

## Famlyal Akdeniz Ateşinde (FMF) Anti-Nötrofil Sitoplazmik Antikorlar

Dr. Kamuran KONCA, Dr. Eren ERKEN, Dr. Süleyman ÖZBEK,  
Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları-İmmünoloji Bilim Dalı ANKARA*

✓ Anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar, belirlenmeleri için en iyi standard olarak kabul edilen immünofloresan teknikle, mikroskopik görünümüne göre, sitoplazmik (c-ANCA) ve perinükleer (p-ANCA) olmak üzere iki şekilde tanımlanmıştır. Sıklıkla pozitif buldukları pauci-immün nekrotizan vaskülitler dışında, diğer inflamatuvar hastalıklarda görünebilirler. Bu çalışmada, akut hecmde olan 21 FMF'li hastada, indirekt floresan antikor tekniğini kullanarak, anti-nötrofil sitoplazmik antikorların sıklığı araştırılmıştır. Aktif şikayetleri olan 21 FMF'liden oluşan hasta grubu ve 20 sağlıklı gönüllüden oluşan kontrol grubunda hiçbir pozitifliğe rastlanamazken, pozitif kontrol olarak alınan 22 aktif lupuslu hastada anti-nötrofil sitoplazmik antikorların oranı %59 bulunmuştur. Elde edilen veriler henüz sebebi bilinmeyen inflamatuvar bir hastalık olan FMF'de mutlak ANCA negatifliğinin, patogenezinin primer nekrotizan vaskülitlerden tamamen farklı bir mekanizma ile oluşmasına ve/veya patogenezin yöneldiği hedefin farklılığına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** FMF, Anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar.

✓ Antineutrophil cytoplasmic antibodies are defined as cytoplasmic (c-ANCA) and perinuclear (p-ANCA) with respect to microscopical appearance in indirect immunofluorescent assays which is the gold standard for their detection. They may be seen in other inflammatory diseases besides pauci-immune necrotizing vasculitides which exhibit a high incidence of positivity. We examined the prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a cohort of 21 FMF patients with acute attack by using indirect fluorescent antibody method. There was no positivity among the study group and controls which consisted of 20 healthy volunteers. We found 59% of antibody positivity among 22 active lupus patients taken as positive controls. The absolute negativity of ANCA in FMF, an inflammatory disease of unknown etiology, may depend on its pathogenetic diversity from primary necrotizing vasculitides and/or the different target tissues of which the disease process is directed.

**Key words:** FMF, Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies.

**N**ötrofillerin sitoplazmik yapılarına karşı antikorların oluştuğu ilk defa 1982 yılında nekrotizan glomerulonefritli hastalarda tanımlandı<sup>(1)</sup>. 1985 yılında bu antikorların Wegener Granulomatozuna ve nötrofillerin sitoplazmik antijenlerle karşı özgünlüğü gösterildi<sup>(2)</sup> Bu antikorların saptanmasında halen 'gold standard' olarak kabul edilen indirekt immünofloresan teknikle 2 morfolojik tip tanımlandı. Kronolojik olarak bunlardan ilki olan c-ANCA'nın Wegener Granulomatozuna yüksek oranda

sensitif ve spesitif olduğu gösterildi<sup>(1,3)</sup>. İmmünofloresan mikroskopta morfolojik olarak granülositlere spesifik antinükleer antikorlara (GS-ANA)<sup>(4)</sup> benzeyen görünüm veren p-ANCA'nın gerçekte nötrofillerin sitoplazmik komponentlerine karşı oluşan otoantikorlarla meydana geldiği, alkolle tespit sırasında katyonik granül proteinlerinin nükleusa yapışması ile 'artifaktüel' bir görünümün oluştuğu ileri sürüldü<sup>(5,6)</sup>,

Önceleri ANCA'nın Wegener granulomatozu, mikroskopik poliarteritis nodosa,

Churg–Strauss sendromu ve kresentik glomerulonefritlerin büyük kısmını kapsayan immün kompleks oluşturmeyen (pauci-immune) nekrotizan glomerulonefrite özel olduğu düşünülmüş ise de, daha sonraki çalışmalarla, değişik kollagen doku hastalıkları, inflamatuvar barsak hastalıkları ve bazı enfeksiyonlardaki da görüleceği anlaşılmıştır<sup>(7-13)</sup>.

Familiyal Akdeniz ateşi, genellikle Yahudi, Ermeni, Arap ve Türk kökenli kişilerde görülen, sebebi bilinmeyen, kalıtsal, rekürren, inflamatuvar bir hastalıktır. Bu hastalıkta supresör T hücresi anormallikleri, araziidonik asid lipoksigenaz metabolizma değişiklikleri ve kuvvetli bir anafilatoksin olan C5a'nın normal inhibitörünün yokluğu tarif edilmiştir<sup>(14,15)</sup> Bu çalışma primer nekrotizan vaskülitlerin patogeneğinde anafilatoksinlerin ve non-spesifik inflamasyonların önemli rolleri gözönüne alınarak, FMF'de de ANCA pozitifliği olup olamayacağını araştırmak amacı ile yapılmıştır.

#### GEREÇ ve YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji kliniğine başvuran hastalardan, semptom, bulgu ve laboratuvar verilerine göre FMF tanısı konan akut hecmedeki 21 hasta (16 kadın, 5 erkek) çalışma kapsamına alındı. Hastaların yaş ortalaması 29.8 (6–59, SD= 11.1) idi. Kontrol grubu 20 sağlıklı gönüllü (16 kadın, 4 erkek) ve 1982 yeniden gözden geçirilmiş ARA kriterlerine göre tanısı konan aktif lupuslu 22 hastadan (19 kadın, 3 erkek) oluştu. Sağlıklı kontrollerin ve lupuslu hastaların yaş ortalaması sırasıyla 30.5 (18–43, SD=6.9) ve 29.5 (19–46, SD=7.4) idi. Hasta ve kontrol gruplarından alınan serum örnekleri –70 derecede saklandı ve çalışma öncesinde değerlendirmeye katılmayan bir kişi

tarafından karışık sıralamayla kodlandı.

Sağlıklı bir kişiden alınan heparinize kandan dansite gradienti (Ficoll–Hypaque, 1077, Sigma) ve dextran (ortalama molekül ağırlığı 162.000, Sigma) sedimantasyonu ile daha önce tanımlanmış bir metodu modifiye ederek hazırlanan nötrofil süspansiyonu, militrede,  $5.10^6$  hücre olacak şekilde ayarlanıp sitosantrifüj slaytlarında her göze 10 mikrolitre konarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra 5 dakika süre ile mutlak alkolde tespit edilip kullanılacakları zamana kadar –70 derecede saklandı<sup>(16)</sup>.

Floresan boyama için, slaytlar önce 1/20 oranında dilüe edilmiş serum örneklerinden otuzar mikrolitre ile, daha sonra da aynı miktarda 1/50 dilüe FITC ile işaretli koyun anti-insan IgG ile yarımşar saat süreyle inkübe edildi. Her iki inkübasyondan sonra 15'er dakika süre ile magnetik karıştırıcı içinde PBS ile yıkayıp, kurumadan, tamponlanmış (pH 7.5) gliserinle kapatılarak iki ayrı gözlemci tarafından değerlendirildi.

#### BULGULAR

FMF hastalarının bazı klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. FMF'li hasta ve kontrol gruplarının verileri Tablo 2'de özetlenmiştir. İndirekt floresan antikor tekniği ile c-ANCA, p-ANCA ve atipik şekilleri (x-ANCA) gözönüne alınarak yapılan değerlendirmede; negatif kontrol grubu ve FMF'li hasta grubunda hiç pozitifliğe rastlanmamıştır. Pozitif kontrol grubunu oluşturan lupuslu 22 hastadan 13'ünde (%59) p-ANCA pozitif bulunmuştur. Bu değerlerin yapılan istatistiksel analizinde çalışma ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları (Mann–Whitney z–testi) ve cinslerin frekansları (Fisher'in khi-kare testi) arasında önemli fark bulunmadığı ( $p>0.01$ );

Tablo-1 : FMF hastalarının bazı klinik özellikleri

Vaka No.	Yaş	Cins	Aile Öyküsü	Hastalık Süresi	Karın Ağrısı	Ateş	Eklem Ağrısı	BK <sup>2</sup>	Sed. Hızı <sup>3</sup>	CRP <sup>4</sup>
1	22	K	+	18	+	+	+	+	+	+
2	26	K	-	5	+	+	+	+	+	+
3	6	K	-	2	+	+	+	+	+	+
4	59	K	-	9	+	+	+	+	+	+
5	22	E	-	6	+	+	+	+	+	+
6	43	K	-	27	+	+	+	+	+	+
7	28	E	-	11	+	+	+	-	+	-
8	34	K	+	24	+	+	+	-	+	+
9	23	K	-	7	+	+	+	+	-	?
10	38	E	+	8	+	+	+	+	+	+
11	30	K	-	6	+	+	+	+	+	-
12	21	K	-	6	+	+	+	+	+	+
13	29	K	+	9	+	+	+	+	+	-
14	31	K	+	7	+	+	+	+	+	-
15	18	K	-	14	+	+	+	+	+	+
16	34	E	-	18	+	+	+	+	+	-
17	46	K	-	6	+	+	+	+	+	-
18	30	K	+	8	+	+	+	+	-	+
19	23	E	+	13	+	+	-	+	+	-
20	37	K	+	32	+	+	+	+	+	-
21	28	K	-	12	+	+	+	-	+	+

<sup>1</sup> Hastalık süresi yıl olarak

<sup>2</sup>BK: Lökosit Sayımı, 8000/mm<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Sedimentasyon Hızı, 20 mm/saat

<sup>4</sup>CRP: C-reaktif protein, 6 mg/dl üzerinde olan değerler + ile gösterildi

K: Kadın; E: Erkek

**Tablo-2** : Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları, erkek, kadın, ANCA pozitifliği ve ANCA negatifliği frekansları

	Ortalama Yaş	Erkek	Kadın	ANCA (+)	ANCA (-)	Toplam
FMF	29.8	5	16	0	21	21
SLE	29.5	3	19	13	9	22
KONTROL	30.5	4	16	0	20	20

ANCA pozitifliği ve negatifliği bakımından Fisher'in kesin khi-kare testi ile yapılan istatistiksel analizde, FMF ve lupuslu hasta grubu arasındaki farkın önemli ( $p=0.000007$ ,  $p<0.01$ ); lupuslu kontrol grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki farkın önemli ( $p=0.000001$ ,  $p<0.01$ ); ve FMF grubu sağlıklı kontrol grubu arasındaki farkın önemsiz ( $p=1$ ,  $p>0.01$ ) olduğu görülmüştür.

### TARTIŞMA

Pauci-İmmün nekrotizan vaskülitlerin patogenezi ANCA'nın önemli bir rolü vardır. Azalmış olan self toleransın etkisi ile nötrofillerin granül proteinlerine karşı meydana gelen otoantikorlar, nonspesifik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan proinflatuar maddelerin (sitokinler, bakteriel formilli peptidler ve C5a gibi kompleman komponentleri etkisiyle aktive olan (primed) nötrofillerin yüzeylerinde ekspres edilen proteazlara bağlanarak lökositlerin stimülasyonu ve degranülasyonuna neden olurlar<sup>(17,18)</sup>. Vaskülitlerde arttığı bilinen intravasküler bölgedeki nötrofil nekrozu bu mekanizmaya bağlanmaktadır. Bu şekilde açığa çıkan proteazlar yeni otoantikorların meydana gelmesine yol açarak bir fasit döngüye neden oldukları gibi, venül ve arteriol düzeyinde vasküler patolojiyi de

başlatırlar<sup>(19)</sup>. Katyonik yapıdaki proteazların anyonik endotel hücresi yüzeyine yapışması, bu hücrelerin de aktive olarak CD11/CD18 integrin reseptörleri aracılığı ile nötrofillerle adhesiv ilişkiye girmesine ve ayrıca ANCA tarafından tanınarak bağlanmaları sonucu oluşan immün komplekslerin başlattığı kompemana bağlı harabiyetine neden olmaktadır<sup>(20,21)</sup>. Bu spesifik patogenetik olaylara proinflatuar maddelerin açığa çıkmasına neden olan nonspesifik inflamasyonlarını yol açtığı düşünülmektedir<sup>(22)</sup>. Bunu kanıtlayıcı bir örnek olarak Wegener granulomatosis'i gösterilmiştir. Bu hastalık önceleri üst solunum yollarının nonspesifik enfeksiyonları şeklinde iken (lokalize hastalık dönemi) daha sonra granülomatöz değişiklikler ve vaskülit ortala çıkmaktadır (yaygın hastalık dönemi)<sup>(23)</sup>.

FMF'in patogenezi ise normal inhibitörünün bulunmaması nedeniyle seröz membranlarda biriken C5a'nın kuvvetli bir anafilatoksin olması yüzünden bu dokulara yönelik inflamatuvar bir reaksiyon başlatması ile açıklanmaktadır<sup>(15)</sup>. Bu özelliği ile FMF vaskülit patogeneziindeki iki önemli unsurdan birini içermesine rağmen ikincisini yani self toleransın azalmasına bağlı olarak otoantikor yapılması

özelliğini, bu hastalıkta da bazı T hücre fonksiyon bozuklukları bulunmasına rağmen göstermediği anlaşılmaktadır<sup>(14)</sup>. Yani self intoleransın yöneldiği hedefler farklıdır. Burada endotel hücrelerinin vasküler patoloji ve ANCA oluşumunda önemli ve spesifik bir rollerinin olması da düşünülebilir. Ülseratif kolit gibi yüksek oranda ANCA pozitifliği ile birlikte seyreden bazı hastalıklarda ANCA'nın hastaların birinci dereceden akrabaları arasında da sağlıklı kontrollardan daha yüksek oranda bulunması bu otoantikorların ekspresyonunda HLA antijenleri ve bazı genomik faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmesine rağmen FMF'in hiçbir HLA antijeni ile ilişkisi tanımlanmamıştır<sup>(24)</sup>.

Sonuç olarak ANCA ile ilişkili vaskülitlerin patogenezi önemli etkisi olan C5a gibi bir proinflatuar madde artışı ile birlikte olmasına rağmen FMF'de ANCA'nın negatif bulunması self toleransın azalması ile sonuçlanan fonksiyonel T hücre anormalliğinin bu hastalıkta meydana gelmemesine ve/veya HLA ve immün cevap genlerini de kapsayan henüz tanımlanmamış bazı genomik faktörlerin kısıtlayıcı etkisine bağlı olabilir.

**Geliş Tarihi:** 08.12.1995

**Yayına Kabul Tarihi:** 04.04.1996

#### KAYNAKLAR

1. Davies D, Moran ME, Niall JF, Ryan GB: Segmental gloerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus etiology. *Br Med J* 1982; 285: 606.
2. van der Woude FJ, Rasmussen N, Blo-batto 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. Tervaert JWC, van der Woude F, Fauci et al: Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch intern Med* 1989; 149:2461-6.
4. Wiik A: Granulocyte specific antinuclear antibodies. *Allergy* 1980; 35:263-89.
5. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318:1651-7.
6. Charles LA, Falk RJ, Jennette RJ. Reactivity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with HL-60 cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53:243-53.
7. Braun MG, Csernok E, Schmitt WH, Gross WL. Incidence and specificity of p-ANCA in rheumatic diseases. in Gross WL (ed): ANCA-Associated Vasculitides: Immunological and Clinical Aspects. Plenum Press, New York 1993; 371-4.
8. Waldendorf M, Schneider M. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. in Gross WL (ed): ANCA-Associated Vasculitides: Immunological and Clinical Aspects. Plenum Press, New York 1993; 381-4.
9. Saxon A, Shanahan F, Landers C, et al. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86:202.

10. Klaassen RJL, Goldschmeding R, Dolmann KN, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with systemic HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1992; 87:24-31.
11. Efthimiou J, Spickett G, Lane D, Thompson A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies, cystic fibrosis and infection. *Lancet* 1991; 1:1037-388.
12. Mege JL, Escallier JC, Capo C, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and infection. in Gross WL (ed): ANCA-Associated Vasculitides : Immunological and Clinical Aspects. Plenum Press, New York 1993; 353-6.
13. Gallicchio MC, Savige JA. Detection of Anti-myeloperoxidase Anti-elastase Antibodies in vasculitides and Infections. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:232-7.
14. Ilfeld D, Weil S, Kuperman O. Immunoregulatory Abnormalities in familial Mediterranean fever. *Clin Immunol Immunopathol* 1981; 18:261-7.
15. Matzner Y, Brezezinski A. C5 inhibitor deficiency in peritoneal fluids from patients with familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1984; 311:287-90.
16. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1989; 97 (Suppl 6):12-3.
17. Lockwood CM. Specificity and pathogenicity of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Exp Nephrol* 1993; 1:133-18.
18. Jennette JC, Falk RJ. Pathogenetic potential of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. in Gross WL (ed): ANCA-Associated Vasculitides: Immunological and Clinical Aspects. Plenum Press, New York 1993; 7-15.
19. Frampton G, Jayne DRW, Perry GJ, et al. Autoantibodies to endothelial cell and neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1990; 82:227-332.
20. Keogan MT, Rifkin I, Rona N, et al. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) increase neutrophil adhesion to cultured human endothelium. in Gross WL (ed): ANCA-Associated Vasculitides: Immunological and Clinical Aspects. Plenum Press, New York 1993; 115-9.
21. Savage COS, Gaskin G, Pusey CD, et al. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) can recognize vascular endothelial cell-bound ANCA-associated autoantigens. *J Exp Nephrol* 1993; 1:190-5.
22. Csernok E, Ernst M, Schmitt WH, et al. Translocation of PR-3 on the cell surface of neutrophils: Association with disease activity in Wegener's Granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1991; 34:79-82.
23. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. ANCA and associated diseases: immunodiagnostic and pathogenetic aspects. *Clin Exp Immunol* 1993; 91:1-12.
24. Shanahan F, Duerr RH, Rotter JI, et al. Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 1992;