

In dit proefschrift wordt de vraagstelling behandeld welke factoren bepalend zijn voor het al dan niet optreden van verhoogde bloedafbraak in patiënten met IgG niet-complement bindende auto-antistoffen en -zo er sprake is van verhoogde bloedafbraak door deze antistoffen teweeggebracht- via welk mechanisme deze versterkte haemolyse wordt geëffectueerd.

Zoals uiteengezet in Hoofdstuk I, werd de relatie bestudeerd tussen de aanwezigheid van de verschillende IgG subklassen op de erythrocyten van patiënten met bovengenoemde auto-antistoffen en het al of niet optreden van verhoogde bloedafbraak in vivo. Bovendien werd onderzocht of the patiënte-erythrocyten in vitro gebonden werden door monocytten, welke geïsoleerd waren uit het bloed van gezonde donoren.

Het bleek, dat de aanwezigheid van IgG3 auto-antistoffen vrijwel altijd gepaard ging met het bestaan van een haemolytische anaemie, terwijl de aanwezigheid van IgG1 auto-antistoffen in sommige patiënten wel, maar in andere niet was geassocieerd met symptomen, veroorzaakt door een verkorting van de overlevingsduur van erythrocyten. Patiënten met IgG2 en IgG4 auto-antistoffen vertoonden geen tekenen van verhoogde bloedafbraak en hun erythrocyten werden in vitro niet gebonden aan monocytten.

Het verband, dat gevonden werd tussen de adherentie van patiënte-erythrocyten aan monocytten en de aanwezigheid van de onderscheiden subklassen, bleek identiek te zijn aan het verband tussen de subklasse samenstelling en het voorkomen van haemolytische anaemie. Dit impliceerde, dat er een sterke relatie werd gevonden tussen de aanwezigheid van verhoogde bloedafbraak in de patiënt en de binding van patiënte-erythrocyten aan monocytten in vitro, terwijl bij afwezigheid van verhoogde bloedafbraak ook geen binding in vitro waarneembaar was. Deze resultaten ondersteunen de veronderstelling, dat adherentie van met inkomplete IgG auto-antistoffen beladen erythrocyten aan mononucleaire fagocyten een belangrijke rol speelt in de afbraak van deze rode bloedcellen in patiënten met AIHA.

Voorts werd gesuggereerd, dat IgG1 auto-antistoffen verder onder te verdelen zouden zijn in 2 typen, waarvan slechts één binding aan mononucleaire fagocyten en daarmee verhoogde bloedafbraak zou kunnen be-

werkstelligen. In Hoofdstuk IV wordt de onjuistheid van deze gedachte aangetoond.

In Hoofdstuk II wordt een patiënt beschreven op wiens erythrocyten IgG4 auto-antistoffen aantoonbaar waren in hoge titer, terwijl deze zelfde rode cellen slechts zwak werden geagglutineerd door anti-IgG1 en anti-IgG3 serum in de directe antiglobuline test. Aangezien de overlevingsduur van de patiënte-erythrocyten, bepaald met ^{51}Cr , slechts gering verkort was en in vitro maar een zeer zwakke binding aan monocytten werd waargenomen vormt dit andermaal een bevestiging van het belang van de subklassen in verband met het al of niet optreden van verhoogde bloedafbraak. De milt van deze patiënt funktioneerde normaal, aangezien donor-erythrocyten, gesensibiliseerd met IgG anti-D allo-antistoffen, in dit orgaan werden gesequestreerd.

In Hoofdstuk III worden de factoren belicht, die belangrijk zijn in verband met de remming van de interactie gesensibiliseerde erythrocyt-monocyt in vitro.

De verkregen resultaten maken duidelijk, dat tenminste twee factoren de remming door IgG kunnen beïnvloeden. In de eerste plaats bleek, dat verhoging van het aantal erythrocyten per monocyt leidde tot een verminderde remming door IgG. Verhoging van het aantal sensibiliserende IgG antistoffen per erythrocyt had een soortgelijk effect. In het milieu van de milt kunnen deze twee factoren hun invloed op de remming door IgG doen gelden.

In Hoofdstuk IV wordt teruggekeken op de in Hoofdstuk I vermelde bevinding, dat sommige patiënten met uitsluitend IgG1 auto-antistoffen lijden aan AIHA terwijl in andere patiënten met deze antistoffen geen tekenen van versterkte haemolyse aantoonbaar zijn. Duidelijker gezegd, het is onderzocht of deze waarneming berust op het bestaan van kwalitatieve verschillen binnen de IgG1 antistoffen, of dat juist kwantitatieve factoren, de hoeveelheid IgG1 auto-antistoffen, van invloed zijn. De relatieve hoeveelheid IgG1 op de erythrocyten werd bepaald met behulp

van een fluorescentie techniek, die geschikt was gebleken om de hoeveelheden IgG antistof, aanwezig op in verschillende mate gesensibiliseerde erythrocyten met elkaar te vergelijken. Na inkubatie met een anti-IgG serum, waaraan een fluorescerend label gekoppeld was, werd de sterkte van de fluorescentie bepaald. Op deze manier werd de hoeveelheid IgG antistoffen op erythrocyten van patiënten met AIHA vergeleken met die aanwezig op erythrocyten van patiënten die geen symptomen van verhoogde bloedafbraak vertoonden.

Tevens werd de mate, waarin de verschillende patiëntecellen werden gelyseerd door monocyten *in vitro* onderzocht. De resultaten wezen uit, dat voornamelijk de hoeveelheid IgG op de erythrocyten, en niet de kwaliteit van deze antistoffen, bepaalde of er versterkte haemolyse optrad. Bovendien werd een fraai verband tussen de op de erythrocyt aanwezige hoeveelheid IgG en de afbraak van deze patiënte-erythrocyten door monocyten *in vitro* aangetoond.

Het bovenvermelde gold ook voor die gevallen, waarin de auto-antistoffen waren ontstaan tijdens het gebruik van α -methyl-dopa.

In Hoofdstuk V worden de resultaten beschreven van een longitudinaal onderzoek, verricht in patiënten met autoimmuun haemolytische anaemie (AIHA), waarbij het verband werd onderzocht tussen het verloop van de ziekte en het effect van de therapie enerzijds en het voorkomen van de verschillende IgG subklassen en de relatieve hoeveelheid antistof op de erythrocyten anderzijds. Hiertoe werden in de loop van de tijd regelmatig bloedmonsters van de patiënt afgenomen. Tevens werd de binding van de patiënte-erythrocyten aan monocyten en de daaruit voortvloeiende afbraak van deze cellen *in vitro* bestudeerd.

Om de betekenis van de cytotoxiciteits-test als parameter in AIHA te bepalen, werd allereerst het verband onderzocht tussen de aanwezigheid van tekenen van verhoogde bloedafbraak *in vivo* en de cytotoxiciteit *in vitro*. Het bleek, dat de erythrocyten van de patiënten met een manifeste haemolyse sterker werden afgebroken door de monocyten dan die van patiënten zonder symptomen van verhoogde bloedafbraak. Dit versterkte andermaal de veronderstelling, dat cytotoxische lysis van erythrocyten een belangrijk destructie mechanisme is in de afbraak van erythrocyten in AIHA.

In de patiënten, die goed op de therapie reageerden, kon een significante daling worden aangetoond van de hoeveelheid antistoffen op de rode bloed cellen. Deze daling ging gepaard met een afnemende binding en lysis van deze cellen *in vitro*. In sommige gevallen veranderde gedurende de behandeling met corticosteroiden de samenstelling van de subklassen op de erythrocyten. Zo trad bij patiënten met IgG3 auto-antistoffen een duidelijke verbetering van de haemolytische anaemie op met het verdwijnen van deze subklasse. Te zelfder tijd verminderde de adherentie van de patiënte-erythrocyten aan monocyten. Ook het aantal erythrocyten, dat door de fagocyten *in vitro* werd gelyseerd, nam af.

Samen met de vermindering van de hoeveelheid IgG1 auto-antistoffen verbeterden de patiënten, op wier erythrocyten deze subklasse aantoonbaar was. Ook in deze gevallen werd de interactie tussen de rode cellen en de monocyten *in vitro* zwakker. De aanwezigheid van IgG2 en IgG4 auto-antistoffen op de patiënte-erythrocyten leidde niet tot verhoogde bloedafbraak *in vivo* noch tot adherentie en cytotoxiciteit *in vitro*.

Naast de bovengenoemde effecten leek de therapie met corticosteroiden ook de werking van de mononucleaire fagocyten *in vivo* te beïnvloeden. Aan de hand van enkele gevallen worden de verschillende reacties op de behandeling besproken.

In Hoofdstuk VI wordt de cytotoxische activiteit van granulocyten, monocyten en lymfocyten, geïsoleerd uit het bloed van patiënten lijdende aan een acute infectieziekte, *in vitro* bestudeerd.

Tijdens de ziekte bleken de granulocyten van deze patiënten significant meer met anti-D gesensibiliseerde erythrocyten te lyseren dan na genezing, terwijl de cytotoxische activiteit van monocyten onveranderd bleef gedurende de periode van de infectie. Lymfocyten waren in deze proefopstelling niet in staat gesensibiliseerde erythrocyten te lyseren.

Bovenstaande resultaten suggereren, dat granulocyten een bijdrage zouden kunnen leveren aan de verhoogde erythrocytenafbraak, welke af en toe wordt waargenomen bij patiënten met AIHA als zij een infectie doormaken.

In hoofdstuk VII tenslotte, worden de experimenten vermeld, die verricht werden om de invloed van

cryopreservatie -het 'diepvriezen'- van monocyten op de functie van deze cellen vast te stellen.

De monocyten werden ingevroren volgens een automatisch gecontroleerd koelingsprogramma en daarna opgeslagen in vloeibare stikstof. Na vriezen, dooien en wassen werd 63% van het oorspronkelijk aanwezige aantal cellen teruggewonnen. Gemeten met de trypaanblauw exclusie test, was 95% van deze cellen vitaal. Het percentage monocyten in de celsuspensies (70-80%) veranderde niet door de opslag bij -196°C . Alhoewel het percentage cellen, dat erythrocyten bond niet was veranderd na bevriezen en weer ontdooien, bleek dat deze rozetvorming makkelijker geremd werd door toevoeging van IgG.

De cytotoxische activiteit van monocyten jegens erythrocyten, die met IgG allo-antistoffen beladen zijn, was door de vries- en dooiprocedure niet veranderd, in tegenstelling tot hun vermogen om zymosan deeltjes te fagocyteren, dat was verminderd. Ook de chemotactische respons na stimulatie door caseïne was na het vriezen lager dan daarvoor.

De reaktiviteit in de verschillende testsystemen van monocyten, die slechts voor korte duur (2-15 uur) waren opgeslagen in vloeibare stikstof, verschilde niet van die van monocyten, die langer dan 3 maanden bewaard werden.

Bovengenoemde resultaten impliceren, dat het mogelijk is monocyten bij -196°C te bewaren, zij het dan met een enigszins veranderde reaktiviteit in sommige testsystemen als gevolg. In de experimenten, beschreven in de Hoofdstukken IV en V, is gedeeltelijk gebruik gemaakt van monocyten, die op deze wijze zijn bewaard.

De resultaten van de onderzoeken, die zijn neergelegd in dit proefschrift, ondersteunen ten sterkste de veronderstelling, dat in patiënten met AIHA, erythrocyten worden afgebroken, doordat zij gebonden en daarna beschadigd of vernietigd worden door mononucleaire fagocyten *in vivo*.

De samenstelling van de IgG subklassen, alsmede de hoeveelheid antistoffen op de patiënte-erythrocyten lijken (mede) te bepalen of de remming *in vivo* door IgG al dan niet overwonnen kan worden en daarmee of er wel of geen manifeste haemolyse optreedt. Gerede-

neerd vanuit dit gezichtspunt, suggereert de waarne-
ming, dat de aanwezigheid van IgG3 auto-antistoffen bijna altijd gepaard gaat met verhoogde bloedafbraak, dat antistoffen van deze subklasse, gebonden aan de erythrocyt, betrekkelijk makkelijk de remming door IgG kunnen overwinnen. IgG2 en IgG4 auto-antistoffen lijken niet actief deel te nemen aan bovengenoemde processen, terwijl het effect van de IgG1 auto-antistoffen duidelijk afhangt van de hoeveelheid van deze subklasse, die aan het erythrocytenoppervlak is gebonden. Aangezien de afbraak van erythrocyten in patiënten met AIHA hoofdzakelijk in de milt is gelokaliseerd, lijkt het speciale milieu in dit orgaan van groot belang met betrekking tot het verschijnsel van de remming door IgG.