

Short Communications

Complementactivatie op micropartikels

É. BIRÓ¹, R. NIEUWLAND¹, C.E. HACK² en A. STURK¹

Het complementsysteem is een belangrijk onderdeel van het aangeboren immuunsysteem. Dit systeem kan worden geactiveerd door pathogene micro-organismen, immuuncomplexen en necrotische of apoptotische cellen (1, 2). Deze activatie kan via een directe interactie tussen het activeringsoppervlak (micro-organismen of cellen) en het complement optreden, of kan worden veroorzaakt door speciale activatormoleculen zoals immuunglobulines, C-reactief proteïne (CRP), of serum-amyloïd-P-component (SAP) die aan het activeringsoppervlak binden. Er zijn drie verschillende activatieroutes van het complementsysteem beschreven. De 'klassieke route' wordt geactiveerd door immuuncomplexen met immuunglobuline (Ig)G of IgM, door complexen met CRP of SAP, of door sommige micro-organismen direct. Deze route bestaat uit de complementfactoren C1q, C1s, C1r, C4, C2 en C3. De 'lectineroute' wordt geactiveerd door bepaalde terminale suikergroepen aanwezig op het oppervlak van micro-organismen, welke groepen het mannose-bindend lectine of een ficoline binden. Deze activeren op hun beurt via mannose-bindend lectine-geassocieerde serineprotease de factoren C4, C2, en C3. De 'alternatieve route' wordt geactiveerd door koolhydraatstructuren op micro-organismen en door immuuncomplexen met IgA, en bestaat uit de factoren C3, D, B en properdine. De laatste route functioneert ook als een amplificatie voor activatie via de klassieke of lectineroute. Alle genoemde activatieroutes leiden uiteindelijk tot activatie van C3 en tot de vorming van het 'membrane attack complex' (MAC), bestaande uit de factoren C5, C6, C7, C8, en C9.

Het geactiveerde complementsysteem stimuleert chemotaxis en activatie van leukocyten (d.m.v. oplosbare fragmenten C3a, C4a en C5a), zorgt voor opsonisatie waardoor fagocytose wordt bevorderd (d.m.v. C3b en C4b welke covalent aan het complementactiverende oppervlak zijn gebonden, en degradatiefragmenten hiervan), en veroorzaakt lysis (d.m.v. het MAC). Samen resulteren alle hiervoor genoemde processen in

het opruimen van pathogenen, immuuncomplexen, of necrotische en apoptotische cellen. Onder bepaalde omstandigheden kan het complementsysteem ook weefselschade veroorzaken, bijvoorbeeld bij groot-schalige (systemische) activatie tijdens sepsis (3), bij weefselnecrose zoals optreedt bij myocardinfarct (4), en bij diverse auto-immuunprocessen.

Micropartikels zijn kleine blaasjes die van cellen worden afgesnoerd tijdens celactivatie of apoptose. Ze spelen een rol in stollings- en ontstekingsprocessen, en kunnen vasculaire functies beïnvloeden (5). Door het overdragen van bioactieve moleculen, zoals arachidonzuur of geoxydeerde fosfolipiden, of door ligand-receptorinteracties, zoals die tussen P-selectine (aanwezig op micropartikels) en het ligand P-selectine-glycoproteïneligand-1 (op leukocyten), zijn micropartikels in staat om chemotaxis, adhesie en accumulatie van leukocyten te veroorzaken, evenals een verhoogde fagocyterende activiteit, en kunnen leukocyten of endotheelcellen worden aangezet tot verhoogde expressie en aanmaak van adhesiemoleculen, cytokinen, lipidenmediatoren of matrix-metalloproteasen (5, 6).

Er zijn ook aanwijzingen dat micropartikels het complementsysteem kunnen activeren. Ten eerste vertoont de fosfolipidensamenstelling van het membraan van micropartikels bepaalde overeenkomsten met die van necrotische of apoptotische cellen, waarvan bekend is dat ze de klassieke route van het complement kunnen activeren. Micropartikels en hiervoor genoemde cellen exposeren fosfatidylserine, fosfatidyletanolamine, lysofosfolipiden, en geoxydeerde fosfolipiden (7, 8). Ten tweede zijn er in-vitrostudies gepubliceerd door Nauta et al. en Gasser et al., welke laten zien dat micropartikels afkomstig van apoptotische T(Jurkat)-cellen of geactiveerde neutrofielen C1q kunnen binden en vervolgens de klassieke route van complement activeren (9, 10). Dit laatste bleek uit de aanwezigheid van C4- en C3-fragmenten aan het oppervlak van de micropartikels. In hoeverre micropartikels ook in vivo complement kunnen activeren is niet duidelijk, de onderzoekers konden ex vivo geen verschil aantonen tussen C1q-binding aan micropartikels afkomstig van gezonde proefpersonen en van patiënten met systemische lupus erythematosus (9).

In een aantal studies hebben wij micropartikels geïsoleerd uit plasma van gezonde personen en patiënten met reumatoïde artritis (RA), pre-eclampsie, hart- en

Afd. Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam¹; Crucell, Leiden²

Correspondentie: É. Biró, Afd. Klinische Chemie, F1-219, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Postbus 22660, 1100 DD Amsterdam
E-mail: E.Biro@amc.nl

vaatziekten, en patiënten die cardiochirurgie met cardiopulmonaire bypass ondergingen. Vervolgens hebben wij onderzocht of C1q, C4 en/of C3 (d.w.z. C4b en/of C3b, of degradatiefragmenten hiervan) aan deze micropartikels waren gebonden. Om het mechanisme van complementactivatie verder te ont-rafelen, hebben wij ook de micropartikels onder-zocht op de aanwezigheid van de activatormoleculen CRP, SAP, IgM en IgG. De studies met gezonde vrij-willigers, RA-patiënten, gezonde zwangeren en pre-eclampsie patiënten zullen hier verder besproken worden (11, 12).

Methoden

Micropartikels werden geïsoleerd d.m.v. differentiële centrifugatie uit synoviaalvloeistof van ontstoken kniegewrichten van patiënten met RA, uit plasma van deze patiënten, en uit plasma van gezonde vrijwilligers van overeenkomstige leeftijd en geslacht (11). Micropartikels zijn tevens geïsoleerd uit plasma van pre-eclampsiepatiënten, gezonde zwangeren, en ge-zonde niet-zwangere vrouwen van overeenkomstige leeftijd, pariteit, en zwangerschapsduur (indien van toepassing) (12).

De aanwezigheid van micropartikel-gebonden complement factoren (C1q, C4, C3) en activatormolecu-len (CRP, SAP, IgM, IgG) werd m.b.v. flowcytome-trie geanalyseerd, waarbij gebruik werd gemaakt van monoklonale antistoffen en een indirecte aankleu-ringsprocedure (11, 12).

Resultaten

Gezonde personen

Het plasma van gezonde vrijwilligers bevatte lage, maar aantoonbare aantallen micropartikels met C1q, C4 of C3 op hun oppervlak. De aanwezigheid van deze drie complementfactoren duidde op activatie van de klassieke route, wat verder werd bevestigd door de correlatie tussen de aantallen micropartikels met gebonden C1q versus die met gebonden C4. Tevens bleken zowel micropartikels met de activator-moleculen SAP (hoogste aantallen), IgM (één na hoogste aantallen), CRP of IgG (beide in zeer lage aantallen) aanwezig. Er was een significante correlatie tussen micropartikels met gebonden CRP en die met gebonden C1q, hetgeen wijst op een mogelijke rol van CRP als complementactivator op microparti-kels in plasma van gezonde vrijwilligers (11, 12).

RA-patiënten versus gezonde personen

Plasma van RA-patiënten bevatte vergelijkbare aan-tallen micropartikels met C1q, C4 of C3 op hun op-pervlak t.o.v. plasma van gezonde vrijwilligers, ter-wijl de totale aantallen micropartikels ongeveer twee keer hoger waren. Ook in het plasma van RA-patiënten correleerden de aantallen micropartikels met gebonden C1q met de aantallen micropartikels met gebonden C4. De aantallen micropartikels met activatormoleculen verschilden niet van die van ge-zonde vrijwilligers, en micropartikels met gebonden CRP correleerden ook in deze monsters met die met gebonden C1q. Er werden dus geen verschillen in de

micropartikel-geassocieerde complementactivatie in plasma van RA-patiënten en gezonde vrijwilligers gevonden (11).

Synoviaalvloeistof van RA-patiënten bevatte 20-40 keer hogere aantallen micropartikels met C1q, C4 of C3 in vergelijking met plasma van gezonde vrijwille-gers, terwijl de totale aantallen micropartikels slechts 5 keer hoger waren. Micropartikels met gebonden C1q correleerden met micropartikels met gebonden C3. Dat er geen correlatie was met micropartikels met gebonden C4 maar wel met die met gebonden C3 kan mogelijk worden verklaard door een verschil-lende mate van activatie van de alternatieve route, of door een verschillende klaringsnelheid van micro-partikels met gebonden C3 en C4 in synoviaalvloe-i-stof versus plasma. Synoviaalvloeistof bevatte sig-nificant verhoogde aantallen micropartikels met gebonden IgM- en IgG-moleculen. Daarnaast was een significante correlatie aanwezig tussen micropartikels met gebonden IgM of IgG en micropartikels met ge-bonden C1q. Een correlatie tussen micropartikels met gebonden CRP en C1q ontbrak. Deze resultaten wij-zen erop dat micropartikels in synoviaalvocht met name via de activatormoleculen IgM en IgG comple-ment activeren (11).

Gezonde zwangere versus gezonde niet-zwangere vrouwen

Plasma van gezonde zwangere vrouwen bevatte iets lagere aantallen micropartikels met gebonden C3 dan plasma van gezonde niet-zwangere vrouwen. Micro-partikels met gebonden C1q en C4 waren in verge-lijkbare aantallen aanwezig, en de totale aantallen micropartikels verschilden niet. De aantallen micro-partikels met gebonden C1q correleerden met de aan-tallen micropartikels met gebonden C4, net als bij ge-zonde niet-zwangere vrouwen. Bij deze laatste groep, in tegenstelling tot de gezonde vrijwilligers van de RA-studie, was er ook een correlatie aanwezig met micropartikels met C3. (In de RA-studie werden rela-tief lage aantallen vrijwilligers en patiënten be-studeerd.) De aantallen micropartikels met gebonden activatormoleculen verschilden niet van die van ge-zonde niet-zwangere vrouwen. De aantallen micro-partikels met gebonden CRP-, IgM- en IgG-mole-culen in de zwangere vrouwen correleerden met micropartikels met gebonden C1q. Hiermee werden aanwijzingen gevonden voor een mogelijk verlaagde mate van complementactivatie op de micropartikels in het plasma van gezonde zwangere vrouwen t.o.v. niet-zwangeren, en de resultaten wijzen op een ander patroon van deze activatie middels de activatoren CRP, IgM en IgG i.p.v. alleen CRP (12).

Pre-eclampsiepatiënten versus gezonde zwangere vrouwen

Plasma van pre-eclampsiepatiënten bevatte vergelijk-bare aantallen micropartikels met C1q, C4 of C3 op hun oppervlak t.o.v. plasma van gezonde zwangere vrouwen, en de totale aantallen micropartikels waren ook vergelijkbaar. Een correlatie tussen de aantallen micropartikels met gebonden C1q en die met gebonden C3 of C4 was niet aantoonbaar. De aantallen micro-

partikels met gebonden CRP waren sterk verhoogd in pre-eclampsiepatiënten (gemiddeld 5 keer hoger) in vergelijking tot gezonde zwangeren en de aantallen micropartikels met gebonden SAP, IgM of IgG waren vergelijkbaar. De aantallen micropartikels met CRP correleerden niet met de aantallen micropartikels met C1q, wel de micropartikels met SAP of IgG. De verhoogde aanwezigheid van micropartikels met het activatormolecuul CRP op hun oppervlak lijkt dus niet tot verhoogde complementactivatie op de micropartikels in het plasma van de vrouwen met pre-eclampsie te leiden (12).

Conclusies

Deze studies laten voor het eerst zien dat er zowel gebonden complementfragmenten als complementactivatormoleculen aanwezig zijn op het oppervlak van micropartikels *ex vivo*. Daarmee ondersteunen deze resultaten de hypothese dat micropartikels niet alleen *in vitro* maar ook *in vivo* de klassieke route van het complementsysteem kunnen activeren. Zelfs bij gezonde vrijwilligers is dit het geval, maar de aantallen micropartikels met gebonden complementfragmenten zijn bij deze groep zeer laag. Deze bevindingen passen goed bij het feit dat bij gezonde personen een laag (basaal) niveau van complementactivatie plaatsvindt. CRP lijkt hierbij het belangrijkste activatormolecuul te zijn.

De bevindingen bij RA-patiënten, gezonde zwangeren en pre-eclampsiepatiënten t.o.v. gezonde controles zijn samengevat in tabel 1. Hoewel in het plasma van RA-patiënten geen verschillen werden gevonden t.o.v. gezonde controles, zijn er duidelijke aanwijzingen

voor een sterk verhoogde complementactivatie op het micropartikeloppervlak in synoviaalvloeistof, welke hoogstwaarschijnlijk door IgM en IgG is gemedieerd (11). Ook dit is in overeenstemming met het feit dat in gewrichten van RA-patiënten sterke complementactivatie plaatsvindt. In gezonde zwangeren is er mogelijk een verlaagde activatie van het complementsysteem op micropartikels, en naast CRP lijken ook IgM en IgG betrokken te zijn. In pre-eclampsiepatiënten zijn geen aanwijzingen gevonden voor een verhoogde complementactivatie op micropartikels t.o.v. gezonde zwangeren. De sterk verhoogde aantallen micropartikels met gebonden CRP geven mogelijk de verhoogde inflammatoire status en daarmee verhoogde plasma-CRP-concentraties bij deze vrouwen weer (12).

Een belangrijke kanttekening die nog moet worden geplaatst bij deze resultaten is dat het niet kan worden uitgesloten dat complementactivatie *in vivo* niet op de micropartikels zelf maar op cellen heeft plaatsgevonden, welke vervolgens micropartikels hebben afgesnoerd. Er zijn aanwijzingen dat complementactivatie zelfs bijdraagt aan dit afsnoeringsproces. Waarschijnlijk kunnen zowel de cellen als de door hen afgesnoerde micropartikels het complement activeren, maar deze processen zijn experimenteel moeilijk van elkaar te onderscheiden.

Dankwoord

De auteurs willen prof. dr. P.P. Tak, drs. C.A.R. Lok, mevr. L.M. Pronk en mevr. M.C.L. Schaap bedanken voor hun bijdrage aan deze studies.

Tabel 1. Aantallen micropartikels met gebonden complementfactoren of gebonden activatormoleculen t.o.v. plasma van gezonde controles, en correlatie van aantallen micropartikels met gebonden C1q met micropartikels met gebonden activatormoleculen

	Gezonde personen	RA-patiënten versus gezonde personen		Gezonde niet-zwangere vrouwen	Gezonde zwangere versus gezonde niet-zwangere vrouwen	Pre-eclampsiepatiënten versus gezonde zwangeren
	Plasma	Plasma	Synoviaalvloeistof	Plasma	Plasma	Plasma
Aantallen						
C1q-MP		-	↑↑		-	-
C4-MP		-	↑↑		-	-
C3-MP		-	↑↑		↓	-
CRP-MP		-	-		-	↑
SAP-MP		-	-		-	-
IgM-MP		-	↑		-	-
IgG-MP		-	↑		-	-
Correlatie C1q-MP met						
CRP-MP	+	+	-	+	+	-
SAP-MP	-	-	-	-	-	+
IgM-MP	-	-	+	-	+	-
IgG-MP	-	-	+	-	+	+

CRP: C-reactief proteïne; IgG: immuunglobuline G; IgM: immuunglobuline M; MP: micropartikels; SAP: serum-amyloid-P-component. ↑ / ↑↑ / ↓ Verhoogde / sterk verhoogde / resp. verlaagde aantallen MP t.o.v. plasma van controles.

- Aantallen niet verschillend t.o.v. plasma van controles, dan wel correlatie van MP met gebonden C1q niet aanwezig met de genoemde MP. + Correlatie van MP met gebonden C1q wel aanwezig met de genoemde MP.

Referenties

1. Hack CE, Wolbink GJ, Schalkwijk C, Speijer H, Hermens WT, Bosch H van den. A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunol Today* 1997; 18: 111-5.
2. Seelen MA, Trouw LA, Daha A, Roos A. De rol van het complementsysteem in de afweer tegen infecties en nieuwe bepalingmogelijkheden van de activatieroutes. *Ned Tijdschr Geneesk* 2004; 148: 2318-23.
3. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 133-42.
4. Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FW, Meijer CJ, Hack CE. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 97-103.
5. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 392-401.
6. Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3337-48.
7. Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 2002; 302: 191-8.
8. Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL, Binder BR, Leitinger N. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 101-7.
9. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijmsa O, Nieuwland R, Schwaeble WJ, Gingras AR, Mantovani A, Hack EC, Roos A. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1726-36.
10. Gasser O, Schifferli JA. Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocytes in the presence of complement. *Exp Cell Res* 2005; 307: 381-7.
11. Biró É, Nieuwland R, Tak PP, Pronk LM, Schaap MC, Sturk A, Hack CE. Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis* published online 29 Jan 2007; doi:10.1136/ard.2006.061309.
12. Biró É, Lok CA, Hack CE, Post JA van der, Schaap MC, Sturk A, Nieuwland R. Cell-Derived Microparticles and Complement Activation in Preeclampsia Versus Normal Pregnancy. *Placenta* published online 11 Apr 2007; doi:10.1016/j.placenta.2007.02.008.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 173-175

Detection of drugs-of-abuse in athletes

D. de BOER

Drugs-of-abuse (DOA) in sports is as old as modern sports itself and started at the end of the 19th century. In those days developments in science lead to the isolation and identification of several alkaloids; naturally occurring amines produced by plants, which are pharmacologically active. Consequently, the first kind of drugs applied in sports were the alkaloids such as morphine, heroine (synthetic variant of morphine), caffeine, cocaine and strychnine. Alkaloids remained the drugs of interest until the 2nd World War (Figure 1). Their application was not considered to be an abuse in human sports and therefore detection of alkaloids as DOA was not an issue for athletes. However, at the beginning of the 20th century the administration of alkaloids in horse racing was regarded as game and gambling fraud and because of that testing for horses was initiated as early as 1910.

Department of Clinical Chemistry, University Hospital Maastricht, Maastricht

E-mail: ddb@klinchem.azm.nl

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007, vol. 32, no. 3

In the late twenties of the last century detection of DOA in horse racing consisted of screening for alkaloids in saliva by colorimetry (1). Saliva was chosen, as urine collection was considered to be dangerous and impracticable. Alcohol was applied in order to stimulate sufficient amounts of saliva. For detection different analytical chemical approaches were already available. The STASS-DRAGENDORF procedure for example included distillation to remove ethanol, liquid/liquid extraction and precipitation to isolate the alkaloids. Finally, using general and specific colour reactions it was possible to screen for alkaloids in general and to confirm certain alkaloids specifically. The 2nd World War induced significant changes as certain drugs were applied to improve the performances of soldiers. Amphetamine was used for example to deprive them from exhaustion (2) and anabolic androgenic steroids (AAS) were supposed to make them more aggressive (3). After the war the returning soldiers are assumed to have introduced these drugs into the society and sports. However, testing of athletes remained a non-issue during the first two decades after the war. Detection of DOA