หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ANCA

ประวัติ

ได้มีการค้นพบ ANCA ในปี 1982 (Davies และคณะ ,1982) ได้ตรวจคนไข้ 8 รายมีอาการปวดกล้ามเนื้อ (myalgia), ปวดข้อ (arthralgia) พร้อมกับมีการตรวจพบว่ามีไตอักเสบ(nephritis) ในคนไข้ทั้งหมดนี้ 4 รายมีอาการไอเป็นเลือด เหนื่อยหอบ เมื่อนำน้ำเหลืองของคนไข้เหล่านี้มาทำปฏิกิริยากับนิวโทรฟิลด้วยวิธี indirect immunofluorescent (IIF) พบว่ามีการเรืองแสงเกิดขึ้น แสดงว่าในน้ำเหลืองของคนไข้ทั้ง 8 รายนี้ มีแอนตีบอดีต่อนิวโทรฟิลอยู่ ได้ทำการตรวจพยาธิสภาพของไต พบว่าเป็น necrotizing segmental crescentic glomerulonephritis โดยไม่พบหลักฐานการเกาะตัวของ immune complex หรือ glomerular basement membrane คนไข้ทุกรายได้รับการรักษาด้วย corticosteroid ร่วมกับ cyclophosphamide หรือ azathiopine อย่างใดอย่างหนึ่ง ผู้รายงานได้ให้คำอธิบายว่า คนไข้เหล่านี้ซึ่งอยู่ทางตอนใต้ของประเทศออสเตรเลีย มีการติดเชื้อ arbovirus ซึ่งเป็นเชื้อที่ระบาดในท้องถิ่นนั้นเป็นสาเหตุของการเกิดโรค และการเกิดแอนตีบอดีต่อนิวโทรฟิลนั้นเป็นปรากฏการณ์ที่พบร่วมกันในช่วงที่คนไข้มีอาการของโรค

รายงานนี้จึงเป็นรายงานแรกที่ตรวจพบแอนตีบอดีต่อซัยโตพลาสซึมของนิวโทรฟิล(ANCA) ร่วมกับมีอาการทางคลินิกเกิดการอักเสบของไตชนิด crescentic glomerulonephritis (CGN) ที่พบว่าไม่มี immune complex มาเกาะอยู่ซึ่งต่างจากคนไข้ปกติโดยทั่วไป

สองปีต่อมา (Hall และคณะ, 1984) ก็มีการตรวจพบแอนตีบอดีต่อนิวโทรฟิลนี้ในคนไข้ 4 รายที่เป็นโรคหลอดเลือดอักเสบชนิด systemic vasculitis เกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดอักเสบในหลาย

ระบบเช่น ปอด ไต กล้ามเนื้อและกระดูกรวมทั้งที่ผิวหนังโดยไม่มีการตรวจพบของ immune complex เกาะอยู่ที่พยาธิสภาพของอวัยวะต่าง ๆ เหล่านั้น

ในปี 1985 (van der Woude และคณะ, 1985)ได้รายงานการศึกษาที่ทำในประเทศเนเธอร์แลนด์และเดนมาร์ก พบว่า ANCA นี้มีความสัมพันธ์กับโรค Wegener 's granulomatosis (WG) ซึ่งขณะนั้นผู้วิจัยเรียกแอนติบอดีนี้ว่า anticytoplasmic antibodies (APCA) ตรวจพบ APCA ในคนไข้ 25 รายจากทั้งหมด 27 รายที่เป็นโรคนี้ในระยะเฉียบพลันและพบเพียง 4 รายจากทั้งหมด 32 รายของโรคนี้ในระยะสงบของโรค โดยตรวจไม่พบ ANCA ในคนที่บริจาคเลือด 500 รายและในกลุ่มควบคุม 190 รายที่ป่วยด้วยโรคต่าง ๆ จากผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า ความไวและความจำเพาะของ ACPA ต่อโรค WG ระยะเฉียบพลันสูงมาก และยังนำมาใช้เป็นตัวแสดงถึง disease activity ได้เป็นอย่างดี โดยในปีเดียวกัน ก็มีรายงานสนับสนุนในทำนองเดียวกัน (Rasmussen และคณะ,1985)

ในปี 1986 (Gross และคณะ, 1986) มีรายงานสนับสนุนว่า ANCA มีความไวต่อโรค WG มาก และยังพบว่าระดับของ ANCA มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (Ludemann และคณะ, 1986)(Nolle และคณะ,1986)

ในปี 1987 ตรวจพบ ANCA ในคนไข้ที่เป็นโรค microscopic polyarteritis nodosa (Lockwood และคณะ ,1987)(Savage และคณะ,1987) ในปีเดียวกันนี้ พบว่า ANCA มีความสัมพันธ์กับ Churg-Strauss syndrome (Wathen และ Harrison,1987) พบว่า ANCA มีประโยชน์ทางคลินิกในการเฝ้าดูอาการและการประเมินผลทางพยาธิสภาพของอวัยวะต่าง ๆ แต่ยังเป็นการยากที่จะจัดคนไข้ที่พบ ANCA ว่าเป็นในโรคกลุ่มไหนของ systemic vasculitis (Parvevleit และคณะ ,1987)

ในปี 1988 (Falk และคณะ,1988) พบความสัมพันธ์ระหว่าง ANCA กับ polyarteritis nodosa, necrotizing glomerulonephritis, crescentic glomerulonephritis โดย

ไม่พบว่ามีการลุกลามถึงอวัยวะส่วนอื่น และการตรวจพยาธิสภาพไม่พบว่า immune complex เกาะอยู่ที่หลอดเลือดที่เคยเข้าใจว่าจะสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพ และมีผู้สนับสนุนรายงานในทำนองเดียวกัน (Walters และคณะ, 1988)

International Workshops on ANCA

ได้มีการจัดประชุมร่วมกัน เพื่อศึกษาเกี่ยวกับ ANCA ในปี 1988 รวบรวมผู้ที่สนใจใน ANCA จัดเป็น International Workshops on ANCA โดยครั้งแรกจัดที่ โคเปนเฮเกน ประเทศ เดนมาร์ก ได้มีการแลกเปลี่ยนความรู้และข่าวสาร ถกเถียงซึ่งนำมาในข้อตกลงได้ในเรื่องวิธีการและขบวนการมาตราฐานในการตรวจหา ANCA โดยวิธี indirect immunofluorescent (IIF) โดยให้ใช้วิธีการ fix วัตถุดิบซึ่งได้แก่ นิวโทรฟิลของคนปกติด้วย ethanol (Wiik ,1988)

ในการประชุม International Workshops on ANCA ได้จัดขึ้นเป็นครั้งที่สองในปี 1989 ที่ Noordwijkerhout ประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้เน้นเรื่องการตรวจหา ANCA ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) การค้นหาแอนติเจนที่เป็นสาเหตุให้เกิด ANCA มีการนำเสนอข้อมูลของคนไข้ทางคลินิกจากศูนย์การแพทย์ต่าง ๆ ซึ่งกล่าวถึงความไวและความจำเพาะของ ANCA และได้มีการแยกชนิดของ ANCA ออกเป็น 2 subtypes โดยวิธี IIF

การประชุมครั้งที่สามจัดที่ วอชิงตัน ดี.ซี. ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1990 มีการประชุมใน 4 หัวข้อใหญ่คือ

1. วิธีการตรวจหา ANCA
2. แอนติเจนที่จำเพาะต่อ ANCA
3. โรคที่จำเพาะต่อ ANCA
4. กลไกการก่อพยาธิสภาพของ ANCA

จากที่ประชุมมีความเห็นตรงกันในการจัด classification ของกลุ่มหลอดเลือดอักเสบใหม่ ตามที่ได้มีข้อมูลใหม่เพิ่มเติมหลังจากมี

การตรวจพบ ANCA ในกลุ่มโรคต่าง ๆ โดยแยกเป็นกลุ่มโรคหลอดเลือดอักเสบที่มี ANCA และ กลุ่มโรคที่ตรวจไม่พบ ANCA

ประเภทของ ANCA

จากการตรวจย้อมด้วยวิธี indirect immunofluorescent (IIF) สามารถพบการติดย้อม fluorescene เป็น 2 ลักษณะแตกต่างกันออกไป ตามลักษณะการทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในซัยโตพลาสซึมของนิวโทรฟิล

1. C-ANCA (classic antineutrophil cytoplasmic antibody) ให้การเรืองแสงเป็นเม็ดละเอียด (granular) กระจายอยู่ทั่วไปในซัยโตพลาสซึม โดยจะเห็นนิวเคลียสเป็นส่วนมืดเด่นชัดขึ้น (ตามรูปที่)

2. P-ANCA (perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody) ให้ลักษณะการเรืองแสงรอบ ๆ นิวเคลียส เห็นเป็นก้อนเรืองแสงชัดเจน (ตามรูปที่)

การที่เกิดเห็นเป็นลักษณะเรืองแสง 2 รูปแบบนั้นอธิบายได้ดังนี้คือ ตามปกติแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ของ ANCA อยู่ใน azurophilic granule ของนิวโทรฟิลแต่ระหว่างการ fixed ด้วย ethanol ทำให้ granule ของนิวโทรฟิลแตกออก แอนติเจนที่ให้ลักษณะของ P-ANCA เช่น MPO เป็นโปรตีนที่เป็นด่าง (positively charged) เคลื่อนย้ายไปหาประจุลบที่นิวเคลียสและไปเรืองแสงที่นั่น เหตุการณ์นี้จะไม่เกิดกับแอนติเจนของ C-ANCA และเมื่อ fix นิวโทรฟิลด้วย formalin ก็จะไม่พบลักษณะของ P-ANCA

เมื่อนำ C-ANCA มาทำการตรวจสอบพบว่าเป็น immunoglobulin ชนิด G เป็นส่วนใหญ่ (Davies และคณะ, 1982) (van de Woude และคณะ, 1985) มีการพบเป็นชนิด Ig M บ้าง ในกลุ่มคนไข้ที่มีอาการของ pulmonary hemorrhage และ rapidly progressive glomerulonephritis (Penning และคณะ, 1988) ใน

subclass Ig G นั้นพบว่าส่วนใหญ่เป็นชนิด G_1 และ G_4 ส่วนชนิด G_2 และ G_3 พบได้บ้างแต่น้อยกว่า และส่วนใหญ่ของ ANCA สามารถ fix complement ได้ทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อ เป็นสิ่งที่แสดงว่า ANCA มีความสำคัญในพยาธิกำเนิดของกลุ่มโรคหลอดเลือดอักเสบ และยังพบอีกว่าในช่วงระยะเฉียบพลันของโรคยังพบสัดส่วนของ G_3 มากกว่า subclass อื่นด้วย

ส่วนชนิดของ immunoglobulin ของ P-ANCA ปัจจุบันยังไม่มีรายงานกล่าวถึง

แอนติเจนที่จำเพาะต่อ ANCA

จากวิธีการสกัดเอาส่วนประกอบ ของนิวโทรฟิล (Borregaard และคณะ, 1989) โดยนำเลือดมาปั่นแยกนิวโทรฟิลด้วย percoll hyplaque ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี Nitrogen-bomb cavitation นำส่วนที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ C-ANCA พบว่ามีการจับตัวกับส่วนประกอบของเซลล์ที่มีความหนาแน่นระหว่าง primary และ secondary granules ของ granulocytes และไม่ทำปฏิกิริยากับ specific granule, plasma membrane และ cytosol ของ granulocyte ผลการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนในการประชุม international Workshop on ANCA (Goldschmedding และคณะ, 1989)

การค้นคว้าวิจัยต่อมามีการตรวจหาแอนติเจนของ ANCA โดยวิธีต่าง ๆ เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot, subcellular fractionation, protein purification, aminoacid และ DNA sequencing สามารถสรุปได้ว่า แอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับ ANCA ได้แก่ proteinase 3 (PR3) และ myeloperoxidase(MPO) พบได้ใน 95% ของคนไข้ทั้งหมด ส่วนอื่น ๆ อีกหลายชนิดได้แก่ CAP57, elastase, lactoferrin, cathepsin G พบได้เป็นส่วนน้อยของคนไข้ โดยรายละเอียดจะได้กล่าวดังต่อไปนี้คือ

1. proteinase 3 (PR3) (Goldschmeding และคณะ,1989)(Nilesและคณะ,1989) พบเป็น90% ของ ANCA แอนติเจนทั้งหมด เป็น elastinolytic neutral serine protienase ตัวหนึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญเป็น diisopropylfluorophosphate (DFP) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29 kd บรรจุอยู่ใน azurophilic granules ของนิวโทรฟิล เมื่อเกิด autoantibody ต่อ PR3 จะทำให้ enzymatic function ของมันผิดปกติไป (Jenne และคณะ,1990) และยังพบว่า แอนติบอดีนี้มีผลทำให้ นิวโทรฟิลเกิด differentiation มากขึ้น สารที่ยับยั้งการทำงานของ PR3 ในธรรมชาติคือ α_1-antitrypsin (α_1-AT)(van de Weil,1991) โดยมีการจับกันของสารทั้งสองเกิดเป็นสารประกอบมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 83 kd ทำให้การทำงานของ PR3 ผิดปกติไป สารประกอบนี้สามารถตรวจพบได้ในเสมหะและน้ำเหลืองของคนไข้ และยังพบว่าถ้ามีการขาดหายไปของ α_1-AT อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดอักเสบ จากการที่มีรายงานพบคนไข้ที่เป็น WG พร้อมกับเป็น homozygous α_1-AT deficiency PR3 นี้มีชื่อเรียกอื่น ๆ ได้แก่ AGP27, p29, myelobastin. แอนติเจนนี้จะเกิดแอนติบอดีและตรวจพบเป็นการเรืองแสงแบบ C-ANCA

2. myeloperoxidase (MPO) (Falk และ Jennette, 1988) เป็นแอนติเจนส่วนใหญ่ของ P-ANCA มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 130 kd แต่จะพบในรูปที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนหลังจากมีการหลั่งออกมานอกเซลล์ของนิวโทรฟิล (denaturation and reduction) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 65, 43, 15 kd ตามลำดับ การจับตัวกันระหว่าง MPO และแอนติบอดีของมันไม่ทำให้การทำงานของแอนติเจนซึ่งเป็น enzyme ทำงานลดลง โดยพบว่าตำแหน่งที่มีการจับกันนั้นเป็นคนละตำแหน่งกับตำแหน่งการทำงานของ enzyme แอนติบอดีชนิดนี้ทำให้เกิดการเรืองแสงแบบ P-ANCA

นอกจากแอนติเจนที่พบบ่อยทั้งสองแล้ว ยังมีแอนติเจนอื่น ๆ

ในซัยโตพลาสซึมของนิวโทรฟิลที่ทำให้เกิดแอนติบอดีชนิด ANCA ได้ พบใน คนไข้กลุ่มเล็กเท่านั้นซึ่งยังไม่มีข้อสรุปในการวินิจฉัย และอธิบาย กลไก ต่าง ๆ ได้เหมือนกับแอนติเจนทั้งสองตัวแรก แอนติเจนเหล่านี้พบได้น้อยกว่า 5 % ได้แก่

3. CAP57 (Falk และคณะ,1991) เป็นโปรตีนที่มีประจุบวก เป็นสารต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial cationic protein) อยู่ใน azurophilic granule ของนิวโทรฟิล (Periera และคณะ,1990) มีน้ำหนักโมเลกุล 57 kd ให้ลักษณะการเรืองแสงแบบ C-ANCA

4. elastase (Goldschmeding และคณะ,1989) (Nassberger และคณะ,1989) เป็น enzyme อยู่ใน azurophilic granule (human leukocyte elastase,HLE) แอนติบอดีต่อมันให้ ลักษณะการเรืองแสงเป็นแบบ P-ANCA มักจะไม่เกิดพร้อมกับ ANCA ที่เกิด จาก MPO และ PR3 พบได้ 0.5% ของคนไข้ที่ให้ลักษณะ P-ANCA ทั้งหมด และพบในคนไข้ที่เป็น SLE (Nassberger และคณะ,1989)

5. lactoferin (Thomson และคณะ,1989) เป็น enzyme ที่อยู่ใน specific granule ของนิวโทรฟิล แอนติบอดีต่อมันให้ ลักษณะการเรืองแสงเป็นแบบ P-ANCA มักจะไม่เกิดพร้อมกับ ANCA ที่เกิด จากแอนติเจนอื่น ๆ พบในคนไข้ที่เป็น necrotizing glomerulonephritis และ lupus nephritis บางราย(Pozzi และ คณะ,1991)

6. Cathepsin G (Daha และคณะ,1990) เป็น neutral protease น้ำหนักโมเลกุล 25 kd พบใน azurophilic granule แอนติบอดีต่อมันจะให้การเรืองแสงที่แตกต่างจากปกติโดยทั่วไป คือเป็น homogenous non-C-ANCA มักพบร่วมกับ anti-elastase และ anti MPO พบในคนไข้ที่เป็น WG

7. eosinophil peoxidase (EPO)(Dolman และคณะ ,1990) อยู่ใน granule ของนิวโทรฟิล

จะเห็นได้ว่าจากรูปแบบการเรืองแสง Fluorescent จาก การย้อมด้วยวิธีการใช้ ethanol ทำการ fixed นิวโทรฟิล ต่อแอนติเจน

ต่างกันออกไปโดย C-ANCA จะมีแอนติเจนเป็น PR3 และ CAP57 ส่วน P-ANCA จะมีแอนติเจนเป็น MPO, elastase และ lactoferin เป็นต้น

โดยปกติแล้วคนไข้ที่พบ ANCA มักจะมีแอนติเจนที่เป็นสาเหตุเพียงตัวเดียว โดยเกือบทั้งหมดจะไม่พบ anti-PR3 ร่วมกับanti-MPO ยกเว้นเพียง 1 ใน 400 รายที่ตรวจพบพร้อมกัน (Jennette และ Falk,1991)

นอกจากที่ได้กล่าวมาทั้งหมดแล้ว ยังพบว่า 5% ของคนไข้ทั้งหมดที่พบ C-ANCA ยังไม่สามารถตรวจพบว่าแอนติเจนที่เป็นสาเหตุนั้นคืออะไร นอกเหนือจากที่กล่าวมาทั้งหมดแล้ว ซึ่งต้องทำการเฝ้าติดตามผลการวิจัยต่อไป

การตรวจหา ANCA

การตรวจหา ANCA สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ Indirect immunofluorescent(IIF), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), Western blotting, dot blotting และ immunoprecipitation แต่จะขอกล่าวคร่าว ๆ ใน 2 วิธีแรกเท่านั้น

1. IIF เป็นวิธีแรกที่ใช้ตรวจหา ANCA ตามข้อตกลงของการประชุม International Workshop on ANCA ครั้งแรก ต้องการทำการแยกนิวโทรฟิลโดยใช้ heparinized blood ปั่นแยกชั้นนิวโทรฟิลใน Ficoll hypaque ล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS) ที่ผสมรวมกับ 1% human serum albumin นำนิวโทรฟิลมา fixedใน absolute ethanol ที่ 4°c เป็นเวลา 5 นาทีจึงนำมาตรวจกับน้ำเหลืองของคนไข้ ล้างออก แล้วมาตรวจวัดการเรืองแสงด้วย anti-human immunoglobulin ที่มี fluorescene ติดอยู่ จะเห็นลักษณะการเรืองแสงเป็น 2 ลักษณะดังที่กล่าวมาแล้ว (วิธีทำโดยละเอียดจะกล่าวต่อไปในภาคผนวก)

2. Enzyme immunoassay และ radioimmunoassay

จากข้อยุ่งยากบางประการของ IIF จึงมีการค้นหาการตรวจ

ใหม่โดยใช้ solid phase ในการหา สิ่งที่สำคัญในการตรวจวิธีการนี้คือต้องรู้แอนติเจนว่าเป็นอะไร และสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบได้ วิธีนี้มีความจำเพาะและความไวสูงมาก แต่อาจมีข้อผิดพลาดในกรณีที่แอนติเจนที่เป็นสาเหตุของคนไข้อื่นเป็นคนละชนิดที่นำมาเป็นวัตถุดิบ เช่น anti-elastase และ anti-lactoferin เป็นต้น

เมื่อเทียบข้อดีข้อเสียทั้งสองวิธีแล้วพบว่า

1. ELISA มีความไวกว่า IIF เล็กน้อย แต่ IIF สามารถตรวจพบได้ในคนไข้บางรายที่มีแอนติเจนที่เป็นสาเหตุต่างไปจากปกติ

2. การวัด titer ของ ELISA มีความสัมพันธ์กับอาการของคนไข้ดีกว่าการตรวจด้วย IIF

ส่วนการหาโดยวิธีอื่น ๆ ส่วนมากใช้ในการทดลองหาชนิดและลักษณะของแอนติเจนได้แก่ Western blot, dot blotting, immunoprecipitation เป็นต้น

บทบาทของ ANCA ต่อพยาธิสภาพของโรค

หลังจากที่มีการค้นพบว่า ANCA มีความสัมพันธ์กับโรคต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่กลไกการเกิดโรคก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัด มีการทดลองหลายอย่างที่พยายามจะอธิบายว่า ANCA มีบทบาทต่อการเกิดพยาธิสภาพจริง ไม่ใช่เพียงการตรวจพบร่วมในเหตุการณ์เท่านั้น จึงเริ่มมีการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยศึกษาเหตุการณ์ต่าง ๆ ที่พบ ศึกษากลไกการกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลและโมโนซัยท์ การเปลี่ยนแปลงของ T lymphocyte โดย ANCA ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

การกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลในห้องทดลอง

การสังเกตการทำงานของนิวโทรฟิลนั้นดูได้จาก (Brian และคณะ, 1991)

- มีการรวมตัวของเซลล์ (cell aggregation)
- การส่งสัญญานให้มารวมตัวกันของนิวโทรฟิลมากขึ้นในบริเวณนั้น (chemotaxis)

- การสร้าง reactive oxygen species (ROS) ของนิวโทรฟิล

- การปล่อย granule ของนิวโทรฟิลออกมานอกเซลล์

- การทำลายเนื้อเยื่อของนิวโทรฟิล

โดยปกติการทำงานของนิวโทรฟิลนั้นจะต้องมีภาวะกระตุ้นที่เหมาะสม (Brian และคณะ,1991)หรือที่เรียกว่าการ primed นิวโทรฟิล โดยสารบางชนิดเช่น formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), protein kinase C activator(phorbol 12-myristate 13-acetate,PMA)และ C_5a กลไกการกระตุ้นนั้นอาจทำให้เกิดเหตุการณ์อย่างหนึ่งอย่างใดต่อไปนี้คือ

1. เกิด endocytosis เอา receptor-mediate เข้าไปเกิดกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิล

2. เกิดการกระตุ้นการทำงานที่ plasma membrane granule ที่บรรจุ enzyme อยู่และปลดปล่อยออกมา

3. หรืออาจเกิดจากการเปิดปิดของ ion channel ปลดปล่อย granule ออกมา

ซึ่งทั้ง 3 วิธีนี้ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นวิธีใดที่เกิดขึ้นจริง

<u>การแสดงตัวของแอนติเจน</u>

การที่ ANCA จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของมันนั้น มีอยู่ 2 วิธีที่เป็นไปได้คือ

1. ANCA ต้องมีความสามารถเข้าไปในเซลล์ของนิวโทรฟิล (van der Woude และคณะ,1985)โดยพบว่าเมื่อนำนิวโทรฟิลทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองของคนไข้ที่มี ANCA ย้อมด้วยวิธี IIF พบว่าภายใน 10 วินาทีพบแอนติบอดีในนิวโทรฟิลเห็นเป็น diffuse cytoplasmic pattern

2. แอนติเจนออกมานอกเซลล์ หรือที่ผิวเซลล์โดยพบว่าเมื่อศึกษา MPO เป็นแม่แบบ MPO สามารถมาปรากฏบนผิวเซลล์ได้โดยใช้ TNF วัดได้จาก

flow cytometry studies (FACS) แอนติเจนที่ปรากฏบนผิวเซลล์สามารถทำปฏิกิริยากับ polyclonal anti-MPO, MPO-ANCA Ig G และ MPO-ANCA Ig G $F(ab)'_2$ fragments (Calafat และคณะ,1990)แอนติเจนของ C-ANCA ก็สามารถตรวจพบได้ในทำนองเดียวกัน (Niles และคณะ,1991)(Charles และคณะ,1991)และยังสามารถสนับสนุนเหตุการณ์ต่างๆด้วยวิธี immunoelectron microscope(Caldas และคณะ,1991)ก็พบว่ามีการปรากฏของแอนติเจนอยู่จริง ซึ่งเหตุการณ์ที่แอนติเจนของนิวโทรฟิลมายังผิวเซลล์ เราเรียกว่า การ priming

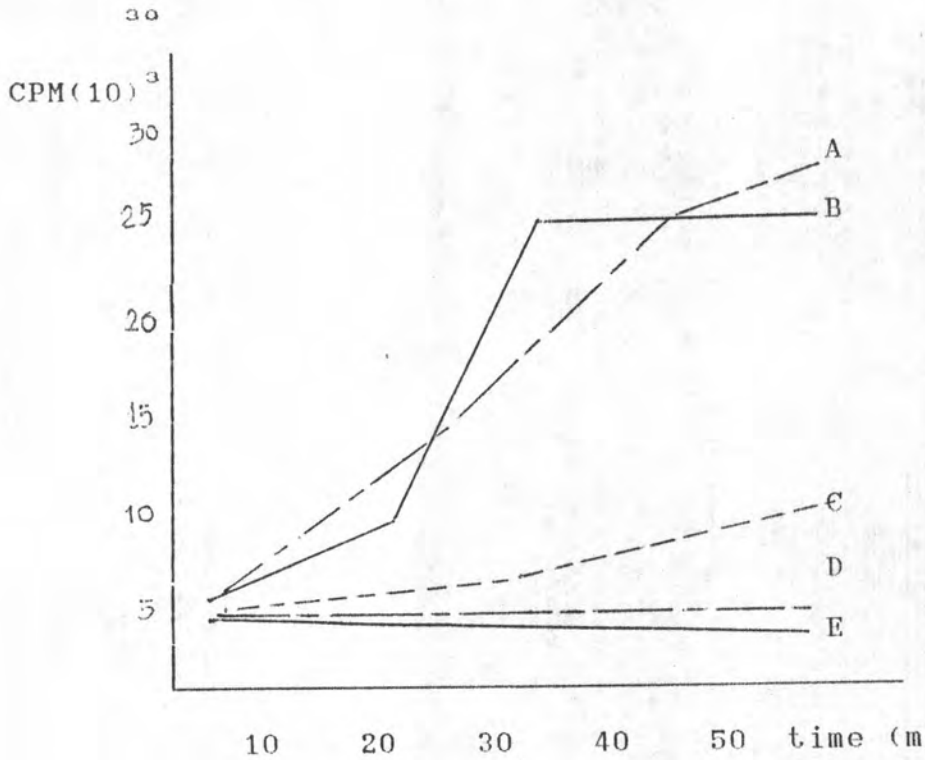
การทดลองผลของ ANCA ต่อ neutrophil

การที่พบนิวโทรฟิลอยู่ในบริเวณที่มีพยาธิสภาพอย่างหนาแน่น จึงมีการมองว่านิวโทรฟิลน่าจะมีส่วนสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพ ยังพบว่านอกจากในพยาธิสภาพที่พบเพิ่มขึ้นแล้ว total blood granulocyte pools และ การหมุนเวียน (turn over rate) มีการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วยเมื่อเทียบกับคนปกติ (Dale และคณะ,1973)

ผลของ ANCA ต่อการกระตุ้นการสร้าง ROS ของนิวโทรฟิล

มีผลการทดลองพบว่าเมื่อนำเอาน้ำเหลืองของคนไข้ที่ตรวจพบ ANCA,Ig G-ANCA หรือส่วน $F(ab)'_2$ ของ Ig G ทั้งที่เป็น C-ANCA และP-ANCA มาทำปฏิกิริยากับนิวโทรฟิล พบว่าสามารถทำให้นิวโทรฟิลมีการหลั่ง ROS ออกมา ซึ่งสามารถวัดได้จากการตรวจด้วยวิธี chemiluninescent และวิธี superoxide-inhibitable reduction ของ ferricytochrome C โดยไม่เกิดในคนปกติ และผู้ป่วยในโรคอื่น ๆ (Falk และคณะ,1990) ดังแผนกราฟที่ 2

I15876238



แผนภูมิที่ 2การหลั่ง ROS ของนิวโทรฟิลวัดด้วยวิธี chemiluminescence เปรียบเทียบระหว่าง (A) C-ANCA IgG (B) MPO-ANCA (C) MPO-ANCA $F(ab)_2$ (D) anti-GBM-IgG (E) MPO-ANCA โดย A-D ใช้นิวโทรฟิลของคนปกติ ส่วน E ใช้นิวโทรฟิลของผู้ป่วย Chronic granulomatous disease

ในการประชุม International Workshop on ANCA ครั้งที่ 3 ยังพบว่ามีแอนติบอดีต่อสารอีกหลายตัวใน azurophilic granule เช่น PR3, CAP57, lactoferrin, lysozyme, cathepsin G ทั้งหมดนี้ก็สามารถทำให้นิวโทรฟิลหลั่ง ROS ได้อีกด้วย (Charles และคณะ ,1990) รวมทั้งยังมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานโมโนซัยท์ด้วย (Charles ,1991)

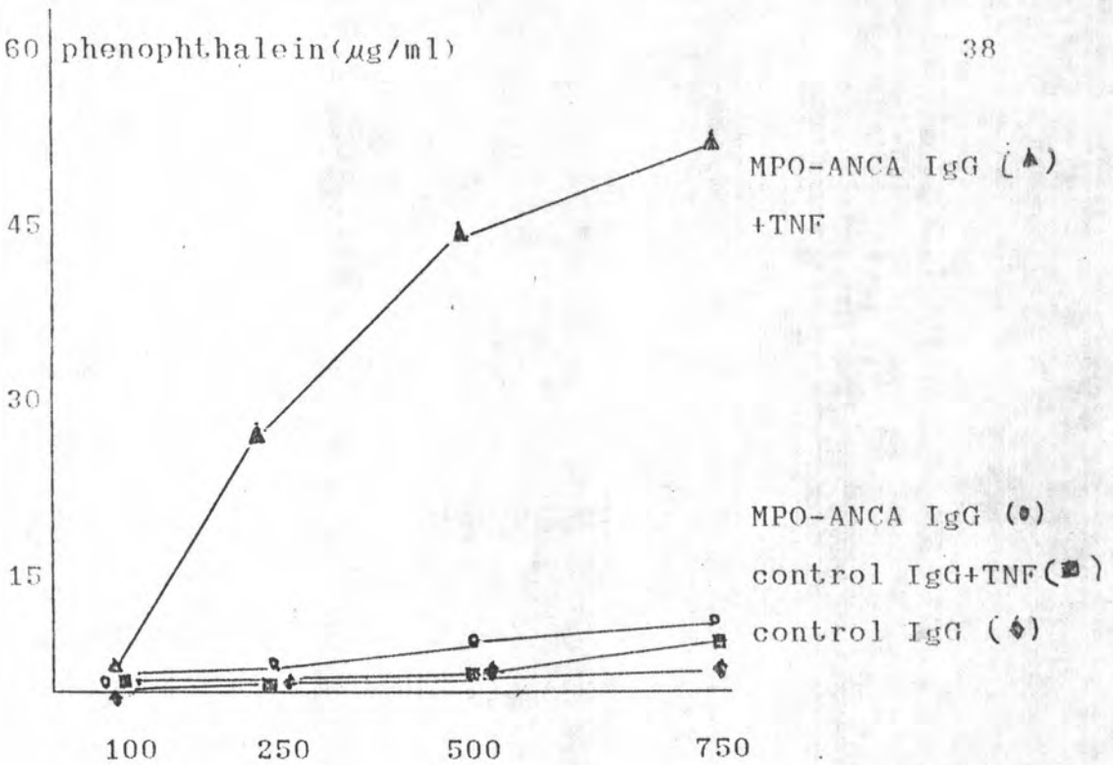
จากการศึกษายังพบว่าทั้ง PR 3 และ MPO อยู่ใน azurophilic ของ granulocyte ทั้งคู่และมีการเคลื่อนย้ายมาอยู่ที่ผิวเซลล์ระหว่างที่นิวโทรฟิลถูกกระตุ้น (Caldos และคณะ,1991) ทำให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยาได้โดยตรง กระตุ้นการทำงาน มีการหลั่งของ PR3 และ MPO ทำปฏิกิริยากับ cell membrane และglomerular basement membrane(GMB)(Johnson และคณะ,1988)(Johnson และ

คณะ,1987) ทำให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือด โดย PR3, elastase, cathepsin G จะย่อยสลาย elastin ส่วน MPO นั้นทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อผ่านทาง MPO-H_2O_2-halide system โดยทำให้เกิด hypochlorous acid และ chloramine radicals ทำลายเนื้อเยื่อ(Johnson และคณะ,1987)(Johnson และคณะ,1988) และ MPO เองก็สามารถทำให้เกิดการทำลายโดยตรง

การที่นิวโทรฟิลอยู่ในภาวะที่พร้อมจะถูกกระตุ้น (priming) เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อโดยนิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้นด้วยANCA ในภาวะปกติ ยังไม่ทราบแน่นอนว่านิวโทรฟิลถูก primed เมื่อใด อาจเป็นไปได้ว่าถูก primed ตั้งแต่อยู่ในไขกระดูก หรืออาจจากการติดเชื้อจุลชีพ ปัจจัยที่ทราบแล้วว่า primed นิวโทรฟิลได้คือ ผิวแก้วหลอดทดลอง dextran ที่ใช้ปั่นแยกเซลล์ bacterial lipopolysaccharides (LPS)(Aida และคณะ,1990)

การหลั่ง granule และการรวมตัวของนิวโทรฟิลโดย ANCA

เมื่อนำ ANCA กระตุ้นนิวโทรฟิลพบว่ามีการหลั่งของ β-glucuronidase และ N-acetyl-β-glucosaminidase ซึ่งอยู่ใน granule ของนิวโทรฟิล เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อใส่แอนติบอดีชนิดอื่น ๆ โดยจะมีสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นถ้ามีการ priming นิวโทรฟิลด้วย TNF ดังกราฟที่ 3 (Falk และคณะ,1991) ANCA ยังสามารถเสริมการทำงานของ fMLP ในการดึงดูดนิวโทรฟิลให้มารวมตัวกันด้วย (Keogan และคณะ,1991)



แผนภูมิที่ 3 การวัด phenophthalein จากการกระตุ้นนิวโทรฟิลให้หลั่ง β-glucuronidase จาก azulophilic granule ซึ่งไปแยกการจับตัวของ glucuronic acid-phenophthalein เป็น phenophthalein เทียบระหว่าง MPO-ANCA กับ control-IgG

ผลของ ANCA ต่อ cell maturation

PR3 หรือในชื่ออื่น ๆ คือ myeloblastin,p29,AGP7 นอกจากเป็นเอนไซม์ย่อยเนื้อเยื่อแล้ว(Kao และคณะ,1988) ยังสามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation) โดยสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของ HL-60 ซึ่งเป็น leukemic cells ไปเป็นโมโนซัยท์ (Bories และคณะ, 1989) เมื่อเกิด ANCA ต่อ PR3 มันก็จะไปรบกวนการทำงานของ PR3 ทำให้ immature monocyte เปลี่ยนแปลงไปเป็น monocyte, mature macrophage หรือ multinucleated giant cells ได้ ทำให้เราพบ granulomatous lesion ในคนไข้ที่มี PR3-ANCA ได้ (Jenne และคณะ,1990)

ผลของ ANCA ต่อ T lymphocyte

พบว่า ANCA สามารถกระตุ้นการทำงานของ T lymphocyte ทำให้มันหลั่ง soluble interleukin 2 receptors(sIL-2R) (Heesen และคณะ,1991) และพบติดอยู่บนผิวเซลล์ การตรวจวัดดังกล่าวสามารถใช้เป็นตัวแสดง disease activity ได้ดีกว่าการวัด titer ของ ANCA เสียอีกในคนไข้โรค WG สรุปได้ว่านอกจากนิวโทรฟิลจะมีผลต่อการเกิดพยาธิสภาพแล้ว T lymphocyte ก็มีส่วนร่วมด้วย จะทำหน้าที่ primed นิวโทรฟิลโดยการหลั่งสาร lymphokines ต่าง ๆ เกิดแอนติเจนเกิดบนผิวเซลล์

เมื่อแยกส่วน azurophilic granule ของนิวโทรฟิล มาทำปฏิกิริยากับ T lymphocyte ของคนไข้ที่พบ ANCA ในน้ำเหลือง พบว่าสามารถทำให้ T lymphocyte เพิ่มจำนวนขึ้นได้โดยไม่พบว่าเกิดในคนปกติ หรือคนไข้ WG ที่ตรวจไม่พบ ANCA ในขณะนั้น (Peterson และคณะ,1991)

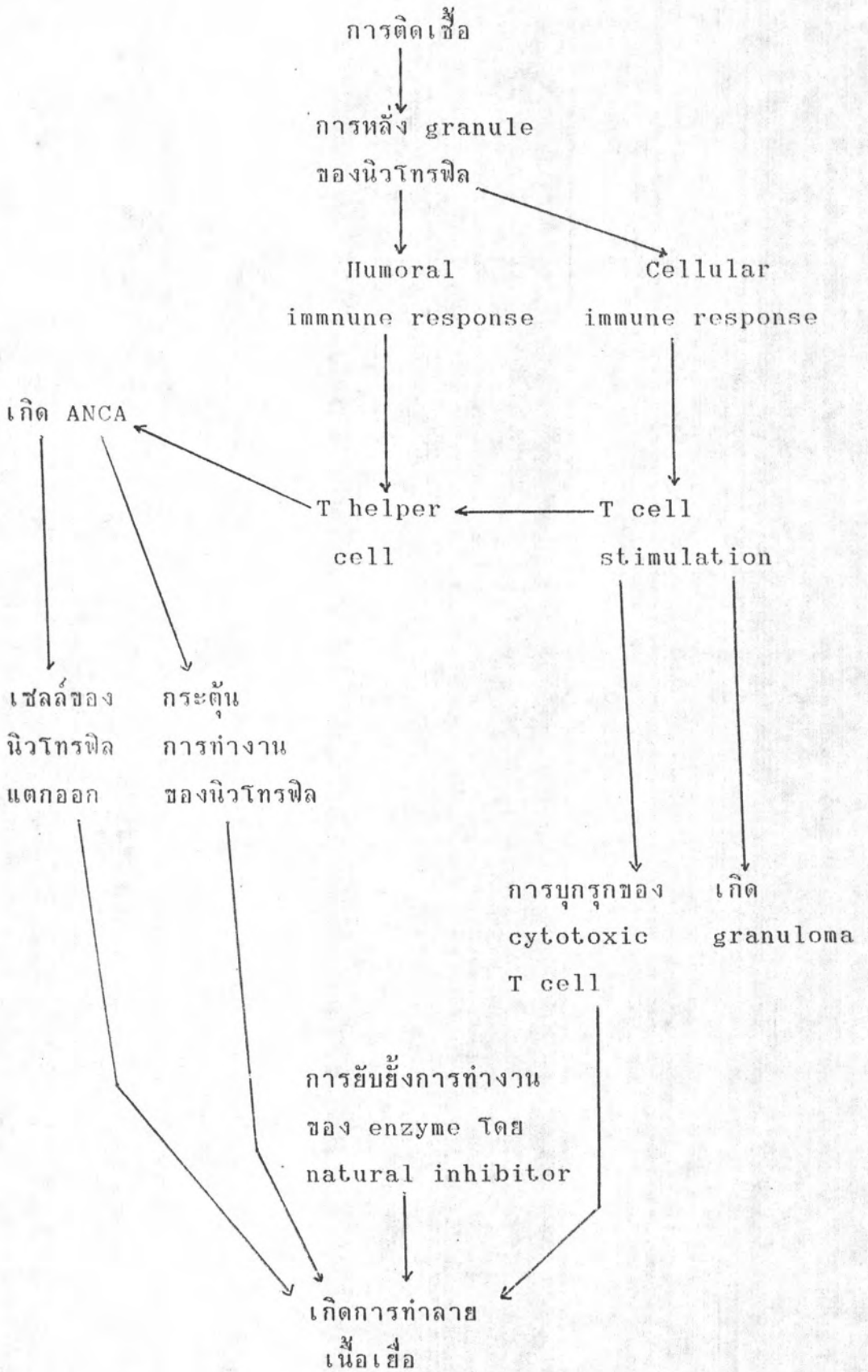
สมมติฐานของการเกิด ANCA

จากการทดลองทั้งหมดซึ่งเป็นการทดลองในขั้นตอนต่าง ๆ ของการกระตุ้นนิวโทรฟิลเมื่อนำมารวบรวมเป็นสมมุติฐาน กลไกการเกิด และการทำงานของ ANCA โดยจะขอยกตัวอย่างในโรค WG ซึ่งเป็นโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับ ANCA ดังนี้

เมื่อปี 1936 Friedrich Wegener ได้เคยกล่าวไว้ว่า โรค WG น่าจะเริ่มจากมีการติดเชื้อของจุลชีพ หรือเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากเกินไป ต่อสารภายนอกร่างกาย เป็นต้นเหตุของโรค (Wegener ,1936;1937) โดยที่สังเกตได้จากการที่มีการกลับมาเป็นโรคใหม่ระหว่างที่มีการติดเชื้อ(Penning และคณะ,1980) และมีอาการดีขึ้นเมื่อได้ยาปฏิชีวนะเช่น sulfamethoxazole-trimethoprim (De Remee และคณะ,1985)(Isarael และคณะ,1988) การติดเชื้อ

ดังกล่าวทำให้เกิดการทำงานของนิวโทรฟิล มีการหลั่ง myeloid lysosomal enzymesและเกิดความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน เกิด Humeral และ Cellular immune response ขึ้น เกิด ANCA ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้นิวโทรฟิลมีการทำงานผิดปกติ โดยความผิดปกติที่เกิด ANCA นี้อาจมีความสัมพันธ์กับ HLA ก็ได้(Katz และคณะ,1979)(Elkan และคณะ,1983) ดังแผนภูมิที่ 4

แผนภูมิที่ 4 สมมุติฐานการเกิดของ ANCA และพยาธิกำเนิด



เมื่อเกิด ANCA แล้วปกติ ANCA จะไม่สามารถทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อได้จนกว่าจะเกิดเหตุการณ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งขึ้นก่อน นั่นคือ การ prime นิวโทรฟิล เหตุการณ์นี้จะเกิดขึ้นได้จะต้องมีการเพิ่มของ cytokines ซึ่งอาจจะได้มาจากการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันที่อาจเกิดจาก การติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย หรือ จุลชีพอื่น ๆ เมื่อนิวโทรฟิลอยู่ในสภาวะที่พร้อมจะกระตุ้นแล้ว (primed) แอนติเจนของ ANCA ก็จะมาปรากฏอยู่บนผิวเซลล์ สามารถทำปฏิกิริยากับ ANCA ได้โดยตรง นิวโทรฟิลถูกกระตุ้นการทำงานให้ทำลายเนื้อเยื่อ เมื่อมีการหลั่ง granule ออกมาก็จะเป็นการเพิ่ม cytokines บริเวณนั้นให้เพิ่มขึ้น เกิดการทำลายเนื้อเยื่อมากขึ้น ทฤษฎีดังกล่าวสอดคล้องกับความเป็นจริงที่มักจะเกิดอาการคล้ายเป็นหวัด ก่อนที่จะมีการเกิดหลอดเลือดอักเสบเสมอ และเป็นมากในช่วงฤดูหนาว(Falk และคณะ,1990) ถึงแม้โดยทั่วไป ระดับการตรวจพบของ ANCA จะมีความสัมพันธ์กับ disease activity แต่ยังไม่สามารถสรุปอย่างนั้นได้ในทุกกรณี(Falk และคณะ,1990)