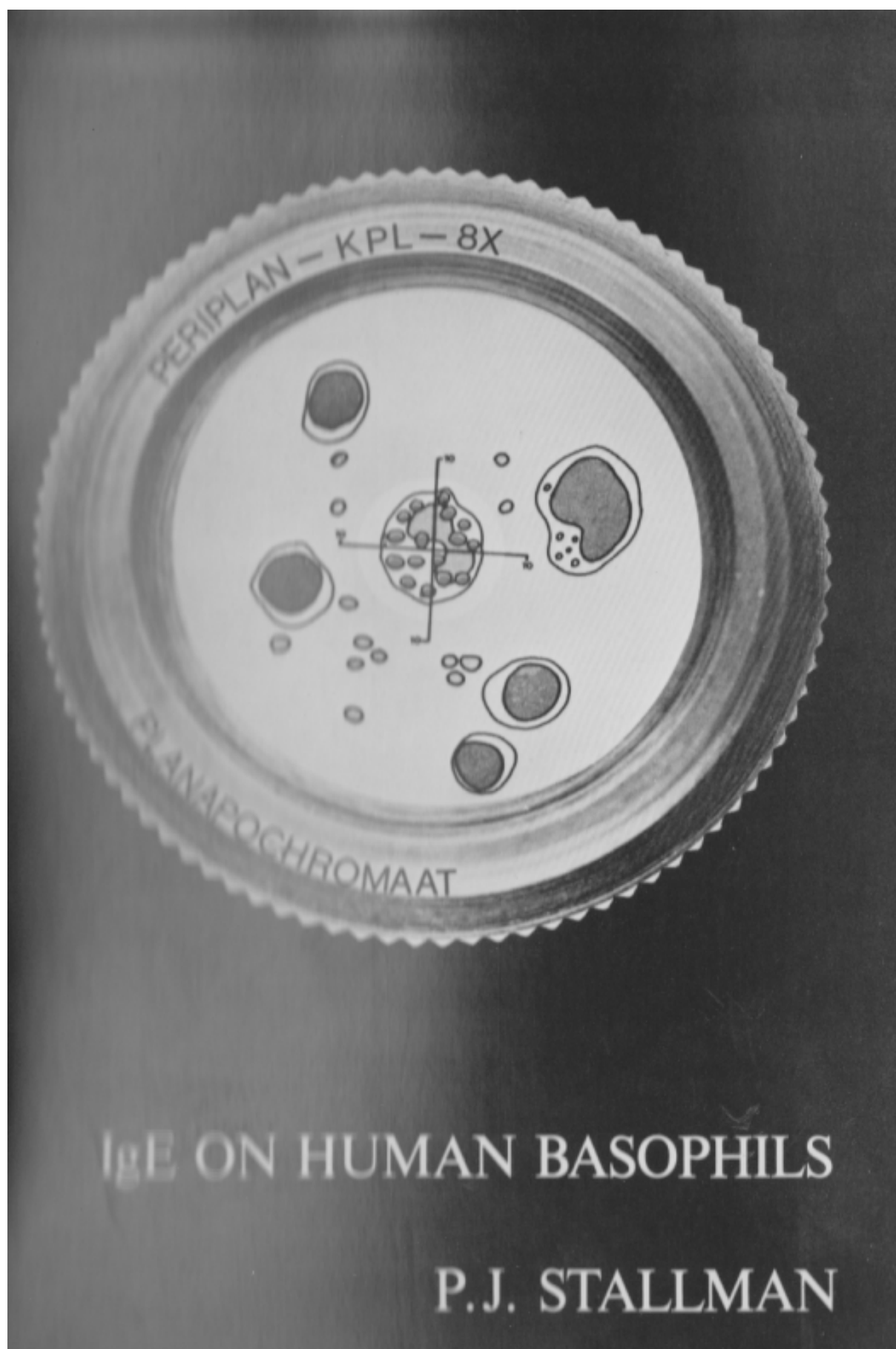




IgE ON HUMAN BASOPHILS

P.J. STALLMAN

IgE ON HUMAN BASOPHILS

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van
doctor in de Geneeskunde
aan de Universiteit van Amsterdam,
op gezag van de Rector Magnificus
Dr. G. den Boef,
hoogleraar in de Faculteit der
Wiskunde & Natuurwetenschappen
in het openbaar te verdedigen in de aula der
Universiteit (tijdelijk in de Lutherse Kerk,
ingang Singel 411, hoek Spui) op
donderdag 24 februari 1977 om 16.00 precies

door

PIETER JOHAN STALLMAN

geboren te Amsterdam



1977

SAMENVATTING

Antistoffen van de immunoglobuline E klasse spelen een belangrijke rol bij vele allergische aandoeningen van het onmiddellijke type. IgE antistoffen kunnen specifiek gericht zijn tegen verschillende allergenen zoals graspollen, huisstof, huidschilfers van mens en dier en vele andere. Deze IgE antistoffen komen bij de mens zowel vrij in het bloed als gebonden aan cellen voor, aan de basofiele granulocyten in het perifere bloed en aan de mestcellen in de weefsels. Wanneer celgebonden antistoffen reageren met het allergeen waartegen ze gericht zijn, heeft dit tot gevolg dat uit de cel verschillende stoffen vrijkomen, onder andere histamine, die de symptomen bij een allergische reactie mede te weeg brengen. In de cellen zijn deze stoffen deels opgeslagen in specifieke korrels, waardoor zowel de mestcel als de basofiele granulocyt gekenmerkt worden.

De aanwezigheid van IgE op deze cellen is met verschillende methodes (autoradiografie, immunofluorescentie techniek, immunoferritine techniek en histamine release met anti-IgE) aangetoond. Een kort overzicht van deze methodes wordt gegeven in de inleiding, Hoofdstuk I. Ook worden in dit hoofdstuk de bevindingen van Ishizaka en anderen genoemd, die de hoeveelheid celgebonden IgE bepaalden door na te gaan hoeveel complement gebonden werd wanneer een overmaat anti-IgE werd toegevoegd aan een suspensie van witte bloedcellen waarin het aantal basofiele leukocyten bekend was. Hoe meer complement per basofiele cel gebonden werd, hoe meer IgE aanwezig geacht werd op deze cellen (C_1 fixation transfer test). Omdat de basofiele granulocyten minder dan 1% van de leukocyten in het perifere bloed uitmaken, is het nodig de bepaling te verrichten met suspensies verrijkt aan basofiele cellen.

Naar aanleiding van deze onderzoeken stelden wij ons tot doel een methode te ontwikkelen waarmee de basofiele granulocyten tussen de andere leukocyten in herkend kunnen worden en tevens de hoeveelheid IgE per individuele basofiele cel kan worden vastgesteld.

In hoofdstuk II wordt de wijze beschreven waarop bij het schaap anti-humaan IgE serum werd opgewekt, werd gekoppeld aan fluoresceïne isothiocyanaat en vervolgens werd getest. Dit antiserum (FlaIgE) wordt in de hierna beschreven experimenten gebruikt.

In Hoofdstuk III wordt de methode om basofiele granulocyten te identificeren in leukocyten suspensies beschreven. Humane leukocyten verkregen door celscheiding over Ficoll-Isopaque worden tegelij-

kertijd gekleurd met toluidine blauw, dat de specifieke korrels van de basofiele cellen kleurt, en gefixeerd met paraformaldehyde. Het blijkt dat met deze procedure de kleuring van de korrels behouden blijft, wanneer vervolgens aan deze cellen FlIgE wordt toegevoegd. Op deze wijze wordt het celgebonden IgE op de nu herkenbare basofielen aangetoond. De specificiteit van de immunofluorescentie reactie wordt aangetoond door blokkerings- en absorptieproeven, evenals door "capping" experimenten.

In Hoofdstuk IV wordt een andere toepassing gegeven van bovengenoemde techniek om basofielen te herkennen, wanneer wordt nagegaan of er een gemeenschappelijk antigeen is op humane basofielen, mestcellen en thymus lymfocyten. Voor de mens en verscheidene diersoorten wordt wel verondersteld dat basofielen en mestcellen voortkomen uit thymocyten en lymfocyten. Onlangs kreeg deze theorie steun, toen de aanwezigheid van een thymus antigeen op basofiele leukocyten van konijnen werd aangetoond. In de onderzoeken beschreven in dit hoofdstuk werd met behulp van de immunofluorescentie techniek en van immunoelectrone microscopie nagegaan of er een humaan thymuslymfocyten-antigeen (HTLA) waargenomen kon worden op het oppervlak van humane leukocyten. Wij toonden de aanwezigheid van HTLA op T-lymfocyten aan, maar niet op basofiele granulocyten noch op mestcellen in verscheidene weefsels.

We keren terug tot het celgebonden IgE in Hoofdstuk V. De eerder genoemde herkennings methode van basofiele leukocyten maakte het mogelijk de fluorescentie intensiteit van de basofielen te meten, nadat ze geïncubeerd waren met FlIgE. Deze meetmethode werd quantitative immunofluorescentie microscopie genoemd. De basofielen werden met doervallend licht opgezocht en binnen het meetdiafragma ingesteld. Hierna werd de intensiteit van de fluorescentie gemeten, objectief en zonder dat de fluorescentie kon uitdoven. Bij 6 personen werd van ieder de gemiddelde fluorescentie intensiteit per basofiele granulocyt gemeten. Deze bleek aanzienlijk te variëren en op de basofielen van 2 atopische donoren het hoogst te zijn. De reproduceerbaarheid van de meting en de invloed van diverse factoren, o.a. de incubatietijd, werden onderzocht. Ook werd door zuurbehandeling het IgE van de cellen van deze 6 donoren losgemaakt (elutiemethode). Het in de bovenstaande vloeistof vrijgekomen IgE werd gemeten en berekend per basofiel aanwezig in de oorspronkelijke suspensie. Er werd een correlatie gevonden tussen de hoeveel-

heid IgE geëluëerd per basofiel en de gemiddelde fluorescentie intensiteit. Zo kon ook geschat worden dat de hoeveelheid IgE moleculen per basofiel bij verschillende personen varieerde tussen de 15.000 en 500.000.

In Hoofdstuk VI wordt het onderzoek beschreven naar het basofiel-gebonden IgE van 28 atopische personen en 29 niet atopische controles. De fluorescentie intensiteit van de basofielen van atopici, zowel van die met een laag als van die met een hoog serum-IgE-gehalte, was hoger dan de fluorescentie intensiteit van de basofielen van de controles. Het basofielgebonden IgE bleek ook samen te hangen met het IgE-gehalte in het serum. Bij atopici met een laag IgE-gehalte in het serum was de fluorescentie intensiteit van de basofielen lager dan bij atopici met een hoog serum-IgE, maar toch aanzienlijk hoger dan bij controle personen met hetzelfde lage IgE-gehalte in het serum.

Bij de lokale atopische reacties zijn echter vooral de mestcellen belangrijk. Daarom wordt in Hoofdstuk VII de IgE-belading van basofielen en mestcellen van dezelfde personen onderzocht en vergeleken. De hoeveelheid IgE gebonden aan mestcellen kan worden gemeten met een semiquantitatieve methode: op vriescoupes van bronchiaal weefsel, tonsillen en adenoid wordt de immunofluorescentie techniek toegepast met een verdunningsreeks van het FlalIgE. De hoogste verdunning van het antiserum waarbij nog mestcelfluorescentie te zien was, bleek een maat te geven voor de hoeveelheid mestcelgebonden IgE. Atopische patiënten hadden een grotere hoeveelheid mestcelgebonden IgE dan niet atopische personen. Evenals bij de basofielen bleek ook bij de mestcellen het serum-IgE-gehalte van invloed te zijn op de hoeveelheid celgebonden IgE. Bij 37 personen konden we de hoeveelheid mestcelgebonden IgE vergelijken met de IgE-belading van de basofielen. Er werd een overeenkomst gevonden tussen de mate van IgE-belading op de twee soorten cellen.

In Hoofdstuk VIII komt de vraag aan de orde of de verschillen in celgebonden IgE veroorzaakt worden door verschillen in dichtheid van de IgE moleculen op het oppervlak van de basofiel, of door toename van het oppervlak van de celmembraan, bijvoorbeeld door villi-vorming. IgE gebonden aan de basofiele granulocyt werd aangetoond met immunoelectrone microscopie met behulp van een met mierikswortel-peroxidase gelabeld anti-IgE. De verdeling van het IgE op de basofielen werd onderzocht bij atopische en niet atopische personen. De intensiteit van de peroxidaseractie op de basofielen

bleek overeen te komen met de hoeveelheid basofielgebonden IgE gemeten met quantitative immunofluorescentie microscopie. Villi werden zelden waargenomen en droegen niet in belangrijke mate bij aan de hoeveelheid celmembraanoppervlak.

Hoofdstuk IX behandelt de relatie tussen de IgE-receptoren op de basofiele leukocyt en het vrije serum-IgE. In de voorgaande hoofdstukken werd de correlatie beschreven die gevonden werd tussen de hoeveelheid IgE op basofielen en de IgE-spiegel in het serum. In dit hoofdstuk wordt getoond dat deze resultaten passen in een vrij uitwisselingsmodel met een ongeveer konstante K-waarde. We onderzochten of vrije IgE-receptoren op de basofiel, die volgens dit model aanwezig zouden zijn, verzadigd konden worden door de celsuspensies te incuberen met myeloom-IgE of met sera van patiënten met een verhoogd IgE-gehalte. Leukocyten van zowel atopische als niet atopische personen werden op deze wijze behandeld onder verschillende incubatie-omstandigheden, maar met quantitative immunofluorescentie microscopie kon geen toename van het basofielgebonden IgE gemeten worden. Voorts kon geen dissociatie van celgebonden IgE worden aangetoond na 24 uur incubatie in een IgE-vrij medium. Op grond van deze bevindingen wordt een ander hypothetisch model ontwikkeld waarin rekening wordt gehouden met de receptor-turnover: hierbij wordt aangenomen dat de funktionele halfwaarde tijd van de vrije receptor op de celmembraan korter is dan die van de receptoren waaraan IgE gebonden is. Dit model voor het verband tussen IgE en de IgE-receptor op basofiele granulocyten kan de genoemde tegenstrijdige resultaten verklaren.