

RADOVI
KNJIGA LVII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA
Knjiga 19.

Urednik
SEID HUKOVIĆ,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine



SARAJEVO
1975.

MOMIR MACANOVIC*

IMUNOLOŠKE STUDIJE KOD GOODPASTURE'S SINDROMA

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 11. XI 1974. god.)

Ernest Goodpasture (1919) je prvi opisao sindrom istovremene difuzne plućne hemoragije i glomerulonefritisa, a od tada broj opisanih slučajeva sa stalno povećava. Posljednjih godina opisano je preko 100 slučajeva ove bolesti (Benoit et al, 1964). Karakteristike sindroma su: hemoptizije, pulmonalni infiltrati, anemija, hematurija i progresivna bubrežna insuficijencija (Rusby and Wilson, 1965). Bolest se smatra za posebni klinički entitet. Opšte je mišljenje da su plućne lezije primarne, a bubrežne sekundarne. Međutim, povremeno su bili opisani slučajevi kod kojih su bubrežne lezije prethodile plućnim, ili gdje su promjene na plućima nastale tek nakon nefrektomije (Maddock et al, 1967, Cleveland et al, 1964, Bloom et al, 1965). Autologna antitijela protiv antigena glomerularne bazalne membrane (GBM) otkrivena su kod bolesnika sa Goodpasture's sindromom (Lerner et al, 1967). Na njihovom djelovanju zasniva se imunopatogenetska baza glomerularnih lezija kod ovih bolesnika.

Ovaj rad prikazuje imunološke studije izvršene kod bolesnika sa Goodpasture's sindromom. Te studije su bile poduzete sa ciljem da se demonstriraju specifična anti-GBM antitijela na bubrezima, cirkulirajuća antitijela u serumu bolesnika i izvrši karakterizacija eluiranih antitijela iz bubrega.

MATERIJAL I METODE

A. Prikaz slučaja

Klinički podaci o bolesniku su ranije detaljno izneseni (Peters and Evans, 1972). Ukratko, bio je muškarac, 60 godina star, vozač taksija. Bolest je počela naglo, sa hemoptizijama, kašljem i umorom.

* Klinika za unutrašnje bolesti »Dr B. Zimonjić«, Radna jedinica II, Nefrološko odjeljenje, Sarajevo.

U početku bolesti, na plućima su postojale bilateralne kreptacije. Već pri prvom pregledu urea je bila 88 mg⁰%, SE 88 mm/prvi sat. U urinu je imao proteinuriju. Rentgenski, u samom početku bolesti, u plućnim vrškovima su postojale promjene označene kao stari Tbc proces. Tri mjeseca nakon prvih simptoma bolesnik je bio dispnoičan već pri najmanjem naporu, bila je izražena normohromna anemija, a urea u krvi 120 mg⁰%. Bubrežna insuficijencija je imala brz i progredijentan tok. Hemoptoe su postojale obimnije i učestalije, anemija se pogoršavala i bolesnik je umro pet mjeseci nakon pojave prvih simptoma bolesti. Patohistološki je nađen glomerulonefritis sa sklerozom mnogih glomerula. Pluća su bila hemoragična.

B. Imunološke studije

1. Direktna imunofluorescenca. Za direktno imunofluorescentno ispitivanje bubrežno tkivo je bilo zamrznuto u tečnom azotu, rezovi debljine 4 mikrona napravljeni u kriostatu a potom fiksirani u acetonu. Upotrebljeni su komercijalni (HAYLAND) antiserumi: FITC anti- IgG, IgA, IgM, C3 i Fibrinogen. Preparati su ispitivani sa Leitz Orthoplan mikroskopom.

2. Indirektna imunofluorescenca. Korištena je modificirana metoda (McPhaul and Dixon, 1969): serum nije razblažen (1:2), nego upotrebljen nerazblažen (1:1). Normalni humani bubrež je korišten kao test supstrat. Prisustvo antitijela protiv GBM je bilo karakterizirano u vidu tipičnih linearnih depozita IgG duž normalne GBM. Preparat normalnog bubrega je inkubiran prvo sa bolesnikovim serumom, a potom monospecifičnim FITC serumima (Macanović, 1973a). Kontrolni eksperimenti su sadržavali: direktno ispitivanje tkiva (autofluorescencija), direktno bojenje sa FITC anti-IgG i inkubiranje sa serumom (pozitivnim) koji je prethodno bio absorbiran sa normalnom humanom GBM.

3. Detekcija cirkulirajućih antitijela pomoću metode pasivne hemaglutinacije. Upotrebljena je metoda hemijskog vezivanja antigena za eritrocite (Macanović et al, 1972a, Macanović and Peters, 1972b). Antigen je bila solubilna humana GBM, čija je preparacija ranije opisana (Macanović, 1973a, Macanović, 1973b, Macanović, 1974). Antigen je otopljen u fiziološkoj otopini (2 mg/ml). Humani eritrociti grupe »O« Rh —, isprani su tri puta u fiziološkoj otopini i na kraju je suspenzija bila 2⁰%. Suspenzija eritrocita (0,05 ml) dodan je antigen (1,25 ml otopine GBM 2 mg/ml), inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min. a potom je dodat glutaraldehid (GA) 2,5% rastvor u fiziološkoj otopini. Nakon ponovne inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta, eritrociti su tri puta isprani u fiziološkoj otopini i na koncu suspendirani u fiziološkoj otopini u koncentraciji od 2⁰%.

U mikrotitracionom sistemu napravljena su dvostruka razrjeđenja seruma sa fiziološkom otopinom, potom dodati »senzibilizirani« eritrociti, a aglutinacija čitana nakon 2 i 24 sata. Recipročna vrijednost najvišeg razblaženja seruma, u kojem se još uvijek mogla očitovati aglutinacija, bila je uzeta kao vrijednost titra antitijela.

4. Elucija antitijela iz bubrega. Eluiranje antitijela iz bubrega bolesnika vršeno je modifikacijom ranije opisanih metoda (Lerner et al, 1967, Krishnan and Kaplan, 1967, Koffler et al, 1969, Kitagawa et al, 1967, McPhaul and Dixon, 1970). Preostali dio bubrega (nakon uzimanja materijala za histološke i imunofluorescentne studije) bio je isječen u male parčiće debljine oko 5 mm, a kora odvojena od medule. Potom je medula bačena, a korteks homogeniziran (1:1 sa fiziološkom otopinom) u Waring blender-u u trajanju od 30 min, pri najvećoj brzini okretaja, uz stalno hlađenje. Homogenat je potom ispiran u fiziološkom rastvoru sve dok supernatant nije bio proziran. Homogenatu je, zatim, dodan citratni pufer pH 3,2, 0,02 M (10 vol. pufera: 1 vol. homogenata) i izvršena je inkubacija na temperaturi 37° u trajanju od 2,5 sata. Suspenzija je zatim centrifugirana, sediment odstranjen a supernatantu dodana 0,5 M NaOH i postignuta pH 7,0. Eluat je potom dijaliziran (protiv fiziološke otopine) koristeći »visking tubes«. Dijaliziranje je vršeno na temperaturi + 4° u trajanju 24 sata. Potom je eluat koncentriran ultrafiltracijom i postignuta je koncentracija proteina 10 mg/ml. U toj koncentraciji eluat je upotrebljen za indirektnu imunofluorescentnu studiju, imunodifuziju, imunoelektroforezu, i markiran radioaktivnim jodom I¹³¹. Imunodifuzija je vršena po metodi Ouchterlony (1958), a imunoelektroforeza po Scheidegger-u (1955). Korišteni su komercijalni (HAYLAND) serumi: anti-IgG, IgG light chains, IgM i IgA.

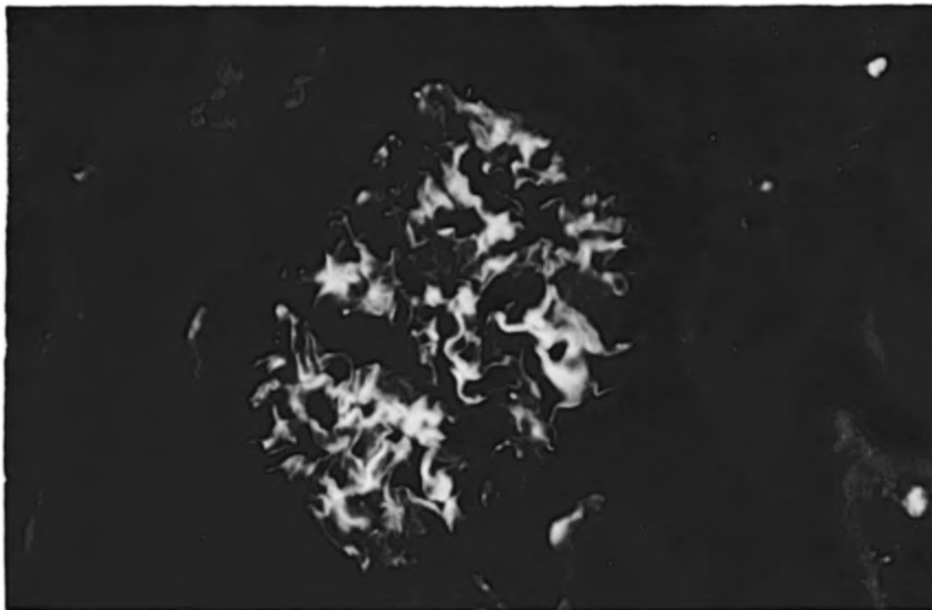
Eluat je markiran sa radioaktivnim jodom I¹³¹ (McFarlane, (1958) i potom inkubiran sa homogenatima različitih humanih normalnih organa: bubreg, pluća, jetra, slezena, mozak, skeletni mišić i hrskavica. Inkubacija je vršena na + 4° u toku 24 sata. Zatim je homogenat ispran u fiziološkoj otopini da se eliminiše sva slobodna radioaktivnost, a fiksirana radioaktivnost izmjerena je u gama brojaču.

5. Serumski komplement. Nivo komplementa (C3) u serumu određen je po metodi Mancini et al, (1965). Korišten je vlastiti anti-C3 serum proizveden kod kunića.

REZULTATI

1. Direktna imunofluorescenca. Preparati bubrega bolesnika, inkubirani sa anti-IgG FITC serumom, pokazivali su linearne depozite IgG u vidu tankog, nježnog kontinuiranog sloja duž glomerularne bazalne membrane (Sl. 1). Depoziti komplementa (C3) nisu se mogli dokazati.

2. Indirektna imunofluorescenca. Serum bolesnika sa Goodpasture's sindromom fiksirao se isključivo na glomerularne bazalne membrane normalnog humanog bubrega (Sl. 2). Fiksacija antitijela je bila u vidu tankih linearnih naslaga. Serumi normalnih osoba i serumi bolesnika sa drugim formama glomerulonefritisa nisu pokazivali ovaj tip fiksacije. Specifičnost za GBM je dokazana kontrolnim eksperimentima. Prethodno inkubiranje seruma sa normalnom glomerularnom bazalnom membranom u potpunosti je absorbiralo anti-GBM antitijela, te nak-



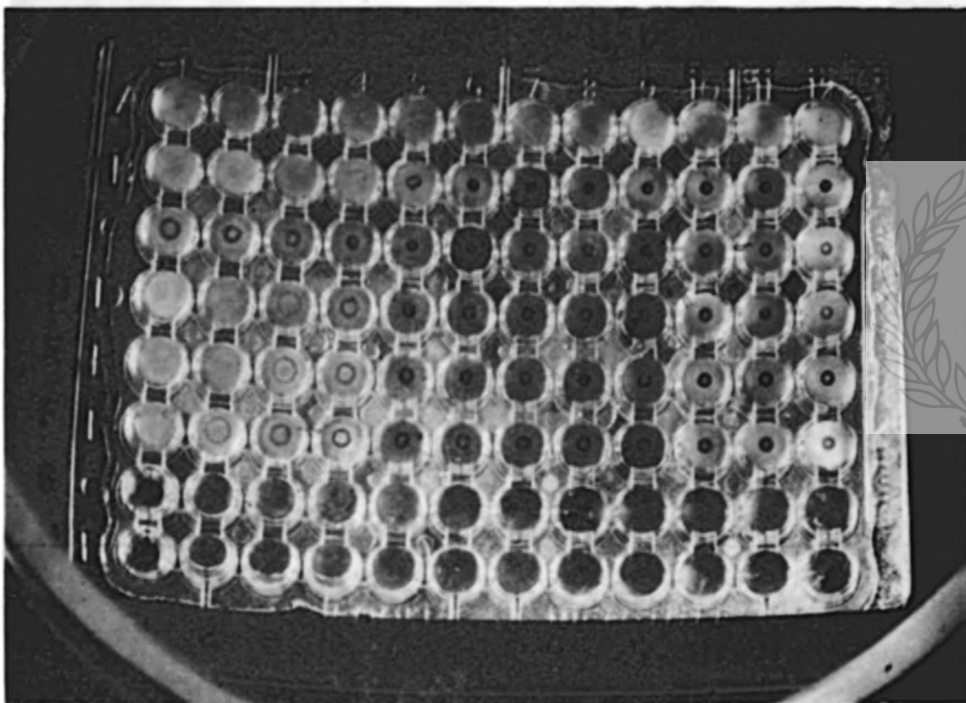
Slika 1.
*Depoziti imunoglobulina (IgG) duž glomerularne bazalne membrane.
 Direktna imunofluorescentna metoda (x 400).*



Slika 2.
*Fiksacija antitijela (IgG) iz seruma bolesnika inkubiranog sa preparatom
 normalnog humanog bubrega duž bazalnih membrana glomerula.
 Indirektna imunofluorescentna metoda (x 400).*

nadna inkubacija tog seruma sa preparatom normalnog bubrega i bojenje sa FITC anti-IgG nisu mogli da demonstriraju prisutna anti-GBM antitijela. Normalni humani liofilizirani serum, homogenati drugih organa i bovini serum albumini nisu bili u stanju da apsorbiraju anti-GBM antitijela iz seruma bolesnika.

3. Detekcija cirkulirajućih antitijela pomoću metode pasivne hemaglutinacije. GBM je bila vezana za eritrocite hemijskim putem koristeći glutaraldehid. Ovako »senzibilizirane« ćelije korištene su u sistemu mikrotitracije i bile u stanju da pokažu izvanredno male količine anti-GBM antitijela u serumu bolesnika. Dok normalne osobe i bolesnici sa drugim formama glomerulonefritisa nisu imali anti-GBM antitijela, bolesnik sa Goodpasture's sindromom je imao visok titar antitijela (1:64). Na Sl. 3 je prikazan tip hemaglutinacije dobijen ovom originalnom metodom.



Slitka 3.

Dokazivanje antitijela protiv glomerularne bazalne membrane metodom pasivne hemaglutinacije.

4. Elucija antitijela iz bubrega. Antitijela su eluirana iz bubrega bolesnika. Izvršena je njihova karakterizacija metodama imunodifuzije i imunoelktroforeze. Dokazano je da ta antitijela pripadaju klasi IgG (Sl. 4 i Sl. 5). Metodom indirektno imuno fluorescencije dokazano je da se eluat fiksira i in vitro u tankom linearnom sloju duž glomerularnih bazalnih membrana. Eluirana antitijela, markirana sa I¹³¹ i eksponirana homogenatima različitih organa, najjače su se fiksirala za homogenat bubrega (Tbl. 1).



Slika 4.

Karakterizacija eluiranih antitijela iz bubrega bolesnika pomoću metode imunoelektroforeze.

5. Serumski komplement. Komplement seruma (C3) bolesnika sa Goodpasture's sindromom bio je na donjoj granici normalnog (70%).

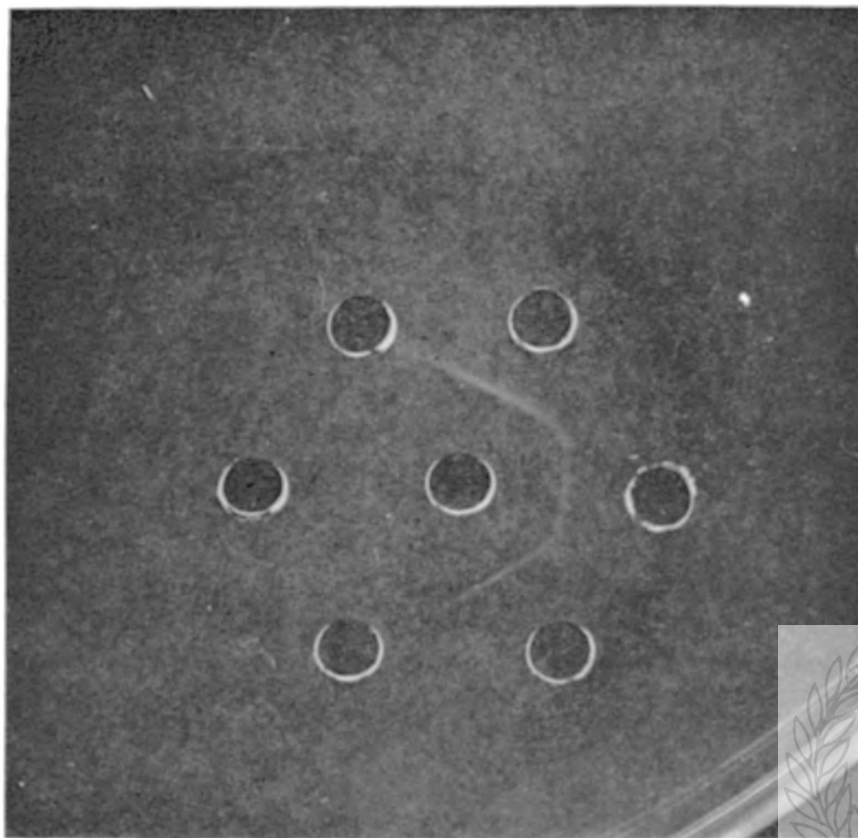
Tabela 1.

ABSORPCIJA ELUIRANIH ANTITIJELA, MARKIRANIH I¹²⁵I I INKUBIRANIH SA HOMOGENATIMA RAZLIČITIH ORGANA

% vezanog IgG	bubreg	pluća	jetra	lien	mozak	mišići	hrskavica
	79	74	43	41	30	28	7

DISKUSIJA

Postoji niz eksperimentalnih i kliničkih podataka da su renalne i plućne lezije kod Goodpasture-ovog sindroma uslovljene alergijskim mehanizmima. Antitijela protiv antigenskih determinanti bazalnih membrana glomerula i plućnih alveola su odgovorna za lezije u oba organa (Koffler et al, 1969). Bazalne membrane plućnih alveola i glomerula su antigenski slične (Hill and Cruickshank, 1953). Eksperimentalni glomerulonefritis je proizveden kod životinja imunizacijom sa humanim plućem u adjuvansu, ili injiciranjem anti-plućnog seruma (Eisen et al, 1950, Chikamutsoe, 1940, deGovin et al, 1963, Steblay and Rudofsky, 1968). Hemoragični pneumonitis i istovremeni



Slika 5.

Karakterizacija eluiranih antitijela iz bubrega bolesnika pomoću metode imunodifuzije. Reakcija precipitacije dobijena sa anti-serumom protiv svih proteina humanog seruma, sa anti-IgG i anti-IgG laki lanci. Negativna reakcija sa anti-IgA i anti-IgM. U sredini eluat.

glomerulonefritis proizvedni su injiciranjem anti-plućnih antitijela (Mellors et al, 1955, Willoughby and Dixon, 1969). Antitijela eluirana iz pluća bolesnika sa Goodpasture-ovim sindromom i pasivno injicirana životinjama, prouzrokovala su renalne lezije (Koffler et al, 1969). Međutim, još uvijek nije rasvijetljena inicijalna faza u alergijskim mehanizmima koji rezultiraju u Goodpasture-ovom sindromu. Smatra se da oštećenja plućnih alveola hemikalijama ili virusima mogu biti uzrok za oslobađanje antigena u cirkulaciju (Wilson and Smith, 1971).

U ovom radu je dokazano prisustvo anti-GBM antitijela na bazalnim membranama glomerula, cirkulirajuća antitijela u serumu, vršena elucija antitijela iz bubrega i njihova karakterizacija. Metodom direktne imunofluorescence dokazana su anti-GBM antitijela na glomerulima u vidu linearnih, tankih i nježnih naslaga duž GBM. Nakon inkubiranja seruma bolesnika sa preparatom normalnog bubrega, anti-

tijela su se fiksirala za specifični antigen i metodom indirektne imunofluorescence se ponovno vide u vidu linearnih, nježnih depozita. Ovim je, ujedno, dokazana i specifičnost antitijela za GBM.

Metoda pasivne hemaglutinacije i upotreba glutaraldehida za hemijsko vezivanje antigena za eritrocite predstavlja veoma senzitivni test za dokazivanje malih količina anti-GBM antitijela. Visoki titar antitijela nalazi se samo kod bolesnika sa linearnim depozitima, te postoji odlična korelacija između oba pokazatelja prisustva anti-GBM antitijela. Metod pasivne hemaglutinacije omogućuje ispitivanje većeg broja bolesnika, jer je teško dobiti uvijek podesan bioptički materijal za imunofluorescentne studije.

Metodom elucije sa kiselim puferom mogu se izolirati antitijela iz organa u kojem su izazvala patološke promjene. U ovom radu iz bubrega bolesnika su izolirana antitijela, a imunohemijskim metodama dokazano je da pripadaju klasi IgG. Specifičnost antitijela za GBM je dokazana dvojako: metodom indirektne imunofluorescence i markiranjem radioaktivnim jodom I^{131} . Eluirana antitijela su se fiksirala u linearnim nakupinama duž GBM, a antitijela, markirana radioaktivnim jodom, fiksirala su se najvećim dijelom za homogenat bubrega.

Serumski komplement kod ispitanog bolesnika je bio neznatno snižen i vjerovatno da aktivacija serumskog komplementa nije učestvovala u nastanku lezija, odnosno komplement u ovom slučaju nije bio konzumiran u alergijskim reakcijama. I u nekim drugim slučajevima Goodpasture-ovog sindroma (Poskitt, 1970, Duncan et al, 1965, Lerner et al, 1967) komplement nije bio izrazito snižen.

ZAKLJUČAK

U radu su opisane imunološke studije kod bolesnika sa Goodpasture-ovim sindromom. Ispitivano je i dokazano prisustvo antitijela protiv glomerularne bazalne membrane (GBM), koja su vizualizirana metodom direktne imunofluorescence kao tanki, nježni, linearni depoziti duž GBM. Cirkulirajuća antitijela su dokazana u serumu bolesnika metodama indirektne imunofluorescence i metodom pasivne hemaglutinacije. Originalna metoda pasivne hemaglutinacije je prikazna i predstavlja veoma senzitivni test za dokazivanje malih količina cirkulirajućih anti-GBM antitijela. Anti-GBM antitijela su i eluirana iz oboljelih bubrega, izvršena je njihova karakterizacija, dokazana specifičnost za glomerularnu bazalnu membranu.

ZAHVALA

Autor se zahvaljuje dr D. K. Petersu iz Royal Postgraduate Medical school and Hammersmith Hospital, u čijim je Laboratorijama najveći dio ovog rada bio urađen. Dio rada je bio finansiran i sredstvima Republičke zajednice za naučni rad SRBiH, ugovor broj 8035.

IMMUNOLOGIC STUDIES IN A CASE OF GOODPASTURE'S
SYNDROME

SUMMARY

The immunologic studies in a case of Goodpasture's syndrome are presented in this paper. The anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies are visualized by the method of direct immunofluorescence as linear deposits along the GBM. The circulating anti-GBM antibodies were investigated using the indirect immunofluorescence and original method of passive haemagglutination. The passive haemagglutination method is very sensitive for the detection of low concentration of circulating anti-GBM antibodies. Anti-GBM antibodies are also eluted from the diseased kidneys, immunochemically characterized, and their specificity for GBM demonstrated.

LITERATURA

1. Benoit, F. L., Rulon, D. B., Theil, G. B. et al.: Goodpasture's Syndrome, a clinico-pathologic entity. *Amer. J. Med.* 37, 424—444 (1964).
2. Bloom, V. R., Wayne, D. J. and Wrong, O. M.: Pulmonary haemorrhage and glomerulonephritis: report of six cases and study of the renal lesion by the fluorescent antibody technique and electron microscopy. *Ann. intern. Med.* 62, 920—926 (1965).
3. Chikamitsue, H. S.: Experimentelle studien neber immunocytotoxische glomerulonephritis. I. Serologische untersuchungsergebnisse des pneumotoxischen Entenimmunserums. *Folia endocrin.* 16, 85—90 (1940).
4. Cleveland, R. J., Lee, H. M., Prout, G. R. and Hume, D. M.: Preservation of the cadaver kidney for renal homotransplantation in man. *Surg. Gynec. Obstet.* 119, 1991—1997 (1964).
5. Duncan, D. A., Drumond, K. N., Michael, A. F. and Vernier, R. L.: Pulmonary hemorrhage and glomerulonephritis. *Ann. intern. Med.* 62, 920—937 (1965).
6. Eisen, H. N., Sherman, B. and Presman, D.: The properties of anti-rat-lung serum. *J. Immunol.* 65, 543—558 (1950).
7. Goodpasture, E. W.: The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of influenza. *Amer. J. med. Sci.* 158, 863—870 (1919).
8. Govin, R. L. de: Nephritis and lung hemorrhage. *Arch. intern. Med.* 111, 16—23 (1963).
9. Hill, A. G. and Cruickshank, B.: A study of antigenic components of kidney tissue. *Brit. J. exp. Path.* 34, 27—34 (1953).
10. Kitagawa, M., Grossberg, A. L., Yagi, Y. and Pressman, D.: Separation of antibodies into fractions with different binding properties. *Immunochemistry* 4, 157—167 (1967).

11. Koffler, D., Schur, P. H. and Kunkel, H. G.: Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J. exp. Med.* **126**, 607—624 (1960).
12. Koffler, D., Sandston, J., Carr, R. and Kunkel, H.: Immunologic studies concerning the pulmonary lesions in Goodpasture's syndrome. *Amer. J. Path.* **54**, 293—300 (1969).
13. Krauss, J., Redenbacher, M. and Streichner, E.: Das Goodpasture-syndrom. Ein klinischer und pathologisch anatomischer Beitrag. *Deutsch. med. Wschr.* **94**, 1820—1824 (1969).
14. Krishnan, C. and Kaplan, M. H.: Immunopathologic studies of systemic lupus erythematosus: II. Antinuclear reaction of gamma-globulin eluted from homogenates and isolated glomeruli of kidneys from patients with lupus nephritis. *J. clin. Invest.* **46**, 569—579 (1967).
15. Lerner, R. H., Glasscock, R. J. and Dixon, F. J.: The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J. exp. Med.* **126**, 989—1004 (1967).
16. Macanović, M., Evans, D. J. and Peters, D. K.: Allergic response to glomerular basement membrane in patients with glomerulonephritis. *Lancet* **II**, 207—210 (1972).
17. Macanović, M. and Peters, D. K.: Immunity to glomerular basement membrane in nephritis. *Kidney Internat.* **2**, 179—180 (1972b).
18. Macanović, M.: Allergic response to glomerular basement membrane in patients with glomerulonephritis. Ph. D. thesis. University of London (1973a).
19. Macanović, M.: Izolacija i karakterizacija antigenskih komponenti glomerularne bazalne membrane. *Med. Arhiv* **27**, 19—25 (1973b).
20. Macanović, M., deBats, A. and Peters, D. K.: Immunochemical characterization of human glomerular basement membrane. In: Peeters, H. (Ed.) *Protides of the biological fluids*. Pergamon Press. Oxford-New York-Toronto, p. 473—476 (1974).
21. Maddock, R. K., Stevens, L. E., Reemtsma, K. and Bloomer, H. A. (1967): Goodpasture's syndrome cessation of pulmonary haemorrhage after nephrectomy. *Ann. intern. Med.* **67**, 1258—133 (1967).
22. Mancini, G., Carbonara, C. O. and Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235—240 (1965).
23. McFarlane, A. S.: Efficient trace labelling of proteins with iodine. *Nature* **182**, 53—60 (1958).
24. McPhaul, J. R. and Dixon, F. J.: The presence of anti-glomerular basement membrane antibodies in peripheral blood. *J. Immunol.* **103**, 1168—1175 (1969).
25. McPhaul, J. R. and Dixon, F. J.: Characterization of human anti-glomerular basement membrane antibodies eluted from glomerulonephritic kidneys. *J. clin. Invest.* **49**, 308—318 (1970).
26. Ouchterlony, O.: Diffusion in gel methods of immunological analysis. *Progr. Allergy* **5**, 1—7 (1958).
27. Peters, D. K. and Evans, D. J.: A case of Goodpasture's Syndrome. *Brit. med. J.* **2**, 272—277 (1972).
28. Poskitt, R. T.: Immunologic and electron microscopic studies in Goodpasture's syndrome. *Amer. J. Med.* **49**, 250—257 (1970).

29. Proskey, A. J., Weatherbee, L., Easterling, R. E., Greene, J. A. and Weller, J. M.: Goodpasture's syndrome. *Amer. J. Med.* 48, 162—173 (1970).
30. Rusby, N. L. and Wilson, C.: Lung purpura with nephritis. *Annu. Rev. Med.* 16, 301—307 (1965).
31. Schedegger, J. J.: Une micromethode de l'immunoelectrophorese. *Int. Arch. Allergy* 7, 103—109 (1955).
32. Steblay, R. W. and Rudofsky, U.: Autoimmune glomerulonephritis induced in sheep by injections of human lung and Freund's adjuvant. *Science* 160, 204—206 (1968).
33. Willoughby, N. and Dixon, F.: Hemmorigic pneumonitis produced in rats by rabbit anti rat lung antibody. *Fed. Proc.* 28, 363 (1969).
34. Wilson, C. B. and Smith, R. C.: Goodpasture's syndrome associated with influenza A2 virus infection. *Ann. intern. Med.* 74, 91—95 (1971).

