrofil istilası, karyoreksis, lökositoklasis
4. Lezyonlarda immün depolanmanın yok ya da çok az olması

İmmün depolanmanın gözlenmemesi ANCA ile ilişkili hastalıkların " Pauci-immün vaskülitler " olarak da adlandırılmalarına yol açmıştır (9). Pauci-immün nekrotizan vaskülitli hastaların yaklaşık %80'inin serumlarında ANCA müsbet bulunmuştur (9).

İster böbreğe sınırlı ister sistemik hastalık olsun ANCA müsbet hastaların glomerüler lezyonları aynı olup pauci-immün nekrotizan ve kresentik glomerülonefrittir. Ancak ANCA müsbet nadir bazı hastalarda, glomerüler tutulum yerine interstisyel nefrit gözlenebildiği de bildirilmiştir (26). Görülebilen diğer böbrek lezyonları nekrotizan arterit ve medüller peritübüler kapillerit (9). Nekrotizan arterit, kortikal infarktılara, peritübüler kapillerit ise papiller infarktılara yol açar. Renal biyopsilerinde nekrotizan arterit bulunan hastalarda C-ANCA ve P-ANCA sıklığı arasında fark gözlenmemiş olup, ANCA ile ilişkili glomerülonefriti olan hastaların %12'sinde böbrek biyopsilerinde nekrotizan arterit saptanmıştır (9).

Hastaların pek çoğu yukarıda sayılan bu hastalıklardan birine tam uygunluk göstermeyebilir. Bütün ortak özelliklerine rağmen ANCA ile ilişkili hastalıkların herbirinin ayrı ayrı kendilerine has bazı karakteristikleri vardır. Multinükleer dev hücreler ve granülömler WG için, eozinofili ve astma ise CSS için iyi birer örnektir.

ANCA ile ilişkili hastalıkların sınıflandırılması

1. Bu hastalıkların klinik ve patolojik özelliklerinin benzerlik göstermesi
2. Katılan bütün organ ve dokulardan biyopsi almanın güçlüğü
3. Aynı hastada zaman içinde vaskülit şeklinin değişebilmesi (Hasta hekimin karşısına önce sadece nefrit, bir kaç ay sonra lökositoklastik vaskülit ve en sonunda da hemorajik pulmoner kapillerit ile çıkabilir) nedeniyle güç ve karmaşıktır. Ancak klinik seyir ve tedaviye beklenen cevabın tahmini açısından iyi bir klasifikasyon çok gerekli gözükmemektedir. Bu nedenle 3. ANCA Simpozyumunda ön-çalışma karakterinde bir sınıflama önerilmiştir (Tablo 1) (23). Hastalığın kendini gösteriş tarzı, ANCA'nın spesifite-

Tablo1. Antinötrofil sitoplazmik antikorlar (ANCA) ile ilişkili vaskülitlerin III. İnternasyonel ANCA Simpozyumu İsimlendirme Komitesinin önerdiği şekilde sınıflandırılması

Wegener sendromu

- Wegener granülomatozu
- Sınırlı (Linüted) Wegener granülomatozu
- Wegener vaskülit
- Küçük damar vaskülit
- Mikroskopik poliarteritis nodosa
- Lökositoklastik anjütis
- Nekrotizan ve kresentik glomerülonefrit
- Churg-Strauss sendromu
- Klasik poliarteritis nodoza

si, izotipi ve afinitesi gibi bazı kalitatif ve kantitatif değişikliklerden etkilenebilir. Akciğerlerde biyopsiyle saptanmış nekrotizan granüloamatöz hastalığı bulunan hastalar C-ANCA müsbetliği gösterirken, böbreğe sınırlı hastalığı olan olguların daha ziyade P-ANCA müsbetliği gösterdikleri dikkat çekmiştir (8,9). P-ANCA müsbet glomerülonefritlerin yaklaşık %80-90'mda P-ANCA, MPO'a spesifik bulunmuştur (8,9).

ANCA ile kuvvetli ilişkisi olduğu gösterilen ilk hastalık WG'dur (6-11,27). Wegener granüloatozu, Godman ve Churg'un orijinal tarifinde, yaygın sistemik arteritis ve nekrotizan glomerülonefrit olarak tanımlanmıştır (28). Daha sonraları tarif edilen "sınırlı WG" ise belirgin böbrek hastalığı olmaksızın tipik solunum yolları lezyonları olan hastaları tanımlamaktadır (29). WG'nun tanımlanması gerek klinik çalışmaların değerlendirilmesi gerekse ANCA'nın, WG'daki sensitivite ve spesifitesinin tayininde çok önemlidir. Sistemik vaskülit ve nekrotizan glomerülonefrite ek olarak nazal ve/veya pulmoner mukozal kapillerit gibi vasküler inflamasyon belirtileri olmasına rağmen solunum sisteminde histolojik olarak nekrotizan granüloamatöz lezyonların gösterilemediği hallerin WG olarak kabul edilebileceği önerilmiştir (30). Bir çalışmada, pulmoner hastalık klinik olarak hemoptizinin varlığı veya radyolojik olarak nodul, kavite ya da infiltrasyon gibi her türlü pulmoner vaskülit işaretinin varlığı olarak kabul edildiğinde yani daha az kısıtlı tarife uygun olarak WG tanısı konduğunda C-ANCA ve P-ANCA sıklığı eşit bulunmuştur (31). Bir diğer çalışmada, ANCA, klasik aktif WG'da %99, sınırlı WG'da ise %65 oranında müsbet bulunmuştur (32). Yine de, C-ANCA müsbet hastaların 1/3'ü genişletilmiş kriterler uygulanılsa bile WG olarak kabul edilememiştir. Bu da, C-ANCA'nın sadece WG için spesifik olmadığına işaret etmektedir (31). Daha sıkı kriterler uygulandığında, C-ANCA daha yüksek sensitivite fakat düşük spesifiteye, genişletilmiş kriterlerin uygulanması ise C-ANCA'nın düşük sensitiviteye rağmen yüksek spesifite göstermesine yol açmaktadır (31). III. İnternasyonel ANCA simpoziumunda, sinüzit, akciğer infiltrasyonları, nefrit tablosu gösteren ve ANCA müsbet bir hastanın öncelikle Wegener sendromu öntanısı alması ve uygun tedavinin başlatılması önerilmektedir. Daha sonraki tetkikler sırasında histopatolojik olarak tipik granülomlar saptanırsa klasik Wegener granüloatozu, eğer sadece nongranüloamatöz vaskülit saptanırsa (örneğin hemorajik alveolar kapillerit gibi) Wegener vaskülit tanısı konması önerilmektedir (23).

Poliarteritis nodosa, değişik patolojik mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. Hastaların büyük çoğunluğunda vasküler immün depolanmaya rastlanılmamakla birlikte bazı olgularda immün komplekslerin varlığı immünohistolojik olarak gösterilmiştir (33). İmmün komplekslerin sorumlu gözüktüğü PAN olgularında ANCA müsbet bulunmamıştır (22). Klasik PAN'da ana viseral arterler etrafında gros olarak gözlenen nodüller yanısıra küçük arterler ve glomerüllerde mikroskopik vasküler inflamasyon mevcuttur. Ancak PAN'ın başlıca hatta sadece mikroskopik vasküler lezyonlarla gidebileceği, bol sayıda gros lezyonun müsbet olduğu hallerin nadir olduğu ve nodüllerin de sıklıkla trombüslerle dolu anevrizmalar olduğu anlaşılmıştır. Bu olgular için daha ziyade mikroskopik poliarteritis terimi kullanılmaktadır (34). Mikroskopik poliarteritisin tanımı nomenklatur karışıklığı yüzünden oldukça zor olmakla birlikte, klinik olarak en iyi "rapidly progressif glomerülonefrit=hızlı ilerleyen glomerülonefritler" ve patolojik olarak da segmental nekrotizan glomerülonefrit ile seyreden hastaları tanımlamak için kullanılabilir. Olguların %88'inde kresent gelişimi gözlenmiştir (34). Histopatolojik olarak lökositoklastik vaskülit gösteren purpura, hemoptizi ve alveolar kanama ile seyreden pulmoner hastalık, oral ülserler, sinüzit ve epistaksis ile kendini gösteren nazofarengeal katılım ve abdominal semptomlar sık rastlanan diğer belirtilerdir (9,34). Literatürde sıklıkla hipersensitivite vaskülitleri ve klasik PAN serileri içinde yer aldıkları gözlenmektedir. MPA'lı hastaların çoğu ANCA müsbetken, ANCA'nın klasik PAN ile ilişkisi o kadar açık değildir. Hem büyük hem küçük damar hastalığı olanlarda ANCA bazen müsbet olmakta, sadece büyük damar arteritlerinde ise menfi olabilmektedir (23).

Pauci-immün nekrotizan glomerülonefrit, WG ve PAN'ın bir elamanı olarak ortaya çıkabileceği gibi vasküler lezyonların sadece böbreklerde görüldüğü şekilde de karşımıza çıkabilir. Daha, ANCA müsbetliği gösterdiği bilinmeden önce bile glomerüler lezyonların benzerliği sistemik hastalık belirtileri göstermeyen bu antitenin sistemik nekrotizan vaskülitin böbreğe sınırlı şekli olduğu görüşüne yol açmıştı. Birlikte sistemik vaskülit olsun olmasın pauci-immün nekrotizan glomerülonefritli hastaların %80'inde ANCA müsbet bulunmuştur (8,9).

Churg-Strauss sendromu, anamnezde sıklıkla astma, allerjik rinit veya ilaç hassasiyetinin mevcut bulunduğu bir hastalık olup muhtemelen inhalana bir antijen ya da antijenlere karşı bir reaksiyon olarak öncelikle üst ve alt solunum yollarını tutar (35). Sık-

lıkla önceden migratuvar eozinofilik pnömoni hikayesi vardır. Hastalık ilerleme gösterdikçe, kümeler oluşturmuş nekrotik eozinofiller, mononükleer makrofajlar ve multinükleer dev hücrelerle çevrilererek CSS'unun esas lezyonu olan granülomlan oluşturur. Bu granülomlar çeşitli organların parankimlerinde, deride ve özellikle kan damarlarının duvarında bulunur. Ciddi doku hasarı olmasına ve tedavisiz kalan olgularda sonucun iyi olmamasına rağmen WG'nun aksine genelde kendi kendisini sınırlayan bir hastalık olarak kabul görmektedir.

ANCA ile ilişkili hastalıkların tedavisinde oral kortikosteroidlere ek olarak oral ya da intravenöz siklofosfamid kullanılmaktadır. Kortikosteroidlere ek olarak verilen siklofosfamid oral ya da intravenöz olması hasta süurvivinde farklılık yaratmamıştır (31). Ancak tek başına kortikosteroid ile tedavi konusunda henüz kesin bir fikir birliği yoktur.

Sistemik lupus eritematozus (36) ve colitis ülserozada (22) P-ANCA müsbetliği olduğuna dair yayınlar olmakla birlikte bunun anlam ve önemi henüz tam anlaşılammıştır. Henoch-Schönlein purpurası (37) ve IgA nefropatisinde de IgA-ANCA müsbet bulunduğu bildirilmiştir (38).

ANCA müsbetliğinin etyolojisi ve patojenezi belli değildir. Değişik patojenetik mekanizmalar ileri sürülmüşse de henüz Koch postulatının doldurulabileceği bir hayvan modeli bulunamamıştır. Ancak ANCA ile ilişkili hastalıklarda nötrofil yıkımına işaret eden karyoreksis ve nötrofil nekrozu siktir (39). Nötrofil yıkımı mı ANCA gelişmesine yol açmakta yoksa ANCA mı nötrofil yıkımına sebep olmakta ya da her iki mekanizma birlikte mi işlemekte henüz kesin olarak anlaşılammıştır. ANCA'nın etyopatogenetik rolü üzerinde aşağıdaki görüşler ileri sürülmüştür:

1. ANCA ile Nötrofil Aktivasyonu

İn vitro çalışmalarda ANCA-müsbet F(ab)₂ fragmanlarının nötrofil kemotaktik cevabını arttırdığı (40) ve her iki tip ANCA'nın da normal insan nötrofillerini aktive ederek oksidatif patlama ve degranülasyona yol açtığı gösterilmiştir (41). ANCA müsbet serumlar ve ANCA müsbet serumdan saflaştırılmış immün globülinler kontrollere göre anlamlı oranda fazla reaktif oksijen ürünü ve glukuronidaz ve N-acetyl—glucuronidase gibi granül enzimlerinin açığa çıkmasına sebep olmuştur. Bu etkinin nötrofiller önceden tümör nekrozis faktör (TNF) ile muamele edildiğinde daha da arttığı gözlenmiştir (41). ANCA ile karşılaştırılan nötrofillerden, ANCA'nın yöneldiği antijenler normalde aktive olmamış

nötrofillerin yüzeyinde değil sitoplazmik granüllerin içindedir. Nötrofil aktivasyonu için ANCA ile antijenleri arasında bir etkileşim gerekiyorsa ya ANCA'nın nötrofil içine girmesi ya da antijenin hücre yüzeyine çıkması gerekir. ANCA'nın nötrofillere girdiği gösterilmiştir (6). Normal nötrofiller, ANCA müsbet serum ile inkübe edildikten 10 saniye sonra, İİF ile antikorun nötrofil içinde saptandığı ve diffüz sitoplazmik boyanma örneği verdiği bildirilmiştir (6). Flow sitometrik (41) ve elektron mikroskopik (42) çalışmalarda da, sitokinlerle muamele edilmiş nötrofillerin yüzeyinde MPO ve PR3 varlığı gösterilmiştir. Bu da, nötrofillerin yüzeyinde ANCA ile reaksiyona girecek antijenlerin var olduğunu göstermektedir. Bütün bu veriler ANCA'nın, ilgili antijenleriyle şu ya da bu şekilde birleştiğine işaret etmektedir. Böylece hepsi de vasküler inflamasyon ve hasara yol açabilecek litik enzimler, toksik oksijen radikalleri ve lipid metabolitlerinin salıverilmesine yol açabilirler. Bu gözlemlere dayanarak Faik ve arkadaşları, ANCA'nın, invivo patojenik rolü olduğunu ileri sürmektedirler (41). Bu mekanizma, immün floresans ile böbrek biyopsilerinde saptanan immün depolanmanın azlığını hatta yokluğunu açıklayabilir. Ancak ANCA'nın hücre içine alınması ya da antijenlerinin hücre yüzeyine çıkmasının patojenetik önemi henüz belli değildir.

2. Endotel Hücre Hasarı

Monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar granulosis monosit, makrofaj ve vasküler endotelial hücrelerde ortak antijenler olduğunu göstermiştir. Bu yolla, ANCA, endotel hücrelerle bağlanarak da inflamasyonu başlatıyor olabilir. İn vitro çalışmalarda ANCA'nın, sitokinlerle uyarılmış nötrofilleri, insan kordon veni hücrelerine karşı hasar vermeye yönettği gösterilmiştir (43).

3. Hücreiçi Sinyal İletimi Üzerine Etkileri

ANCA'nın, nötrofil hücre içi sinyal iletimi üzerine etki ederek serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasına ve degranülasyona yol açabilecekleri düşünülmekte ve bu konuda çalışmalar özellikle Cambridge, İngiltere'de devam etmektedir (44,45).

4. Hücre Olgunlaşması Üzerine Etkileri

ANCA antijenlerinin inhibisyonunun hücre sel farklılaşma üzerine etkileri olabileceği de bildirilmiştir. HL-60 hücrelerinde, PR3 ekspresyonunun bloke edilmesi bu hücrelerin monosit tipi hücrelere başkalaşmasına yol açmıştır (46). Bu yolla PR3-ANCA'a maruz kalan immatür monositler olgun makro-

fajlara, bunlar da multinükleer dev hücrelere değişiyor olabilir. Bu mekanizma granüloamatöz hastalıkların neden PR3-ANCA müsbet hastalarda daha sık olduğunu da açıklayabilir.

5. Nötrofil Aktivasyonunda MPO FEEDBACK Mekanizmasının Bozulması

Normal nötrofil cevabında MPO'nun süperoksit yapımını ve proteaz salınımını kontrol edici nötralizan bir etkisi de vardır. Eğer MPO-ANCA, MPO'nun enzimatik etkisini inhibe ediyorsa, bu nötralizan mekanizma ortadan kalkacak ve kontrolsüz inflamasyon gelişecektir (40).

6. ANCA'm T Lenfositlere Etkisi

WG'lu hastalarda, serum solubl interleukin-2 reseptör (sIL-2R) düzeylerinin yüksek bulunması ve bu yüksekliğin hastalık aktivitesinin bir belirleyicisi olarak ANCA titrelerinden daha sensitif bulunması, T lenfosit aktivasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir (47). ANCA ile ilişkili hastalıkların patojenezinde T lenfositlerin rolü sitokin salınımıyla nötrofil ve monositlerin stimule edilip yüzeylerinde ANCA antijenlerinin belirmesi ve bunun da ANCA ile oluşan lökosit aktivasyonu yapması şeklinde olabilir. ANCA müsbet aktif WG'lu hastalardan alınan T lenfositler, nötrofil azürofilik granül ekstreleri ile karşılaştırıldığında T lenfositlerin proliferasyonuna olduğu gözlenmiştir. Aynı işlem nonnal kontrol ve ANCA menfi WG'lu hasta T lenfositleriyle tekrarlandığında böyle bir etki gözlenmemiştir. Bu tepkinin otoantikorun yapımı ve/veya yıkımı üzerinde bir rolü olup olmadığı henüz belli değildir (48).

İn vitro çalışmalarda elde edilen veriler ANCA ile oluşan hasarın muhtemelen aşağıda tanımlanan nodele uygun olacağını düşündürmektedir (49):

ANCA serumda mevcutsa vasküler inflamasyon için potansiyel var demektir. Ama doku hasarı için sadece ANCA'nın varlığı yetmez. O halde lokal ve/veya dolaşan sitokin düzeylerini arttıracak bir stimülasyona (priming) ihtiyaç vardır. Bu viral bir enfeksiyonun yapacağı gibi immün sistemin herhangi bir şekilde nonspesifik aktivasyonu olabilir. Enfeksiyonlar sırasında TNF yanısıra diğer sitokinler de dolaşıma salınırlar. ANCA müsbet hastalarda, bu sitokinler nötrofillerin in vivo aktivasyonuna neden olabilir. Nötrofiller bir kere hassaslaştıktan sonra granüller içinde tutulan ANCA antijenleri hücre yüzeyinde kendini göstererek, ANCA ile etkileşime girebilecek duruma gelmiş olurlar. Hücre yüzeyinde antijen-antikor birleşmesi nötrofillerin aktivasyonu ve doku hasarıyla sonuçlanır. Klinik gözlemler de bu

modeli desteklemektedir. Bu olasılık ANCA ile ilişkili hastalıkları olan kişilerde vaskülitik ve nefritik semptomların ortaya çıkmasından önceki dönemde sık olarak gözlenen (%94) "Flu-like illness" prodromunu da açıklayabilir (31). Davies, ANCA müsbet nekrotizan glomerülonefritli hastalarında, geçirilmiş arbovirus enfeksiyonunun serolojik bulgularını göstermiştir (4). Bu hastalıklarda, sitomegalovirus ve Hepatit B virusu ile enfeksiyonun rolü olabileceği de tartışılmıştır (33). Trimethoprim-sulphametoksazole'un WG'ndaki olumlu etkisi, ilacın immün suppressif etkisinden ziyade antibakteriyal etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Yine nekrotizan vaskülitte ait klinik semptomların mevsimsel özellik gösterdiği ve bu hastalıklara ait insidansın enfeksiyonların sık olduğu kış aylarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği bildirilmiştir (31). Bu araştırmaya göre semptomlar vakaların %11'inde yaz, %23'ünde sonbahar, %28'inde ilkbahar ve %38'inde kış aylarında başlamaktadır.

Klinik gözlemler, ANCA'nın tek başına bütün bu olaylar için yeterli olmadığını da göstermektedir. Aktif ve inaktif hastalığı olan bireyler arasında ANCA titreleri önemli ölçüde çakışma göstermektedir (6,31). ANCA müsbet hastalıklardan WG ile mikroskopik poliarteritis arasındaki patolojik farklılıkların sebebi henüz belli değildir. Granuloma oluşumu parçalanamayan bir antijenin dokuda sebat ettiğini düşündürmektedir. Bu da, antijenin vücuda giriş noktasında en belirgin olacaktır. Üst ve alt solunum yollarının kronik enfeksiyonları, WG'da MPA'e göre çok daha sıktır ve muhtemel antijen kaynağı olarak rol oynayabilir. Vücudun diğer yerlerindeki granülomlar ise kan kaynaklı moleküllerin depolanmasından ileri gelebilir.

Anti-Nötrofil Sitoplazmik Antikorların Önemi

ANCA müsbetliği hızla ilerleyen glomerülonefrite yolaçan diğer 2 önemli hastalığın (Goodpasture sendromu ve immün kompleks glomerülonefriti) ayırıcı tanısı açısından önem taşır. ANCA tayini çabuk tanı koyulması ve böylece tedaviye erken başlanması yanısıra tedavinin takibi ve etkinliğinin saptanması yönünden de klinisyene yardımcıdır.

İmmünesupresif alan hastalar enfeksiyonlara meyilli olduğundan ve bu enfeksiyonlar da sıklıkla üst ve alt solunum yollarını tutarak WG aktivasyonunu taklit edebildiğinden hastalık aktivitesinin objektif bir kriterinin olması faydalı olacaktır. ANCA düzeyleri hastalık aktivitesinin genellikle iyi bir göstergesi-

dir (6,19,50,51). ANCA düzeyleri, C-reaktif protein ile de iyi bir korelasyon gösterir (52). C-reaktif proteinin ise PAN'da hastalık aktivitesiyle müsbet korelasyon gösterdiği bilinmektedir (53). Otoantikör düzeyi genellikle tedaviyle ve hastalık aktivitesindeki azalmayla paralel olarak düşer. ANCA düzeyleri tamamen normale inmiş hastalarda nüks olmadığı ancak bazı hastalarda klinik remisyona rağmen anti-kör düzeylerinin yüksek kalabildiği ve yükselen anti-kör titresinin de her zaman klinik reaktivasyona işaret etmediği bildirilmiştir (31). Ancak bir çalışmada bütün nükslerden önce, ANCA titrelerinde

anamlı artış gözlenmiş, 1 olguda ise klinik belirti olmaksızın ANCA titresini yükselmiştir (50).

Bugün, araştırmacıların üzerinde çalıştıkları önemli bir nokta, ANCA ile ilişkili hastalıklar için, in vivo bir model bulup, çok yönlü analizler yapabilmektir. Antinötrofil sitoplazmik antikörlerin gelişme mekanizmaları ve vaskülit patojenezinde oynadıkları rolün tam olarak aydınlatılması, otoimmünite mekanizmalarına ışık tutmak yamsıra, ANCA ile ilişkili hastalıkların tedavisinde yeni ve daha az toksik yöntemlerin geliştirilmesine de katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Faber V, Elling P, Nonip G, et al. An antinuclear factor specific for leucocytes. *Lancet* 1966; 2:344-5.
2. Wiik A. Granulocyte-specific anti-nuclear antibodies. *Allergy* 1980;35:263-89.
3. Wiik A, Jensen E, Friis J. Granulocyte-specific antinuclear factors in synovial fluids and sera from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1974; 33:515-22.
4. Davies J, Moran JE, Naill JF, Ryan GB. Segmental necrotizing glomerulonephritis with antineutrophil antibody: Possible arbovirus activity? *Br Med J* 1982; 285:606-7.
5. Hall JB, Wadham B MeN, Wood CJ, et al. Vasculitis and glomerulonephritis: A subgroup with an anti-neutrophil cytoplasmic antibody. *Aust NZ J Med* 1984; 14:277-8.
6. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Cobatta S, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 425:9.
7. Lockwood CM, Bakes D, Jones S, et al. Association of alkaline phosphatase with an autoantigen recognized by circulating anti-neutrophil antibodies in systemic vasculitis. *Lancet* 1987; 716-20.
8. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescenting glomerulonephritis. *N Eng J Med* 1988; 318:1651-7.
9. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am J Pathol* 1989; 135:921-30.
10. Niles JL, Mc Cluskey RT, Ahmad MF, Arnaout MA. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood* 1989; 74:1888-93.
11. Ludeman J, Utrecht B, Gross WD. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastolytic enzyme. *J Exp Med* 1990; 171:357-62.
12. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, Elema JD, et al. Autoantibodies against myeloperoxidase in crescenting glomerulonephritis. *Kidney Int* 1989; 37:799-806.
13. Falk RJ, Jennette JC. The third workshop on antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:145-7.
14. Goldschmeding R, Van der Schoot CE, ten Bokkel 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.
15. Lesavre P. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies antigen specificity. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:159-63.
16. Dalia MR, Rasmussen N. Presentation of solid phase assays from several laboratories. *Netti J Med* 1990; 36:137-42.
17. Jennette JC, Falk RC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N Eng J Med* 1988; 319:1417.
18. Wiik A. Delineation of a standart procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1989; 97(Sppl6):12-3.
19. Savage COS, Jones S, Winearls CG, et al. Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet* 1987;1389-93.
20. Walis TL, Bonsib SM, Schuster VL. Co-existent Wegener's granulomatosis and antglomerular basement membrane disease. *Hum Pathol* 1987; 18:202-5.
21. Wieslander J. How are antineutrophil cytoplasmic autoantibodies detected. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:154-8.
22. Jennette JC, Falk RC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases: A review. *Am J Kidney Dis* 1990; 6:517-29.
23. Jennette JC, Falk RJ. Diagnostic classification of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculites. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:184-7.

24. Wathen CW, Harrison DJ. Circulating anti-neutrophilic antibodies in systemic vasculitis. *Lancet* 1987;1037.
25. Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated diseases: A pathologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:164-70.
26. Lockwood CM. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: The neplirologist's perspective. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:171-4.
27. Gros WL, Ludemann G, Kiefer G, et al. Anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1986;806.
28. Godman GC, Churg J. Wegener's granulomatosis. Pathology and review of the literature. *Arch Pathol* 1954; 58:533-53.
29. Carrington (S. Liebow AA. Limited forms of angitis and granulomatosis of Wegener's type. *Am J Med* 1966; 41:497-527.
30. Yoshikawa Y, Watanabe T. Pulmonary lesions in Wegener's granulomatosis: A cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and systemic vasculitis. *Ann Int Med* 1990; 113:656-63.
32. Ludeman J, Csernok E, Ulmer M, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis: Immunodiagnostic value, monoclonal antibodies and characteristics of target antigen. *Neth J Med* 1990; 36:157-62.
33. Ronco P, Verroust P, Mifinou F, et al. Immunopathological studies of polyarteritis nodosa and Wegener's granulomatosis. A report of 43 patients with 51 renal biopsies. *Q J Med* 1983; 52:212-23.
34. Savage COS, Winears CG, Evans DJ, et al. Microscopic polyarteritis: presentation, pathology and prognosis. *Q J Med* 1985; 56:467-83.
35. Lanham JG, Elkon KB, Pusey CD, et al. Systemic vasculitis with asthma and eosinophilia: A clinical approach to the Churg-Strauss syndrome. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63:65-81.
36. Nassberger L, Sjöholm AG, Jonsson H, et al. Autoantibodies against neutrophil cytoplasmic components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. *Clin Exp Immunol* 1990; 81:830-8.
37. Van der Wall Bake AWL, Lobatto S, Jongers L, et al. IgA antibodies directed against cytoplasmic antigens of polymorphonuclear leucocytes in patients with Henoch-Schonlein purpura. In Mestecky J et al eds. *Recent advances in mucosal immunology. Part B* New York. Plenum Press, 1987:1593-8.
38. Van der Wall Bake AWL, Daha MR, Van der Woude FJ, et al. IgA class antineutrophil cytoplasmic antibodies (IgA-ANCA) in primary IgA nephropathy. *APMIS* 1989; 97 (Suppl 6):25-6.
39. Pinching AJ, Rees AJ, Pussell BA, et al. Relapses in Wegener's granulomatosis; the role of infection. *Br Med J* 1980;281:836-8.
40. Ewert BH, Jennette JC, Falk RJ. The pathogenic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:188-95.
41. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:4115-9.
42. Caldas ML, Charles LA, Falk RJ, et al. Immunoelectron microscopic documentation of proteins reactive with ANCA to neutrophil cell surface during neutrophil activation. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:208.
43. Ewert BH, Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) stimulate neutrophils to injure endothelial monolayers in vitro. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:203.
44. Lai KN, Lockwood CM. Effect of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) on signal transduction in human neutrophils and HL-60 cells. *Kidney Int* 1990; 37:442.
45. Fujimoto T, Lockwood CM. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) activate protein kinase C in human neutrophils and HL-60 cells. *Am J Kidney Dis* 1991; 19:204.
46. Bories D, Raynay MC, Solomon DH, et al. Down-regulation of serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocyte leukemia cells. *Cell* 1989; 59:959-68.
47. Heesen C, Kekow J, Rautmann A, et al. Correlation of soluble interleukin-2 receptor levels with disease activity in Wegener's granulomatosis. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:205.
48. Peterson J, Rasmussen N, Szpirt N, et al. T lymphocyte proliferation to neutrophil cytoplasmic antigen(s) in Wegener's granulomatosis. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:205.
49. Jennette JC, Charles LA, Falk RJ. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: Molecular biology and pathophysiology. In Solez K (ed): *International review of experimental pathology* (ed 32). San Diego CA Academic, 1990:193-221.
50. Cohen Tervaert JW, Van der Woude FJ, Fauci AS, et al. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Int Med* 1989; 149:2461-5.
51. Halma C, Daha MR, Schrama E, et al. Value of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies and other laboratory parameters in follow-up of vasculitis. *Scand J Rheumatol* 1990; 19:392-7.
52. Ludeman G, Gross WC. Autoantibodies against cytoplasmic structures of neutrophil granulocytes in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 1987; 69:350-7.
53. Hind CRK, Savage CO, Winears CG, Pepys MB. Objective monitoring of disease activity in polyarteritis by measurement of serum C reactive protein concentration. *Br Med J* 1984;288:1027-30.