

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİ NÜKLEER ANTİKORLARIN FARKLI
YÖNTEMLERLE BAKILMASI VE ALT GRUPLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

Bio. Emine Sacide ÇAĞLAYAN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. Orhan Cem AKTEPE

Tez No:2006-016

2006-AFYON

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunması Tarihi: 09 / 06 / 2006

Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE
ÜYE

Yrd Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ
ÜYE

Prof. Dr. Turgut İMİR
ÜYE

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans
öğrencisi Emine Sacide ÇAĞLAYAN'ın " Antinükleer Antikorların Farklı
Yöntemlerle Bakılması ve Alt Gruplarının Karşılaştırılması" başlıklı tezi, 09. 06.
2006 Cuma günü saat 14:00'da lisansüstü eğitim ve öğretim sınav yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Fevzi Sefa DEREKÖY
Enstitü Müdürü

III

ÖNSÖZ

Tez hazırlama döneminde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Doç. Dr Orhan Cem AKTEPE başta olmak üzere bana emeği geçen bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime başladığım Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 'nda öncelikle danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr Turgut İMİR'e ve ardından beni yüreklendiren bütün hocalarıma en içten teşekkürlerimi iletmek istiyorum.

Hayatın her aşamasında olduğu gibi Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni yalnız bırakmayan ve destekleyen aileme içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
KISALTMALAR.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
1.1 TARİHÇE.....	7
1.2 İMMÜNOLojİK TOLERANS.....	8
1.2.1 Santral Tolerans.....	10
1.2.2 Periferal Tolerans.....	11
1.3 OTOİMMÜNİTE.....	12
1.3.1 Otoimmün Mekanizmalar.....	12
1.3.2 Otoimmünite Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	14
1.4 OTOİMMÜN HASTALIKLAR.....	15
1.4.1 Sistemik Otoimmün Hastalıklar.....	16
1.4.1.1 Romatoid Artrit.....	17
1.4.1.2 SLE.....	18
1.4.1.3. Sjögren Sendromu.....	19
1.4.1.4 Skleroderma.....	19
1.4.1.5 Polimiyozitis/ Dermatomyozit.....	20
1.4.2. Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar.....	20
1.4.3 Otoantikorlar.....	24
1.4.3.1. ANA.....	25
1.5 TANI YÖNTEMLERİ.....	32
1.5.1 İmmüno floresan Antikor Testi.....	33
1.5.2 İmmünodiffüzyon.....	35
1.5.3 Counter İmmünoelektroforez (CIE) Yöntemi.....	35
1.5.4 İmmünoblot.....	36
1.5.5 Radyoimmünoprespitasyon.....	37
1.5.6 RIA.....	37
1.5.7 ELISA.....	38
1.5.8 Diğer Teknikler.....	39
1.6 EPİDEMİYOLOJİ.....	40
1.7 TEDAVİ.....	41
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	43
2.1. ANA POZİTİFLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....	43
2.2. IFA.....	43
2.3. DOT BLOT.....	45
2.4. ELISA.....	46
2. 5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	48
3. BULGULAR.....	49

5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	61
7. KAYNAKLAR.....	62

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACA: Anti Sentromer Antikoru

AMA: Anti Mitokondriyal Antikor

ANA: Antinükleer Antikor

ANCA: Anti Nötrofil Sitoplazmik Antikor

Anti- Tg: Anti Tiroglobulin Antikoru

APC: Antijen Sunucu Hücreler

ASMA: Anti Smooth Muscle Antibody

ATP: Adenozin Trifosfat

BDH: Bağ Doku Hastalıkları

BCR: B Hücre Reseptörleri

CIE: Counter Immunoelectrophoresis

CREST: Kalsinozis, Raynold Fenomeni, Özefagal Dismotilite, Sklerodaktili, Telenjiestaz

DNA: Deoksi Ribonükleik Asit

DNP: Deoksiribonükleoprotein

dsDNA: Çift İplikli DNA

EBV: Ebstein-Barr Virus

EIA: Enzim İmmunoassay

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ENA: Ekstrakte Edilebilir Nükleer Antijen

FANA: Floresans ANA

GBM: Glomerular Bazal Membran

HLA: İnsan Lökosit Antijenleri

IB: İmmünoblot

IDDM: İnsüline Bağlı Diabetes Mellitus

IFA: İndirekt Floresan Antikor

IL: İnterlökin

LATS: Long- acting Thyroid Stimulator

LE: Lupus Eritematozus

VII

- MCTD:** Miks Connective Tissue Disease
MHC: Major Histokompatibilite Kompleksi
mRNA: Mesajcı RNA
PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS: Primer Biliar Siroz
PBS: Fosfat Buffer Solusyonu
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PML: Polimorfonükleer Lökositler
RA: Romatoid Artrit
RANA: Romatoid Artrit ile İlişkili Nükleer Antijen
RF: Romatoid Faktör
RIA: Radioimmunoassay
RNA: Ribonükleik Asit
RNP: Ribonükleoprotein
SLE: Sistemik Lupus Eritematozus
ssDNA: Tek İplikli DNA
TCR: T Hücre Reseptörleri
tRNA: Taşıyıcı RNA
TSH: Tiroid Uyarıcı Hormon
VDRL: Venereal Disease Research Laboratory
WB: Western Blot

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Otoimmün Hastalıklar	17
Tablo 2. Otoimmün Hastalıklarda Otoantijen- Otoantikor İlişkisi	25
Tablo 3. ANA Subtipleri ve Antijenlerle İlişkileri	31
Tablo 4. Konnektif Doku Hastalıkları ile İlişkili Otoantikorlar ve Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	39
Tablo 5. Hastaların Kliniklere Göre Dağılımı.....	49
Tablo 6. Hastalarda Cinsiyet Dağılımı.....	49
Tablo 7. IFA Yönteminde ANA Pozitifliğinin Titrelere Göre Dağılımı	50
Tablo 8. Dot Blot Yönteminde Alt Gruplara Göre Dağılım	50
Tablo 9. Dot Blot Yönteminde Alt Grupların IFA Yönteminde Titrelere Göre Dağılımı	51
Tablo 10. ELISA Yönteminde Saptanan Sonuçlar	52
Tablo 11. IFA ve Dot Blot Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	52
Tablo 12. IFA ve ELISA Yöntemlerinin Karşılaştırılması	53
Tablo 13. Dot Blot ve ELISA Yöntemlerinin İstatistiksel Analizi.....	53

ÖZET

Otoimmün hastalıklar, organizmanın kendi doku ve hücrelerine karşı immün yanıt gelişmesi sonucu oluşmaktadır ve bu hastalıkların tanısında otoantikörler büyük önem taşımaktadır. Anti nükleer antikör (ANA) adı verilen, hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer yapılara karşı gelişen otoantikörler, bağ doku hastalıklarında (BDH) önemli bir tanı kriteridir. Günümüzde, ANA pozitifliğinin saptanması amacıyla geliştirilmiş bir çok yöntem bulunmaktadır. Ancak, en eski yöntem olarak bilinen indirek immünfloresans antikör (IFA) tekniği, hala en yaygın kullanılan yöntem olma özelliğini korumaktadır. Son yıllarda, serum fizyolojik ile ekstrakte edilebilen nükleer antijenlere karşı gelişen antikörlerinin (anti ENA), BDH'ta, hastalık tipinin belirlenmesi ve şiddetinin takibinde önem taşıdığı vurgulanmaktadır. ANA pozitifliğinin yanında, alt grupların birbirinden ayırt edilmesi amacıyla geliştirilmiş yeni tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, farklı kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen, 85 (%72.6) kadın, 32 (%27.4) erkek olmak üzere toplam 117 hasta serumunda IFA, Dot Blot ve ELISA teknikleriyle ANA pozitifliği araştırılmıştır. IFA referans yöntem kabul edilerek, mikroskopik boyanma şekilleri ve titreler dikkate alınmış, Dot blot tekniği ile alt grup tayini yapılmış, ELISA ile total anti ENA antikörlerine bakılmıştır.

Çalışmamız neticesinde, IFA yöntemi ile 81 (%72.6), Dot Blot tekniği ile 98 (%83.8) ve ELISA ile 56 (%47.9) hastada ANA pozitifliği belirlenmiştir. Duyarlılık değerleri, Dot Blot için %81.2, ELISA için %71.7 olarak bulunmuştur. Özgüllük değerleri, Dot Blot yönteminde %50.0 iken ELISA tekniğinde %85.7 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, ANA pozitifliğinin belirlenmesinde tek bir yöntemle tanıya gidilmesinin gerçekçi bir uygulama olmadığı bilinmektedir. Dot Blot yöntemiyle, subtiplerin ayırt edilebilmesinin, hatta aynı hastada birden fazla alt grubun saptanabilmesinin mümkün olduğu görülmüştür. Ancak IFA ile düşük titrelerde bile doğrulanamayan pozitifliklerle karşılaştırılması, bu yöntemin tek başına

kullanılmasının sakıncalarını ortaya koymuştur. ELISA tekniğinde kısa süre içinde fazla sayıda hasta serumuyla çalışılabilmekle beraber kalitatif bir değerlendirme imkanı elde edilebilmiştir. Ancak, alt grupların birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün olmamıştır. Bu açıdan, IFA yöntemi ile beraber bir veya birkaç testin bir arada kullanılmasının, sonuçların güvenilirliği açısından uygun olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Anti nükleer antikor, anti ENA, indirekt immünofloresans antikor, Dot Blot, ELISA, otoimmün hastalık, otoantikor.

SUMMARY

Autoimmune diseases occur as a result of the immune response to self antigens and tissues of the organism and the detection of autoantibodies is very important in the diagnosis of these disorders. Antinuclear antibodies (ANA) autoantibodies generated against to nuclear/ cytoplasmic components of the cell are important diagnostic criteria for connective tissue diseases. Currently, a number of methods are available for the detection of ANA. Indirect immunofloresance antibody (IFA) method, known as the oldest technique, is still widely used. Nowadays, the autoantibodies orginated to extractable nuclear/cytoplasmic antigens, anti ENA antibodies in connective tissue disease has been noticed for evaluation of the disease differantion and the severity of the course. The new tecniques, developed for the detection of subgroups, are also needed the entities with ANA positivity.

In our study, it was investigated ANA positivity by using IFA, Dot Blotting and ELISA techniques on a total 117 patient sera from different clinics. The enrolled patients were 85 (%72.6) women and 32 (%27.4) men. IFA accepted as a reference test, for the examination titration and patterns were taken into consideration. Subgroups were determinated by Dot Blotting and total anti ENA antibodies were investigated by ELISA.

As a result of our study, the positivity was found in 81 (%72.6) sera by IFA, 98 (%83.8) sera by Dot blotting and 56 (%47.9) sera by ELISA. Sensitivity was found % 81.2 for Dot Blotting and %71.7 for ELISA . Specificity was found %50.0 for dot blotting and %85.7 for ELISA.

In conclusion, it is known that diagnosis with only one method is not a reliable approach for the detection of ANA positivity. It is shown that, it is available to differentiate subgroups of ANA and to determinate different subgroups in same patient by Dot Blotting. However, it is obvious that using this technique alone was due to detect some positive samples even though they were negative by IFA and also

when their titre were low level. It was possible work with relatively a high number of samples in a short period of time and to perform qualitative evaluation by ELISA. But with this methodology differentiating subgroups was not possible. Therefore we suggest using one or more than one tests together with IFA was suitable in order to get more reliable results.

Key words: Antinuclear antibody, anti ENA, indirect immunofluorescence antibody, Dot Blotting, ELISA, autoimmune disease, autoantibody

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün sistem, normal koşullarda kendine ait olan (self) ve kendine yabancı (nonself) molekülleri ustalıkla birbirinden ayırt edebilmekte ve self determinantlara karşı bir immün yanıt geliştirmemektedir. Ancak bazı patolojik durumlarda, bu toleransın ortadan kalkması sonucu immün sistem, organizmanın otoantijen adı verilen self yapılarına karşı da reaksiyon göstermekte ve bu durum doku hasarı ile sonuçlanmaktadır. Organizmanın self yapılara karşı immün yanıt gelişmesi durumuna otoimmünite, otoimmünizasyon sonucu gelişen hastalıklara da otoimmün hastalıklar adı verilmektedir. Otoimmün hastalıklarda, immün yanıt tek bir organ veya dokuda sınırlı ise bunlara organ spesifik otoimmün hastalıklar, birden fazla organ tutulumu söz konusu ise bu gruba sistemik (nonorgan spesifik) otoimmün hastalıklar adı verilmektedir. (1,2)

Antinükleer antikor (ANA) başlığı altında toplanan hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer komponentlere karşı gelişen antikorlar; romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematozus (SLE), sjögren sendromu dermatomyozit/polidermamiyozitis gibi sistemik otoimmün hastalıkların tanısında büyük önem taşımaktadır. Ancak bunlar; yaşlılık, kanser ve sitotoksik ilaç kullanımı gibi durumlarda da oluşabileceği için ANA pozitifliğinin, anti-ENA adı verilen ekstrakte edilebilir nükleer antijenlere karşı gelişen antikorların araştırılması ile desteklenmesi gerekmektedir.(3-5)

ANA pozitifliğinin belirlenmesinde indirek immünofloresan antikor (IFA) testi bilinen en eski yöntem olmasına rağmen günümüzde hala yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Bu yöntemde hücre nükleusunun farklı bölgelerinde yerleşim gösteren antijenlere karşı oluşan antikorlar, farklı mikroskopik paternler şeklinde belirlenebilmektedir. IFA yönteminin; basit, uygulanması kolay ve maliyeti düşük bir test olması önemli avantajlarındandır. Ancak zaman alıcı ve subjektif bir değerlendirme süreci gerektirmekte ve değerlendiren kişinin bilgili, yetenekli ve tecrübeli olması büyük önem taşımaktadır. Bunun yanında çok sayıda serum örneğinin aynı anda çalışılmasını da zorlaştırmaktadır. Son yıllarda geliştirilen

ELISA, immüno blot, immünodifüzyon, counter current immünoelektroforez ve Dot Blot gibi yöntemler objektif ve değerlendirmesi kolay yöntemler olarak rutin laboratuvarlarda IFA yöntemiyle beraber veya tek başına kullanılabilir. Ayrıca bu yöntemler arasında, ekstrakte edilebilir nükleer antijenlere karşı gelişen antikör (anti ENA) paternlerini ayrı ayrı belirleyebilme imkanı sağlayanlar da bulunmaktadır. Fakat IFA yöntemine göre maliyeti yüksek ve özgüllüğü düşük olarak kabul edildikleri için, tek başına kullanılmaları bazı önemli sorunlara neden olabilmektedir.(4-6)

Laboratuvarlarda, ANA pozitifliğinin saptanması amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin her biri kendi içinde belirli avantajlara sahip olduğu gibi bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Günümüzde, tek bir yöntemle ANA pozitifliğinin belirlenmesi, bazı rutin laboratuvarlarda uygulanabildiği gibi elde edilen sonuçları karşılaştırma amacıyla birkaç farklı yöntemin bir arada kullanıldığı da görülmektedir. Yalnızca bir yöntemin kullanılması, önemli bazı sorunları beraberinde getirebilecek bir uygulama olarak kabul edilmektedir. Altın standard olarak en eski ve yaygın kullanılan IFA yöntemi ile beraber son yıllarda geliştirilen bir veya birkaç testin bir arada kullanılması, daha güvenilir ve sağlıklı sonuçlara ulaşılması açısından gerekli bir uygulama olarak kabul edilmektedir. (4,5,7-9)

Çalışmamızda, IFA testi referans yöntem kabul edilerek, Dot Blot ve ELISA teknikleriyle ANA pozitifliği saptanması, bu yöntemlerle elde edilen sonuçların birbiriyle karşılaştırılması ve rutin laboratuvarlarda tercih edilecek uygun stratejilerin, hastalık tipinin belirlenmesi ile birlikte hastalık şiddetinin takibine de katkıda bulunması amaçlanmıştır.

1.1 TARİHÇE

İmmünite, organizmaya zarar verebilen durumlara karşı gelişmekte olan savunmayı ifade etmektedir. Otoimmünite ise, immün sistemin self yapılara karşı immün yanıt geliştirmesi durumudur. Yeni bir bilim alanı olarak kabul edilen immünolojinin kısa tarihinde otoimmünitenin, uzun bir süreci kapsayan geniş bir bölüm olduğu düşünülmektedir. (10)

İmmünolojinin öncü bilim adamlarından biri olan büyük kuramcı Paul Ehrlich, 1901 yılında immün sistemin kendi yapılarına karşı reaksiyon gösterdiğini ilk kez ortaya koymuş ve bu olay için "horror autotoxicus" ifadesini kullanmıştır. Ehrlich deney hayvanlarında, bazı antikorların organizmanın kendi dokularına toksik etkili olduğuna, normal koşullarda ise bu antikorları ve onların zararlı etkilerini önleyici mekanizmalarının bulunduğu karar vermiştir. Ancak ilerleyen zamanlarda "horror autotoxicus" ifadesi orjinalliğini yitirecek kadar fazla kullanılmıştır. Bu terimin, aslında kişinin kendi yapılarına karşı geliştirdiği otoantikorların, normal koşullarda bilinmeyen bir mekanizma ile yasaklanmış olduğunu ifade ettiği düşünülmüştür. Ancak immün yanıtın düzenlenmesindeki olası özelliklerin anlaşılmasının, bazı patolojik durumların açıklanmasından daha önemli olduğu zamanla unutulmuştur. (11,12)

Ehrlich'ten üç yıl sonra, 1904'te Donath ve Landsteiner, hemoglobini krizinden sorumlu ve sıklıkla sifiliz hastalarında görülen bir antikor tanımlamışlardır. Bu antikoru insanlarda kırmızı kan hücrelerine karşı reaksiyon veren gerçek bir antikor olduğu bilinmektedir ve bifazik Donath-Landssteiner antikorumun gösterilmesi, patolojik koşullarda kişinin kendi yapısal komponentlerine karşı antikor oluştuğunu ve hücresel elemanlar üzerinde toksik etkili olduğunu göstermesi açısından önem taşımaktadır. (10)

Sonraki yıllarda, infeksiyon hastalıklarında mikroorganizma antijenlerine karşı olmayıp konak hücre komponentlerine karşı oluşan bazı antikorlar belirlendiği halde otoimmüniteyle ilgili çarpıcı bir gelişme görülmemiştir. Ancak Rivers ve

arkadaşları deney hayvanlarında nörolojik hastalıkların indüksiyonu ile ilişkili bir seri yayın çıkarmaya başladıktan sonra durgun bir dönem sona ermiştir. Rivers ve arkadaşlarının çalışmalarında göstermiş oldukları hastalık bugün deneysel otoimmün ensefalomyelit olarak bilmekte ve sistemik skleroz, aşı sonrası ensefalomyelit gibi hastalıklara model olarak gösterilmektedir. (13)

Ehrlich'in öğrencisi Hans Sach tarafından yetiştirilen Witebsky 1953'te tiroid dokusu enjekte edilmiş tavşanlarda tiroid oluşumunu deneysel olarak gösteren yeterli verileri sağlamıştır. Ancak Witebsky kendi deneylerinin geçerliliğini kabul edememiş ve üç yılını yaptığına inandığı hataları araştırmakla geçirmiştir. Aynı yıllarda Dacie ve Worlledge, Dameshek ve Schwartz'ın araştırmaları üzerinde çalışmışlar ve bunlara Coombs'un anti-immünglobulin testlerini ilave etmişlerdir. Ancak Witebsky self yapılarla reaksiyon gösteren antikörlerin oluşumunun yasaklandığına ısrarla inandığı için bu durumu da kabul etmek istememiştir. (14-17)

1956 yılına gelmeden, Witebsky kendi çalışmaları ve kendisi gibi başarısız olan diğer araştırmacıların çalışmaları sonucunda fikir değiştirerek deneysel otoimmün tiroid üzerine derlediği verileri yayınlamaya başlamıştır. Aynı yıl içinde Roitt ve arkadaşları Hashimoto tiroidi üzerine kendi çalışmalarını yayımlarken, Adams ve Purves hipertiroid hastalarının serumunda bulunan, in vitro koşullarda tiroid dokusu üzerinde güçlü ve uzun süreli bir fonksiyonel etki gösteren LATS (long-acting thyroid stimulator) adında bir maddeyi göstermişlerdir. Birbirini takip eden araştırmaların neticesinde 1956 yılı otoimmünitenin hem klinik hem de deneysel alanındaki çalışmaları için modern bir dönem olmuştur. Bir tesadüf değildir ki aynı on yıl içinde Burnet'in "klonal seleksiyon" teorisi modern immünolojinin muazzam yapısının esası haline gelmiştir. (18-21)

1.2 İMMÜNOLOJİK TOLERANS

Organizmaya yabancı olan mikroorganizmaları, allerjenleri ve diğer molekülleri tanıyıp bir seri savunma mekanizması geliştirerek onları elimine etmek immün sistemin temel görevidir. Bu süreç makrofajlar, T ve B lenfositleri ile çeşitli

biyolojik mediatörler arasındaki karmaşık ilişkilerle sağlanmaktadır. Bir taraftan yabancı determinantlara karşı cevap geliştirerek onları ortadan kaldırmakla görevli olan immün sistem, diğer taraftan immün homeostazı korumak için çalışmaktadır. Hedef, optimum düzeyde bir immün yanıt geliştirmektir. Doğuştan veya kazanılmış immün cevabın minimuma doğru zayıflaması ile immün yetmezlik ve tümör gelişimi gibi hastalıklar oluşabilirken, maksimuma doğru zorlanması sitokin patolojisi, süperantijen hastalığı ve otoimmünite gibi patolojilere yol açabilmektedir (22)

İmmün sistemin belirli bir antijene karşı yanıtızsız kalması durumuna immünolojik tolerans adı verilmektedir. Bu yanıtızsızlığın organizmanın kendisine ait olup immünojenik özellik gösteren determinantlara karşı gelişmesi durumuna doğal immünolojik tolerans (self tolerans), yabancı antijenlere karşı gelişmesine ise kazanılmış immünolojik tolerans adı verilmektedir.(2)

Normal koşullarda immün sistemin kendi antijenik yapılarına karşı bir immün yanıt oluşturmadığı bilinmektedir. Oysa her bireyin kanında, hücrelerinde ve konnektif dokularında immün yanıt oluşturabilecek potansiyele sahip yapılar bulunmaktadır. Bu antijenlere self-antijen veya otoantijen adı verilmektedir. Otoantijenler lenfositlerle sıklıkla karşılaşmalarına rağmen immün yanıt oluşturmamaktadırlar. Bu spesifik cevapsızlık durumundan çeşitli mekanizmaların sorumlu olduğu bilinmektedir. Bunlar:

- a) Klonal delesyon: Bu mekanizma ile self antijenlerle reaksiyon veren T lenfositleri timustaki eğitilme süreci içinde olgunlaşmadan apoptoz yoluyla ortadan kaldırılmaktadır. Timustan kaçarak perifere geçmeyi başaran az sayıda T lenfositisi ise yine apoptoz ile elimine edilmektedir.
- b) Saklı antijenler: Beyin, testis ve göz gibi organlardaki bulunan antijenler immün sistemle karşılaşmadıkları için bunlara karşı bir immün yanıt gelişmemektedir.

- c) Antijeni görmezden gelme: Bazı self antijenler antijen sunucu hücrelerin (APC) yüzeyinde yoğun bir biçimde sergilendikleri için bunlara karşı ne tolerans, ne de immün yanıt gelişmektedir.
- d) Anergji: T lenfositlerine karşı APC tarafından gönderilen tanıma sinyali bu hücrelerin aktive olması için yeterli olmamaktadır. Ayrıca yine APC tarafından kostimülatör sinyal veya sekonder sinyal adı verilen ikinci bir sinyal molekülünün sergilenmesi gerekmektedir. Aksi takdirde T hücreleri anejik fazda kalacaklardır.
- e) Supresyon: Self antijenlerle güçlü reaksiyon veren B hücreleri birçok bireyde bulunmaktadır. Bu self reaktif B lenfositleri, uygun CD4 (+) Th hücrelerinin supresör T hücreleri (Ts) ile baskılanması sonucu ortadan kalkmakta veya anejik fazda kalarak aktive olamamaktadır. Kısacası self-reaktif B lenfositleri Ts hücreleri ile dolaylı olarak baskılanmaktadır. (2,23)

1.2.1 Santral Tolerans

Kemik iliğinde T hücre grubuna farklılaşan lenfositler timusa gelerek olgunlaşmalarını tamamlar. Bu dönem içinde T lenfositlerinde T hücre yüzey reseptörleri (TCR), CD4(+) ve CD8(+) yardımcı molekülleri oluşmaktadır. Farklı APC hücreleri tarafından bu olgunlaşma döneminde T lenfositlerine doku uygunluk kompleksine (MHC) bağlı self antijenler sunulmaktadır. MHC-self antijen kompleksine düşük afiniteyle bağlanan T lenfositleri sinyal alamadıkları için spontan bir şekilde apoptozdan korunmakta ve timusta ölmektedirler. Bu komplekse yüksek afiniteyle bağlanan T lenfositleri ise apoptoz ile ortadan kaldırılmakta ve bu olay negatif seleksiyon olarak adlandırılmaktadır. MHC molekülüne bağlı self yapılara orta düzeyde afinite gösteren diğer T lenfositleri ise timusta olgunlaşmasını tamamladıktan sonra periferik ulaşmayı başarmaktadır. Bu olay ise pozitif seleksiyon olarak adlandırılır. Santral toleransın oluşabilmesi için otoantijenlerin timusta T hücrelerine tanıtılması gerekmektedir ve timusta bulunmayan self yapılara karşı tolerans oluşumu için periferik toleransa ihtiyaç duyulmaktadır. (24-26)

T lenfositlerinin aksine B lenfositleri antijen üzerindeki uygun epitoplara antikor adını verdiğimiz B hücre yüzey reseptörleriyle (BCR) antijen sunumu olmadan veya MHC molekülüyle ilişki kurmadan bağlanmaktadır. Bu nedenle pozitif seleksiyon oluşmamakta ancak kemik iliğinde negatif seleksiyonla self reaktif, olgunlaşmamış B lenfositleri elimine edilmektedir. (11)

1.2.2 Periferel Tolerans

T hücrelerinin aktive olabilmesi için APC tarafından verilen tanıma sinyali tek başına yeterli olmamakta, aynı zamanda yine APC tarafından alınacak kostimülator (sekonder) sinyale de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu olay interlökin 2 (IL-2) gibi T-hücre büyüme faktörü olarak adlandırılan maddelerin salgılanmasına yol açacaktır. Kostimülator sinyali alamayan T hücreleri ise uzun süren bir cevapsızlık dönemine, yani anerjik faza geçmektedirler. APC yüzeyinde kostimülator moleküllerin sergilenmemesi durumunda bu hücrelerin aktive edeceği self reaktif T lenfositleri anerjik hale geçmekte yani IL-2 sentezleyemeyip kısa süre içinde ölmektedir. Bunun yanında yüksek konsantrasyondaki antijenler, spesifik T hücrelerini sürekli olarak uyarmakta ve onların Fas ligand (FasL) aracılığıyla, apoptozis sonucu ölümüne yol açmaktadır. Bazı lenfositler ise anerjik olmadıkları halde Ts hücreleri tarafından inhibe edilmektedirler. Bu mekanizmaların yanında T lenfositlerinin bazı antijenlere karşı duyarsız kaldığı bilinmektedir. (27-29)

B hücrelerinin periferde aktive olabilmeleri için Th hücrelerinin yardımı gerekmektedir. B hücre yüzeyindeki CD40 ligandı ile aktive olmuş T hücrelerinin yüzeyindeki CD40 ligandı etkileşmekte ve Th2 hücreleri IL-4 ve IL-5 gibi sitokinler salgılamaktadır. Bu yolla, immatur B hücreleri aktive olabilmektedir. B lenfositlerinde tolerans oluşumu için gerekli antijen miktarı T hücrelerine oranla daha fazladır. Bu şekilde daha kolay oluşan bir T hücre toleransı, B hücrelerinin de kolay bir yoldan tolerize edilmesini sağlamaktadır. (30-32)

1.3 OTOİMMÜNİTE

İmmün sistem, normal koşullar altında self ve nonself molekülleri rahatlıkla birbirinden ayırt edebilmekte ve kendi antijenik yapılarına karşı immün yanıt geliştirmemektir. Ancak self yapılara karşı varolan toleransın çeşitli patolojik olaylar sonucu kırılmasıyla immün sistem kendi antijenlerine karşı da immün reaksiyonlar gösterebilmektedir. Self tolerans mekanizmalarının işlememesi sonucu organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün yanıt geliştirmesine otoimmünite adı verilmekte ve otoimmünizasyon sonucu gelişen hastalıklar ise otoimmün hastalıklar başlığı altında toplanmaktadır. (2,30)

1.3.1 Otoimmün Mekanizmalar

Organizmanın kendi dokularına karşı immün sistemin yanıtızsız kalması immünolojik tolerans mekanizmalarıyla gerçekleştirilmektedir. İmmün sistemin bu görevinin aksaması ise otoimmüniteye neden olmaktadır. Otoimmün reaksiyonlardan sorumlu immünopatolojik mekanizmaların üç ana başlık altında toplandığı bilinmektedir.

- 1) Tip II Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları: Bu tip reaksiyonlarda humoral immün yanıt sonucu oluşan otoantikorların özgül antijenleriyle birleşmesi olayı kompleman aktivasyonu ve antikora bağlı sitotoksik mekanizmalarla dokunun zarar görmesine neden olmaktadır. Otoimmün hemolitik anemi, nötropeni, lenfopeni ve trombopeni gibi otoimmün hastalıkların bu mekanizma yoluyla gerçekleştiği bilinmektedir.
- 2) Tip III Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları: Burada, immün kompleks olarak adlandırdığımız otoantijen-otoantikor kompleksi, intraselüler sıvılar veya dolaşımda oluştuktan sonra vücudun böbrek ve eklem gibi bölgelerinde bulunan geniş süzücü zarlarda depolanabilmektedir. Bu durum hem kompleman faktörlerini hem de granülosit ve monosit gibi polimorfonükleer

lökositleri (PML) aktive ederek immün kompleksin bulunduğu bölgeye çekmektedir. PML, immün kompleksi fagosite ederek ortadan kaldırmakla yükümlüdür. Ancak patolojik durumlarda görevini gerçekleştirememekte ve dışarıya lizozomal enzimler salgılamaktadır. Bu enzimlerin kanda nötralizasyonu mümkündür ancak dokularda bu durum geçerli değildir. Dolayısıyla, nötralize edilemeyen bu enzimler yoluyla dokular zarar görmektedir. RA ve SLE gibi otoimmün hastalıklar bu mekanizma ile oluşan hastalıklar arasındadır.

- 3) Tip IV Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları: Bu reaksiyonlar, duyarlı T lenfositleri aracılığıyla oluşan hücrel immün yanıt tipidir. Mekanizması tam olarak aydınlatılamasa da lenfokinler ve lezyonun bulunduğu bölgeye gelen immün sistem hücrelerinin etkisiyle doku hasarı olduğu düşünülmektedir. (22,25)

Hem hücrel, hem de humoral immün yanıtta kontrol görevi gören Th hücreleri ile ilişkili tolerans bozukluklarının otoimmünite ile sonuçlanma ihtimali yüksektir. Ancak otoimmün hastalıkların oluşumunu tek bir mekanizma ile açıklamanın mümkün olmayacağı önemle vurgulanmaktadır. Bu süreçten sorumlu olduğu düşünülen birkaç farklı mekanizma tanımlanmıştır. (23,30)

a) Daha önce immün sistemle karşılaşmamış sekestre (saklı) antijenler travma gibi herhangi bir etken sonucu dolaşıma karışıklarında immün yanıtı yol açabilmektedirler. Örnek olarak gözün içinde bulunan uvea antijenlerinin gözün zedelenmesi sonucu dolaşıma karışması, sempatetik oftalmi hastalığına yol açmaktadır.

b) Organizmanın kendisine ait olarak tanıdığı ve normalde immün yanıt geliştirmedeği yapılar fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişikliğe uğradıkları zaman immün sisteme yabancı hale gelmekte ve sonuçta immün cevaba yol açmaktadırlar.

c) Yabancı bir antijenle vücudun kendisine ait olan bir yapı çapraz reaksiyon gösterebilmektedir. Örneğin streptokoklardaki M proteiniyle kalp kası arasındaki çapraz reaksiyon sonucu miyokardit oluşmaktadır.

d) Th hücrelerinin Ts hücreleriyle baskılanması B lenfositlerinin aktive olmasını önlemektedir. Ts hücrelerindeki yapısal bir bozukluk Th hücrelerinin sürekli olarak otoreaktif B lenfositlerini aktive etmesine neden olmakta ve bu durum otoantikor senteziyle sonuçlanmaktadır.(31,32)

1.3.2 Otoimmünite Oluşumunu Etkileyen Faktörler

a) Genetik Faktörler

Bazı otoimmün hastalıkların aynı ailenin fertlerinde görülme sıklığı fazladır. Bunun yanı sıra belirli insan lökosit antijenleri (HLA) antijenlerini yöneten gen lokusları, bazı otoimmün hastalıklarla ilişkili bulunmaktadır. Örneğin RA HLA-DR4 ile ilişkili bulunurken Adisson hastalığı ise HLA-B8 ile ilişkilendirilmektedir.

b) İmmünolojik Faktörler

T hücre toleransı şüphesiz ki self yapılara karşı oluşan immün yanıtta önemli role sahiptir. Antijen moleküllerinin yapısında meydana gelen bazı değişiklikler Th hücre toleransını ortadan kaldırabilmektedir. Yabancı antijenler de aynı şekilde Th hücre toleransını yanıtlanmaktadır.

Poliklonal B lenfositlerinin özgül olmayan bir şekilde uyarılması ve çoğalması da otoimmün olaylarla sonuçlanabilmektedir. Bunu bakteriyel bir yapı veya bir virus tetikleyebilmektedir.

Ts hücreleri otoimmün yanıtın baskılanmasında önemli bir rol üstlenmiştir. Ts hücreleri Th hücrelerini baskılamakta ve dolaylı olarak poliklonal B hücrelerinin aktive olmasını engellemektedir. Ts hücrelerinin fonksiyonlarının bozulması,

otoreaktif etkili B lenfositlerinin kontrolsüz çoğalarak otoantikör üretmeleriyle sonuçlanabilmektedir

Merkezi sinir sistemi, testis ve göz gibi immün sistemden uzak kalmış organlarındaki antijenik yapılar herhangi bir travma veya zedelenme sonucu dolaşıma karıştığında otoimmün reaksiyonları başlatabilmektedirler.

c) İnfeksiyon Etkenleri

Epstein-Barr virusu gibi mikroorganizmalar özgün olmayan poliklonal B hücre aktivasyonunu başlatabilmektedir. Bunun yanında bazı mikroorganizmalara ait antijenler bazı HLA antijenleriyle moleküler açıdan benzerlik gösterebilmekte ve otoimmün hastalıklara yol açmaktadırlar. Bazen de T hücreleriyle infeksiyon etkeninin ortak antijen taşıması, bu hücrelerin enerjik hale geçmelerine yol açmakta ve bu durum otoimmün olayları başlatabilmektedir.

c) Hormonal Faktörler

Bazı durumlarda bir hormon veya biyolojik mediatöre karşı spesifik idyotip antikörler oluşmakta ve bu antikörlere karşı da anti idyotip antikörler sentezlenmektedir. Bunlar hormon veya mediatöre bağlanan antijene benzerlik gösterdikleri için, antikörlerin antijenle ilişki kurdukları hücre yüzey reseptörlerine bağlanmaktadırlar. Bunlara anti reseptör antikörler adı verilmektedir. Bu durumda reseptör hasar görmekte ve fonksiyon bozukluğu oluşabilmekte ya da hormonun bağlanması engellenerek hormona karşı direnç artmaktadır. Son olarak reseptör aktive olabilmektedir. (1,32)

1.4 OTOİMMÜN HASTALIKLAR

Otoimmünitede hem hücresel immün yanıt hem de humoral immün yanıt mekanizmaları rol oynayabilmektedir. Başka bir deyişle T hücrelerinin etkisiyle ve/veya antikörler sonucu oluşabilmektedir. Organizmanın, kendisine ait olan ve

immün sistemle karşılaştığında immün yanıt oluşturabilen yapılarına otoantijen adı verilmektedir. Bazı otoimmün hastalıklarda hastaların serum veya plazmasında otoantijenlere karşı gelişen spesifik antikolar bulunmaktadır. Bunlar ise otoantikör olarak adlandırılır ve otoimmün hastalıkların tanısında büyük önem taşırlar. Bu antikolar bir organ veya dokuya özgül olabilmekte veya vücudun birçok farklı dokusunda bulunan hücre nükleusu, mitokondri, DNA ve IgG gibi yapılara da bağlanabilmektedirler. (1)

Otoimmün yanıtın tipine göre bazı otoimmün hastalıklarda immün yanıt tek bir organ veya dokuyla sınırlı kalabilmektedir. Bunlara organ spesifik otoimmün hastalıklar adı verilmektedir. Örneğin Hashimoto tiroiditinde özgül bir biçimde tiroit bezi elemanlarına karşı immün yanıt gelişmektedir. Diğer taraftan bazı otoimmün hastalıklarda ise birçok farklı organ tutulumu söz konusudur. Bu hastalıklara ise organ spesifik olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklar adı verilmektedir. Örnek olarak RA ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi hastalıklarda deri, böbrekler, akciğer, sinir sistemi ve eklemler gibi vücudun birçok bölgesinde otoimmün reaksiyonlar gelişebilmektedir. (1,33,34)

1.4.1 Sistemik Otoimmün Hastalıklar

RA, SLE, skleroderma, sjögren sendromu, dermatomyozit/polidermamiyozitis ve diğer sistemik otoimmün hastalıklara dahil edilemeyen karışık bağ doku hastalıkları (MCTD), organ spesifik olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklardandır. Bu grupta, vücudun birden fazla organ veya dokusunda otoimmün reaksiyonlar görülebilmekte ve hastalık sırasında hücre nükleusu ve/veya sitoplazmadaki yapılara karşı otoantikörler oluşmaktadır. Bunlara genel olarak ANA adı verilmektedir. ANA, sistemik otoimmün hastalıkların tanısında büyük önem taşımaktadır. (1,35,36)

Tablo 1. Otoimmün Hastalıklar (1)

Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar	Sistemik Otoimmün Hastalıklar
Hashimoto Tiroiditi	Romatoid Artrit
Otoimmün Hemolitik Anemi	Sistemik Lupus Eritematozus
Pernisiyöz Anemi	Sjögrens Sendromu
Adisson Hastalığı	Skleroderma
Otoimmün Ensefalomyelit	Polimiyozit-Dermatomyozitis
Goodpasture Sendromu	Reiter Sendromu
Otoimmün Trombositopeni	Karışık Bağ Doku hastalıkları
Myastenia Gravis	
Toksik Guatr	
İnsüline Bağlı Diabetes Mellitus	
Aktif Kronik Hepatit	
Ülseratif Kolit	
Primer Biliar Siroz	

1.4.1.1 Romatoid Artrit

Eklemlerde nonspesifik inflamasyon şeklinde kendini gösteren ve bunun dışında deri, kas, kan damarları, akciğer, kalp ve diğer organları tutan sistemik bir hastalıktır. İlerleyebilen harabiyetle sonuçlanma olasılığı yüksek, kronik inflamatuvar seyir gösterebilmektedir. Toplumda prevalansı %1-3 oranında olmakla beraber, kadınlarda erkeklere oranla 3 kat fazla görülmektedir. Menarş sonrası ve menapoz öncesi daha sık görülüp hamilelik döneminde artması nedeniyle oluşumunda hormonal faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca HLA-DR4 geni taşıyanların %70'inde görülmesi genetik faktörlerin önemini vurgulamaktadır. İnfeksiyon etkeni olarak *Proteus vulgaris*'in yüzey antijeni ile HLA-DR4 arasında çapraz reaksiyon gelişebildiği için persistan *Proteus vulgaris* infeksiyonuna yakalanmış hastalarda RA'ya rastlanmaktadır.

Patogenezinde sinoviyal B lenfositleri tarafından salınıp anormal IgG antikorlarına karşı gelişen ve romatoid faktör (RF) adı verilen IgM tipi antikorlar

görülmektedir. RF ile IgG yapısındaki antikorların birleşmesi sonucu oluşan immün kompleksler klasik ve alternatif yoldan komplemanı aktive etmekte ve inflamasyonu başlatmaktadır. Eklem sıvısında oluşan immün kompleksler bir miktar da kanda oluşabildiği için vaskülitlere ve SLE benzeri semptomlara yol açmaktadır. SLE hastalığından farklı olarak nadiren nefrite yol açabilmektedir.

Klinik tanıda anamnez, simetrik poliartrit ve direk grafide eklemlerde erozyon görülmesi önemlidir. İmmünolojik olarak ise en önemli bulgu RF pozitifliği'dir. Bunun yanında hipergammaglobulinemi, lupus eritematozus (LE) hücrelerinin pozitifliği, ANA pozitifliği, lenfositoz ve sedimentasyon hızının artması önem taşımaktadır. Serum kompleman düzeyi normaldir. (1,36)

1.4.1.2 SLE

Özellikle 20-40 yaş arasındaki kadınları tutan sistemik bir hastalıktır. Yüzde kelebek şeklinde döküntü ve atralji ile karakteristik olup hastaların %90'ını kadınlar oluşturmaktadır. HLA-DR4 alleli taşıyanlarda daha sık görüldüğü bilinmekle beraber genetik ilişkileri kesin olarak bilinmemektedir. LE hücreleri, DNA- anti DNA kompleksini fagosite etmiş granülositlerdir ve varlığı SLE hastalığını düşündürmekte ancak hastalık süresince dönem dönem oluştuğu için görülmemesi ise SLE hastalığının olmadığı anlamına gelmemektedir.

Patogeneğinde meydana gelen DNA-anti DNA kompleksinin böbrek ve eklem gibi filtrasyon yapan zarlarda birikmesi sonucu doku hasarı görülmektedir.

SLE, ANA pozitifliğinin görüldüğü prototipik bir otoimmün hastalıktır. Hastaların %95'inde spesifik olmadığı düşünülen ANA pozitifliği görülmektedir. Bu hastalıkta SLE için en spesifik ANA alt grubu olan dsDNA'nın tek başına veya ssDNA ile beraber saptanması, hipergammaglobulinemi, LE hücreleri, yalancı Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) pozitifliği ve deri biyopsilerinde immün kompleks birikimi görülmektedir.

SLE tanısında ateş, yüzde kelebek biçiminde gelişen döküntüler, mukoza ülserleri, perikardit, plörezi, eklem ağrıları, nefrotik sendrom, lenfadenopati, amenore, bir günlük idrarda 3.5 gramın üzerinde görülen proteinüri bir arada ve hematüri, Raynaud fenomeni, artrit, nöropati ve nötropeni, anemi, yalancı VDRL pozitifliği birlikte görülmektedir. En önemli bulgu ise anamnez ve fizik muayenedir. Anti-dsDNA pozitifliğinin tanıda önemli olduğu düşünülmektedir.(1,36)

1.4.1.3. Sjögren Sendromu

Tükrük ve gözyaşı bezlerinin immün reaksiyonlar sonucu hasar görmesi ile oluşan ağız, göz ve mukozaların kuruması şeklinde kendini gösteren sistemik inflamatuvar bir hastalıktır. RA, SLE ve skleroderma gibi hastalıklarla bir arada görülmektedir. Özellikle kadınlarda 40 yaşın üzerinde görülme sıklığı artmaktadır. Solunum yolunda oluşan kuruma sonucu ölümcül pnömoniler gelişebilmektedir. Üç gruba ayrılmaktadır: Primer Sjögren Sendromu, Sekonder Sjögren Sendromu ve RA ile beraber görülen 3. tip sjögren sendromu. Primer Sjögren Sendromu veya Sicca Sendromu adı verilen hastalıkta HLA-DW3 alleli ile ilişkilendirilmektedir. Sekonder sjögren sendromunda ise sicca sendromu, SLE, PBS, polimiyozit ile birlikte görülmektedir. Üçüncü grup ise RA ile birlikte görülen sjögren sendromudur.

Sjögren sendromunda %70'in üzerinde bir ANA pozitifliği ile beraber SS-A ve SS-B'ye karşı gelişen spesifik antikorların bulunması tanıda önem taşımaktadır. Bunun yanısıra salgı kanallarını etrafında mononükleer ve CD4(+) lenfosit infiltrasyonu görülmektedir. (1,36)

1.4.1.4 Skleroderma

Deri, böbrek, eklemlerdeki oluşumlar, özefagus, barsak kanalı, tiroid, akciğer ve iç organlarda bağ dokusunun anormal bir biçimde artması ile gelişen bir otoimmün hastalıktır. İmmünolojik faktörlerle beraber oluşan damar anomalilerinin hastalıkta etkili olduğu düşünülmektedir. Yaygın skleroderma, iç organ tutulumu ile

beraber görülürse ölümle sonuçlanabilmektedir. Bazen de el ve yüzde oluşan skleroz yıllar sonra CREST sendromuna dönüşebilmektedir. Sklerodermanın en iyi huylu formunun CREST sendromu olduğu bilinmektedir.

İlerleyen sklerodermada böbrek tutulumu en sık görülen ölüm nedenidir. ANA pozitifliği %60-90 oranında görülebilmektedir. Bunun yanında RF pozitifliği de görülmektedir. Çözünabilir nükleer antijenlere karşı gelişen anti Scl-70 antikoru skleroderma için spesifik olmakla birlikte anti-sentromer antikoru ise CREST sendromu ile ilişkilendirilmektedir. (1,36)

1.4.1.5 Polimiyozitis/ Dermatomyozit

Çizgili kaslarda iltihaplar, zayıflık ve ağrılarla karakterize, perivasküler sistem tutulumunun görüldüğü bir hastalık grubudur. Bu durumun tipik deri dejenerasyonu ile beraber görülmesine Dermatomyozit adı verilmektedir. Damar çevrelerinde CD4(+) T ve B lenfositlerinin infiltrasyonu görülmektedir. Anti Jo-1 antikorunun özgülüğünün polimiyozitis için yüksek olduğu bilinmektedir.(1,36)

1.4.2. Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar

Organ spesifik otoimmün hastalıklarda hastalık semptomları tek bir organ veya dokuda görülmektedir ve hastalığın gerçekleştiği dokunun dışında kalan kısımlar otoimmün mekanizmalardan etkilenmemektedir. Bu durumdan yola çıkarak organ spesifik otoimmün hastalıklar, hastalığın gerçekleştiği organ veya dokuya göre sınıflandırılmaktadırlar.

1) Tiroid:

Bunların başında Hashimoto tiroidi gelmektedir. Guatr ile birlikte hipotiroidizm bulunmaktadır. Başlangıçta tiroid uyarıcı hormon (TSH) düzeyi ve tiroid fonksiyonları normal olduğu halde guatr gelişebilmekte, ancak ilerleyen

dönemlerde TSH artmakta ve T4 seviyesi düşmektedir. Bu hastalıkta yüksek titrede otoantikörler görülür. Genellikle tiroglobüline karşı otoantikörler gelişmektedir. Bunun yanında tiroid yüzey antijeni ve ikinci bir kolloid antijenine karşı da antikör oluştuğu görülmektedir. Mikrozomlara karşı oluşan antikörler ve özel olarak programlanmış T hücrelerinin etkisiyle doku zarar görmekte ve sonuç olarak miksödem oluşmaktadır. Normal tiroid bezinde foliküler hücreler kolloid aralıkta sıralanmakta ve bu aralığa tiroglobulin salgılamaktadırlar. Hashimoto tiroidinde bu normal yapı hemen hemen yok olmuş ve koloidal aralığı lenfosit ve makrofajlar doldurmuştur. Sonuçta rejeneratif tiroid folikülleri oluşmakta, bezde destriksüyon ve fibrozis gelişmektedir.

2) Mide- Barsak:

Pernisiyöz anemi hastalığında, otoimmün hasara yol açan anti periyatal hücre antikörleri oluşmaktadır. Bu otoantikör asit sekresyonu yapan H-K ATPaz enzimine karşı oluşan periyatal hücre antikörlerini hedef almakta ve intrinsek faktör yapımını azaltmaktadır. Bu duruma yol açan iki tip antikör bulunmaktadır. Bunlardan biri intrinsek faktörün B12 vitaminine bağlanmasını engelleyen bloke edici antikörler, diğeri ise intrinsek faktörün ileuma bağlanmasını engelleyen bloke edici antikörlerdir.

3) Pankreas:

İnsüline bağlı Tip 1 diabetes mellitus (Tip 1 IDDM) hastalığında pankreatik beta hücrelerine karşı hücre adacık antikörleri gelişmektedir. Bu antikörler hastalık klinik olarak gelişmeden yıllar önce ortaya çıkabilmektedir. Otoimmün hasarın oluşumu adacık hücrelerinin etrafındaki lenfositik hücre infiltrasyonundan anlaşılmaktadır. IDDM hastalarının % 90'ında HLA-DR3 veya DR4 alleli bulunmaktadır. Ayrıca insüline karşı otoantikörlerin oluşumu ilerleyen dönemlerde hastalarda IDDM gelişme ihtimalini düşündürmektedir.

4) Adrenal Bez:

Adrenal bezin tüberküloz ile hasar görmesi sonucu adisson hastalığı oluşmaktadır. Hiperpigmentasyon, kilo kaybı, hipoglisemi ve adrenokortikal hormonlarda eksiklik görülmektedir. Mineralkotrikosteroid eksikliği sonucu böbreklerde Na ve K tutulması asidoza yol açar. Adrenal bezin her üç tabakasına karşı otoantikorlar gelişmektedir ancak en sık olarak adisson hastalığında görülmektedir.

4) Böbrek:

Glomerulonefrit, glomerular bazal membranda bulunan nefritojenik antijene karşı oluşan antikorların bazal membranla birleşmesi sonucu immün kompleks birikimi ile oluşmaktadır. Goodpasture sendromunda ise glomerular bazal membran ve akciğer alveolar bazal membranı etkileyen anti-GBM antikorları oluşmaktadır.

6) Sinir sistemi

Bu gruba giren hastalıklar arasında akut ensefalomyelit ve myastenia graves bulunmaktadır. Akut ensefalomyelit, bazı viral infeksiyonlar sonrasında miyelin proteinine karşı hücresel tip immün yanıtın olduğu bir hastalıktır. Myastenia graves hastalığında asetil kolin reseptörlerine karşı otoantikorlar oluşmaktadır.

7) Karaciğer:

Otoimmün hepatit genellikle genç kadınlarda görülen bir hastalık grubudur. Damar düz kas hücreesindeki aktine karşı otoantikorlar gelişmekte ve bunun yanı sıra diğer organ spesifik ve organ spesifik olmayan otoantikorlar da görülmektedir. Diğer otoimmün hastalıklarla ve HLA DR3-DR8 ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Primer biliyer siroz (PBS), orta yaşlı kadınlarda kaşıntı ve kolestaz bulgularının görüldüğü bir hastalıktır. IgM yapısındaki anti

mitokondriyal antikor (AMA), bu hastalıkta yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Piruvat dehidrojenaz kompleksinin bir komponenti olan M2 antijeni mitokondriumun iç membranında lokalize olmuş bir yapıdır. M2 antijenine karşı oluşan antikorlar PBS için spesifik kabul edilmektedir.

8) Göz:

Herpes zoster, tüberküloz ve aspergilloz gibi infeksiyonların skleritis ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İmmün komplekslerin depolanmasının; kompleman aktivasyonuna, polimorfonükleer lökositlerin kemotaksisine ve olası otoimmün reaksiyonların başlamasına neden olduğu düşünülmektedir

Üveitis, immün kompleks hastalıklarında oluşan üveit ve gözde meydana gelen hasar sonucu oluşan sempatik oftalmi göz yapısında oluşan otoimmün hastalıklar arasındadır.

9) Kan Hastalıkları

Otoimmün hemolitik anemi sıcak reaktif IgG otoantikor nedeniyle olabilmekte ve bu hastaların yaklaşık %50 kadarında lenfoma, SLE ve RA görülebilmektedir. Soğuk reaktif IgM antikorları ise soğuk hemaglutinin hastalığında görülmekte ve bu hastalık kronik hemolitik anemi ve Raynold fenomeni ile ilişkilendirilmektedir.

İdiopatik trombositopenik purpura hastalığında tahrip olan trombositlere karşı anti trombosit antikorları oluşmaktadır.

10) Deri

Epiderm hücreleri arasında immünglobulin ve kompleman depolanması, IgG tipi otoantikorların oluşumuna neden olmakta ve Ig G titresi ile hastalık aktivitesi

arasında bağlantı bulunmaktadır. Genellikle SLE, titoma ve myastenia graves hastalığıyla birlikte görülmektedir.

Büllöz permfigoid hastalığında ise lamina lucida tabakasına karşı IgG tipi oto antikolar oluşmaktadır. IgG titresi ile hastalık arasında bir bağlantı bulunmamaktadır. (36,37)

1.4.3 Otoantikolar

Organizmanın antijenik özellik gösteren yapılarına karşı gelişen antikolar otoantikolar olarak adlandırılmaktadır. Bunlar hücre yüzeyi, sitoplazmik yapılar veya hücre nükleusuna karşı gelişebilmektedirler. Otoantikolar 1956'dan beri otoimmün hastalıkların tanısında önemli bir gösterge olarak görülmektedir. (1)

Vücudumuzun çeşitli bölgelerinde bulunan yapılar, bazı patolojik durumlarda antijen özelliği gösterebilmektedir. Nükleus, hücre sitoplazmasında bulunan bazı organeller, DNA, RNA ve IgG gibi moleküller immün yanıt oluşturma özelliğine sahip otoantijenler arasında gösterilmektedir. Otoantijenlere karşı oluşan spesifik antikolar ise günümüzde otoimmün hastalıkların teşhisi ve tedavisinin takibinde yol gösterici durumdadır. (1, 38,39)

Tablo 2. Otoimmün Hastalıklarda Otoantijen- Otoantikör İlişkisi (36)

Hastalık	Otoantijen	Otoantikör
Hashimoto tiroiditi	Tyroglobulin	Anti Tg
Kronik aktif hepatit	Düz kas	ASMA
Good pasture sendromu	Glomerular bazal membran	Anti GBM AMA
Primer biliar siroz	Mitokondri	RF, ANA
Romatoid artrit	IgG, DNA, kollojen,	Anti DNA, Anti nRNP/Sm,
SLE	RANA	Anti histon
Sjögren sendromu	Nükleoprotein, DNA,	Anti SS-A, Anti SS-B
MCTD	RNA Jo, La ENA	Anti ENA

1.4.3.1. ANA

Antinükleer antikörler kromatin olarak adlandırılan DNA-histon kompleksine, nükleer veya sitoplazmik ribonükleer proteinlere, nükleolar ve sitoplazmik diğer yapılara karşı oluşan antikörlerin genel ismidir. Bağ doku hastalıkları (BDH) adı verilen RA, SLE, sjögren sendromu, skleroderma, sistemik skleroz, kalsinozis-raynold fenomeni- özefagal dismotilite-sklerodaktili- telenjiestaz (CREST sendromu), polimiyozit/dermatomiyozitis, MCTD gibi hastalıkların tanısında ve tedavisinin takibinde ANA büyük önem taşımaktadır. (40)

ANA'ların doku spesifitesi göstermediği düşünülmektedir. Ancak tiroid, gastrik mukoza, adrenal korteks ve bazı eritrosit yapısından izole edilen nükleusların ANA ile spesifik reaksiyonlar geliştirdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Kromatin, nükleer zarf, nükleer porlar, nükleolus, ribonükleoprotein (RNP), nükleer sıvı gibi değişik bölümlere dağılmış nükleer antijenlere karşı immünolojik olarak IgG, IgM, IgE, IgA ve IgD tipi antikörler oluşabilmektedir. Ancak bunlardan en yaygın oluşan ANA tipinin IgG sınıfı antikörler olduğu kabul edilmektedir. IgG tipi ANA, IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3 olarak dört alt gruba ayrılmıştır. Bu alt grupların

antikorların spesifitesi ve hastalığın şiddeti ile olmasa da farklı IFA paternleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. (40,41)

ANA Subtipleri :

ANA'ların sistemik otoimmün hastalıklar grubuna dahil edilen BDH tanısında önemli olduğu bilinmektedir. Ancak son yıllarda nükleusta farklı yerleşim gösteren birçok antijene karşı gelişen antikorların genel ifadesi olan ANA, nükleik asitler, bazik histon proteinleri ve asidik nonhiston proteinlerine karşı gelişen antikorlar olarak 3 ana kategoriye ayrılmıştır. (5) Nükleer antijenler arasında yer alan nRNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70 ve sitoplazmik bir antijen olan Jo-1'e karşı oluşan antikorların bazı otoimmün hastalıklarla yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Timus, dalak ve hücre kültürlerinden serum fizyolojik ile ekstrakte edilen bu antijen grubuna ekstrakte edilebilir nükleer antijenler (ENA) adı verilmiş ve bu antijenlere karşı gelişen antikorlar da anti-ENA başlığı altında toplanmıştır. (4)

1) Anti-ds DNA ve anti-ssDNA:

Anti-dsDNA, DNA yapısındaki pürin ve pirimidin antijenlerine karşı, anti-ssDNA ise deoksiriboz iskeletindeki komponentlere karşı gelişen antikorlardır. Anti-ssDNA'nın daha sık ortaya çıktığı ve herhangi bir hastalığa karşı spesifitesinin bulunmadığı bilinmektedir. Anti-dsDNA ise tek başına nadiren bulunmakta ve diğer BDH'da düşük titrelerde bulunmasına rağmen SLE için yüksek bir spesifiteye sahip görülmektedir. Anti-dsDNA antikorlarının titresi hastalık şiddetiyle ilişkili olarak yükselmekte hastalığın takibinde büyük önem taşımaktadır. (42,43)

2) Anti-histon antikorları:

Histonlar deoksiribonükleoproteini oluşturmak üzere DNA ile kompleks yapan temel nükleer proteinlerdir. Memelilerde H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olarak

5 alt fraksiyona ayrılmıştır. Genellikle SLE, RA, ilaca bağlı lupus, sistemik skleroz ve MCTD hastalıklarında görülmektedir. (44,45)

3) Anti-Sm ve anti-RNP:

Sm ve RNP antijenleri birbirlerine çok yakın, küçük nükleer RNA kompleksleridir. U1-U6 RNA komplekslerini içerdiği için U-RNA olarak ta bilinmektedirler. Bu antikorların prekürsör mRNA'ların kesilmesi sırasında rol oynadığı, bu kesilme olayını inhibe ederek fonksiyonel mRNA oluşumunu engellediği bilinmektedir. Bu inhibisyonun önemi vurgulansa da romatolojik hastalıklardaki rolü bilinmemektedir. Anti-RNP, birçok BDH'da oluşabilmekte, yüksek titrelere görüldüğünde MCTD için tanısal değer taşımaktadır. (39,46)

4) SS-A (Ro) ve SS-B (La) antikorları:

Ro antijeni olarak ta bilinen SS-A bir nükleik asit antijeni olmayıp sitoplazmik ve buna karşı gelişen antikorlar genellikle SLE ve Sjögren sendromunda görülmektedir. SS-B veya diğer adıyla La ise çözünebilir sitoplazmik RNA-protein antijenidir ve SLE'de görülmektedir. SS-A ve SS-B hücrenin fonksiyonlarına bağlı olarak sitoplazma ve nükleusta bulunabilmekte ve her iki antijen de polipeptitler üzerine yerleşmiş bulduklarından tripsine duyarlılık göstermektedirler. SS-A substrat fiksasyon aşamasında bozulabildiği ve yıkama işlemi ile ortadan kaldırılabilmesi için yalancı negatifliğe yol açabilmektedir. Bu sebeple hücre kültürleri dondurulmuş dokulardan daha duyarlı kabul edilmektedir. SS-A'ya karşı antikorlar başta SLE ve sjögren sendromu olmak üzere birçok BDH'da görülebilmektedir. SLE hastalığının erken dönemlerinde tek başına, geç dönemlerinde ise SS-B'ye karşı gelişen antikorlarla bir arada bulunmaktadırlar. Anti SS-A antikorlarının C3 ve C4 eksikliği, subkutanöz lupus ve neonatal lupus ile ilişkili olduğu da bilinmekte, ayrıca PBS, kronik aktif hepatit gibi hastalıkların yanı sıra sağlıklı kişilerde de bulunduğunu gösteren deliller bulunmaktadır. SS-A antikorları tek başına veya SS-B antikorlarıyla birlikte primer veya sjögren sendromunda ortaya çıkabildiği gibi

vaskülit, kriyoglobulinemi, lökopeni, lenfopeni, anemi gibi hematolojik hastalıklar ve merkezi sinir sistemi hastalıklarıyla da ilişkilendirilmektedirler. (39,42,44)

5) Anti Scl-70 ve Anti Sentromer (kinetokor) Antikorları:

Scl-70'e karşı gelişen antikorlar ve anti-sentromer antikorları (ACA) nadiren bir arada bulunmaktadırlar. Sistemik skleroz hastalığında ortaya çıkmakta, tanı ve prognozda önem taşımaktadırlar. Scl-70 antijeninin temel kromozomal bir protein olduğu ve DNA topoizomeraz enziminin parçalanması ile ortaya çıkan ürünlerden biri olduğu bilinmektedir. Scl-70 antijenine karşı gelişen antikorların ise bu enzimin süpersarmal DNA üzerindeki açılma aktivitesini inhibe ettiği ortaya konmuştur. Bu antikor sistemik sklerozlu hastaların %22-28'inde, hastalığın diffüz formunda ise %33 oranında saptanmaktadır. Sentromer antijenleri üç tabakalı kinetokorun iç ve dış tabakalarında yer alan üç proteinden ibarettir. Anti sentromer antikorlarının ise sistemik sklerozun bir varyantı olan CREST sendromu için oldukça spesifik olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra bu antikorlar sistemik skleroz, primer Raynaud fenomeni, SLE, MCTD ve PBS hastalıklarında ortaya çıkabilmektedir. (39,44,47)

6) Nükleolusa Karşı Antikorlar:

Nükleolusa karşı gelişen antikorlar sistemik skleroz başta olmak üzere SLE, sjögren sendromu ve Raynold fenomeninde görülmektedir. İmmünofloresan boyama teknikleri ile nükleolar paternde boyanabilen birçok antikor gösterilmiştir. Bunların başında anti RNA polimeraz I antikorları gelmektedir ve sistemik sklerozlu hastaların %4'ünde görülmektedir. Bu antikor rRNA'nın öncül moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunda görevli RNA polimeraz I enzimine karşı gelişmektedir ve noktalı nükleolar boyanma göstermektedir. Diğer bir nükleolar antijen olan fibrillarine karşı anti fibrilların antikoru gelişmektedir ve bu da sistemik skleroz için özgül olup hastaların %8'inde rastlanmaktadır. Bu

antikoru varlığı kalp ve akciğer tutulumunu ifade etmekte ve kümeli nükleolar boyanma göstermektedir.

PM-Scl adı verilen nükleolar antijenin işlevi kesin olarak bilinmemekle birlikte pre ribozomal bir partikül olduğu düşünülmektedir ve buna karşı gelişen antikoların polimiyozit ve sistemik sklerozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu antikolar homojen nükleolar boyanma göstermektedir. Sistemik sklerozla ilişkili NOR-90 adı verilen bir diğer nükleolar antijenin varlığı gösterilmiştir ancak buna karşı gelişen antikolar tamamen açıklanamamıştır. (39,41,44)

7) Nükleer/Sitoplazmik Antijenlere Karşı Oluşan Antikolar:

Nükleer/sitoplazmik antijenler arasında Jo-1, PL-7, PL-12, Mi-1, Mi-2 ve Ku bulunmaktadır. (38) Özgül aminoasit-tRNA sentetaz molekülleri olan Jo-1, PL-7 ve PL-12, protein sentezinde amino asitleri aktive ederek kendilerine uygun tRNA'lara bağlanmalarını sağlayan enzimlerdir. Bu antijenlere karşı gelişen antikolar ise özellikle polimiyozit/dermatomyozit hastalarında %4-30 oranında bulunmaktadır. Anti Mi-1 ve anti Mi-2 antikolarının birbirinden bağımsız olarak ortaya çıktığı ve dermatomyozit ile yakın ilişkili olup bu hastalığa özgü iki önemli marker olduğu bilinmektedir. Anti-Ku antikoru ise DNA'ya bağlanan p70/p80 nükleer protein çiftine karşı gelişmekte olup yaygın benekli ve nükleolar boyanma göstermektedir. Anti-Ku antikolarına sistemik skleroz, polimiyozit, ve SLE hastalıklarında sıklıkla karşılaşıldığı bilinmektedir. (39,44,48)

8) PCNA'ya (cyclin= PL-5) Karşı Oluşan Antikolar:

DNA replikasyonunda regülatör olarak görev yapan PCNA antijenine karşı gelişen anti PCNA antikolarının, antijenin bu aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir ve SLE hastalarının %2-3'ünde pozitiflik göstermektedir. (39,48)

9) Romatoid Artrit ile İlişkili Nükleer Antijene (RANA) Karşı Gelişen Antikorlar:

RANA'ya karşı gelişen antikorlar RF ile benzerliği bulunmayan IgG yapısında antikorlardır. Sadece Epstein Barr virusu ile transforme hücrelerde görüldüklerinden RA hastalarında bulunmaları EBV'nin olası patojenik rolünü desteklemektedir. Bu antikorlar RA hastalarının çoğunda, diğer BDH'da ve normal bireylerin ise az bir kısmında bulunmaktadır. (39,43,44)

10) Anti Ma Antikorları:

SLE hastalarında saptanan anti Ma antikorlarının hastalığın ciddiyetini ifade ettiği ve böbrek tutulumu, hipertansiyon, nörolojik hastalık, kompleman düzeyinde azalma, hepatosplenomegali, lenfadenopati ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Asidik bir protein olan Ma antijenin nefrit atağından hemen önce dolaşımında görülmeye başlandığı bildirilmiştir. (39)

Tablo 3. ANA Subtipleri ve Antijenlerle İlişkileri (61)

Antikor	Antijen
Anti ssDNA	DNA'nın deoksi ribofosfat iskeleti
Anti dsDNA	Pürin, pirimidin
Anti histon	Histon proteinleri (H1, H2A, H2B, H3, H4)
Anti Sm	U1-U6 RNA proteinleri
Anti RNP	U1a, U1b
Anti SS-A	hY, hY3, hY4, hY5 proteinleri
Anti SS-B	RNA polimeraz III'teki fosforile proteinler
Anti Scl-70	DNA topoizomeraz I
Anti sentromer	Kinetokor proteinleri
Anti RNA polimeraz I	RNA polimeraz I
Anti fibrillarin	U1-U3 kompleksindeki nükleer proteinler
Anti PM-Scl	Bilinmiyor
Anti Jo-1	Histidil-tRNA sentetaz
Anti PL-7	Treonil-tRNA sentetaz
Anti PL-12	Alanil-tRNA ve Alanil-tRNA sentetaz
Anti Ku	DNA'ya bağlı proteinler
Anti Mi-1	Nükleolar proteinler
Anti Mi-2	Bilinmiyor
Anti PCNA	DNA polimeraz delta proteini
Anti RANA	Muhtemelen EBNA-1
Anti Ma	Nükleer asidik protein

1.5 TANI YÖNTEMLERİ

Günümüzde otoimmün hastalıkların tanısında kullanılan çok çeşitli teknik ve yöntemler bulunmaktadır. Ancak klinik bulgulardan bağımsız bir şekilde yalnızca laboratuvar testlerine dayanarak tanıya gitmenin yanlışlığı önemle vurgulanmaktadır. Klinik bulguların daima öncelikli olması ve bunun ışığında test istemlerinin yapılması gerekmektedir. Kısaca testler: klinik göstergeleri doğrulamak ve desteklemek, klinik bulgular ve prognozdan farklı altgrupları ayırt etmek, uygulanan tedaviye karşı hastadaki tepkiyi değerlendirmek ve tedavi amaçlı kullanılan ilaçların yan etkilerini ortaya koymak amacıyla kullanılmalıdır. Bunun yanı sıra otoimmün hastalıklarda ortak olan özellikler tanıda büyük önem taşımaktadır. Bunlar:

- 1) Hipergammaglobulinemi: Serumda normalin üzerinde gammaglobulin bulunmasıdır.
- 2) Otoantikolar: Hücre ve dokularda antijenik özellik gösteren yapılar bulunmakta ve normalde bunlara karşı gelişebilecek immün yanıt tolerans mekanizmalarıyla baskılanmaktadır.
- 3) Hasta dokularda Ig ve kompleman birikmesi: Antijen-antikor kompleksine komplemanın da bağlanması ve dokularda bu immün kompleksin birikmesi, serumdaki C3 ve C4 düzeyini düşürmektedir.
- 4) Hasta dokularda lenfosit sayısının artması: Dokularda lenfosit sayısının artması inflamasyona işaret etmektedir.
- 5) İmmüniteyi baskılayan ilaçlar kullanıldığında hastalık semptomlarının iyileşmesi: Aktif hastalık döneminde kortikosteroid kullanımının birçok otoimmün hastalığı baskıladığı görülmüştür.
- 6) Otoimmüniteyle ilişkili çeşitli lezyonların saptanması (34)

Otoimmün hastalıkların tanısında 50 yılı aşkın bir süredir otoantikolar kullanılmaktadır. 1948 yılında Hargraves ve arkadaşlarının LE hücreleri üzerindeki çalışmaları ANA üzerine yapılan ilk laboratuvar testi olmuştur. (49) Bu yöntem o dönemlerde klinisyenler için SLE hastalığının tanısını destekleyebilecek önemli bir buluş olarak görülmüştür. Daha sonraki yıllarda ise LE hücrelerinin SLE tanısı için duyarlı ve spesifik bir yöntem olmadığına karar verilmiştir. Bunu takiben gerçekleştirilen bir çok çalışma sonucu, LE hücre fenomeninden sorumlu çeşitli nükleer yapılara karşı gelişen antikor topluluğunun farkına varılmıştır. Bunlar bugün ANA başlığı altında toplanmaktadır. 1950'li yıllarda ANA tespitinde, hayvan doku substratları kullanılarak uygulanan immunofloresans (IF) teknikleri geliştirilmiştir. Günümüzde ise bu amaçla bir çok yöntem kullanılmaktadır. (3,50) Bu yöntemlerden bazıları:

- 1) İmmünodifüzyon
- 2) Counter İmmünoelektroforez
- 3) İmmünoblot
- 4) Radyoimmünoprespitasyon
- 5) RIA
- 6) ELISA

1.5.1 İmmünofloresan Antikor Testi

Romatolojik hastalıkların tanısında ANA araştırılması büyük önem taşımaktadır. Günümüze kadar bu amaç için bir çok teknik geliştirilmiştir ancak en eski yöntemler arasında bulunan IFA tekniği hala kullanımdaki en yaygın yöntem olma özelliğini korumaktadır. İmmünodifüzyon, counter immünoelektroforez (CIE), immünoblot, RIA ve ELISA gibi yeni teknikler antikor spesifikliği sağlaması açısından kullanılan diğer tekniklerdir. IFA ise duyarlılık, uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle avantajlı görülmektedir. (51-55)

IFA tekniğinde uygun substrat seçimi büyük önem taşımaktadır. Bir çok doku kesiti ve hücre kültürleri substrat olarak kullanılabilir. Ancak substrat olarak

çok çeşitli kaynakların kullanılması ve konjugatlar için belirlenmiş bir standardın bulunmaması önemli olumsuzluklardır. Değerlendirme ise tamamen yorumlayan kişinin bilgi ve deneyimine bırakıldığı için laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası çalışmalar karşılaştırıldığında farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Floresans mikroskopisiyle ilgili problemler de IFA tekniğini olumsuz bir yönünü oluşturmaktadır. (40)

IFA testinde yaygın olarak karaciğer doku kesitleri kullanılmaktaydı. Günümüzde ise bunun yerini Hep-2 hücreleri almıştır. Bu hücrelerin büyük nükleusları bulunmakta ve hücre siklusu boyunca farklı şekillerde sergilenen antijenlerin belirlenmesine imkan vermektedir.

ANA pozitifliği 4 ana boyanma şekli ile görülmektedir: homojen, benekli, periferik ve nükleolar. Bu paternler belirli hastalıkların tanısında büyük önem taşımaktadır.

Nükleusun tamamının aynı yoğunlukta boyanması ile homojen patern ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni deoksiribonükleoprotein (DNP), dsDNA, histonlar ve ssDNA'ya karşı gelişen antikorların homojen boyanma özelliği göstermesidir.

Benekli boyanma ise nükleusta dağılmış halde bulunan antijenlere karşı gelişen antikorlardan kaynaklanmaktadır ve büyüklük itibarıyla kaba benekli, ince benekli, kaba ve/veya ince benekli olarak farklı görünümler vermektedir.

Periferik boyanma, nükleusun merkezi boyanmadığı halde çevresinin yoğun bir biçimde boyandığı paternidir. Bunun kondanse olmuş kromozomun etrafındaki metafazik hücrelere karşı gelişen antikorlarla oluştuğu bilinmektedir.

Nükleolar boyanma ise genellikle diğer boyanma şekilleriyle birlikte görülen karışık tipte bir floresan boyanmayı göstermektedir. RNAaz ve tripsine karşı duyarlı olması bu boyanmanın nükleolar RNA proteinine karşı gelişen antikorlarla gerçekleştiğini düşündürmektedir. (40,56)

SLE tanısında büyük öneme sahip anti dsDNA antikorlarının saptanmasında, substrat olarak insanlar için patojen olmayan *Crithidia luciliae* hücreleri kullanılmaktadır. Bu mikroorganizma, modifiye büyük bir mitokondri ve stabil halde sirküle dsDNA içeren kinetoplastlara sahiptir. *C. luciliae*, kültürü kolay yapılan bir parazittir ve kinetoplast DNA'sı, RNA ve nükleer proteinlerle ilişkili değildir. Floresans ANA (FANA) testinin aksine bu yöntem anti DNA için %95'in üstünde bir spesifiteye sahiptir ve bu sebeple SLE tanısı için oldukça uygundur. (57,58)

1.5.2 İmmünodiffüzyon

Geçmiş yıllarda IFA yöntemiyle belirlenen pozitiflikler ANA spesifitesine işaret etmiştir. Ancak çeşitli araştırmalar klinik özellikleri SLE olan ancak IFA testi negatif bir hasta grubu tanımlamış ve bunu ANA negatif lupus olarak isimlendirmiştir. Bu hastaların serumları immünodiffüzyon yöntemi ile çalışıldığında ANA IFA testi negatif olmasına rağmen SS-A/Ro antijenlerine karşı gelişen antikorlar pozitif sonuç vermiştir. (59) Bu sebeple gelişmiş araştırma laboratuvarlarında standard indirek immünofloresans tekniği ile birlikte immünodiffüzyon metodu da kullanılarak ANA bakılması yaygınlaşmıştır.

İmmünodiffüzyon yöntemi ile monospesifik bir prototip serum ile timus ve dalak doku ekstrakteleri kullanılmaktadır. DNA gibi büyük moleküllerin agarda diffüzyonu zayıf olduğu için bu yöntemle anti DNA tayini zor gerçekleşmektedir. (60)

1.5.3 Counter İmmünoelektroforez (CIE) Yöntemi

İmmünodiffüzyon tekniğine göre daha hassas olduğu bilinmektedir. DNA ve RNA gibi asidik antijenleri katodal (-) kuyucuğa, özgül antikorları ise anodal (+) kuyucuğa yerleştirilerek elektroforez işlemi uygulanmaktadır. Bu yöntemde antijen kaynağı olarak kaba ekstraktler kullanılır, duyarlılığı kısmen yüksektir ve yükler

sayesinde farklı antijenler kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Ancak basit antijenleri saptayamaması ve serumda ancak 10 mg/ml antikora gereksinim duyması gibi sınırlamaları bulunmaktadır.(61)

1.5.4 İmmünoblot

Günümüzde, immünoblot tekniği antikor spesifitesini tanımlamak için zorunlu bir test haline gelmiştir. Temel olarak, antijen preparasyonları poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile ayrılmakta ve nitroselüloz membrana elektrotransferi gerçekleştirilmektedir. Sonraki aşamada dilüe edilmiş hasta serumu ile inkübasyon gerçekleştirilmekte ve antikor reaktivitesi radyoaktif işaretli veya enzim işaretli ikinci bir reaktif ile belirlenmektedir. Çözünmüş proteinlerin poliakrilamid jelden nitroselüloz membrana elektrotransferi proteinlerin kantitatif tayinini mümkün hale getirdiği gibi transfer süreci içinde ayrılmış proteinlerin tamamen çözülmesini sağlamaktadır. Bir sonraki adımda katı yüzeye tutunmuş antijenler antikor veya diğer reaktiflerle kolaylıkla birleşebilmektedir. (62)

İmmünoblot tekniği, nükleer antijenlere karşı gelişen antikorların alt gruplarını birbirinden ayırarak belirleyebilme imkanı tanımaktadır. Bu alt gruplar, bazı otoimmün hastalıkların varlığına işaret etmektedir. Örneğin Sm antijenine karşı gelişen antikorlar SLE varlığına işaret etmektedir. Anti Scl-70 veya fibrillarine karşı gelişen antikorlar ise sklerodermayı düşündürmektedir. Hasta serumunda Anti SS-A ve Anti SS-B antikorları genellikle sjögren sendromunda ve SLE'de görülse de bu hastalıklar için spesifik markerler olarak kabul edilmemektedir. Optimal koşullarda fibrillarine karşı gelişen antikorlar kümeli nükleolar floresans paterni göstermektedir. Ancak deneyim sahibi biri, bu paterni doğru değerlendirebilmektedir. Bu açıdan immünoblot tekniğinin daha güvenilir sonuç vereceği düşünülmektedir.

İmmünoblot tekniğinin genellikle spesifik ve duyarlı olduğu düşünülür. Diğer yöntemlerde, kullanılan kontrollerle hatasız bir sonuca ulaşıldığından emin olunması önemlidir. Bu açıdan immünoblot tekniği bilinen antikor kontrolleri ile değerlendirme imkanı sağlamaktadır.

ANA'ya sistemik romatolojik hastalıkların tanısında önemli bir unsur olarak ilginin büyümesi klinik laboratuvarlarda immünoblot tekniğinin yer almasını sağlamıştır. IFA gibi yaygın metodlar ANA belirlenmesinde bazen yeterince duyarlı ve kesin olmamaktadır. İmmünoblot tekniği, otoantikörlerin moleküler düzeyde spesifitesini belirlemekte bir sonraki adım olarak gösterilmektedir. (63)

1.5.5 Radyoimmünoprespitasyon

Bu teknikte kültüre alınmış hücreler ^{35}S (proteinleri işaretlemek için) veya ^{32}P (nükleik asitleri işaretlemek için) ile inkübe edilmektedir. Daha sonra sentetik boncuklara bağlanmış hasta antikörleri, işaretlenmiş antijenlerle bağlanmaktadır. Bu antijenler boncuklardan ayrılarak poliakrilamid jel üzerine dökülerek elektroforetik ortamda boylarına göre ayrıştırılmaktadır. Jelin radyografisi çekildiğinde otoradyografide işaretlenmiş ilgili antijenler bantlar şeklinde görülmektedir. (38)

Radyoimmünoprespitasyon tekniği yüksek düzeyde duyarlılık ve spesifite gibi birçok avantaja sahip bir sistem olarak kabul edilmektedir. İmmünodifüzyon yöntemi ile karşılaştırıldığında Ro gibi küçük hücrel komponentlere karşı gelişen antikörlerin ve hatta U1 ve RNP gibi antijenlere karşı gelişen antikörlerin belirlenmesinde çok daha duyarlı olduğu görülmüştür. (64)

1.5.6 RIA

Bu teknik özellikle anti DNA analizinde kullanılan bir yöntemdir. Kabaca iki gruba ayrılmaktadır: Solid faz RIA ve Solubl Faz RIA. Solid faz RIA tekniğinde antijen katı bir yüzeye kaplanmaktadır. Spesifik antikörler antijene bağlandıktan sonra, buna bağlanabilecek radyoaktif işaretli insan anti-globulin antikoru ortama eklenmektedir. Son aşama gama sayıcı ile ortamdaki radyoaktivitenin belirlenmesidir. Hasta serumundaki antikör miktarı ise standard serum kullanılarak belirlenmektedir. Solubl faz RIA tekniğinde ise katı bir yüzey yerine ortam olarak solusyonlar kullanılmaktadır. Anti dsDNA antikörlerinin belirlenmesinde kullanılan Fahr testi bu tekniğin prototipidir. Hasta serumundaki ds DNA antikörleri ortamdaki

işaretili DNA'ya bağlandıktan sonra ortama katılan NH_2SO_4 serbest haldeki DNA yerine antikora bağlanmakta ve antikorun bağlı bulunduğu DNA'yı çöktürmektedir. Çökelti miktarı hasta serumunda mevcut anti dsDNA miktarı ile doğru orantılıdır. Son olarak çökeltinin radyoaktivitesi ölçülüp total radyoaktiviteye oranlanarak sonuçlar yüzde değerleriyle belirlenmektedir. Normal bir serumun DNA bağlama kapasitesi yaklaşık % 20 iken SLE'de bu oranın %100 olduğu bilinmektedir. (38,60)

1.5.7 ELISA

İkinci antikorun bağlanmasına kadar uygulanan aşamalar solid faz RIA yöntemine benzemektedir. ELISA' da ortama katılan ikinci antikor, radyoaktif bir izotop yerine alkalin fosfataz veya peroksidaz gibi bir enzimle bağlı bulunmaktadır. Daha sonraki basamakta ortama eklenen substrat ile bu enzim reaksiyona girmekte ve renk açığa çıkmaktadır. Reaksiyon durdurulduktan sonra optik bir okuyucu ile rengin koyuluğu ölçülüp standart serumla karşılaştırma yapılarak kalitatif veya kantitatif bir sonuç verilmektedir. (38)

ELISA yöntemi özellikle dsDNA ve ssDNA'ya karşı oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanında anti ENA ve anti kardiyolipin antikorların belirlenmesinde de tercih edilmektedir. Pikogram ve nanogram düzeyinde sonuç verebildiği için RIA yönteminden daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca ELISA yönteminde total ANA tespiti de yapılmaktadır. Ancak SS-A ve SS-B nükleusta az miktarda bulduklarından ELISA ile iyi belirlenmemektedir. Fakat bu durum total ANA tesbitinde önemli bir sorun olarak görülmemektedir.

ELISA tekniğinin duyarlılığı yüksektir. RIA'ya göre daha ucuz ve güvenilir olduğu bilinmektedir. Kısa zamanda daha çok hasta üzerinde çalışılabildiği için ve nükleus içinde yaygın halde bulunan ANA'ları daha kolay belirlediği için IFA yönteminden daha kullanışlı bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Ancak özgüllüğünün düşük olması nedeniyle yanlış pozitifliklere sık rastlanmaktadır.(60, 65)

1.5.8 Diğer Teknikler

Özellikle RA hastalığının tanısında önem taşıyan RF tayininde rapid slayt test, nefalometre ve ELISA yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca western blot ile peptit yapıda, southern blot ile DNA yapısında ve northern blot ile RNA yapısında antijenlerin tayini yapılmaktadır. Flow sitometri tekniği romatolojik hastalıklarda serum ve sinoviyal sıvıda hücre tiplerinin belirlenmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Otoimmün hastalıklara yol açabilecek mikroorganizmaların tayini ve çeşitli infeksiyöz ajanların romatolojik hastalıklarla ilişkilerinin ortaya konması gibi nedenlerle PCR tekniği kullanılmaktadır. Bunun yanında eklem sinoviyasında bulunan çeşitli sitokinlerin mRNA'larının saptanması ile hastalıkların etiyopatogenezi hakkında fikir sahibi olma amacıyla da PCR tekniğine başvurulmaktadır. (38, 66)

Tablo 4. Konnektif Doku Hastalıkları ile İlişkili Otoantikolar ve Tanısında Kullanılan Yöntemler (61)

Hastalık	Otoantikor	Tanı Yöntemi
Romatoid Artrit	A-RANA, RF	Lateks aglütinasyon, Nefalometre, ELISA
SLE	A-dsDNA, A-ssDNA, A-SS A, A-SS B, A-Sm, A-histon	IFA, RIA, İmmünodifüzyon, ELISA, Jel Elektroforezi
Sjögren Sendromu	A-SS A, A-SS B	IFA, RIA, İmmünodifüzyon, ELISA, Jel Elektroforezi
Skleroderma/CREST	A-Scl 70, A-sentromer	IFA, İmmünodifüzyon, ELISA, Jel Elektroforezi
Miks Konnektif Doku Hastalığı	A-RNP	İmmünodifüzyon, Hemaglütinasyon, Jel Elektroforezi
Polimiyozit	A-PM 1, A-Jo 1	İmmünodifüzyon, Jel Elektroforezi

1.6 EPİDEMİYOLOJİ

Otoimmün hastalıkların genellikle nadir görülen hastalıklar arasında olduğu düşünülse de, mortalite ve morbidite üzerindeki etkileri dikkate alındığında bu oranın oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde otoimmün hastalıklar 65 yaşın altındaki gençler ve orta yaşlı kadınlar arasında önemli bir ölüm nedeni olarak gösterilmektedir. (67) Bu hastalık grubunun bir çoğunun kronikleşmesi, sağlık alanında, ekonomik anlamda ve yaşam kalitesi üzerinde kayda değer kayıplara yol açmaktadır. (68)

Otoimmün hastalıkların neredeyse tamamı kadınları daha fazla etkilemektedir. Tiroid, skleroderma, SLE, sjögren sendromu gibi hastalıkların kadınlarda görülme sıklığı %85'in üzerindedir. RA, sistemik skleroz gibi hastalıklarda ise bu oran %60-75 arasında değişmektedir. Kadın ve erkekler arasında, Tip 1 diabet gibi bazı otoimmün hastalıkların çocukluk döneminde başlama riskinin ise aşağı yukarı bir birine eşit olduğu bildirilmektedir. Diğer taraftan juvenil RA gibi hastalıkların ise kadınlarda baskın olduğu bildirilmiştir. Son çalışmalar ise yetişkin diabet başlangıcında erkeklerin kadınlara oranla daha fazla risk taşıdığı göstermiştir. (69,70)

Otoimmün hastalıkların yaşa bağlı görülme sıklığında kayda değer bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Ancak Tip 1 diabet ve juvenil artrit gibi iki önemli çocukluk dönemi hastalığında, hastalık başlangıcının yaklaşık 8-10 yaş dolaylarında görüldüğü belirtilmektedir. Graves ve sistemik skleroz gibi hastalıkların ise genellikle 30-50 yaş dönemleri arasında görüldüğü bildirilmektedir. Daha ileri yaş gruplarında (40-70) görülen hastalıklar arasında da tiroid, sjögren sendromu ve RA, gibi hastalıklar bulunmaktadır. (68)

Otoimmün hastalıklardan SLE'nin erkeklere oranla kadınlarda 5-10 yıl erken görüldüğü belirtilmiştir. Ancak bu farklılığın sadece beyaz ırkta görülebileceği düşünülmektedir. (71) Bunun aksine hipertiroidizmin kadınlara oranla erkeklerde daha erken yaşlarda görüldüğü bildirilmiştir. (72)

Otoimmün hastalıklarda risk faktörleri ülkeler arasında veya aynı bölgede yaşayan etnik gruplar arasında farklılık gösterebilmektedir. Örneğin Tip 1 diabet, Kuzey Avrupa ülkelerinde, Güney Avrupa ve Asya ülkelerine nazaran daha yaygın görülmektedir. (73) Hakkında yeterli kanıt elde edilememiş olmasına rağmen sistemik skleroz da bu duruma bir örnek olarak gösterilebilmektedir. (74)

ABD’de siyah ırk, beyaz ırka oranla SLE için daha yüksek bir risk taşımaktadır. Bunun yanında, Tip 1 diabet hastalığının insidansı ise beyaz ırka oranla daha nadir görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde yaşayan siyah ırk ve asyalılar, sistemik skleroz açısından daha düşük bir risk taşımaktadır. (68)

1.7 TEDAVİ

Otoimmün hastalıklarla ilişkili bazı gelişmeler tedavi stratejilerinin de oluşumuna katkıda bulunmuştur. Kostimülatör moleküllerin bloke edilmesi veya Th (CD4+) hücrelerinin monoklonal antikorlarla ortadan kaldırılması toleransla sonuçlanmaktadır. Genellikle bu tür gelişmeler organ transplantasyonunda otoimmün hastalıkların tedavisinde elde edilen sonuçlardan daha başarılı olmuştur. Otoimmün hastalıklarda immünopatoloji, klinik semptomlar geliştiği zaman daha iyi anlaşılmaktadır. Bu sebeple günümüzdeki tedavi stratejileri önceki nonspesifik uygulamaların aksine en iyi risk/fayda oranının belirlenmesi ile mümkün olmaktadır. (75)

Otoimmün hastalıkların tedavisinde üzerinde durulan bazı stratejiler:

- 1) Anti Lenfosit Antikorları: Th hücrelerine karşı gelişen monoklonal antikorların bloke edilmesi ve otoimmün hastalıkla ilişkili lezyonda baskın halde bulunan bazı hücrelerin ortadan kaldırılmasının RA gibi hastalıkların kontrol altında tutulmasını sağlayacağına inanılmaktadır.

- 2) Anti Sitokin Antikorları: TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlere karşı gelişen monoklonal antikorların klinik alanda mümkün bir tedavi stratejisi olduğu 1990'lı yılların başlarında anlaşılmıştır. Ayrıca monoklonal antikorlar yerine TNF- α aktivitesini engellemek için bu sitokinin bağlanacağı reseptörün engellenmesi de olası bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir.
- 3) İmmün Sistemin Baskılanması: İmmün sistemin baskılanması, dokuların fazla hasar gördüğü durumlarda otoimmün hastalıkların ve inflamasyonun kontrol altına alınması veya organ transplantasyonu sonrası transplantın reddedilmesini önlemek amacıyla sıkça kullanılmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak glukokortikoidler, azitoprin, metotreksat, siklosporin, siklofosamid ve merkaptopurin kullanılmaktadır. (76, 77)

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamıza, Aralık 2004-Aralık 2005 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı kliniklerden IFA çalışılmak üzere ANA ve Dot Blot çalışılmak üzere Otoimmün panel istemiyle gönderilen hasta serumlarından, bu testlerden en az birinde pozitiflik görülmüş 85 kadın ve 32 erkek toplam 117 örnek dahil edilmiştir. Her bir serum IFA, Dot Blot ve ELISA yöntemleriyle sonuçları karşılaştırılmak üzere çalışılmıştır.

2.1. ANA POZİTİFLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Laboratuvarımıza gönderilen serumlarda, yapılan isteme uygun olarak IFA ve Dot Blot testleri çalışılmıştır. IFA yönteminde pozitiflik saptanmış ve patern belirlenmiş, negatifliğin görüldüğü titreye kadar aynı test ile çalışmaya devam edilmiş, bunu müteakiben Dot Blot testi çalışılmıştır. Dot Blot yönteminde, membran striptlerinde mevcut bulunan alt grup dağılımına bakılmış, bunlardan en az birinde pozitiflik saptanmış serumlar IFA tekniği ile değerlendirilmiş, bu yöntemde pozitiflik saptanmışsa negatifliğin görüldüğü titreye kadar çalışmaya devam edilmiştir. IFA ve Dot Blot yöntemleri ile çalışması tamamlanmış pozitif serumlar ELISA testi çalışılmak üzere derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir. ELISA yönteminde ANA pozitifliği, total Anti ENA antikor pozitifliği bakılarak saptanmıştır.

2.2. IFA

Laboratuvarımıza ANA ve/veya Dot Blot istemiyle gelerek pozitif olarak değerlendirilmiş serumlar negatifliğin saptandığı titreye kadar 1/40-1/3200 oranları arasında dilüe edilmiştir. Ticari kit olarak Euroimmün kullanılmış ve çalışmalar prosedüre uygun olarak yapılmıştır.

Kullanılan IFA slaytlarının her bir bölmesinde pozitiflik ve patern belirlenmesi için Hep-2 ve sonuçların desteklenmesi için primat karaciğer hücreleri bulunmaktadır.

Çalışma Prosedürü:

Serum dilüsyonu, yıkama ve konjugat dilüsyonu için PBS-Tween 20 karışımı 1 litre distile su içinde çözülmeye bırakılmıştır.

- 1) Slaytlarla uyumlu zemin üzerindeki her bir bölüme pozitif kontrol, negatif kontrol ve serum dilüsyonlarından 25µm pipetlendikten sonra üzerine IFA slatları yerleştirilmiş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 2) Slaytlar zemin üzerinden çıkarılarak PBS-Tween 20 içerisinde 5 dakika yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.
- 3) Zemin üzerindeki her bir bölmeye 1/5 oranında PBS-Tween 20 ile dilüe edilmiş konjugattan 20µm pipetlenip üzerine kurumuş slaytlar kapatılarak 30 dakika inkübasyonda bekletilmiştir.
- 4) Slaytlar PBS-Tween 20 karışımında 5 dakika yıkayıp kurumaya bırakılmıştır.
- 5) Slaytlarla uyumlu lamel üzerine 40µm gliserol damlatılıp slaytlar yerleştirildikten sonra IFA mikroskopunda, 40'lık objektifte sonuçlar değerlendirilmiştir.

Değerlendirme aşamasında floresans mikroskobu olarak Nikon Eclips E200 kullanılmıştır. Bu aşamada pozitifliğin yanında hücre nükleusu ve sitoplazmik komponentlere karşı gelişen homojen, nükleer membran, nükleoplazmik dot, nükleoplazmik granüller, nükleolar, mitotik hücreler, sitoplazmik granüller ve sitoplazmik filamentöz olarak 8 ana patern dikkate alınmıştır. Her serum için uygulanacak titreler sırasıyla: 1/40, 1/100, 1/200,1/400, 1/800, 1/1600 ve 1/3200

olarak belirlenmiştir. 1/40'lık dilüsyondan başlanarak çalışılan serumlar pozitiflik yakalandıkça her defasında bir üst titreye alınmıştır. Negatifliğin olduğu titrenin bir altındaki değer pozitif olarak kabul edilmiştir. Son olarak 1/3200'de hala pozitif veren serumlar için "1/3200 ve üzeri pozitif" sonucucu verilmiştir.

2.3. DOT BLOT

Laboratuvarımıza Dot Blot istemiyle gelen ve/veya ANA IFA testi pozitif saptanmış serumlar Dot Blot tekniği ile değerlendirilmiştir. Ticari kit olarak Euroimmun kullanılmış ve çalışmalar prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma prosedürü:

- 1) Çalışmaya başlamadan önce inkübasyon kanallarına yerleştirilen membran striptleri, 1.5 ml kullanıma hazır sample buffer ile 5 dakika inkübe edilmiştir.
- 2) Sample buffer ile 1/101 oranında dilüe edilmiş serumlardan inkübasyon kanallarına 1.5 ml pipetlenerek 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 3) Distile su ile 1/10 oranında dilüe edilen 1.5 ml wash buffer ile her kanal 5 dakika yıkanmış ve bu işlem üç kez tekrarlanarak toplam 15 dakika uygulanmıştır.
- 4) Sample buffer ile 1/10 oranında dilüe edilen konjugattan her bir inkübasyon kanalına 1.5 ml ilave edilerek 30 dakikalık inkübasyon aşamasına geçilmiştir.
- 5) 2. aşamadaki yıkama işlemi aynen uygulanmıştır.
- 6) Kullanıma hazır olan substrat her bir inkübasyon kanalına 1.5 ml pipetlenmiş ve 10 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

- 7) Her bir inkübasyon kanalına 1.5 ml distile su ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve striplerde pozitif kontrole uygun bir renklenmenin olup olmadığına bakılmıştır. Sonuçlar negatif (-) ve pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir.

Membran striplerinde, ANA alt grubu olarak kabul edilen anti-ENA antikorlarının her birine ait özel bir çizgi bulunmaktadır. Striptin en alt kısmında ise çalışma sonunda tüm striptlerde renklenmesi beklenen pozitif kontrol bulunmaktadır. Sonuçlar pozitif kontrol çizgisine göre değerlendirilmiştir.

Strip üzerinde 1 pozitif kontrol ve 14 alt grup bulunmaktadır. Bu alt gruplar sırasıyla: SS-A, SS-B, Sm, Scl-70, Ro-52, RNP/Sm, PCNA, PM-Scl, Nükleozom, Jo-1, Histon, CENP-B, dsDNA ve AMA-M2 alt gruplarıdır.

2.4. ELISA

ANA açısından IFA ve Dot Blot testleri çalışılmış ve en az birinde pozitiflik saptanmış serumlar son olarak ELISA tekniği ile değerlendirilmiştir. Ticari kit olarak ORGENTEC kullanılmış ve çalışma prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemde kullanıma hazır mikroplet içindeki her bir kuyucuk SS-A 52 (Ro-52), SS-A 60 (Ro-60), SS-B (La), RNP/Sm, RNP-70, RNP-A, RNP-C, SmBB', Sm-D, Sm-E, Sm-F, Sm-G, Scl-70, Jo-1, dsDNA, ssDNA, polinükleozomlar, mononükleozomlar, histon kompleksi, histon H1, histon H2A, histon H2B, histon H3, histon H4, PM-Scl-100, sentromer antijenleri ile kaplıdır. Dilüe edilmiş hasta serumunda bu antijenlerin herhangi birine karşı antikor bulunuyorsa yıkama aşamasında ortamdaki uzaklaşmayacaktır. Horseradish peroksidaz (HRP) özgül antijeni ile birleşmiş antikora bağlanacak insan Ig G antikoruna konjuge haldedir. Ortama ilave edildiğinde konjugat-antikor-antijen kompleksi oluşmaktadır. hasta serumunda özgül antikor bulunmuyorsa ilk yıkamada ortamdaki uzaklaşacağı için ikinci yıkamada konjugata bağlanmayan antikorlar da giderilecektir. Enzim substrat ortama ilave edildiğinde konjugatla bağlanması sonucu hidroliz reaksiyonu meydana

gelecek ve mikropletteki her bir kuyucukta mavi renk oluşumu gözlenecektir. Stop solusyonu ise reaksiyonun sonlanması ve oluşan mavi rengin sarıya dönüşümünden sorumludur. Sonuçlar 450 nm’de fotometrik olarak ölçülmektedir.

Çalışma prosedürü:

- 1) Hasta serumları 1/100 oranında hazır sample buffer ile dilüe edilmiştir.
- 2) Hazır mikroplet üzerindeki ilk üç kuyucuğa sırayla pozitif kontrol, negatif kontrol ve cut-off kontrolden; diğer kuyucuklara ise hasta serumu dilüsyonlarından 100 µl pipetlenmiş ve oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 3) 1/5 oranında distile su ile dilüe edilmiş wash buffer ile her aşamada bir kuyucuğa 300 µl pipetlenecek şekilde toplam 3 defa yıkama yapılmıştır.
- 4) Mikroplet üzerindeki her bir kuyucuğa 100 µl enzim konjugat ilave edilerek 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 5) 3. aşamadaki yıkama işlemi uygulanmıştır.
- 6) 100 µl TMB substrat her bir kuyucuğa pipetlendikten sonra 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 7) Hazır stop solusyonundan 100 µl pipetlenerek her bir kuyucuktaki enzim-substrat reaksiyonu durdurulmuştur.
- 8) Mikroplet ELISA okuyucusu ile 450nm optik dansisistede değerlendirmeye alınmıştır.

- 9) İndeks değeri (IV)= $OD_{\text{hasta surumu}} / OD_{\text{cut-off}}$ olarak hesaplanmış; $OD_{\text{cut-off}}$ değerinden düşük sonuçlar negatif, yüksek sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2. 5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmamızda IFA yöntemi referans yöntem kabul edilerek Dot Blot ve ELISA tekniklerinin, duyarlılık (sensitivite), özgüllük (spesifite) değerleri hesaplanmıştır. Duyarlılık, testin gerçek pozitifleri belirleyebilme oranını, özgüllük ise testin gerçek negatifleri belirleyebilme oranını ifade etmektedir.

$$\text{Duyarlılık} = (\text{Gerçek pozitif} / (\text{Gerçek pozitif} + \text{Yanlış negatif})) \times 100$$

$$\text{Özgüllük} = (\text{Gerçek negatif} / (\text{Gerçek negatif} + \text{Yanlış pozitif})) \times 100$$

3. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen 85 (%72.6) kadın, 32 (%27.4) erkek olmak üzere toplam 117 hasta serumundan 81'i (%69.2) farklı titrelerde IFA , 98'i (%83.8) Dot Blot ve 56'sı (%47.9) ELISA tekniğinde pozitif olarak belirlenmiştir. Hastaların kliniklere göre dağılımı Tablo 5, cinsiyete göre dağılımı Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. Hastaların Kliniklere Göre Dağılımı

Klinik	Frekans	Yüzde (%)
Dahiliye	52	44.2
FTR	21	17.9
Çocuk Sağlığı	13	11.1
Dermatoloji	5	4.3
İnfeksiyon	5	4.3
Diğer	21	17.9

Tablo 6. Hastalarda Cinsiyet Dağılımı

Cinsiyet	Frekans	Yüzde
Kadın	85	72.6
Erkek	32	27.4
TOTAL	117	100.0

IFA yönteminde pozitif olarak değerlendirilen 81 (%69.2) serum örneğinde titrelerle göre dağılım; 1/40'lık 20 (%30.8) , 1/100'lük 30(%25.6), 1/200'lük 10 (%8.5), 1/400'lük 3 (%2.6), 1/800'lük 6 (%5.1), 1/1600'lük 4 (%3.4), 1/3200 ve üzeri 8 (% 6.8) olarak bulunmuştur. Çalışılan 117 hasta serumundan 36'sı (%30.8) IFA yöntemiyle negatif olarak değerlendirilmiştir. IFA yönteminde titrelerle göre dağılımı Tablo 7' de özetlenmiştir.

Tablo 7. IFA Yönteminde ANA Pozitifliğinin Titrelere Göre Dağılımı

IFA	Frekans	Yüzde
Negatif	36	30.8
1/40	20	17.1
1/100	30	25.6
1/200	10	8.5
1/400	3	2.6
1/800	6	5.1
1/1600	4	3.4
1/3200 ve üzeri	8	6.8
TOTAL	117	100.0

Tablo 8. Dot Blot Yönteminde Alt Gruplara Göre Dağılım

Dot Blot	Frekans	Yüzde
SS-A	27	23.1
SS-B	14	12.0
Sm	4	3.4
Scl-70	3	2.6
Pm-Scl	15	12.8
Ro-52	31	26.5
RNP/Sm	5	4.3
PCNA	1	0.9
Nükleozom	12	10.3
Jo-1	1	0.9
Histon	2	1.7
CENP-B	14	12.0
dsDNA	10	8.5
AMA-M2	13	11.1
TOTAL	117	100.0

Çalışılan hasta serumlarından 98'i Dot Blot yönteminde, farklı alt gruplarda pozitif olarak saptanmıştır. Alt gruplarına göre: SS-A 27 (%23.1), SS-B 14 (%12.0), Sm 4 (%3.4), Scl 70 3 (%2.6), Pm-Scl 15 (%12.8), Ro-52 31 (%26.5), RNP/Sm 5 (%4.3) , PCNA 1 (%0.9), nükleozom 12 (%10.3), Jo-1 1 (%0.9), histon 2 (%1.7), CENP-B 14 (%12.0), dsDNA 10 (%8.5), AMA-M2 13 (%11.1) olarak bulunmuştur. 19 örnek ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Dot Blot tekniğinde altgrup dağılımı Tablo 8'de, IFA yöntemindeki titrelelere göre alt grup dağılımı ise Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Dot Blot Yönteminde Alt Grupların IFA Yönteminde Titrelelere Göre Dağılımı

DOT BLOT	IFA								
	Negatif	1/40	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	Toplam
SS-A	9	3	3	1	-	3	3	5	27
SS-B	3	2	4	1	-	1	-	3	14
Sm	-	1	1	1	-	-	1	-	4
Scl-70	2	1	-	-	-	-	-	-	3
Pm-Scl	5	5	3	1	-	1	-	-	15
Ro-52	6	4	8	2	1	3	2	5	31
RNP/Sm	-	1	-	-	-	2	1	1	5
PCNA	-	-	1	-	-	-	-	-	1
Nükleozom	4	1	2	1	-	3	-	1	12
Jo-1	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Histon	-	-	-	-	-	1	-	1	2
CENP-B	3	3	2	6	-	-	-	-	14
dsDNA	3	1	3	1	-	1	-	1	10
AMA-M2	4	1	2	2	1	1	-	2	13

IFA ve Dot Blot yöntemleri ile çalışıldıktan sonra ELISA yöntemi ile değerlendirilen toplam 117 serum örneğinden 55'i pozitif olarak saptanmıştır. Bunlardan 2'si (%1.7) düşük, 35'i (%29.9) normal, 5'i (%4.3) yüksek ve 13'ü (11.1) çok yüksek değerlerde pozitif olarak sonuç vermiştir. 62 örnek ise negatif olarak saptanmıştır. Çalışmamızın ELISA sonuçları Tablo 10'da özetlenmiştir.

Tablo 10. ELISA Yönteminde Saptanan Sonuçlar

ELISA	Frekans	Yüzde
Negatif	62	%53.0
Düşük pozitif	2	1.7
Pozitif	35	29.9
Yüksek pozitif	5	4.3
Çok yüksek pozitif	13	11.1
TOTAL	117	100.0

IFA ve Dot Blot yöntemlerinden elde edilen sonuçlar birbiri ile karşılaştırıldığında şu veriler elde edilmiştir. IFA yöntemi ile negatif olarak değerlendirilen 36 örnekten tamamı (%100) Dot Blot yöntemi ile pozitif sonuç vermiştir. Her iki yöntemle negatiflik elde edilmemiştir. Bunun nedeni IFA ve Dot Blot tekniklerinden en az biri pozitif olarak saptanan örnekler çalışmaya dahil edilmiştir. IFA pozitif örneklerin titrelere göre Dot blot tekniği ile karşılaştırması Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. IFA ve Dot Blot Yöntemlerinin Karşılaştırılması

DOT BLOT	IFA								
	Negatif	1/40	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	Total
Negatif	-	4	11	1	1	1	1	-	19
Pozitif	36	16	19	9	2	5	3	8	98
Total	36	20	30	10	3	6	4	8	117

IFA ve ELISA yöntemlerinden elde edilen sonuçlar birbiri ile karşılaştırıldığında IFA negatif hastalardan 6'sı ELISA ile pozitif, 30'u ise negatif olarak saptanmıştır. IFA pozitif örneklerin titrelere göre ELISA yöntemi ile karşılaştırması Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. IFA ve ELISA Yöntemlerinin Karşılaştırılması

ELISA	IFA								
	Negatif	1/40	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	Total
Negatif	30	20	11	-	1	-	-	-	62
Pozitif	6	-	19	10	2	6	4	8	55
Total	36	20	30	10	3	6	4	8	117

IFA referans yöntem kabul edilerek yapılan istatistiksel analizde Dot Blot tekniğinde, duyarlılık % 81.0, özgüllük %50.0, pozitif prediktif değer %69.2 ve negatif prediktif değer %65.4 olarak bulunmuştur. ELISA yönteminde, duyarlılık %71.7, özgüllük %85.7, pozitif prediktif değer %93.1 ve negatif prediktif değer %52.9 olarak bulunmuştur. Dot Blot ve ELISA yöntemlerinde istatistiksel analizler Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Dot Blot ve ELISA Yöntemlerinin İstatistiksel Analizi

	DOT BLOT	ELISA
Duyarlılık	%81.1	%71.7
Özgüllük	%50.0	%85.7

5. TARTIŞMA

Otoimmün hastalıklar ABD’de önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olarak gösterilmektedir. 1997 yılında yapılan epidemiyolojik bir araştırmada 31 amerikalıdan birinin otoimmün hastalıklardan etkilendiği kaydedilmiştir. (78,79) Bu hastalıkların oluşumunun kesin nedeni olarak kabul edilen self antijenlere karşı gelişen immün yanıt oluşumu günümüzde tamamen aydınlatılamamıştır. Otoimmün hastalıkların fiziksel, psikolojik ve ekonomik zararlarının boyutu önem arz etmektedir, çünkü bu problemin özellikle genç populasyon üzerindeki olumsuz etkileri kayda değer bir risk faktörüdür. Bu hastalık grubunda erken teşhis büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla genellikle otoantikor testleri kullanılmaktadır. Ancak otoantikor test sonuçlarının güvenilirliği açısından laboratuvarlarda uygulanan yöntemler hakkında bilgi ve deneyim sahibi olunması, kliniklerle irtibat kurulması, hasta ve hastalıkla ilgili bilgilerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.(79-81)

Sistemik otoimmün hastalık grubuna dahil edilen RA, SLE, Sjögren Sendromu, Skleroderma, Dermatomyozit/ Polidermamiyozitis gibi BDH grubuna dahil edilen hastalıkların tanısı ve tedavisinin takibinde hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer antijenlere karşı gelişen antinükleer antikorlar büyük önem taşımaktadır. IFA, bu amaçla geliştirilen en eski ve yaygın yöntem olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra son yıllarda geliştirilen ELISA, immünoblot ve immünodiffüzyon gibi yöntemler de laboratuvarlarda tek başına veya IFA ile beraber kullanılmaktadır. Antinükleer antikorların yaşlılık, sitotoksik ilaç kullanımı ve kanser gibi durumlarda da görülmesi nedeniyle ANA pozitifliğinin anti-ENA adı verilen ANA alt gruplarının belirlenmesine de olanak sağlayan farklı yöntemlerle doğrulanmasının gerekliliğine dikkat çekilmektedir. Her yöntemin kendi içinde mevcut bazı avantajlar ve sınırlamalar göz önünde bulundurulduğunda, tek bir yöntemle tanıya gidilmesinin önemli bazı sorunlara yol açabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. (3-5,82)

IFA yönteminin basit, uygulanması kolay ve maliyeti düşük bir test olduğu kaydedilmiştir. Ancak zaman alıcı ve subjektif bir değerlendirme sürecini

gerektirmesi önemli sınırlamalar arasında gösterilmektedir. Bu açıdan değerlendiren kişinin bilgi ve deneyimi sonuçların geçerliliğini büyük ölçüde etkilemekte, ayrıca çok sayıda serum örneğinin kısa sürede çalışılmasını zorlaştırılmaktadır.(5)

Son yıllarda geliştirilen ELISA, immüno blot ve EIA gibi yöntemlerin uygulamasının daha pratik olması ve objektif bir değerlendirme sürecini sağlaması rutin laboratuvarlarda bu yöntemlerin yaygınlaşmasına olanak sağlamıştır. IFA ile karşılaştırıldığında, sonuçların laboratuvar içi veya laboratuvarlar arası tutarsızlığının önemli ölçüde giderildiği bildirilmiştir. (5)

Jawowski ve arkadaşları, 601 hasta ve 202 sağlıklı bireylerden alınan serum örnekleri üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında IFA ve EIA yöntemleri arasında iyi bir kolerasyon olduğunu belirtmişlerdir. Ancak kullanılan beş farklı EIA kitinin hiç birinde IFA'ya oranla % 100 duyarlı olmadığına dikkat çekmişlerdir. (7)

Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Eylül 2000- Mayıs 2001 tarihleri arasında gerçekleştirilen bir çalışmada IFA ve EIA yöntemleri arasındaki uyumluluğun Helix Diagnostic kiti için %90, Sera Quest kiti için %82 olarak belirlenmiştir. Jaskowski ve arkadaşlarının çalışmaları da dikkate alındığında ANA-EIA kitlerinin genel olarak iyi bir performansa sahip olduğu, ancak geliştirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. (83)

Reisner ve arkadaşları ANA-EIA yöntemindeki teknik hataların performansı olumsuz yönde etkilediği ve sonuçların IFA ile doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır. Ülkemizde, Yılmaz ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise EIA ile IFA arasındaki uyumun %18.2 gibi düşük bir değerde olduğu saptanmıştır. (8,84)

Çalışmamızda yüksek titrede IFA ANA pozitifliğinin (1/3200, 1/1600, 1/800), ELISA yöntemiyle %100 uyumlu sonuçlar gösterdiği görülmüştür. Bunun yanında 1/400 titrede %75.0, 1/200 titrede %100, 1/100 titrede %63.3 oranında uyumluluk saptanmıştır. 1/40 titrede IFA pozitifliğinin ise ELISA ile %0 uyumlu,

başka bir ifadeyle tamamen uyumsuz sonuç verdiği belirlenmiştir. IFA negatifliğinin ise ELISA ile %83.3 uyumlu olduğu görülmüştür.

IFA yönteminde hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasında farklı yerleşim gösteren nükleer antijenlere karşı gelişen antikolar farklı boyanma paternleri ile saptanmaktadır. Ancak nükleer boyanmaya neden olan antikor tiplerinin birbirinden ayırt edilmesi IFA yönteminde zordur. İmmüno blot yönteminde ise hedef antijene karşı gelişen antikoların özgül ve duyarlı bir şekilde saptandığı bilinmektedir. Tek bir örnekle bile hızlı bir biçimde sonuç vermesi ve bir test stribinde birkaç farklı antikorun saptanabilmesi immüno blot yönteminin önemli avantajlarından. Ancak maliyetinin yüksek olması, teknik hatalara ve solusyonların saklanma koşullarına bağlı olarak yalancı pozitiflik verebilmesi bu yöntemin önemli dezavantajlarından. (83)

Nawarro ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada Western Blot (WB) yönteminin özellikle anti-Sm antikorlarının belirlenmesinde, karşılıklı immünoelektroforez tekniğinden daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. (85)

Berkem ve arkadaşlarının çalışmasında iki farklı üretici firmaya ait immüno blot kitlerinin, IFA yöntemi referans kabul edildiğinde duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla Euroimmun kiti için %54 ve %100, GenBio için %48 ve %98 olarak belirlenmiş, her iki kitin uyumluluk değerlerinin %74 oranında olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada anti dsDNA antikorları için IFA referans yöntem kabul edildiğinde kullanılan iki farklı ticari kitin duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla Euroimmun için %50 ve %86, GenBio için %66 ve %100 olarak belirlenmiş, uyumluluk değerlerinin ise sırasıyla %84 ve %98 olduğu bildirilmiştir. (83)

Ülkemizde Us ve arkadaşları, yapmış oldukları bir çalışmada immüno blot yönteminin anti-ENA antikorlarının saptanması için kullanılabilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Ancak çalışmada farklı bir yöntemle karşılaştırma yapılmadığı için özgüllük ve duyarlılıkla ilgili bir yorum getirilmemiştir. (86)

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında Kasım 2002- Ağustos 2003 döneminde yapılan bir çalışmada ANA araştırılmasında IFA yönteminin temel yöntem olarak kullanılmasının duyarlılığı arttırdığı, immüno blot yönteminin özgül otoantikörlerin belirlenmesinde kullanılmak suretiyle alt grupların saptanarak hastalığın kesin tanısında yardımcı olacağı belirtilmiştir. Burada ANA pozitifliğinin yanında özgül antikörlerin de belirlenmesinin hastalıkların ayırt edilmesi ve hastalık şiddetinin takibine yararlı olacağı vurgulanmaktadır. (87)

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Ekim 2002- Haziran 2004 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada IFA yöntemi ile pozitif 208, negatif 313 olarak saptanan toplam 521 hasta serumunda anti-ENA çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pozitif hastaların 126'sı (%60.5), negatif hastaların ise 4'ü (%1.3) anti-ENA pozitif olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara dayanarak IFA kitlerinde ANA varlığının Hep-2 hücreleri yardımıyla bilinen ve bilinmeyen tüm antijenlere karşı gelişen otoantikörlerin saptanmasını mümkün kıldığı belirtilmiş ve anti-ENA testinin ise sadece bilinen bir antijene karşı gelişen antikor saptama amacıyla kullanıldığı aktarılmıştır. Bu doğrultuda anti-ENA testinin ANA testinden daha duyarlı olabileceği bildirilirken maliyetinin yüksek oluşu ve zaman alıcı bir yöntem olması vurgulanmıştır. (88)

Çalışmamızda 1/3200 titrelerinde saptanan ANA IFA pozitifliğinin Dot Blot yöntemi ile %100 uyumlu olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra 1/1600 titrede pozitifliğin %75.0, 1/800 titrede %83.3, 1/400 titrede %66.7, 1/200 titrede %90.0, 1/100 titrede %63.3, 1/40 titrede ise %80.0 uyumlu olduğu belirlenmiştir. Çalışmamıza IFA ve Dot Blot tekniklerinden herhangi biri pozitif olarak saptanan hasta örnekleri dahil edildiği için bu iki yöntem negatiflik açısından karşılaştırılamamıştır.

Yılmaz ve arkadaşları BDH ön tanısı konmuş ve takibe alınmış hastalarda nükleer ve sitoplazmik otoantikör pozitifliği ve bu antikörlerin tiplerini WB, IFA ve EIA yöntemleri ile araştırmışlardır. Burada altın standard olarak WB yöntemi

seçilmiştir ve yöntemler arası uyum IFA için %91.6, EIA için %16.6 olarak belirlenmiştir. (8)

Çalışılan hasta örneklerinde cinsiyete göre dağılım Tablo 2’de gösterilmiştir. Çalışmamız süresince çeşitli kliniklerden gönderilen ve çalışmamıza dahil edilen hastalar içinde kadınlar %72.6 oranıyla daha fazla pozitifliğin görüldüğü grubu oluşturmaktadır. Otoimmün hastalıkların kadınlarda erkeklere oranla daha sık görüldüğü bilinmektedir. (89) Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların da bu doğrultuda olduğu görülmüştür.

Son yıllarda, ANA pozitifliğinin saptanması amacıyla bir çok yöntem geliştirilmiştir. Ancak IFA, halen altın standart olma özelliğini korumakta ve rutin laboratuvarlarda, yeni yöntemlerin, IFA tekniği ile belirlenen ANA pozitifliğinin takibinde kullanılması gerektiği önerilmektedir. IFA yöntemi, floresans mikroskopunda görülen farklı boyanma şekillerine göre, bu aşamadan sonra hangi yöntemin kullanılabilceği konusunda yol gösterici olmaktadır. Saptanan pozitifliğin yanında, titre tayinine de olanak sağlaması, klinisyene, hastalık şiddeti hakkında fikir verebilmektedir. Ancak subjektif bir değerlendirme gerektirdiği için laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası farklı sonuçların görülmesi, ANA varlığına işaret etmeyen boyanmaların pozitif kabul edilebilmesi ve floresans mikroskobu ile ilgili problemlerin değerlendirmeye yansması tek başına IFA ile sonuca gidilmesinin sakıncalarını ortaya koymaktadır. ANA alt gruplarının ayrımının yapılması, hastalık tipinin belirlenmesinde oldukça önemli kabul edilmektedir. IFA yönteminde mikroskopik boyanma şekillerinin belirlenmesinin oldukça güç olması ve alt grupların tam olarak ayırt edilebilmesinin mümkün olmaması da bunu takiben uygulanacak uygun bir testin gerekliliğini desteklemektedir.

Antikor spesifitesinin tanımlanmasında, IFA yönteminin yetersiz kalması, yeni yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla, moleküler düzeyde analiz imkanı sağlayan immünoblot ve benzeri teknikler geliştirilmiştir. Dot Blot tekniğinde bir çok alt grubun bir birinden ayırt edilmesi, hatta aynı hastaya ait serum örneğinde birkaç farklı alt grubun eş zamanlı olarak tayin edilebilmesi

mümkündür. Ayrıca bu yöntem, tek bir hastayla çalışılabilme imkanı sağlamakta, kolay ve güvenilir bir değerlendirme imkanı sunmaktadır. Ancak IFA yönteminin düşük titrelerinde bile doğrulanamayan pozitiflikler görülmektedir. Bu nedenle, tek başına kullanılması önemli sorunlara yol açabilecek bir uygulama olarak kabul edilmiştir. Maliyetinin yüksek olması da kullanımını sınırlayan diğer bir etmen olarak karşımıza çıkmaktadır.

ELISA yöntemi, uygulanması kolay bir yöntem olarak rutin laboratuvarlarda yerini almıştır. Anti ENA antikorlarının belirlenmesinde duyarlı ve tercih edilebilir bir yöntem olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Fazla sayıda örneğin kısa süre içinde çalışılmasına imkan vermesi, özellikle tarama amaçlı kullanılabilmesine olanak sağlamıştır. Değerlendirme süreci objektif ve güvenilir kabul edilmiştir. Bu yöntemle, genellikle total Anti ENA ölçümleri yapılmaktadır. Bu durum, sadece pozitifliğinin belirlenmesine olanak sağlamakta, alt gruplar hakkında herhangi bir fikir verememektedir. ANA pozitifliğinin tanıda tek başına yeterli olmadığı göz önünde bulundurulduğunda, bu tekniğin tek başına kullanımının yanlış bir uygulama olduğu görülmektedir.

BDH araştırılması amacıyla klinik immünoloji laboratuvarlarında kullanılan bir çok geliştirilmiş test ve metodlar, klinisyenlere bu hastalıkların tanı ve takibinde yardımcı olmaktadır. Bu amaçla kullanılan bir çok test bulunmakta, her bir test farklı bir metodla uygulanabilmekte ve bazı kendine özgü sınırlamaları da beraberinde getirmektedir. Bu test ve metodlar hakkında yeterince bilgi ve deneyime sahip olunması klinik immünoloji laboratuvarlarının BDH araştırılmasında daha verimli ve ekonomik çalışması için gerekli bir koşul olarak görülmektedir. (90)

ANA pozitifliğinin belirlenmesini takiben anti-ENA antikorlarının araştırılması sürecine nasıl girileceği dikkat çekici sorulardan biri olarak görülmektedir. İlk olarak ANA pozitifliğini daima anti-ENA testleri takip edecekse, titre ve paternlerin her ikisi de hangi sıradan anti-ENA antikorlarının araştırılmasının gerekli olmadığı hakkında bir görüş sahibi olunmasına yol gösterebilmektedir. Klinisyenlerin sonuçları rapor etmek için kullanılan algoritmeler kadar test

karakteristiklerinden de haberdar olmaları önemle vurgulanmaktadır. Son olarak uygun bir testin uygulanması için klinisyenin laboratuara kliniksel bilgileri de göndererek yardımcı olması gerektiği belirtilmektedir. (91)

6. SONUÇ

Sonuç olarak IFA yönteminin kullanılan en eski ve yaygın yöntem olduğu bilinmektedir. Slaytlar üzerinde Hep-2 hücreleri yanında karaciğer hücrelerinin de bulunması paternlerin belirlenmesi kolaylaştırmıştır. Titrelere dayanarak yapılan analizlerle klinisyene hastalık şiddeti hakkında fikir verilebilmektedir. Maliyetinin düşük olması da önemli bir avantajdır. Ancak değerlendiren kişiler değişikçe sonuçlar arasında farklılıklar görülebilmekte ve bazı durumlarda patern belirlenmesi açısından güçlükler yaşanmaktadır. Dot Blot tekniğinin en önemli avantajı bir çok farklı alt grubun bir birinden net bir şekilde ayırıldığını sağlamaktadır. Uygulanması ve değerlendirmesi kolay olduğu için kısa sürede sonuç alınabilmektedir. Ancak sonuçların tamamen kalitatif olması ve çok fazla saptanan pozitifliğin diğer testlerle doğrulanamaması önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmıştır. Diğer taraftan maliyetinin de yüksek oluşu testin kullanımını sınırlayan önemli nedenler arasındadır. ELISA yönteminin de uygulanması ve değerlendirilmesinin kolay olduğu görülmüştür. Dot Blot tekniğinde olduğu gibi prosedüre uygun olarak gerçekleştirilen bir çalışmanın laboratuvar içi ve laboratuvar arası farklılığı azalttığı bilinmektedir. IFA yöntemi ile uyumlu sonuçlar verdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Ancak total ANA ölçümüne dayanması ve sub tipler hakkında herhangi bir bilgi vermemesi diğer iki testle karşılaştırıldığında önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmıştır.

Çalışmamızın neticesinde aşağıdaki temel sonuçlara ulaştık:

- 1) ANA pozitifliğinin belirlenmesi tek başına yeterli değildir.
- 2) ANA pozitifliğinin yanında titre ve paternler de dikkate alınarak anti-ENA antikörlerini araştırmak üzere uygun testler seçilmelidir.
- 3) Anti ENA antikörlerinin belirlenmesinde kullanılan yeni sistemleri anlamak üzere geniş ve çok merkezli kliniksel değerlendirmeye ihtiyaç duyulmaktadır.
- 4) Rapor edilmiş test sonuçlarının uygun yorumlanması için klinisyenin anti-ENA antikörlerinin belirlenme ve rapor edilme yollarını fark etmesi gerekli görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1) Ruacan Ş. (1999) Otoimmünite. Pp: 245-249. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Güneş Kitabevi, Ankara
- 2)) Terzioğlu E. (1999) Self Tolerans ve Otoimmünite. Pp: 55-57. In: Gümüşiş G, Doğanavşargil E (eds). Klinik Romatoloji Kitabı. Deniz Matbaası, İstanbul
- 3) Von Muhlen CA, Tan EM. (1995) Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum 24, 323-358
- 4) Ersöz Us D. (1992) Antinükleer antikörler ve hastalıklarla ilişkileri. Mikrobiyol Bült. 26, 379-389
- 5) Chan EKL, Pollard KM. (1997) Detection of autoantibodies to ribonucleoprotein particles by immunoblotting . Pp: 928-934. In: Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (Eds). Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fifth Edition. ASM Press, Washington DC.
- 6) Tan EM, Smolen JS, MacDougall JS, et al. (1999) A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear antibodies of defined specificities. Arthritis Rheum. 42, 455-464
- 7) Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, et al. (1996) Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. Am J Clin Pathol. 105, 468-473
- 8) Yılmaz Ö, Kahraman M, Koşar Y, Bahar İH, Yuluğ N. (2001) Antinükleer antikörlerin saptanmasında indirek immün floresan, enzim immünassay ve western blot yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült. 35, 473-480

- 9) Navarro E, Palau J. (1991) Anti-Sm sera are misdetected by counterimmunoelectrophoresis. A critical analysis of CIE and western blotting on the detection of human antinuclear antibodies. *J Autoimmun.* 4, 213-222
- 10) Masllorens FO. (2000) Autoimmune disease and physiological autoimmunity: recognition of self. *Allergol Immunol Clin.* 15, 5-12
- 11) Naik S. (2004) The immunological basis for autoimmunity. *J Indian Rheumatol Assoc.* 12, 22-28
- 12) Addams D. (1996) How the immun system Works and why it causes autoimmune disease. *Immunol Today* 17, 300-3002
- 13) Rivers TN, Sprunt DH, Berry GP. (1933) Experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 58, 39-54
- 14) Silverstein AM. (1989) A history of immunology. San Diego: Academic Press
- 15) Dacie JV, Worlledge S. (1969) Autoimmune haemolytic anemia. *Prog Hematol* 6, 80-120
- 16) Dameshek W, Schwartz SO. (1938) On the pathogenesis of haemolytic anemia. *N Engl J Med* 218, 75-82
- 17) Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. (1945) A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol* 26, 255-266
- 18) Rose NR, Witebsky E. (1956) Studies on organ specificity. V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunisation with rabbit thyroid extracts. *J Immunol* 76, 417-427

- 19) Roitt IM, Doniach D, Campbell PN, Vaughan Hudson R. (1956) Autoantibodies Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre). *Lanset* 2, 820-821
- 20) Adams DD, Purves HD. (1956) Abnormal responses in the assay of thyrotropin. *Proc Univ Ontario Med School* 34, 11-12
- 21) Burnet FM. (1957) The clonal selection theory of acquired immunity. Londres: Cambridge University Press
- 22) Kılıçkaya T. (2003) Self Tolerans ve Otoimmünite. Pp: 241-261. In: Kılıçturgay K (ed) *İmmünoloji Kitabı* . Motif Matbaacılık- Nobel & Güneş Kitabevi. 2003. 359-379
- 23) Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. (2001) *N Engl J Med* 344, 655-664
- 24) Delves RJ, Roitt IM. (2000) The İmmun Sistem. *N. Engl J Med* 343, 37-49
- 25) Akkaraju S, Ho WY, Leong D, Canan K, Davis MM, Goodnow CC. (1997) Arange of CD4 Tcell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 7, 255-271
- 26) Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B. (2000) Shaping of the otoreactive T-cell repertoire by splice variant of self proteins expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med* 6, 56-61
- 27) Butcher EC, Picker LJ. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66
- 28) Ferber I, Schönrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hammerling GJ, Arnold B. (1994) Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 263, 674-676

- 29) Kurts C, Carbone FR, Barnden M, et al. (1997) CD4⁺ T cell help impairs CD8⁺ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 186, 217-253
- 30) Nemazee D. (2000) Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 18, 19-51
- 31) Kouskoff V, Lacaud G, Nemazee D. (2000) T cell-independent resource of B lymphocytes from peripheral immun response. *Science* 287, 2501-2503
- 32) Fagarasan S, Honjo T. (2000) T-independent immun response: new aspects of B cell biology. *Science* 290, 89-92
- 33) Gülmezođlu E, Ergüven S (eds) .(1994) İmmünoloji. In: 223-224 Hacettepe Taş Yayınları. Ankara
- 34) Yeđin O. (1992) Temel İmmünoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları. Pp: 255-264 . Akdeniz Üniversitesi Basımevi Antalya
- 35) Babacan M. (1994) Otoimmünite ile ilgili ders notları. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi. Erzurum
- 36) Theofilopolus AN, MD. (1987) Autoimmunity. Pp: 128-158. In: Stites DP, Stobo JD, Wells JW. *Basis & Clinical Immunology*. Sixth Edition, Appleton & Lange. USA
- 37) Volpe R. (1984) Immunological Aspects of Thyroid Disorders. *Triangle* 23, 95-103

- 38) Keser G. (1999) Romatolojik Hastalıkların Tanısında Hematolojik, Biyokimyasal ve Serolojik İncelemeler. Pp: 147-159. In: Gümüşdiş G, Doğanavşargil E (eds). Klinik Romatoloji. Deniz Matbaası İstanbul.
- 39) Us DE. (1992) Antinükleer antikorlar ve hastalıklarla ilişkileri. Mikrobiyoloji bülteni 26, 379-389
- 40) Fernandez MF, Mattioli M. (1976) Antinuclear antibodies: immunologic and clinical significance. Seminars in Arthritis and Rheum 6 (2), 83-124.
- 41) Monier JC. (1990) Antinuclear Antibodies: Detection and diagnostic value. Nuc. Med. Biol. 17(7), 713-718.
- 42) Tan EM. (1989) Antinuclear Antibodies: Diagnostic markers for autoimmune disease probe for cell biology. Adv. Immunol. 44, 93-151
- 43) Tan EM. (1982) Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. Adv in Immunol. 33, 167-240
- 44) Mongey AB, Hes EV. (1991) Antinuclear Antibodies and Disease Specificity. Pp: 151-165. In: Stollerman GH, LaMont JT, Leonard JJ et al (eds). Advanced in Internal Medicine. Mosby Year Book, USA
- 45) Bernstein RM, Hobbs RN, Lea DJ et al. (1985) Patterns of antihistone antibody specificity in systemic rheumatic disease, systemic lupus erytematosus, MCTD, primary sicca syndrome and rheumatoid arthritis with vasculitis. Arthritis Rheum. 28, 285-293
- 46) Tan EM, Kunkell HG. (1966) Characteristic of soluble nuclear antigen precipitating with sera patients with systemic lupus erytematosus. J Immunol 96, 466-471

- 47) Earnshaw WC, Bordwell BJ, Marino C et al. (1986) Three human chromosomal autoantigens are recognised by sera from patients with anticentromer antibodies. *J Clin. Invest* 77, 429-430
- 48) WHK A. (1987) The value of specific antinuclear antibodies determination in rheumatology. *Allergy* , 241-261
- 49) Hargraves M, Richmond H, Morton R. (1948) Presentation of two bone marrow components, the tart cell and the LE cell. *Mayo Clin Proc* 27, 25-28
- 50) Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. (2000) Guidelines for Clinical Use of Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Arch Pathol Lab Med.* 124, 72-81
- 51) Beutner EH. (1972) Defined immunoflorescent staining. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 254, 873-891
- 52) Cleymaet JE, Nakamura RM. (1972) Indirect immunoflorescent antinuclear antibody tests: comparison of sensitivity and specificity of different substrates. *Am. J. Clin. Pathol* 58, 388-393
- 53) MacCarty, G.A., Valencia DW, Fritzler MJ. (1984) Antinuclear antibodies: contemporary techniques and clinical applications to connective tissue disease. Oxford University Pres, New York
- 54) Molden DP, Nakamura RM, Tan EM. (1984) Standardization of immunoflorescent tests for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defined antibody specificity. *Am. J. Clin. Pathol* 82, 47-66
- 55) Nakamura RM, Peebles CL, Molden DP, Tan EM. (1984) Advances in laboratory tests for autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic disease. *Lab Med* 15, 190-198

- 56) ANA Atlas. (1990) An imperative guide to immunoflorescent Hep-2 antinuclear antibodies. Helix Diagnostics, Inc, West Sacramento California
- 57) Ballou, S.P., Kushner I. (1979) Anti-native DNA detection by the Crithidia luciliae method. An improved guide to the diagnosis and clinical management of systemic lupus erithematosus. Clin. Exp. Immunol 22, 321-327
- 58) Chubick, A., Sontheimer RD, Gilliam NJ. (1978) An apparasial of tests for native DNA antibodies in connective tissue diseases. Clinical usefulness of Crithidia luciliae assay. Ann. Intern. Med 89, 168-192
- 59) Reichlin, M., Wasicek CA. (1983) Clinical biological significanca of antibodies to Ro/SS-A. Hum. Pathol 14, 401-405
- 60) Emerk K. (1994) Romatizmal hastalıklarda laboratuar bulguları. Pp: 51-87. In Tuna N (ed) Romatizmal hastalıklar, Taş Yay İstanbul
- 61) Nasuhbey N. (1995) Bölgemizdeki Bazı Otoimmün Hastalıklarda Antinükleer Antikor Prevalansı, ASO,CRP,RF İlişkisi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi
- 62) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354
- 63) Chan EKL, Pollard KM. (1992) Autoantibodies to Ribonucleoprotein Particles by Immunoblotting. Pp: 755-761. In: Rose NR, Demarcio EC et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM press

- 64) Craft J, Hardin JA. (1992) Immunoprecipitation Assays for the Detection of Soluble Nuclear and Cytoplasmic Nucleoproteins. Pp: 747-754. In: Rose NR, Demarcio EC et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM press
- 65) Jitsukawa T, Nakajima S, Usui J, Watanabe H. (1991) Detection of anti-nuclear antibodies from patients with systemic rheumatic diseases by ELISA using Hep-2 cell nuclei. J. Clin. Lab. Analysis , 49-53
- 66) Cook L, Agnello V. (1992) Tests for Detection of Rheumatoid Factors. Pp: 762-764. In: Rose NR, Demarcio EC et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM Press
- 67) Walsh SJ, Rau LM. (2000) Autoimmune disease: a leading cause of death among young and middle-aged women in the United States. Am J Public Health, 90: 1463-1466
- 68) Cooper GS. (2002) The epidemiology of autoimmune diseases: Contributions of previous studies and opportunities for future research. In: Pp 582-603. Conrad K, Fritzler M, Sack U, Shienfeld Y (eds). From Proteomics to Molecular Epidemiology: Relevance of Autoantibodies. 6th Dresden Symposium on Autoantibodies, Dresden
- 69) Kyvik KO, Nystrom L, Gorus F, Songini M, Barak L, Burton P, Castell C et al. (2001) Incidence of type 1 diabetes in young adult across Europe- an EU funded multicentre study (IDA). Diabetologia, 44: A75 (abstract # 284)
- 70) Ostrauskas K, Zalinkevicius R, Norkus A. (2001) Incidence of Type 1 diabetes mellitus over eight consecutive year among 15-39 year aged Lithuanian population. Diabetologia, 44: A96 (abstract # 367)
- 71) Cooper GS, Parks CG, Treadwell EL, et al. (2002) Differences by Race, Sex, and Age in the Clinical and Immunologic Features of Recently-Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus Patients in the Southeastern United States. Lupus, 11: 161-167

- 72) Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM et al. (1995) The incidence of thyroid disorders in the community: A twenty- year follow-up of the Whickham survey. *Clin Endocrin*, 43: 55-68
- 73) Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E et al. (2000) Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Care*, 23: 1516-1526
- 74) Rosati G. (2001) The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*, 22: 117-139
- 75) Tyndall A. (2000) News in autoimmune disease. *Schweiz Med Wochenschr* 130, 113-118
- 76) Elliot MJ, Maini RN, Feldmann M, et al. (1994) Randomised double blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344, 1105-1110.
- 77) Mladenovic V, Domljan Z, Rozman B, et al. (1995) Safety and effectiveness of leflunamide in treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism* 38, 1595-1603.
- 78) Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. (1997) Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune disease in the United States. *Clin. Immunol. Immunopathol* 84, 223-243
- 79) Rioux JD, Abbas AK. (2005) Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature Publishing Group* 435, 584-589
- 80) Bradwell AR. (2002) Immunofluorescent antinuclear antibody tests. Pp: 922. IN: Rose NR, ed. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 6 edn ASM Pres, Washington, DC

- 81) Fritzler MJ, Salazar M. (2005) Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. Clin Microbiol Reviews 5,136-139
- 82) Prelog M. (2005) Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity. Autoimmune Reviews 5, 136-139
- 83) Berkem R, Gümüő T, Karakoç E, Acar N. (2003) Antinükleer Antikorların Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması. Mikrobiol Bült 37, 171-178
- 84) Reisner BS, DiBlasi J, Goel N. (1999) Comparison of enzyme immunoassay to an indirect fluorescent immunoassay for the detection of antinuclear antibodies. Am J Clin Pathol 111, 503-506
- 85) Nawarro E, Palau J. Anti-Sm sera are misdetected by counterimmunoelectrophoresis. (1991) A critical analysis of CIE and western blotting on the detection of human antinuclear antibodies. J Autoimmun 4, 213-222
- 86) Us D, Şener B, Haşçelik G, Günalp A. (1997) Sistemik lupus eritematozuslu hastalarda ekstrakte edilebilir nükleer antijenlere karşı antikorlar (Anti-ENA) varlığının immüno blot yöntemiyle araştırılması. Mikrobiyol Bült 31, 155-163
- 87) Aktepe OC, Altındiş M, Çetinkaya Z, Çiftçi İH, Çetinkol Y. (2003) Afyon Bölgesinde Antinükleer Antikorların Dağılımı. XVII. Ulusal İmmünoloji Kongresi Kitabı 251, 34
- 88) Yumuk Z, Çalışkan Ş, Gündeş S, Willke A. (2005) Antinükleer Antikorların (ANA) Araştırılması ve Saptanmasında Kullanılan Teknikler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 35, 40-44

89) Fairweather D, Rose NR. (2004) Women and Autoimmune Disease. *Emerging Infectious Disease* 10, 2005-2011

90) Aziz KA, Faizal AA. (2004) The role of the clinical immunology laboratory in the diagnosis and monitoring of connective tissue diseases. *Saudi Med J* 25 (12),1796-1807

91) Damoiseaux JGMC, Cohen Tervaert JW. (2006) From ANA to ENA: How to proceed?. *Autoimmunity Reviews* 5, 10-17

