



İZMİR KÂTİP ÇELEBİ
ÜNİVERSİTESİ

T.C.

SAĞLIK BAKANLIĞI

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

**ANTİSENTROMER ANTİKOR POZİTİF HASTALARDA
OTOİMMUN HEPATİT MARKERLARININ İMMUNOBLOT
TEST YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Celal BUĞDACI

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Aslı Gamze ŞENER

İZMİR - 2015

T.C
SAĞLIK BAKANLIĞI
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

ANTİSENTROMER ANTİKOR POZİTİF HASTALARDA
OTOİMMUN HEPATİT MARKERLARININ İMMUNOBLOT
TEST YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Celal BUĞDACI

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Aslı Gamze ŞENER

İZMİR – 2015

ÖNSÖZ

Çalışmanın her aşamasındaki eşsiz katkıları ve tüm eğitimim boyunca esirgemediği rehberliğinden dolayı tez danışmanım Doç. Dr. Aslı Gamze ŞENER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime katkıda bulunan İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Eğitim sorumlusu Prof. Dr. Selçuk KAYA ve hocalarım. Tez çalışmam sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Emine Figen TARHAN'a teşekkürlerimi ve saygılarımı arz ederim. Bütün eğitim hayatım boyunca beni her koşulda destekleyen sevdiklerime, sevgili annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Celal BUĞDACI, Ekim 2015

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Otoimmunitte ve Otoimmun Hastalıklar	2
2.1.1 İmmun sistem ve Otoimmunitteye Genel Bakış	2
2.1.2 Otoimmun Hastalıklarda İmmunopatolojik Mekanizmalar	4
2.1.3 Otoimmun Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler	5
2.2 Otoantikorlar	7
2.2.1 Antinükleer Antikorlar	8
2.2.2 Antinükleer Antikor Tipleri	9
2.2.3 Antinükleer Antikorların Laboratuvar Tanı Yöntemleri	15
2.2.4 ANA İFA Testinde Hücre Çekirdeğinde Gözlenen Boyanma Şekilleri	20
2.3 Otoimmun hepatit.....	42
2.3.1 Tip 1 Otoimmun Hepatit.....	43
2.3.2 Tip 2 Otoimmun Hepatit.....	44
2.3.3 Tip 3 Otoimmun Hepatit.....	44
2.3.4 Primer Bilier Siroz	45
2.3.5 Primer Sklerozan Kolonjit	46
2.3.6 Örtüşen Sendromlar	46
2.3.7 Kriptojenik Hepatit	47
2.3.8 Otoimmun Hepatitte Otoantikorlar	47

3. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1 İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR	55
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
ÖZET.....	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACA	: Anti-sentromer Antikorları
AMA-M2	: anti mitokondrial antikor
ANA	: Anti Nükleer Antikor
Anti LC1	: anti liver cytosolic antijen
Anti LKM1	: anti liver kidney mikrozomal antijen
Anti LP	: anti liver pancreas antijen
Anti SLA	: anti soluble liver antijen
Anti-ssDNA	: Anti-single strandedDNA
Anti-dsDNA	: Anti-double-strandedDNA
Anti-Sm	: Anti-Smith
APC	: Antigen Presenting Cell (Antijen Sunucu Hücre)
AS	: Ankilozan Spondilit
BDH	: Bağ dokusu hastalığı
BEH	: Bilier epitel hücresi
CENP	: Centromer Protein (Sentromer Protein)
EBV	: Epstein Barr Virus
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCTD	: Formimmo nottransferaz siklodeaminaz
G	: Gap (Boşluk)
HEp-2	: Human Epithelial Cell Line 2000
HLA	: Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
IB	: İmmunoblot
IFA	: İmmun floresans antikor
Ig	: İmmunglobulin
IIF	: İndirekt İmmün Floresan
kDa	: kiloDalton
LE	: Lupus Eritematozus
M	: Mitoz
MCTD	: Mix Connective Tissue Disease

MHC	: Major Histocompatibility Complex (Büyük Doku Uygunluk Kompleksi)
OİH	: Otoimmün hepatit
OİKH	: Otoimmün karaciğer hastalıkları
ÖS	: Örtüşen sendromlar
PBS	: Primer bilier siroz
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDC	: Prüvat dehidrogenaz kompleks
PSK	: Primer sklerozan kolanjit
RA	: Romatoid Artrit
RF	: Romatoid Faktör
RIA	: Radioimmünassay
RNP	: Ribonucleic Particle
S	: Sentez
Scl-70	: Topoizomeraz I
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
SS	: Sistemik Skleroz
Th	: helper T cell (Yardımcı T Hücresi)
Ts	: supresör T cell
UDKA	: Urso deoksikolik asit
ÜK	: Ülseratif kolit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	İnterfaz esnasında hücre	21
Şekil 2.2.	Hücre devri	22
Şekil 2.3.	Nüklear membran yapısı	22
Şekil 2.4.	ANA subtipleri	23
Şekil 2.5.	Homojenus boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	24
Şekil 2.6.	İndirekt İmmün Floresan Test: Crithidia luciliae	25
Şekil 2.7.	Nüklear mebran sırayla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	26
Şekil 2.8.	Nüklear dot boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	26
Şekil 2.9.	Few nüklear dot boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	27
Şekil 2.10.	Sentromer proteinlerinin yerleşimi	28
Şekil 2.11.	Sentromer boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	28
Şekil 2.12.	Sc1-70 boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	29
Şekil 2.13.	Nükleolar homojenus boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	29
Şekil 2.14.	Nükleolar küme boyanmanın Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	30
Şekil 2.15.	RNAP I boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	31
Şekil 2.16.	NOR boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	31
Şekil 2.17.	RNP-Sm boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	32
Şekil 2.18.	SS-A / SS-B boyanmanın Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	33

Şekil 2.19. Ku boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	33
Şekil 2.20. Cyclin I boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	34
Şekil 2.21. Cyclin II boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	35
Şekil 2.22. Jo-1 boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve liver dokularındaki görünümü	35
Şekil 2.23. AMA boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	36
Şekil 2.24. Lizozom boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	37
Şekil 2.25. Golgi boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve liver dokularındaki görünümü	37
Şekil 2.26. Ribozomal P fosfoproteinlerin yerleşimi	38
Şekil 2.27. Ribozomal boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	38
Şekil 2.28. Kromozom boyanmanın Hep-2 dokusundaki görünümü	39
Şekil 2.29. Spindle fibers boyanmanın Hep-2 dokusundaki görünümü	39
Şekil 2.30. Midbody boyanmanın Hep-2 dokusundaki görünümü	40
Şekil 2.31. Sentriol boyanmanın Hep-2 dokusundaki görünümü	40
Şekil 2.32. Vimentin boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	41
Şekil 2.33. Tropomiyosin boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	41
Şekil 2.34. Aktin boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü	42
Şekil 2.34. İmmunoblot Tekniğinde Kullanılan Test Stribi	54
Şekil 2.35. Otomatik İmmunoblot Cihazı	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Otoimmün hastalıkların bulunduğu organa göre sınıflandırılması	4
Tablo 2.2. Otoimmün Hastalıklarda Otoantijen- Otoantikör İlişkisi.....	8
Tablo 2.3. ANA Subtipleri ve Antijenlerle İlişkileri	15
Tablo 2.4. Otoimmün hepatit tip 1, 2, 3 ve özellikleri.....	45
Tablo 2.5. AMA alt tipleri ve buldukları hastalıklara göre sıklıkları	50
Tablo 4.6. Otoantikör Pozitifliğinin Hastalıklara Göre Dağılımı.....	55

1. GİRİŞ

Sistemik otoimmün hastalıklar geniş bir spektrum gösterir ve bu hastalıklarda oluşan otoantikörler tanı amaçlı kullanılır. Toplumda otoimmün hastalıkların % 1-2 oranında olduğu tahmin edilmektedir. Otoimmün hastalıkların hepsinde, hastalığın nedeninden bağımsız olarak saptanabilen otoantikörler bulunur ve bu antikörlerin saptanması, klinik tanıda oldukça önemlidir (1). Klinik uygulamalarda otoantikörler, tanı kriteri olarak kullanılmakta klinik fenotipi belirlemeye ve hastalığın aktivitesini değerlendirmeye yardımcı olmaktadır (2).

Antisentromer antikörler (ACA), CREST sendromu olarak bilinen sınırlı skleroderma için spesifik kabul edilmekle birlikte, diffüz skleroderma, SLE, Romatoid artrit, Raynoud fenomeni gibi hastalıklarda da pozitif saptanabilmektedir. Primer bilier siroz 'da (PBS) % 30'a varan oranda ACA pozitifliği bildirilmektedir. PBS'li hastalarda bu antikörlerin mevcudiyeti, sıklıkla CREST ve varyant sklerodermanın klinik bulgularıyla birlikte. Antisentromer antikörler, IFA ile bakıldığında, karakteristik bir boyanma örneği sergiler (3).

Otoimmün hepatit; hipergamaglobulinemi, transaminaz yüksekliği, antikör varlığı ve histolojik olarak da aktif nekroinflamatuvar süreçle karakterize bir kronik hepatit türüdür (4). Otoimmün hepatit düşünülen hastalarda başlangıçta tarama testi olarak ANA (antinükleer antikör), indirekt immünofloresan yöntemiyle tayin edilir. ANA, hücre nükleusunun fonksiyonel yapısal içeriklerine, nükleer membrana veya DNA'ya karşı gelişmiş bir otoantikördür. Sentromer, ribonükleoproteinler, siklin A ve diğer pek çok antijene karşı reaktif olduğu saptanmıştır (5).

Bu çalışmada; çalışmaya dahil ettiğimiz antisentromer antikör pozitif hasta grubunda, anti-soluble liver antigen \ liver pancreas antigen (anti-SLA\LP), anti-liver cytosolic antigen 1 (anti-LC1), anti-liver kidney microzomal antijen 1 (anti-LKM1) ve antimitokondrial antikör M2 (AMA-M2) sıklığı ve antisentromer antikör pozitifliği ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar

2.1.1 İmmün Sistem ve Otoimmüniteye Genel Bakış

İmmunoloji, immün sistemin ve vücuda yayılan patojenlere verdiği cevapların incelendiği bir daldır. İmmünite, özellikle enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç olarak tanımlanır. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına immün sistem adı verilir. Bu hücrelerin ve moleküllerin enfeksiyona yol açan mikroorganizmalara karşı düzenli olarak verdikleri tepkiye ise immün yanıt denir (6).

İmmün sistemin başlıca görevi organizmanın kendisine yabancı antijenleri tanıma ve onlara karşı immün cevap oluşturmaktır. B ve T tipi lenfositler ile makrofajlar immün cevap oluşumundan ve denetiminden sorumludur (7).

İmmün sistem kendi doku antijenlerine karşı immün cevap vermemektedir. Ancak, bazı patolojik durumlara bağlı olarak hücre reseptörlerinin bozulması ile veya immün cevap ürünlerinden bazılarının değişik aktivite göstermesi ile, organizmada değişen doku antijenlerine karşı immün cevap oluşmaktadır. Canlıların kendi antijenlerine cevap vermemesi olayı esasta şu mekanizmalarla sağlanmaktadır :

1. Klonal delesyon: T hücreleri oluşurken konağın kendi hücrelerine karşı reaksiyon veren T hücrelerinin apoptoz ile yok edilmesi veya reaksiyonsuz hale getirilmesi durumudur. Timustan kaçarak dolaşıma geçen az sayıdaki T lenfositler de yine apoptoz yolu ile elimine edilirler.

2. 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 anerjik fazda kalarak aktive olamamaktadır. Kısacası self reaktif B lenfositleri Ts hücreleri ile dolaylı olarak baskılanmaktadır.

3. Saklı antijenler: İmmün sistemle karşılaşmayan beyin, testis ve göz gibi organlarda bulunan antijenlere karşı da bir immün yanıt gelişmemektedir.

4. 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.

5. Aneji: 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 (8,9).

Genel olarak özetlenirse, immün sistem daha embriyonik dönemdeyken B ve T lenfositler kemik iliğinde yapılır, B lenfositler kemik iliğinde olgunlaşırken T lenfositler gelişimini timusta tamamlar. Bu aşamada self reaktif hücreler, timusta veya kemik iliğinde apoptoz sinyali oluşmasıyla ölüme giderler. Buna Santral (Merkezi) tolerans denir. Kemik iliği ve timusta self antijenlerin tüm yapıları bulunmadığından otoreaktif klonlar santral toleranstan kaçabileceklerdir. Otoreaktif B ve T hücreleri, APC ile karşılaştıklarında yeterince sinyalizasyon oluşmaması; (ortamdaki anti-inflamatuar sitokinler, regülatuar T hücreleri vs.) periferik tolerans olarak adlandırılmaktadır (10).

Bazı patolojik durumlarda santral ve periferik tolerans mekanizmalarındaki (biri veya her ikisi) bozukluğa bağlı, otoreaktif hücreler ortaya çıkarak otoimmunitiyi başlatabilir. Sonuç olarak organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmasına otoimmünite, bu otoimmünizasyona bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklara ise otoimmün hastalıklar (O.İ.H) denir (11).

Otoimmün hastalıkların serolojik belirteci ise hücre içi ve dışı moleküllere karşı mevcut dolaşan otoantikordlardır. Kendi moleküllerine karşı (öz antijenlere) reaksiyon veren antikordlar sağlıklı insanlarda bulunabilir ve bunlar doğal antikordlar veya otoantikordlar olarak adlandırılırlar (12).

Doğal antikordlar büyük bir kısmı değişime uğramamış V(D)J genleriyle kodlanan IgM sınıfında, aralarında belirgin bir bağlantı olmayan antijenleri orta

derece afinite ile bağlayabilen polireaktif özelliktedirler, bunun yanında doğal monoreaktif antikorlar da mevcuttur.

Patojenik otoantikorlar, doğal antikorlardan farklı olarak yüksek affiniteli ve somatik olarak mutasyona uğramış IgG ailesindedir. Mutasyona uğramamış doğal otoantikorları kalıp olarak kullanan patojenik otoantikorlar somatik hipermutasyon ve sınıf değişimi neticesinde oluşabilirler. Patojenik otoantikorların varlığı vücudun kendi özgül antijenlerine karşı toleransın bozulmasının önemli bir göstergesidir (13).

Farelerde çok sayıda proteinin fonksiyon kaybı veya yetersizliğinin apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmalarını olumsuz etkileyerek lupus benzeri hastalıklara yol açtığı gösterilmiştir (14, 15).

Otoimmün hastalıklar hastalığın bulunduğu organa göre başlıca iki sınıfta toplanır (16):

Tablo 2.1. Otoimmün hastalıkların bulunduğu organa göre sınıflandırılması

a. Organa Özgül O.İ.H	b. Organa Özgül Olmayan O.İ.H
Hashimoto tiroititi	Sjörger sendromu
Primer miksedem	Romatoid artrit
Tirotoksikoz	Dermatomiyozit
Pernisiyöz anemi	Skleroderma
Addison hastalığı	Sistemik lupus eritematozus (SLE)
Jüvenil diabet	Reiter sendromu
Good pasture sendromu	Miks bağ dokusu hastalıkları
Otoimmün hemolitik anemi	
Primer bilier siroz	
Aktif kronik hepatit	
Ülseratif kolit	
Myastenia gravis	
Otoimmün trombositopeni.	

2.1.2 Otoimmün Hastalıklarda İmmünopatolojik Mekanizmalar

1. İmmün sistem araçlarıyla doğrudan temas halinde olmayan hücre içi maddeler organizma tarafından “kendisine ait” olarak tanınmamış olabilir. Bunlar

dolaşıma karıştıkları takdirde bir immün cevaba yol açabilirler. Sempatik oftalmide etkili olan bir mekanizmada normal olarak gözün içerisinde bulunan ve dolaşıma karışmayan bir antijenin dolaşıma katılması bağışıklık cevabına neden olmaktadır.

2. Organizmanın “kendisine ait” olarak tanıdığı antijenler; kimyasal, fiziksel veya biyolojik değişikliklere uğrayarak bu özelliklerini kaybedebilirler. Örneğin kontak dermatitinde olduğu gibi bazı kimyasal maddeler, vücut proteinleriyle birleşerek onları immün cevabı meydana getirebilecek hale sokabilmektedir.

3. Yabancı bir antijen, organizmanın “kendine ait” antijenleriyle çapraz-reaksiyon meydana getirerek bir bağışıklık cevabının oluşmasına neden olabilir. Streptokoklardaki M proteiniyle insan kalp kası arasındaki çapraz reaksiyonu buna örnek olarak gösterilebilir.

4. Otoimmünite oluşumunda hücrel immün cevabın önemi de büyüktür. T ve B lenfositler normalde organizmanın kendi doku antijenleri ile uyarılmamaktadır. Bu olay gelişme sürecinde otoantijenlerle temas sonucu anerji (cevapsızlık) oluşmasıyla ve yetişkin dönemde ise otoantijene özgül supresör T hücresi oluşmasıyla açıklanmaktadır. Gelişim sırasında bir mutasyonla supresör T lenfositlerin fonksiyonlarının azalması sonucu, Th lenfositlerin B lenfositleri sürekli aktive etmesi ile otoantikorlar sentezlenmektedir. Lepra, sifiliz, tüberküloz gibi kronik bakteri infeksiyonlarında adjuvant gibi kuvvetli ve devamlı uyarım yapan antijenler, B lenfositleri normal dışı uyararak otoantikorların sentezine neden olmaktadır (7,17)

2.1.3 Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler

a) Genetik faktörler: Otoimmün hastalığa yatkınlığa neden olan en önemli genlerden en önemlileri MHC genleridir. Otoimmünitede genetik etmenlerin rolü ikizlerle yapılan çalışmalarda dikkati çekmiştir. İkizlerden birinde bir otoimmün hastalık geliştiğinde diğesinde de gelişme olasılığı toplumda beklenenden çok daha fazladır. Ayrıca bu olasılık tek yumurta ikizlerinde, çift yumurta ikizlerine göre daha yüksektir.

Birçok otoimmün hastalık belli MHC allelleri ile bağlantılıdır. HLA allelleri ile otoimmün hastalıklar arasındaki ilişki çok eskiden beri bilinmektedir ve bu bilgi T

hücrelerinin de bu hastalıklarda önemli rolü olduğu konusunda birinci derece kanıt olarak algılanmıştır. Çünkü MHC moleküllerinin temel görevi peptit antijenlerini T hücrelerine sunmaktır. Bazı otoimmün hastalıkların sıklığı belirli bir HLA allelini taşıyanlarda taşımayanlara oranla çok daha yüksek olarak gözlenmektedir. Örneğin Romatoid artrit (RA) HLA-DR4 ile, Ankilozan Spondilit (AS) HLA-B27 ile ilişkili bulunurken Addison hastalığı ise HLA-B8 ile ilişkilendirilmektedir (6).

b) Enfeksiyon etmenleri: Enfeksiyonlar özgül lenfositleri aktive edebilir ve otoimmün hastalıkların gelişimine yol açabilirler. Bazı mikroorganizmalar doku antijenlerimize çok benzeyen veya çapraz reaksiyon veren peptidler içerir veya üretirler. Mikroorganizma peptidleriyle özgül antijenlerimiz arasındaki bu çapraz reaksiyon durumu “moleküler benzeşme” olarak adlandırılmaktadır. Enfeksiyonlar ayrıca doku zedelenmesi ve hücre ölümüne yol açarak normalde bağışıklık sistemine gösterilmeyen antijenleri ortama salarak otoimmün reaksiyon geliştirebilir (6).

İnsan virüsleri içinde EBV otoimmün hastalıkların nedeni olarak göze çarpmaktadır. EBV poliklonal B hücresi aktivatör etkisi göstererek özellikle romatoid faktör (RF) gibi otoantikorların sekresyonuna sebebiyet verir. Otoimmüniteden sorumlu tutulan virüsler içerisinde retrovirüsler, sitomegalovirüsler, koksakivirüsler, hepatit virüsleri de sayılabilir (18).

Pediyatrik otoimmün nöropsikiyatrik hastalıklar olarak da tanımlanan PANDAS Streptokok enfeksiyonu sonucu gelişen otoimmün bir hastalıktır (19).

c) İmmunolojik etmenler: T hücre toleransı muhakkak ki self yapılara karşı oluşan immün yanıtta önemli role sahiptir. Antijen moleküllerinin yapısında meydana gelen bazı değişiklikler Th hücre toleransını ortadan kaldırmaktadır. Yabancı antijenler de aynı şekilde Th hücre toleransını yanıltabilmektedir.

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 (20).

d) Hormonal etmenler: Bir antijenin kendisine karşı gelişen antikör ile birleşmesini sağlayan, antijene özgüllüğünü veren farklı epitoplara bulunmaktadır. Bu epitoplara karşı da antikör oluşmaktadır ki, bunlara anti idiotip antikörler denir.

Bazı durumlarda bir hormon veya biyolojik mediatöre karşı spesifik idiotip antikörler oluşmakta ve bu antikörlere karşı da anti idiotip antikörler sentezlenmektedir. Bunlar hormon veya mediatöre bağlanan antijene benzerlik gösterdikleri için, antikörlerin antijenle ilişki kurdukları hücre yüzey reseptörlerine bağlanmaktadır. 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 (21, 22).

2.2 Otoantikörler

Organizmanın antijenik özellik gösteren yapılarına karşı gelişen antikörler otoantikörler olarak adlandırılmaktadır. Bunlar hücre yüzeyi, sitoplazmik yapılar veya hücre nükleusuna karşı gelişebilmektedirler. Organizmanın çeşitli komponentleri, yukarıda bahsedilen mekanizmalar sonucunda otoantijen haline alabilir. Otoimmün hastalıkların tanısında spesifik otoantikörler 1954'den beri önemli bir gösterge olarak görülmektedir (21).

Organizmanın değişik 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 (21, 23, 24.).

Romatolojik hastalıkların çoğunda bir veya daha fazla otoantikörlerin oluşması karakteristik bir bulgudur. Bilindiği gibi hücre çekirdeğine karşı oluşan antikörlere antinükleer antikörler (ANA) adı verilir. Romatolojik hastalıklar, organ tutulumu ve

otoantikörlerin tipi açısından bir çok değişiklik gösterir. Örneğin Sistemik lupus eritematosus (SLE)'da çoklu organ tutulumu yani sistemik bir hastalık tablosu oluşturmaktadır ve çok değişik tipte otoantikörler saptanmaktadır (25).

Son yıllarda, hücre fonksiyonlarında önemli olan bazı hücreyel komponentlere karşı (DNA polimeraz, aminoaçil tRNA sentetaz gibi) otoantikörlerinde ortaya çıktığı ve böylece oluşan immun komplekslerin hücre fonksiyonlarını bozduğu ileri sürülmektedir (26).

Otoantikörler otoimmün hastalıkların tanısının konulması yanında, bu hastalıkların aktivitesinin belirlenmesinde, tedavinin takibinde, tedaviye yanıtın belirlenmesinde ve bazı otoimmün hastalıklarda hastalık alt gruplarının belirlenmesinde de kullanılır (27).

Tablo 2.2. Otoimmün Hastalıklarda Otoantijen- Otoantikör İlişkisi (28)

Hastalık	Otoantijen	Otoantikör
Hashimoto troiditi	Tiroglobulin	Anti tiroglobulin
Kronik aktif hepatit	Düz kas	ASMA
Goodpasture sendromu	Glomeruler bazal membran	Anti GBM
Primer bilier siroz	Mitokondri	AMA
Romatoid artrit	IgG, DNA, kollejen, RANA	RF, ANA
SLE	Nükleoprotein, DNA, RNA	Anti DNA, Anti nRNP/Sm, Anti histon
Sjögren sendromu	Jo, La	Anti SS-A, Anti SS-B

2.2.1 Antinükleer Antikörler (ANA)

Antinükleer antikörler kromatin olarak adlandırılan DNA-histon kompleksine, nükleer veya sitoplazmik ribonükleer proteinlere, nükleolar ve sitoplazmik diğer yapılara karşı oluşan antikörlere verilen isimdir. Bu otoantikörler, otoimmün hastalıkların tanısında oldukça önemli göstergelerdir (29).

1948'de Hargraves tarafından gösterilen ve SLE için özgül olan LE hücre fenomeni, bir IgG antikoru olan LE faktörünün deoksiribonükleoproteine bağlanması sonucunda ortaya çıktığını bulmuş, daha sonra bunu çok sayıda diğerleri izlemiştir. (25).

1960'ların başında, antinükleer faktörlerin, serumun γ globulin fraksiyonuna ait ve antikor yapısında olduğu tesbit edilmiştir. ANA'ların değişik kaynaklardan köken alan çekirdekler ile çapraz reaksiyona girdiği gösterilmiştir. Bu yüzden, ANA'ların doku yada türe spesifik olmadığı düşünülmektedir. Ancak tiroid, lökosit, gastrik mukoza, adrenal korteks ve bazı eritrositlerden izole edilen nükleusların ANA özelliğine sahip olan bazı örnekler ile spesifik reaksiyona girdiğini gösteren çalışmalar vardır (29).

İmmunolojik yapı itibariyle, IgM, IgG, IgA, IgD ve IgE sınıfından ANA'lar belirlenmişse de, anti immunglobulinler kullanılarak yapılan çalışmalarda, ANA tipinin IgG sınıfı antikorlar olduğu kabul edilmektedir.

IgG tipi ANA, IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3 olarak dört alt gruba ayrılmıştır. Ayrıca indirekt immünofluoresans (IIFA) ANA testinde, boyanma özellikleri ile IgG alt grupları arasında ilişki bulunmuştur. Bu ilişki, periferik boyanma özelliğine sahip antikorların primer olarak IgG1 ve IgG3 yapısında, benekli boyanma özelliğine sahip antikorların primer olarak IgG3 yapısında, homojen boyanma özelliğine sahip olanlarınsa primer olarak IgG3 ve daha az olarak da IgG1 yapısında olmaları şeklindedir (30).

2.2.2 Anti Nükleer Antikor Tipleri

ANA'ların sistemik otoimmün hastalıklar grubuna dahil edilen bağ dokusu hastalıklarının (BDH) tanısında, nükleusta farklı yerleşim gösteren birçok antijene karşı gelişen antikorların genel ifadesidir, nükleik asitler, bazik histon proteinleri ve asidik nonhiston proteinlerine karşı gelişen antikorlar olarak 3 ana kategoriye ayrılmıştır (31).

a) Anti-ds DNA ve anti-ssDNA:

DNA yapısındaki pürin ve pirimidin antijenlerine karşı anti-dsDNA, deoksiriboz iskeletindeki komponentlere karşı gelişen antikor anti-ssDNA'dır. 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 olduğu görülmektedir. Anti-dsDNA antikorlarının titresi hastalık şiddetiyle ilişkili olduğundan hastalığın takibinde büyük önem taşımaktadır (26,32).

b) Anti-histon antikorları:

Histonlara karşı oluşan antikorlar ilk kez, Kunkell ve arkadaşları tarafından SLE'li hastalarda kompleman birleşmesi testi ile tanımlanmıştır (29)

Histonlar; desoksiribonükleoprotein oluşumu için DNA ile kompleks yapan küçük, temel, nükleer proteinlerdir. Memelilerde H1,H2A,H2B,H3,H4 olmak üzere 5 histon subfraksiyonu vardır. Bunlardan yalnız birine veya birkaçına karşı antikor oluşabilmektedir. Bu antikorlar en sık SLE'de, ilaca bağlı lupus ve RA'de görülmekle birlikte, miks konnektif doku hastalığında (MCTD) ve sistemik skleroz (SS) hastalıklarında da rapor edilmişlerdir (25,33).

c) Anti-Sm ve anti-RNP:

Sm antijeni ilk kez, Tan ve Kunkell tarafından Smith adlı hastanın serumunda tanımlandığı için bu ad verilmiştir (34).

Sm ve RNP antijenleri immunolojik olarak birbirine çok yakın olup, küçük nükleer RNA (snRNA) kompleksleridir. Ayrıca U1-U6 RNA komplekslerini içerdikleri için U-RNA olarak da bilinirler (U nükleer olduğunu ifade etmektedir). Son yıllarda SnRNP'lerin, prekürsör mRNA'ların kesilmesi sırasında rol oynadığı gösterilmiştir. Anti-Sm ve anti-RNP antikorları bu kesilme olayını inhibe etmekte ve fonksiyonel mRNA oluşumunu engellemektedir (24).

d) SS-A (Ro) ve SS-B (La) Antikorları:

Ro antijeni olarak 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 primer bilier siroz (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 (24,25,26).

e) Anti Scl-70 antikorları:

Scl-70, antijeni temel kromozomal nonhiston proteini olup 70 kDa ağırlığındadır. Bu antijenin DNA topoizomeras I enziminin parçalanma ürünlerinden biri olduğu ve anti-Scl 70 antikorlarının ise, supersarmal DNA'nın bu enzim tarafından gerçekleştirilen açılma olayını inhibe etmek suretiyle etki gösterdiği ortaya konulmuştur (24)

Anti-Scl 70 antikorları; sistemik sklerozlu hastalarda yüzde 20-28, bu hastalığın diffüz formunda ise yüzde 33 oranında saptanmaktadır (25).

f) Antisentromer antikorlu:

Antisentromer antikorlar (ACA) başta sistemik skleroz olmak üzere otoimmün hastalıkların pek çoğunda pozitif olarak saptanan antikorlardır. ACA, metafazdaki kromatine karşı gelişmekte ve sklerodermanın bir varyantı olan % 55 prevalansı olduğu bildirilen CREST sendromlu hastaların serumunda sıklıkla bulunmaktadır. ACA, nadiren primer biliyer siroz, Sjögren sendromu, sistemik lupus eritematosus veya Raynaud fenomeninde de tanımlanmıştır (35,36).

Sentromer proteinleri, hücrenin bölünme aşamasında mitotik spindle aparatı ile etkileşen iç ve dış kinetokor plaklarında yer alır. Antisentromer antikorları genellikle 6 farklı kromozomal proteine karşı oluşur. 17 kDa ağırlığında CENP-A, 80 kDa ağırlığında CENP-B, 140 kDa ağırlığında CENP-C, 50 kDa ağırlığında CENP-D, 312 kDa ağırlığında CENP-E ve 400 kDa ağırlığında CENP-F proteinleri oluşur, bunların arasında CENP-B önemli olan otoantijendir. Bu proteinler HEp2 hücrelerinin substrat olarak kullanıldığı IFA çalışmalarında özel bir boyanma paternine sebep olur. Mitoz aşamasındaki hücrelerde yoğun benekli tarzda boyanma görülürken, interfaz aşamasındaki hücrelerin nükleuslarında 40-60 arasında tek tek ince benek tarzında boyanma görülür (37).

g) Nükleolusa Karşı Antikorlar:

Nükleolus antijenleri ile reaksiyon veren antikorlar ilk olarak Beck tarafından bulunmuştur (29).

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 enzime karşı gelişmektedir ve noktalı nükleolar boyanma göstermektedir. Diğer bir nükleolar antijen olan fibrillarine karşı anti fibrilların antikorlu gelişmektedir. Ve U3-RNP kompleksi ile ilişkili 34 kDa ağırlığında bir nükleolar proteindir. Bu da sistemik skleroz için özgül olup hastaların %8'inde rastlanmaktadır. Bu antikorun varlığı kalp ve akciğer tutulumunu ifade etmekte ve kümeli nükleolar boyanma göstermektedir.

Önceden PM-1 olarak bilinen PM-Scl antijeni, 20-110 kDa arasında değişen ağırlıklarda 11 polipeptitlerden oluşmuştur. Bu antijenin işlevi kesin olarak bilinmemekle birlikte preribozomal bir partikül olduğu düşünülmektedir ve buna karşı gelişen antikörlerin polimiyozit ve sistemik sklerozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu antikörler homojen nükleolar boyanma göstermektedir. Sistemik sklerozla ilişkili NOR-90 adı verilen bir diğer nükleolar antijenin varlığı gösterilmiştir ancak buna karşı gelişen antikörler tamamen açıklanamamıştır (24, 25, 30).

h) Nükleer/Sitoplazmik Antijenlere Karşı Oluşan Antikörler:

Bu grup içinde, Jo-1, PL-7, PL-12, Mi-1, Mi-2 ve Ku antijenleri bulunmaktadır. Özgül aminoasit-tRNA sentetaz molekülleri olan Jo-1, PL-7 ve PL-12, protein sentezinde aminoasitleri aktive ederek kendilerine uygun tRNA'lara bağlanmalarını sağlayan enzimlerdir. Bu antijenlere karşı gelişen antikörler ise özellikle polimiyozit/dermatomiyozit hastalarında %4-30 oranında bulunmaktadır. Anti-Jo ve anti-PL antikörlerinin polimiyozitli hastalarda interstisiyel akciğer hastalığı ve artrit ile ilişkileri olduğu bildirilmektedir. Anti Jo-1 antikörlerini göstermek için yapılan IFA testinde, Jo-1 antijeninin nükleer olduğu ancak hücre sitoplazmasında yer aldığı görülmüştür. Anti-Mi antikörleri ilk kez dermatomiyozitli hastaların % 60'ında kompleman fiksasyon inhibisyon yöntemi ile gösterilmiştir ve 2 tipi mevcuttur. Mi-1 antijeni 150 kd ağırlığında çözümlenür nükleolar nonhiston bazik proteindir ve kompleman fikse etme yeteneği yoktur. Mi-2 antijeni ise, 35 ve 61 kd ağırlığındaki 2 proteinden oluşmaktadır ve kompleman fikse edebilir. Bunlar birbirinden bağımsız olarak ortaya çıkan 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 antikörlerine sistemik skleroz, polimiyozit, ve SLE hastalıklarında sıklıkla karşılaşıldığı bilinmektedir (24,25,38,39,40).

i) PCNA'ya (Siklin = PL-5) Karşı Oluşan Antikorlar:

Sadece proliferen olan hücrelerde ortaya çıkan nükleer antijenlere (PCNA) karşı oluşan antikorlar ise SLE'li hastaların % 2-3'ünde pozitifdir. Bu antijen, 36 kd ağırlığında "siklin" adı verilen bir nükleer proteindir ve DNA polimeraz delta proteinine benzemektedir. Anti-PCNA antikorlarının, DNA replikasyonunda regülatör rolü olan bu antijenin aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (24,25,38).

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

RANA karşı oluşan antikorlar ise sadece Epstein-Barr virüsü ile transforme hücrelerde saptanabilmektedir. Bu antikorlar IgG antikorları olup romatoid faktör ile benzerlikleri yoktur. RA'lı hastaların çoğunda, diğer bağ dokusu hastalığı olan kişilerde ve normal kişilerde ise az sıklıkta bulunabilmektedirler. RA'deki varlıkları, bu hastalıkta EBV'un muhtemel patojenik rolünü desteklemektedir (24,25,32).

k) Anti-Ma Antikorları:

Bir nükleer asidik protein olan Ma antijenine karşı oluşan Anti-Ma antikorları ise, SLE'li hastalarda saptanmaktadır. Anti-Ma antikor varlığı, hastalığın ciddiyetini ifade eder ve böbrek tutulumu, hipertansiyon, nörolojik hastalık, kompleman düzeyinde azalma, hepatosplenomegali ve lenfadenopati ile ilişkilidir. Ma antijeninin, nefrit atağından hemen önce dolaşımda görülmeye başladığı bildirilmektedir (24).

Tablo 2.3. ANA Subtipleri ve Antijenlerle İlişkileri (41)

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 topoizomerez I
Anti sentromer	Kinetokor proteinleri
Anti RNA polimeraz I	RNA polimeraz I
Anti fibrilların	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

2.2.3 Anti Nükleer Antikorların Laboratuvar Tanı Yöntemleri

Bir otoantikoru isterken hangi metodla bakılmasını isteyeceğimizi veya bize gelen bir sonucu yorumlarken testin hangi metodla yapıldığını bilmemiz gerekir. Ancak bu sayede sonuçları doğru bir şekilde yorumlayabiliriz. 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 alt grupları ayırt etmek, uygulanan tedaviye karşı hastadaki tepkiyi değerlendirmek ve tedavi amaçlı kullanılan ilaçların yan etkilerini ortaya koymak amacıyla

kullanılmalıdır. En sık kullanılan yöntemler immünofluoresans antikor testi (IFA) ve ELISA yöntemleridir (27).

Günümüzde otoimmün hastalıkların tanısında kullanılan çok çeşitli teknik ve yöntemler bulunmaktadır (20). Bunlar;

- a) İndirekt immün Floresan Testi (IIFA)
- b) İmmunodifüzyon
- c) Counter immunoelktroforez (CIE)
- d) İmmunoblot (IB)
- e) Radyoimmünopresipitasyon
- f) Radioimmünassay (RIA)
- g) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

a) İndirekt İmmün Floresan Testi

Romatolojik hastalıkların tanısında ANA araştırılması büyük önem taşımaktadır. Günümüzde ANA tespitinde en çok tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan yöntem ve günümüzde kullanımda altın standart olan IFA yöntemidir. İndirekt IFA testi çok duyarlı olup çok sayıda nükleer antijene karşı oluşan antikorları belirleme özelliğine sahiptir. Duyarlılık, uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle avantajlı görülmektedir (42).

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 tekniğinin olumsuz bir yönünü oluşturmaktadır (29).

IFA testinde günümüzde yaygın olarak Hep-2 hücreleri kullanılmaktadır. Bu hücrelerin büyük nükleusları bulunmakta ve hücre siklusu boyunca farklı şekillerde sergilenen antijenlerin belirlenmesine imkan vermektedir. Bu hücreler ösefagus ve

skuamöz hücreli karsinom hücrelerinden elde edilmektedir (29). Hücre çekirdeğinde gözlenen boyama paternlerine diğer konu başlığı altında yer verilecektir (Bkz. Bölüm 2.2.4.)

b) İmmunodifüzyon

Önceki 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 immünodifüzyon yöntemi ile çalışıldığında ANA IFA testi negatif olmasına rağmen SS-A/Ro antijenlerine karşı gelişen antikolar pozitif sonuç vermiştir. Bu sebeple gelişmiş araştırma laboratuvarlarında standard indirek immüno Floresans tekniği ile birlikte immünodifüzyon metodu da kullanılarak ANA bakılması yaygınlaşmıştır (43).

İmmünodifüzyon yönteminde monospesifik bir prototip serum ile timus ve dalak doku ekstrakteleri kullanılmaktadır. DNA gibi büyük moleküllerin agarda difüzyonu zayıf olduğu için bu yöntemle anti DNA tayini zor gerçekleşmektedir (44).

c) Counter İmmunoelektroforez (CIE)

Bu yöntemin agar difüzyona göre daha hassas olduğu bilinmektedir. DNA ve RNA gibi asidik antijenler katodal (-) kuyucuğa, özgül antikolar 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 (41).

d) İmmunoblot

Günümüzde, immunoblot (IB) tekniği antikor spesifitesini tanımlamak için zorunlu bir test haline gelmiştir. Bu test temel olarak, antijen preparasyonları

poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile ayrılmakta ve nitroselüloz membrana elektrotransferi gerçekleşmektedir. Sonraki aşamada dilüe edilmiş hasta serumu ile inkübasyon gerçekleşmekte ve antikor reaktivitesi radyoaktif işaretli veya enzim işaretli ikinci bir reagent 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 reaktifler kolaylıkla birleşebilmektedir (45).

İmmunoblot 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 laboratuarlarda immunoblot tekniğinin yer almasını sağlamıştır. IFA gibi yaygın metodlar ANA belirlenmesinde bazen yeterince duyarlı ve kesin olmamaktadır. İmmunoblot tekniği, otoantikorların moleküler düzeyde spesifitesini belirlemekte bir sonraki adım olarak gösterilmektedir (46).

e) Radyoimmünopresipitasyon:

Bu yöntemde kültüre alınmış hücreler ³⁵S (proteinleri işaretlemek için) veya ³²P (nükleik asitleri işaretlemek için) ile inkübe edilmektedir. Daha sonra sentetik boncuklara bağlanmış hasta antikorları, 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 (23).

f) Radioimmunassay (RIA) :

Bu yöntem özel anti DNA'ları ölçmede kullanılır. Kabaca iki gruba ayrılmaktadır: Solid faz RIA ve Solubl faz RIA. Solid faz RIA tekniğinde antijen katı bir yüzeye kaplanmaktadır. Spesifik antikorlar antijene bağlandıktan sonra, buna bağlanabilecek radyoaktif işaretli insan anti-globulin antikoru ortama eklenmektedir.

Son aşama gama sayıcı ile ortamdaki radyoaktivitenin belirlenmesidir. Hasta serumundaki antikor miktarı ise standart serum kullanılarak belirlenmektedir. Solubl faz RIA tekniğinde ise katı bir yüzey yerine ortam olarak solüsyonlar kullanılmaktadır. Hasta serumundaki dsDNA antikorları ortamdaki işaretli DNA'ya bağlandıktan sonra ortama katılan NH₂SO₄ 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 (22, 44).

g) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA):

RIA'ya oranla daha ucuz, daha güvenlidir ayrıca ELISA yönteminin duyarlılığı daha yüksektir. İkinci antikorun bağlanmasına kadar uygulanan aşamalar solid faz RIA yöntemine benzemektedir. ELISA'da ortama katılan ikinci antikor, radyoaktif bir izotop yerine alkalen 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 (23).

Özellikle ds ve ssDNA'ya karşı olan antikorların tayininde kullanılır. Bunun yanında anti-ekstrakte edilebilen nükleer antijen (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.

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 (44,47).

2.2.4 ANA IIFA Testinde Hücre Çekirdeğinde Gözlenen Boyanma Şekilleri

Hücre içi antijenlere karşı anormal düzeyde otoantikörlerin mevcudiyeti sistemik bağ dokusu hastalıklarının önemli göstergelerindedir. İndirekt immünfloresans testi ANA'ların rutin olarak tayininde ilk olarak tanımlandıkları 1954 yılından beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Testte hayvan (fare, sıçan, maymun gibi) karaciğer, böbrek, mide doku kesitleri substrat olarak kullanılmış olup günümüzde epitelyal kültür hücreleri (insan larenks karsinoma hücreleri, HEp-2 hücreleri, Amerikan doku koleksiyonu CCL-23) daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücreler düz cam yüzeylerde gelişebilir ve fikse edildiklerinde antikörlerin hücrelerin içine girmeleri mümkün olur. Hücre siklusunun değişik aşamalarında eksprese olan antijenlere karşı antikörler doku substratlarında saptanamazken kültür hücrelerinde tespit edilebilirler. HEp-2 hücrelerinin fiksasyon işlemleri bazı antikörlerin saptanmasını güçleştirebilir. SS-A/Ro antijeni asetonla daha iyi fikse edilebilirken, etanol veya metanolla fiksasyonunda SS-A iyi fikse edilemez ve ANA negatif bulunmasına rağmen ELISA veya immünblot yöntemlerinde SS-A pozitif bulunabilir (48).

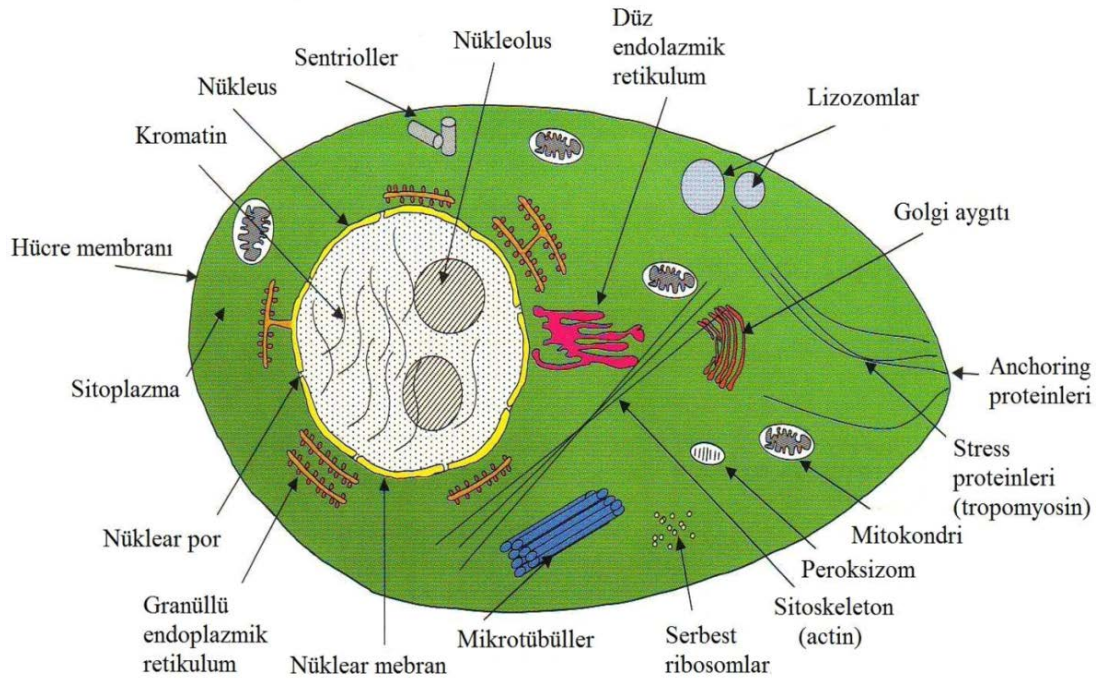
ANA tarama testi ELISA ile de çalışılabilir ancak testte kullanılan antijenlerin farklılıkları, standardizasyonun olmaması, düşük aviditeli antikörler nedeniyle yanlış pozitiflikler testin değerlendirilmesini güçleştirir. ANA, IFA yönteminde nükleus ve stoplazmik otoantikör pozitiflikleri sayısı otuza yakın farklı boyanma modeli gösterirler.

ANA, IIFA testinde laboratuvar test sonuç raporunda, testte kullandığı substrat doku veya hücrelerini, tarama titresini (1/100 veya 1/160), titreyi (ileri dilüsyon çalışmasındaki pozitiflik saptanan en yüksek titre), floresans şiddetini (otoantikör derişimiyle ve titreyle ilişkili olup 1+, 2+, 3+, 4+ olarak verilir), hücrenin nükleus, nükleolus, nükleus membranı, stoplazma, diğer organellerde ve mitotik hücrelerde gözlenen boyanma modeli/modellerini, ilişkili olabilecek otoantikörleri belirtmelidir. ANA pozitifliğinde gözlenen boyanma modeline göre otoantikör ELISA, immunoblot ve benzeri yöntemlerle teyit edilebilir. Otoantikör pozitifliklerinin klinik verilerle birlikte değerlendirilmesi, klinik bulgusu olmayan ancak otoantikör pozitifliği saptanan olguların uzun süreli takibi önerilmektedir (49).

Hep-2 hücre yapısı

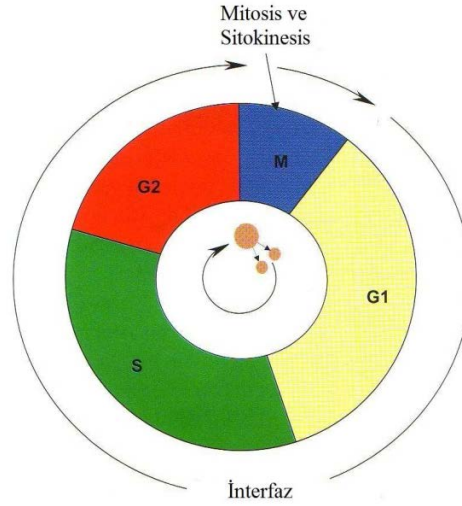
İmmüno Floresan paternler hücre devri ile ilişkili olarak Hep-2 hücrelerinde kendilerine özgü görünürler. Mitoz esnasında sınırlı sayıda boyanma olurken çoğu patern interfaz esnasında görülür.

İnterfaz aşamasında hücre: İnterfaz aşamasında, fibriller örtü formundaki kromatinlerden oluşan kromozomlar nükleoplazma boyunca aşağı yukarı düzgün olarak dağılırlar ve nükleer membran tarafından sınırlanırlar. Nükleoplazmada yalnızca nükleoluslar iyi ayırtedilebilir. Sitoplazmik organeller ve fibröz yapılar bu evrede çok fazla görünürler ve bu yapıların çoğu mitoz esnasında ya değişikliğe uğrar yada kaybolur (50).



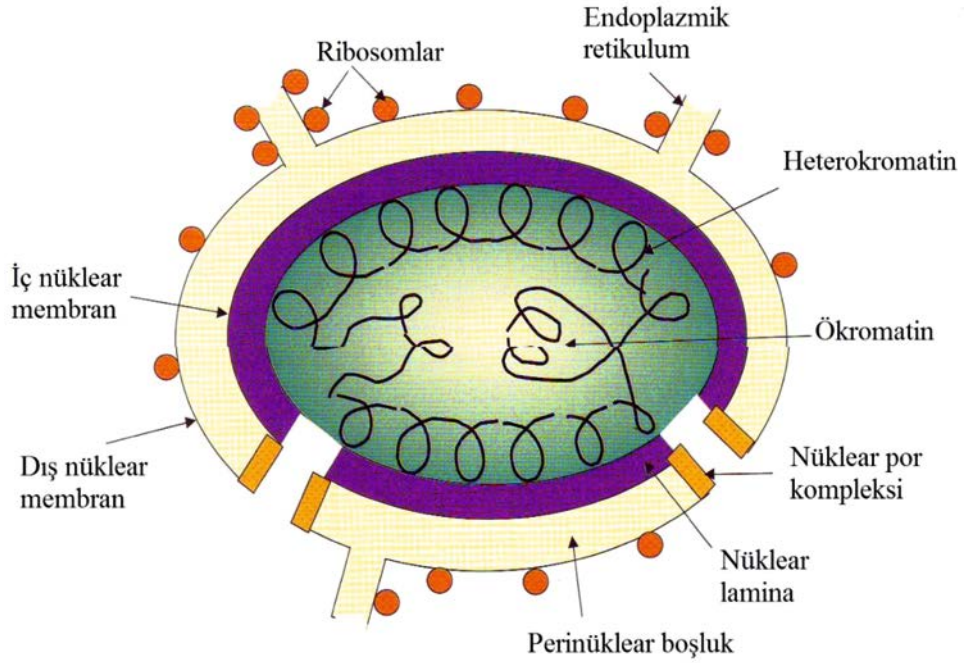
Şekil 2.1. İnterfaz esnasında hücre (50).

İnterfazda ard arda üç period ile tekrar bölünme gerçekleşir. G1, S ve G2 (G: gap=boşluk, S: synthesis=sentez). G1 fazı DNA'nın kopyalanması ve biyosentez için hazırlık aşamasıdır. S fazı DNA'nın kopyalanması ve biyosentezin gerçekleştiği aşamadır. G2 fazı ise DNA sentezinin tamamlandığı fazdır. M (M: mitosis=mitoz) fazında ise her bir hücrede DNA miktarı azalır ve hücrenin ikiye bölünmesi gerçekleşir. Hep-2 hücresinin optimal çoğalma süresi yaklaşık olarak 36 saattir (50).

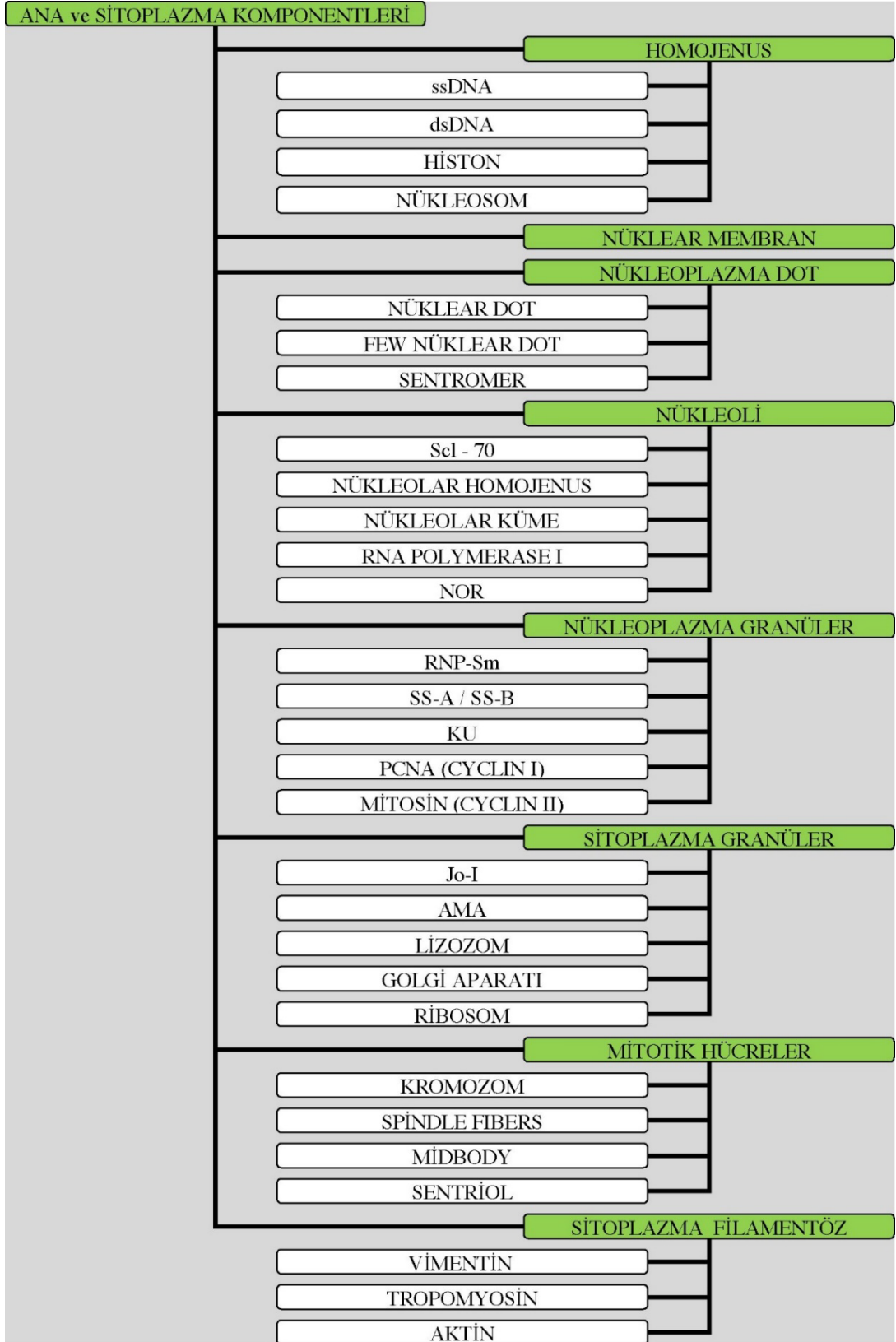


Şekil 2.2. Hücre devri (50).

Nükleer membran: Nükleer membran interfaz esnasında nükleoplazmanın bütünlüğünü korur. Endoplazmik retikulum bu zarfın bir ürünüdür ve sentezi sitoplazmada planlanır. Nükleer membran üç ayrı katmandan meydana gelir. Bunlar nükleer lamina, iç membran ve dış membrandır (50).



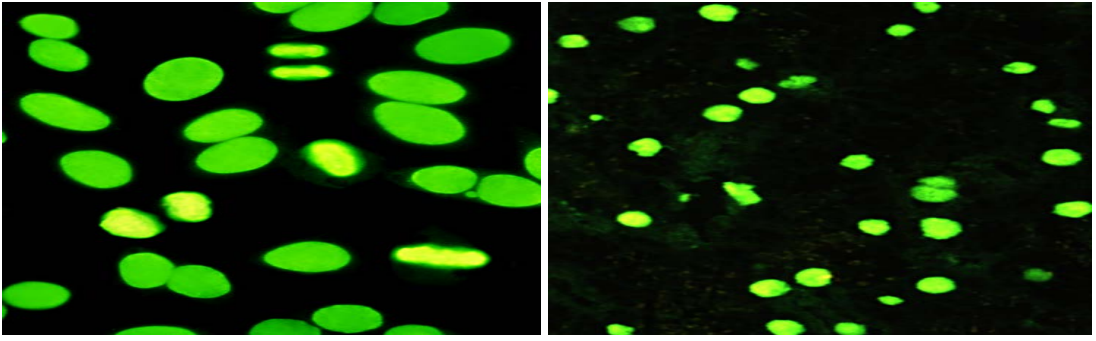
Şekil 2.3. Nükleer membran yapısı (50)



Şekil 2.4. ANA subtipleri (51)

1) Homojen

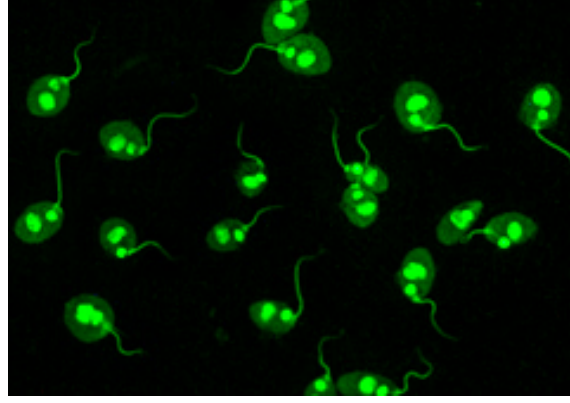
Bu boyanma tipinde antikorlar dsDNA, histonlar (başlıca [H2A-H2B] DNA kompleks), ssDNA ve nükleosomlara karşı oluşur. interfaz aşamasındaki hücrelerin nükleusunun tamamı tek tip floresan boyanır. Hücre sitoplazması negatiftir. Yüksek titreli örnekler, eski preparatlar yada eski reaktifler interfaz aşamasındaki hücrelerin dış kenarlarını daha belirgin boyanmış gösterebilir. SLE, ilaçla indüklenmiş lupus, RA, juvenil kronik artrit ve sistemik sklerozlu hastalarda yaygın olarak görülür (48).



Şekil 2.5. Homojenus boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

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'nda düşük titrelerde bulunmasına rağmen SLE için yüksek bir spesifiteye sahip olduğu görülmektedir. Anti-dsDNA antikorlarının titresi hastalık şiddetiyle ilişkili olarak yükselmekte hastalığın takibinde büyük önem taşımaktadır.

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. IFA testinin aksine bu yöntem anti-dsDNA için %95'in üstünde bir spesifiteye sahiptir ve bu sebeple SLE tanısı için oldukça uygundur.

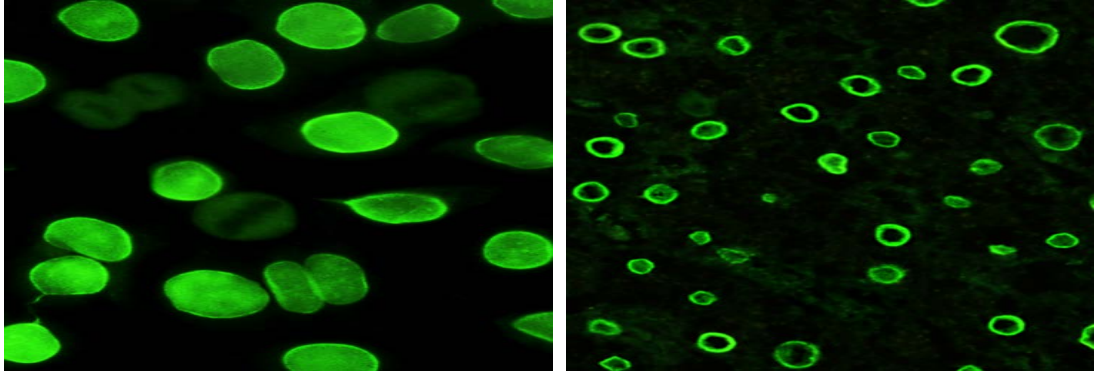


Şekil 2.6. İndirekt İmmün Floresan Test: *Crithidia luciliae* (51)

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 (20).

2) Nükleer membran

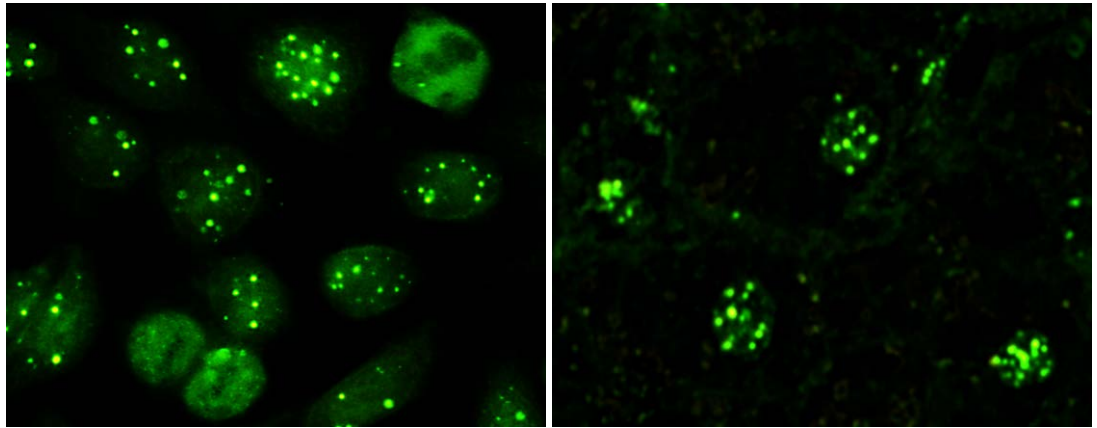
Bu tip boyanma lamin A (74 kDa), B1 (68 kDa), B2 (74 kDa) ve C (60 kDa)'yi kapsayan ara filamentlere mensup polipeptitler ile laminlerle birleşik proteinler (LAP 1A ve LAP 2)'e karşı oluşan otoantikorların varlığında görülür. Bu tip boyanma homojen tip boyanmadan karaciğer dokusundaki görüntüsüyle kolay bir şekilde ayırt edilebilir. Nükleus içerisindeki homojen boyanma, nükleer membrandaki ince çizgi şeklindeki boyanmaya göre daha az yoğunudur. Bölünen hücrelerin kromatini negatiftir. Bu tip boyanmadaki güçlü nükleer boyanma diğer antijenlere karşı oluşabilecek boyanmaları maskeleyebilir. Genellikle kronik hepatit, vaskülitler, SLE ve trombositopeni gibi miks tip kronik otoimmün hastalıklarda tespit edilir (50).



Şekil 2.7. Nükleer mebran sırayla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

3) Nükleer dot

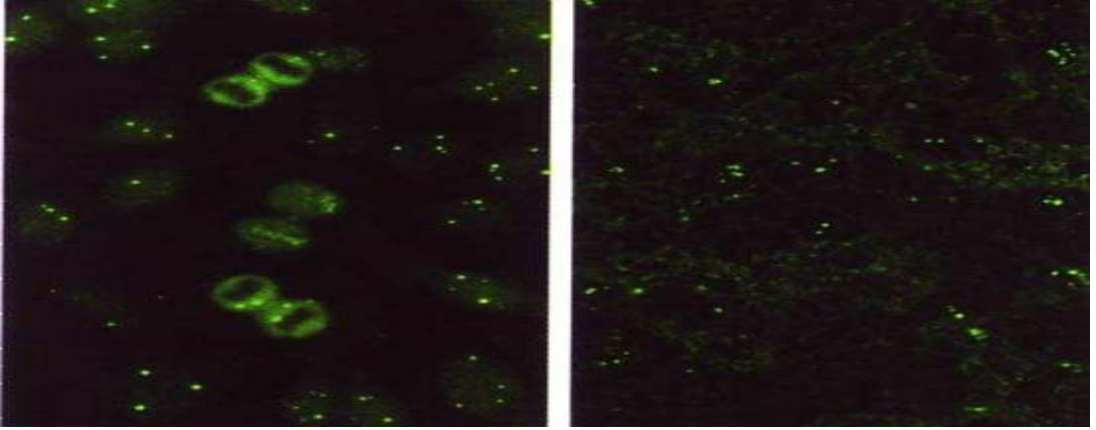
Her hücrede yaklaşık olarak 10 adet nokta şeklinde boyanırlar. Nükleoplazma boyunca yayılan bu nükleer dotlar değişik boyutlardadır ancak nükleoluslardan ayırılırlar. Mitoz esnasında hücrenin çevresinde boyanırlar ve metafaz esnasında kromatin negatifdir. Bu tip boyanmaya neden olan antikorlar Sp-100 proteinine, promyelocytic leukemia protein (PML) ve NDP53'e karşı oluşurlar. Ancak bu nükleer domenlerin fonksiyonları çok iyi anlaşılamamıştır. Bu patern primer bilier siroz'lu hastaların %30'dan fazlasında, sjögren sendromlu hastalarda, SLE ve diğer kronik inflamatuvar bağ dokusu hastalıklarında belirlenebilir (50).



Şekil 2.8. Nükleer dot boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

4) Nüklear az nokta (Few nuclear dot) :

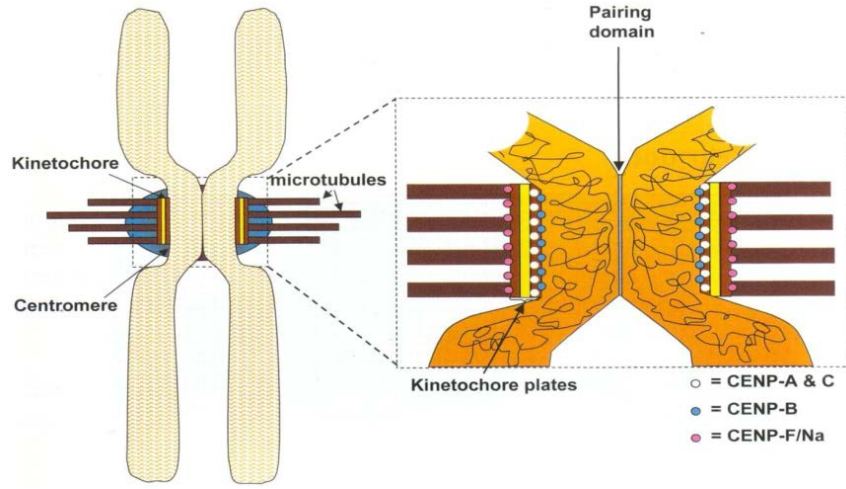
Bir ile altı arasında (ortalama iki) belirgin noktanın interfazdaki hücrelerin sıklıkla nükleolusuna yakın bölgesinde boyanma göstermesiyle karakterizedir. Bölünen hücre kromatini genellikle boyanmaz. Oluşan antikor p80-coilin olarak bilinen 80 kDa'luk bir protein olup, Cajal cisimciği (Coiled body) olarak da bilinen yapılara karşıdır. Otoimmün ve kronik aktif hepatit gibi viral karaciğer hastalıklarında, PBC ve nadiren de kollajen vasküler hastalıklar ve çeşitli otoimmün hastalıklarda görülür (48).



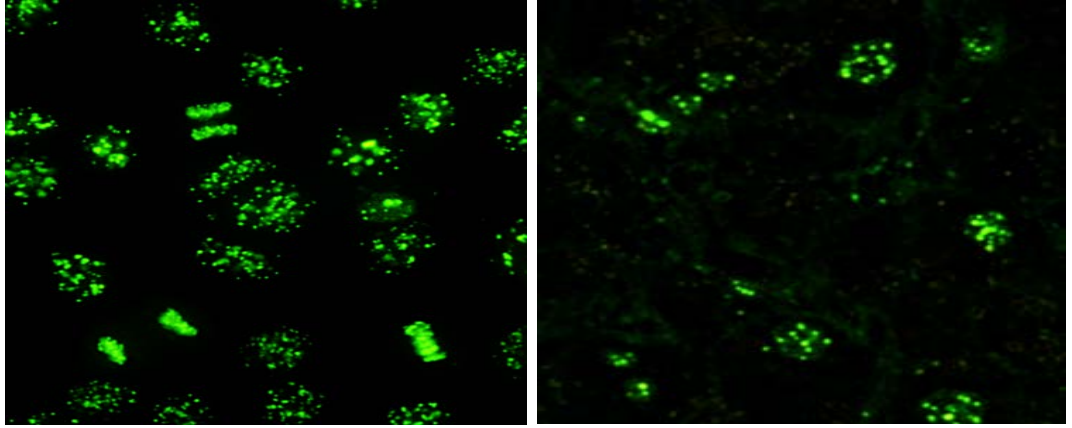
Şekil 2.9. Few nüklear dot boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

5) Sentromer

İnterfazdaki hücrelerin nükleuslarında 40-60 arasında floresan boyalı nokta ile karakterizedir. Mitozdaki hücrelerin kromatini belirgin benekli tarzda boyanmıştır. Anti sentromer antikorlar dört proteine karşı oluşur. En sık CENP-B (80 kDa) ve CENP-A (17 kDa)'a karşı oluşmakla birlikte bazen de CENP-C (140 kDa) ve CENP-D'ye karşı da oluşabilir. Anti CENP-F antikorları bu boyanma tipini göstermezler. Sentromer boyama şekli sınırlı kutenöz sistemik skleroz (CREST sendromu), primer biliyer siroz, Raynoud's fenomeninde saptanabilir (50).



Şekil 2.10. Sentromer proteinlerinin yerleşimi (50).

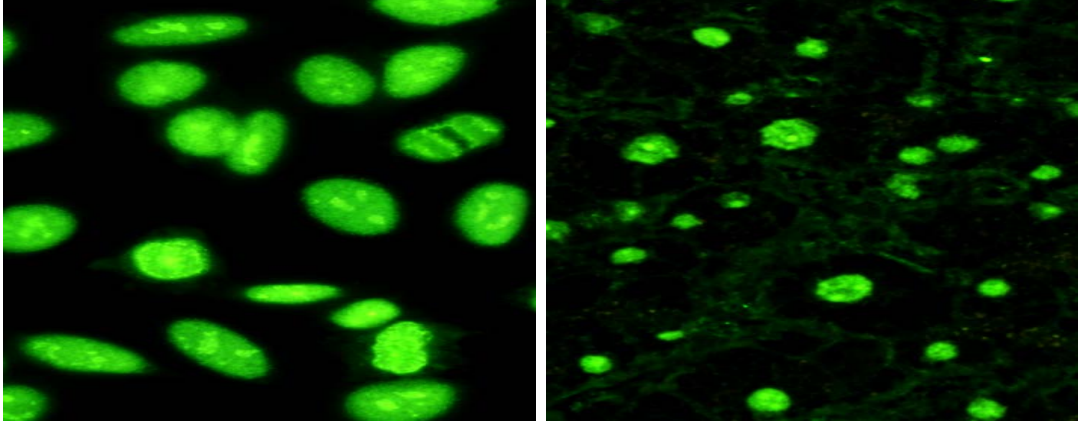


Şekil 2.11. Sentromer boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

6) Scl-70:

Scl-70: Homojen veya ince benekli olarak boyanır. Mitoz esnasında antijenle ilişkili olarak kromatin yoğunlaşır. Farklı antijenik özgüllüğe sahip otoantikörlerin varlığından dolayı nükleoluslar boyanabilir. Bu otoantikörlere sistemik sklerozlu hastalarda sık rastlanır. Scl-70 otoantikörleri Raynaud sendromu ve SLE'li hastalarda da görülebilir (50)

Scl-70 (70 kDa) antijeninin temel kromozomal bir protein olduğu ve DNA topoizomerez enziminin parçalanması ile ortaya çıkan ürünlerden biri olduğu bilinmektedir. Scl-70 antijenine karşı gelişen antikörlerin ise bu enzimin süpersarmal DNA üzerindeki açılma aktivitesini inhibe ettiği ortaya konmuştur (20).

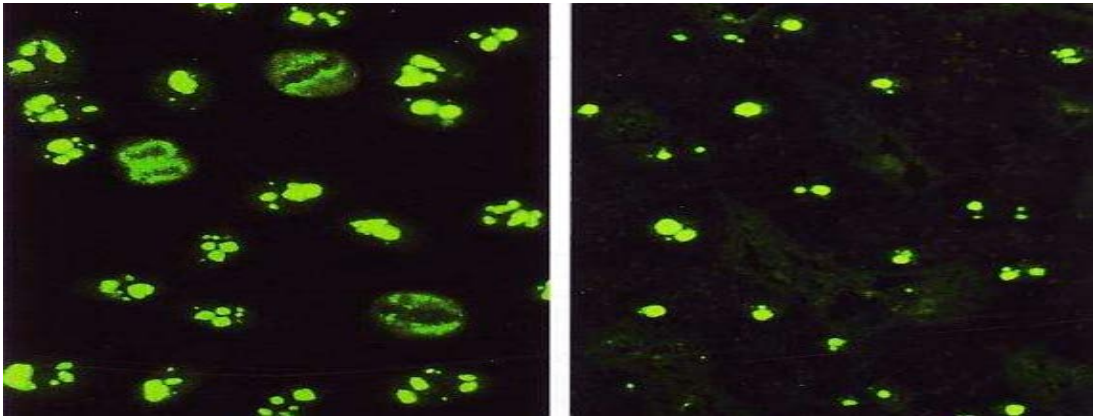


Şekil 2.12. Scl-70 boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

7) Nükleolar homojen

Bu boyanma modelinde mitoz aşamasındaki HEp-2 hücrelerinin nükleuslarında kromatinler boyanmamış, boyanmış veya az sayıda benekli tarzda boyanmış iken nükleoluslar boyanmıştır.

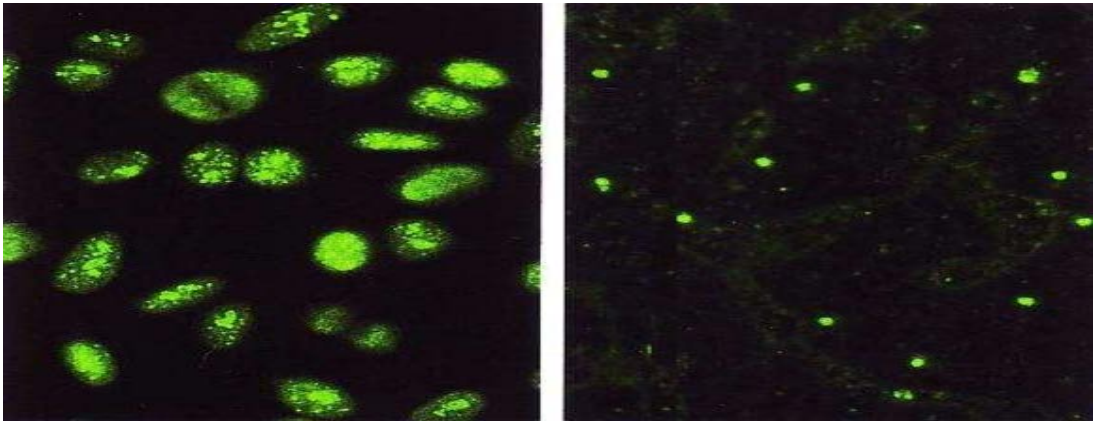
Bu boyanma modelinde nükleolusun homojen, nükleoplazmanın zayıf homojen veya benekli boyandığı durumlarda antikor PM-Scl kompleksine karşı olabilir ve başlıca myozit-skleroderma overlap sendromunda ve daha az sistemik skleroz ve myozitte tesbit edilirler. Bu boyanma şekli anti-Th/To antikorları olarak bilinir ve 40kDa'luk iki küçük ribonükleoproteine karşı oluştuğunda gözlenebilirler. Th/To antikorları sistemik sklerozisde, SLE, polimiyozitis ve romatoid artritte saptanabilir (48,49)



Şekil 2.13. Nükleolar homojenus boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

8) Nükleolar küme (clumpy)

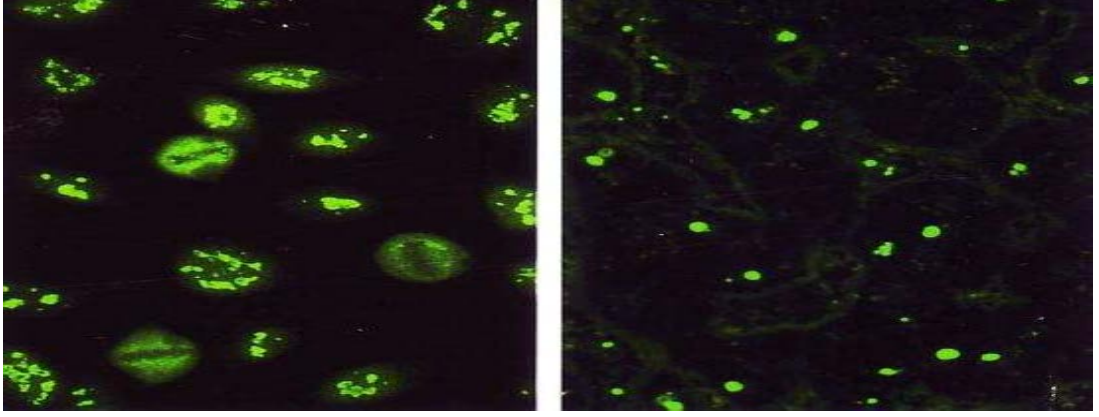
İstirahat halindeki hücrelerin nükleolusunda sıklıkla büyüklüğü ve şekli değişken küme (clumpy) tarzında boyanma, bölünen hücre kromatininde boyanabildiği durumlarda genellikle fibrillarine (U3snoRNP yi de ihtiva eden küçük nükleolar ribonükleoproteinin 34'kDa luk protein alt ünitesi (snoRNP)) karşı antikorların bulunduğunu gösterir ve sistemik skleroz için yüksek spesifiktir (48, 49).



Şekil 2.14. Nükleolar küme boyanmanın Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

9) RNA polimeraz I (RNAP I):

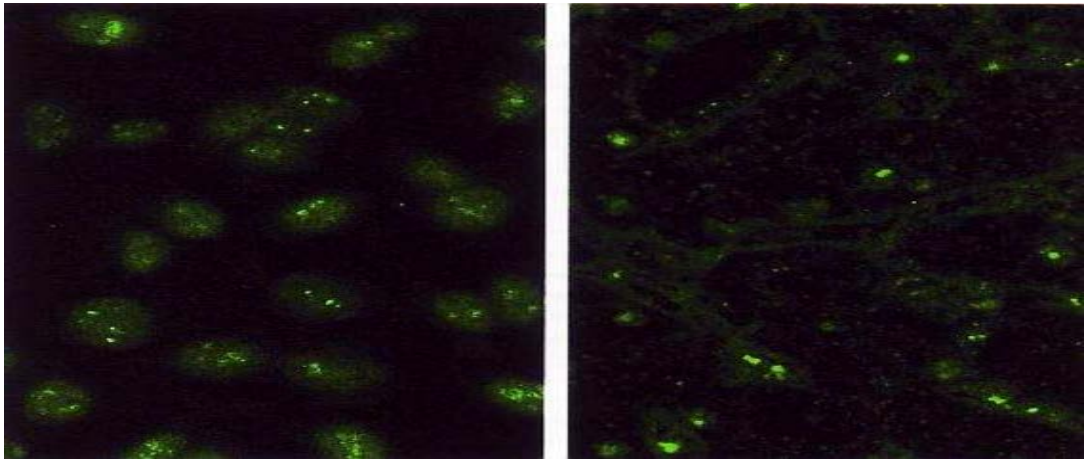
İnterfaz safhasındaki hücrelerin nükleoluları benekli boyanırken nükleoplazma ince benekli tarzda boyanır. Mitoz esnasında kromozom bölgesi koyu iken nükleoli organizasyon bölgesi parlak benekli görülebilir. Sistemik sklerozda yüksek spesifiteye sahiptir (%4-20). Ayrıca SLE, RA ve MCTD'lı hastalarda da RNA polymerase I'e karşı oluşan antikorlara rastlanabilir. Bu antikorlar rRNA'nın öncül moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunda görevli RNA polymerase I enzimine karşı gelişmektedir. Nükleoplazmada RNA polimeraz II (RNAP II) ve RNA polimeraz III (RNAP III)'de bulunur. Otoantikorlar genellikle RNAP I- III, RNAP I- II- III ve sadece RNAP II ile çapraz reaksiyon oluşturabilirler (50).



Şekil 2.15. RNAP I boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51)

10) NOR

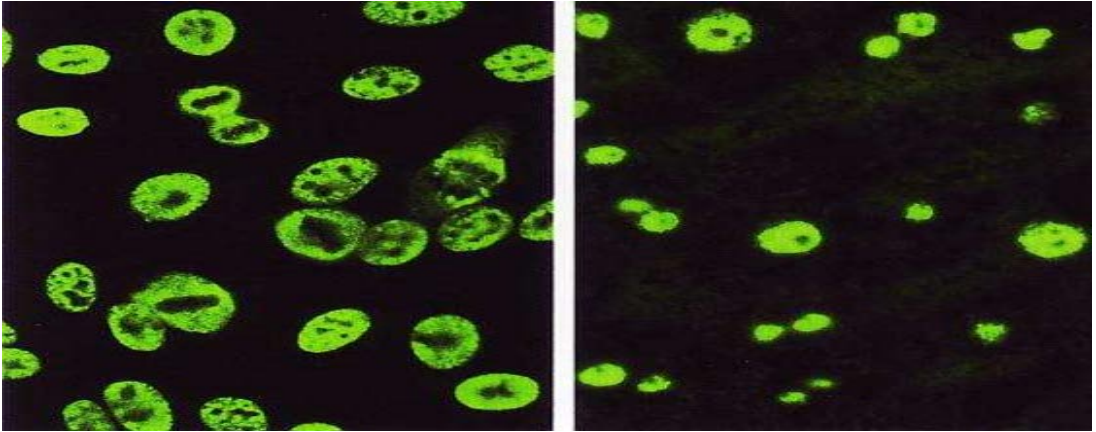
İnterfaz aşamasındaki hücrelerin nükleolusları benekli olarak boyanır. Floresan noktalanmalar bölünen hücrelerin yoğun kromatin bölgelerinde gözlenebilir. Bunlar nükleolar organizasyon bölgesi (NORs) olarak düşünülmektedir. Bu tip boyanma çok nadir olmakla birlikte Raynaud sendromu ve skleroderma hastalarında tespit edilmiştir. Ayrıca kötü huylu hepatoselüler karsinoma, RA ve SLE'li hastalarda da görülebilir. NORs'a karşı oluşan bir çok otoantikor bilinmektedir. Bunlar hUBF/NOR-90, RNAP I ve nükleolar protein ASE-I'dir. hUBF'nin 97 kDa ve 94 kDa ağırlığında iki formu vardır ve bunlar RNAP I'in kopyalanmasında rol oynar (50).



Şekil 2.16. NOR boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

11) RNP-Sm

Tipik kaba benekli olarak boyanırlar. Bu tip boyanma Sm veya U1-sn RNP'ye karşı otoantikor varlığında görülür. Boyanmanın Sm veya U1-snRNP'den hangisine karşı olduğu ayırt edilemez. Sm antijeni Sm-snRNP kompleksindeki en az 8 polipeptidi içerir. Bu kompleksin splising olarak adlandırılan bölgesi olgunlaşmış mRNA'nın üretimine katkıda bulunur. SLE'nin teşhisinde yaklaşık olarak %99 oranında spesifiktir. Asya kıtasında ve siyahi hastalarda daha yüksek sıklıkta görülür. U1-snRNP en çok SLE'li hastalarda olmak üzere nadiren de MCTD, overlap sendromu ve çeşitli romatolojik hastalıklarda da görülebilir. U1-snRNP molekülleri Sm-snRNP kompleksindeki çeşitli polipeptidleri içerir. U1-snRNP mRNA splising'de rol oynar. U1-snRNP antikoru SLE'li hastalarda anti Sm antikoru ile birlikte bulunabilir (50).

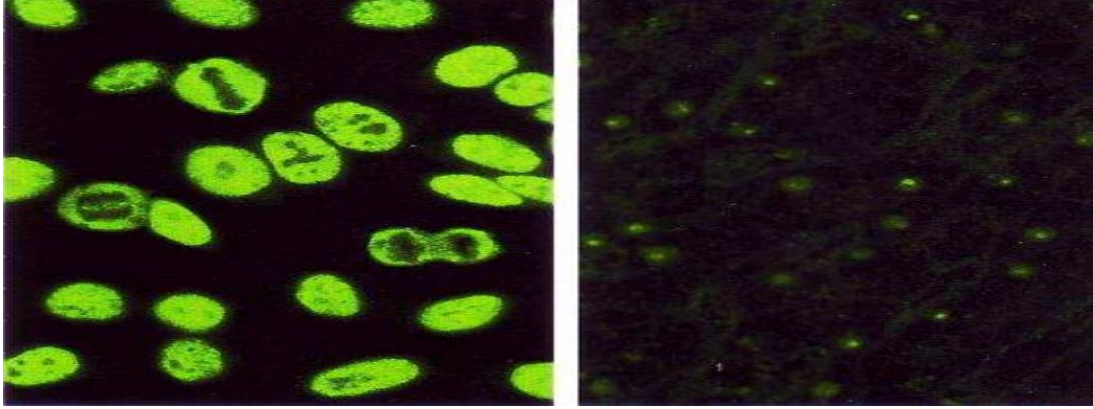


Şekil 2.17. RNP-Sm boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

12) SS-A / SS-B

İnterfaz aşamasındaki hücrelerin nükleusunda ince benekli boyanma görülür. Nükleoluslar genellikle negatiftir ve sitoplazma zayıf boyanabilir. SS-A (Ro) otoantikoru 52 kDa ve 60 kDa'luk iki ribonükleoprotein olarak bilinir. Bu ribonükleoproteinler dört Y-RNAs'dan biriyle ilişkilidir ve fonksiyonu bilinmemektedir. Sjögren sendromlu (SS) hastaların yaklaşık olarak %50-75'inde ve SLE'li hastaların %30-50'sinde görülür. Anti SS-A antikoru polimiyozitis, RA ve sklerodermalı hastalarda da rastlanabilir. SS-B (La) otoantikoru RNAs ile ilişkili

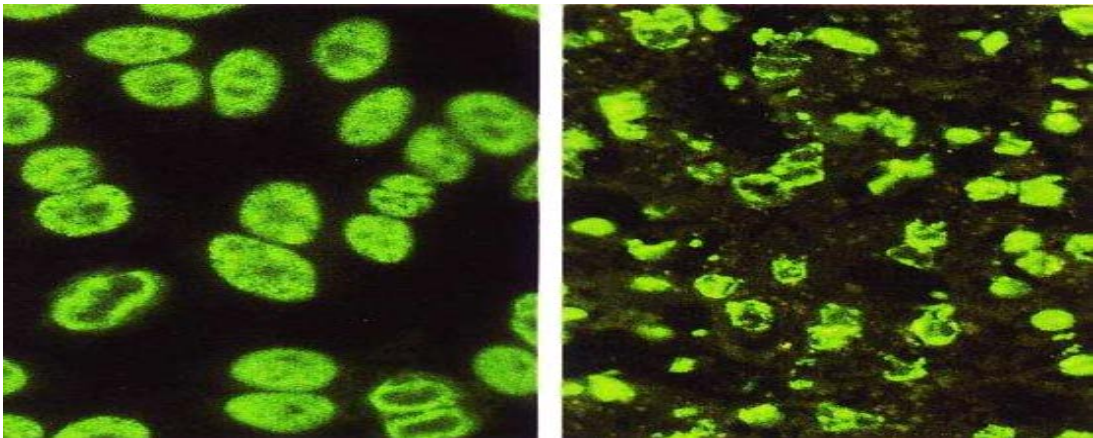
48 kDa'luk bir proteindir. SS-B (La) RNAP III'ün transkripsiyonunun sonlanmasına neden olur. SS'li hastaların % 40-80'ninde ve SLE'li hastaların % 6-21'inde görülür. Maternal SS-B (La) antikorları konjenital kalp bloğu ve neonatal lupus eritematosuz ile ilişkilidir (50).



Şekil 2.18. SS-A / SS-B boyanmanın Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

13) Ku

Anti-Ku antikorları DNA'ya bağlanan p70/p80 nükleer protein çiftine karşı gelişmekte olup yaygın benekli ve nükleolar boyanma göstermektedir. Anti-Ku antikorlarına sistemik skleroz, polimiyozit, ve SLE hastalarında sıklıkla rastlandığı bilinmektedir (20).

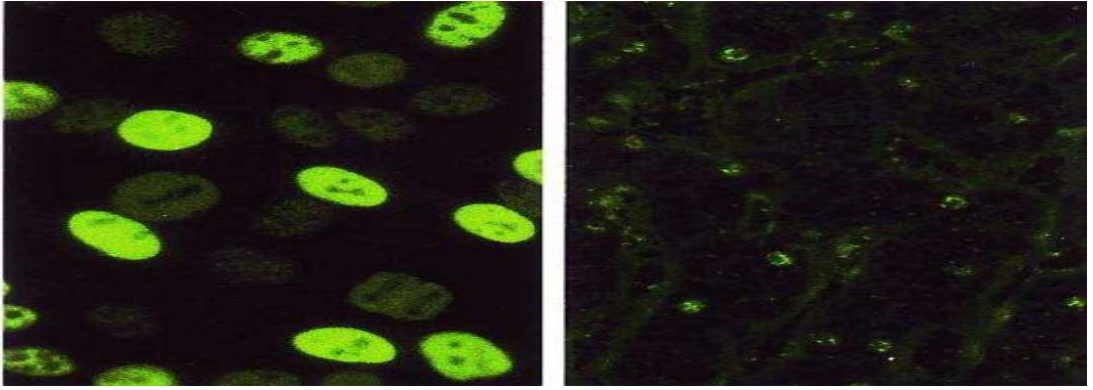


Şekil 2.19. Ku boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (20)

14) PCNA (Siklin I)

İnterfaz aşamasındaki hücrelerin yaklaşık olarak %30-60'ı inceden kaba benekliye değişen şekillerde floresan boyanma gösterir. Değişken boyanmadan dolayı PCNA sentezi varlığı hareketsiz hücrelerde düşüktür ama S fazındaki güçlü boyanma DNA sentezinden hemen önce artar.

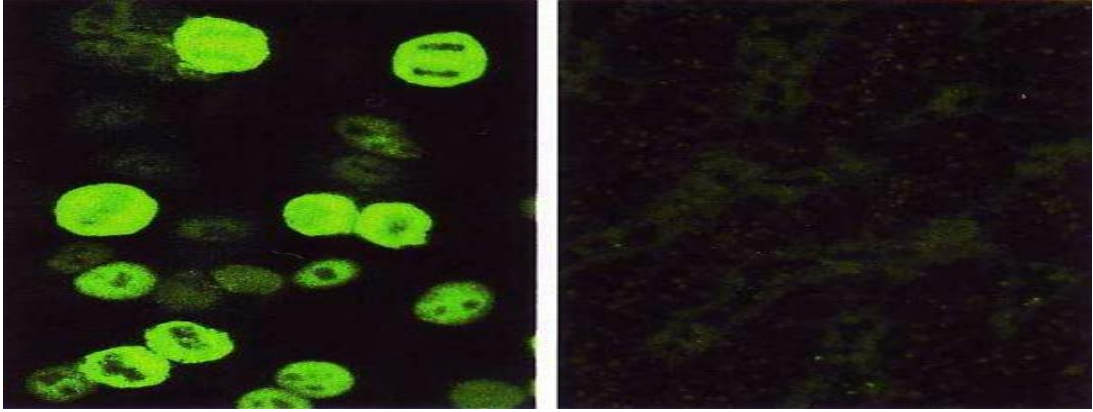
Anti PCNA antikorları SLE'li hastaların %3-6'sında belirlenmiştir. Bu antikorlar kronik hepatit B ve C'li hastalarda da tespit edilebilmiştir. SLE anti PCNA antikorlarının belirlendiği tek otoimmün hastalıktır. Bu antikorlar DNA'nın replikasyonu ve onarımında da görev alan ve siklin olarak da bilinen 36 kDa moleküler ağırlığa sahip DNA polimeraz δ yardımcı proteinine karşıdır (50).



Şekil 2.20. Cyclin I boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

15) Mitozin (Siklin II)

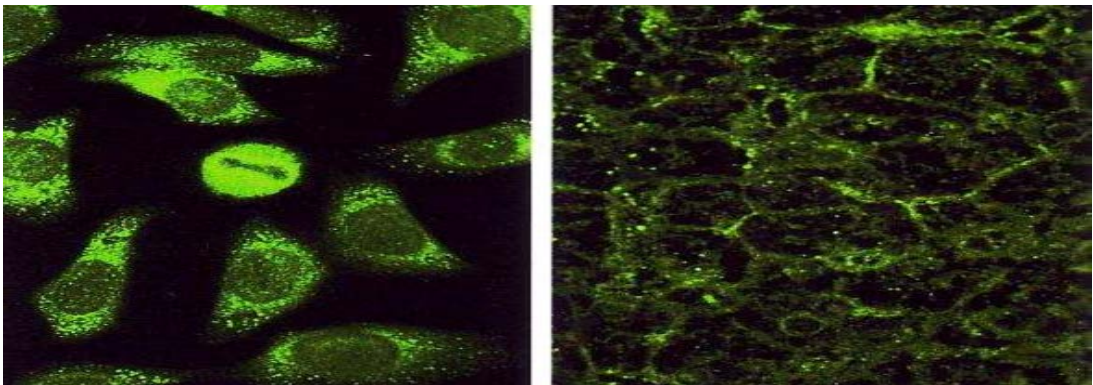
Sentromer F olarak da bilinen bu paternde G2 fazındaki hücrelerin nükleolusları negatif, nükleusları granüler boyanır. Bu antikorlar tümör özellikle de akciğer ve göğüs kanseri ile ilişkilidir. (50).



Şekil 2.21. Cyclin II boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

16) Jo-1

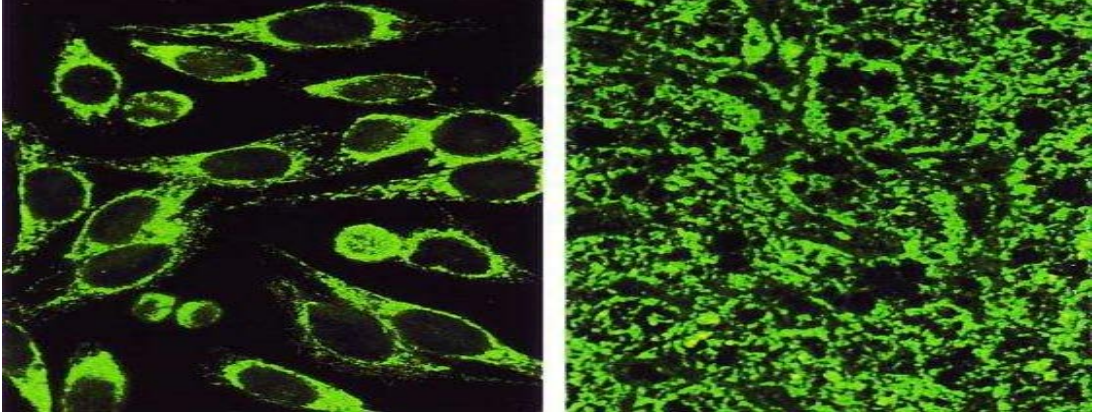
İnce granüller nükleusun çevresinde yoğunlaşmıştır. Genellikle Jo-1 ve diğer bazı anti tRNA sentetazlar sitoplazmanın dış kenarına doğru azalır. Bu tip boyanma lizozomal ve peroksisomal boyanmanın her ikisine de benzemektedir. Bu tip antikor başlıca polimiyozitli hastalarda (yaklaşık olarak %20-40 oranında) görülmesine rağmen overlap sendromlu hastalarda ve dermatomiyozitli hastalarda da görülebilir. Jo-1 antikorları interstisyel akciğer hastalıkları ve artralji ile de ilişkilidir. Jo-1 antikorları 50 kDa ağırlığa sahip histidil tRNA sentetazın reaktif bölgesine karşı yönelirler. Amino-acil-tRNA sentetazı içeren PL 7 (threonil-tRNA synthetases), PL 12 (alanil-tRNA synthetases), EJ (glycyl-tRNA synthetases) ve OJ (isoleucyl-tRNA synthetases) diğer otoantikorlardır (45).



Şekil 2.22. Jo-1 boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve liver dokularındaki görünümü (51).

17) AMA

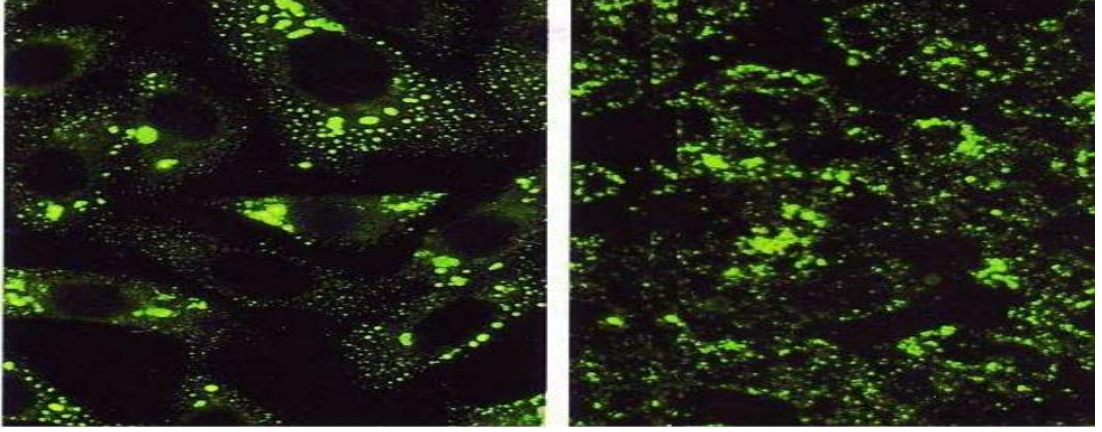
AMA pozitifliğinde sitoplazma boyunca ve nükleusun etrafına kadar uzanan granüler filamentöz boyanma gözlenir. PBC'li hastaların yaklaşık olarak %95'inde (M2 tipi) görülür. Anti mitokondriyal antikolar scleroderma, CREST, SLE ve SS gibi diğer konnektif doku hastalıklarında az sıklıkta görülebilir. Bir çok AMA vardır fakat en sık rastlanılanı AMA-M2'dir. M2, piruvat dehidrogenaz kompleks (PDC)'yi de içeren mitokondriyal iç mebran proteinlerini ihtiva eder. PBC'li hastalarda antikorun ana hedefi PDC-E2 antijenidir (50).



Şekil 2.23. AMA boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

18) Lizozom

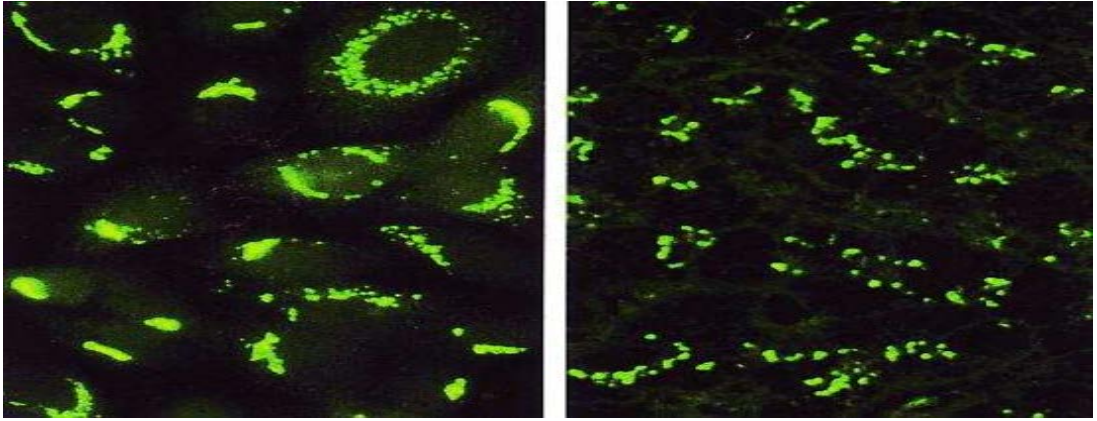
Bu tip boyanmada sitoplazma boyunca dağılmış büyük düzensiz lekeler gözlemlenir. SLE'li hastalarda nadiren görülür ancak klinik önemi bilinmemektedir. Lizozomal antijenler ve lizozomal ilişkili membran proteinlerine (LAMPs) karşı antikor oluştuğu durumlarda gözlenir (50).



Şekil 2.24. Lizozom boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

19) Golgi apparatus

Nükleusa bitişik farklı büyüklüklerde parlak benekli lekelerden ibaret boyanmadır. Bu nadir rastlanan tip SLE, SS ve diğer kronik romatoid hastalıklarda saptanabilir. Golgi antijenleri; golgin-67, golgin-95 (GM 130), golgin-97, golgin-160 (GCP 170), golgin-245 (p230) ve makrogolgin/giantin olarak tanımlanır. Bu yapılar golgi membranının organizasyonunda rol alırlar (50).



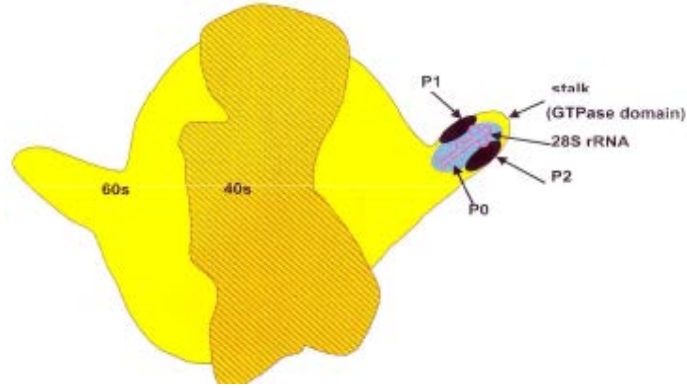
Şekil 2.25. Golgi boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve liver dokularındaki görünümü (51).

20) Ribozom

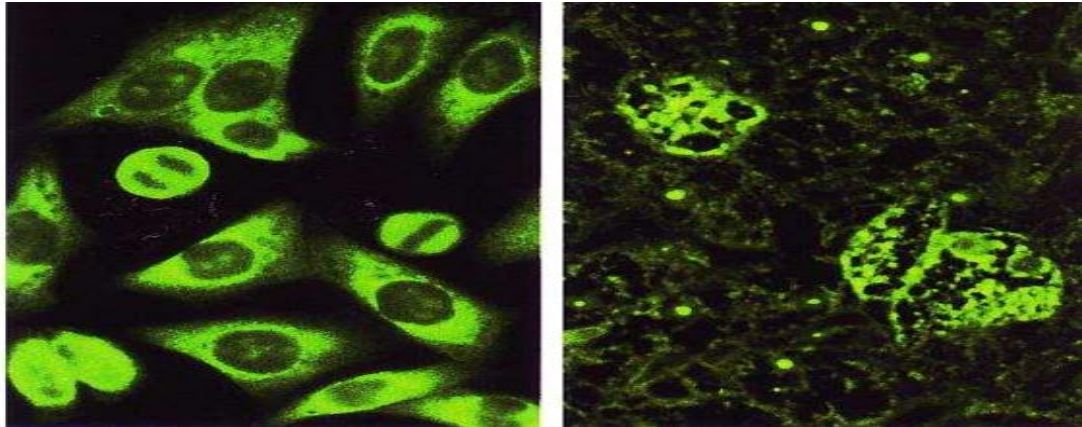
Hücre sitoplazmasında genellikle homojen ince benekli diffüz boyanma ve her zaman görülmemekle birlikte nükleolar boyanma gözlenir. Bazen dsDNA

antikorlarının yokluğunda SLE'li hastalarda (%10-20) rastlanır. Bu antikorların titre değişkenliği nöropsikiyatrik semptomlar ile ilişkilidir.

Bu antikorların ana hedefinde üç ribosomal P fosfoprotein vardır. Bunlar P 0 (38 kDa), P 1 (19 kDa) ve P 2 (17 kDa)'dir. 28s rRNA, S 10, Ja, L 12 ve L5 / 5 S gibi antijenik hedefleri de içerir. Ribosomlar nükleolilerle birleşiktirler ve toplu olarak sitoplazmaya transfer edilirler. Fosfoproteinlerin kesin fonksiyonu bilinmemektedir (50).



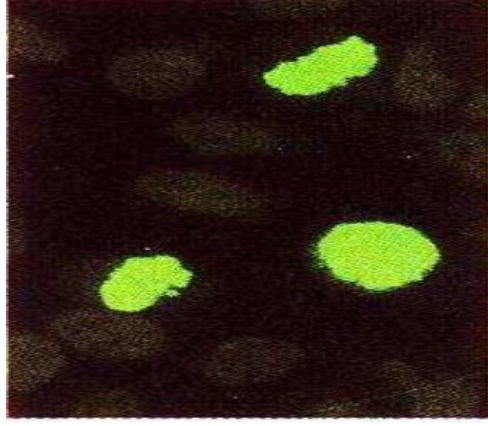
Şekil 2.26. Ribozomal P fosfoproteinlerin yerleşimi (50).



Şekil 2.27. Ribozomal boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

21) Kromozom

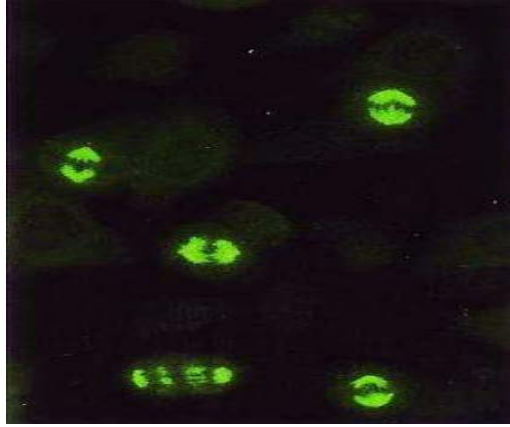
Bazı hücrelerin kromatinleri yoğun bir şekilde floresan boyanır. Nükleoplazma ve sitoplazma negatiftir. Kromozoma karşı oluşan antikorların klinik ilişkisi henüz bilinmemektedir (52).



Şekil 2.28. Kromozom boyanmanın Hep-2 dokusundaki görünümü (51).

22) Spindle fibers

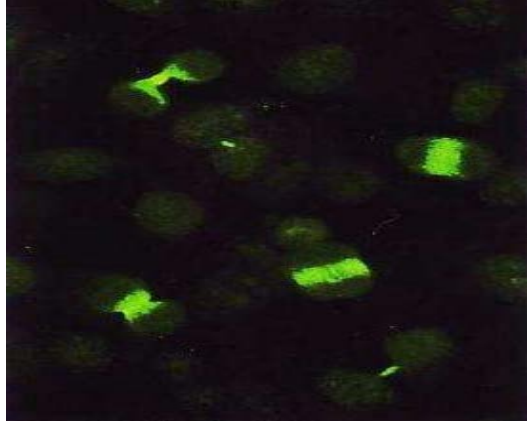
Metafaz ve anafaz esnasında iğ iplikçiklerinin kutuplara doğru yönelerek floresan boyanması ile karakteristiktir. İnterfaz esnasında ince benekli nüklear lekeler görülür. Klinik ilişkisi henüz bilinmemekle beraber SLE, SS, MCTD ve poliartritli hastalarda rastlanmıştır. Hedef antijen 210 kDa ağırlığındaki NuMA-1'e karşıdır (50).



Şekil 2.29. Spindle fibers boyanmanın Hep-2 dokusundaki görünümü (51).

23) Midbody

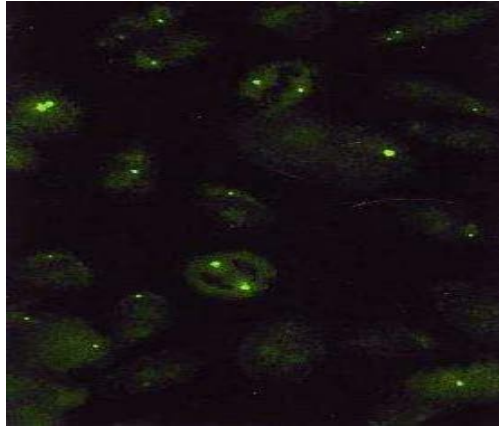
Telofaz ve anafaz esnasında midbody ve ayrılma çizgisi, metafaz esnasında kromatin floresan olarak boyanır. İnterfaz esnasında ise zayıf nüklear boyanma görülür. Raynaud sendromu ve sistemik sklerozlu hastalarda nadiren görülebilir. Karakteristik antijeni yoktur (52).



Şekil 2.30. Midbody boyanmanın Hep-2 dokusundaki görünümü (51).

24) Sentriol

Metafazda mitotik iğ iplikçikleri her bir kutupta noktasal floresan benekler halinde görünür iken bitişik nükleuslu interfaz hücrelerinin sitoplazmasında bir ya da iki noktasal ışık görülür. Bu tip boyanmaya nadir olarak rastlanılır. En çok Raynaud sendrom'lu hastalarda görülür fakat CREST, SS ve skleroderma gibi bir takım otoimmün hastalıkta da görülebilir (50).

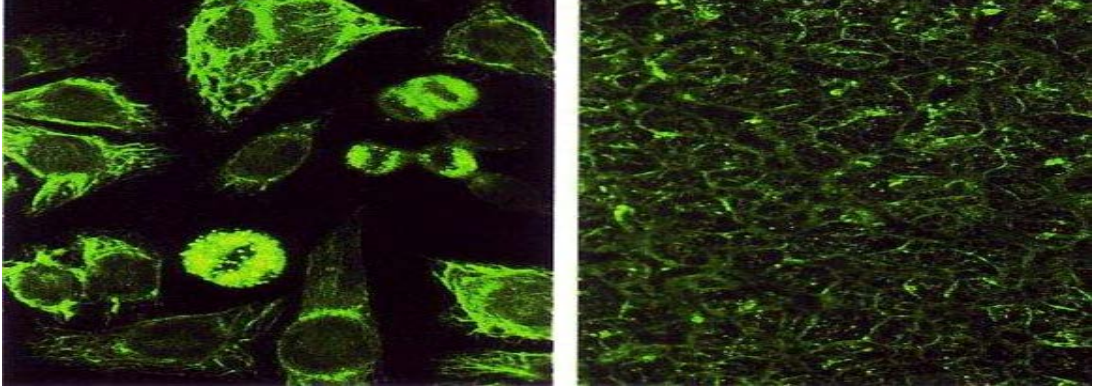


Şekil 2.31. Sentriol boyanmanın Hep-2 dokusundaki görünümü (51).

25) Vimentin

Bu tip boyanmada bol miktarda ince iplikçik sitoplazmanın her tarafında sarmaşık şeklinde bir ışın yayarlar. Anti-vimentin antikorları çeşitli hastalıklarda görülebilir ancak klinik kolerasyonu bilinmemektedir. Kronik romatolojik ve karaciğer

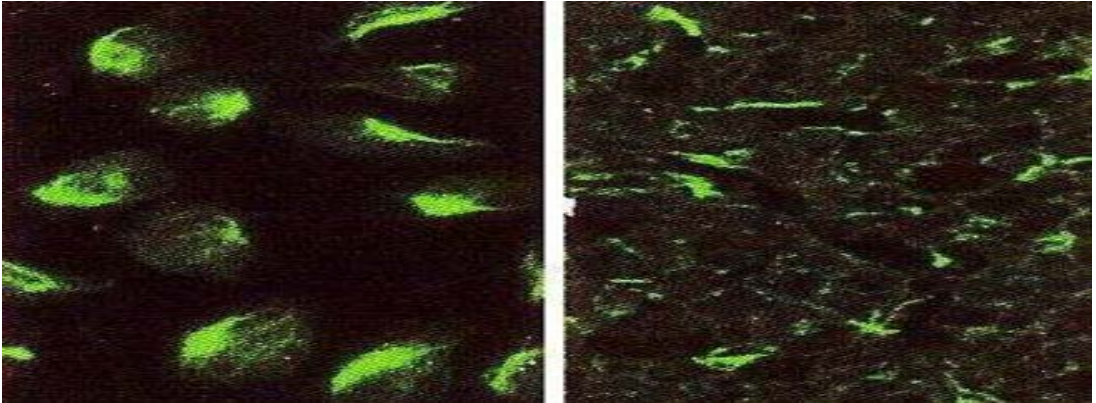
hastalıkları, SLE, Crohn sendromu ve hematolojik hastalıklarda rastlanabilir. Vimentin sitoskeleton tip III ara filamentidir ve gerçek fonksiyonu bilinmemektedir (50).



Şekil 2.32. Vimentin boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

26) Tropomiyosin

Nükleus etrafında düğüm şekli alan fibrillerin floresan renk vermesiyle karakterizedir. Sistemik skleroz, RA, ÜK gibi hastalıklarda yüksek antikor seviyesi görülebilir. Aktin, miyosin, kalponin ve bunların etkileşim içinde olduğu diğer moleküller kas kısalmasının mekanizmasını düzenlerler (50).

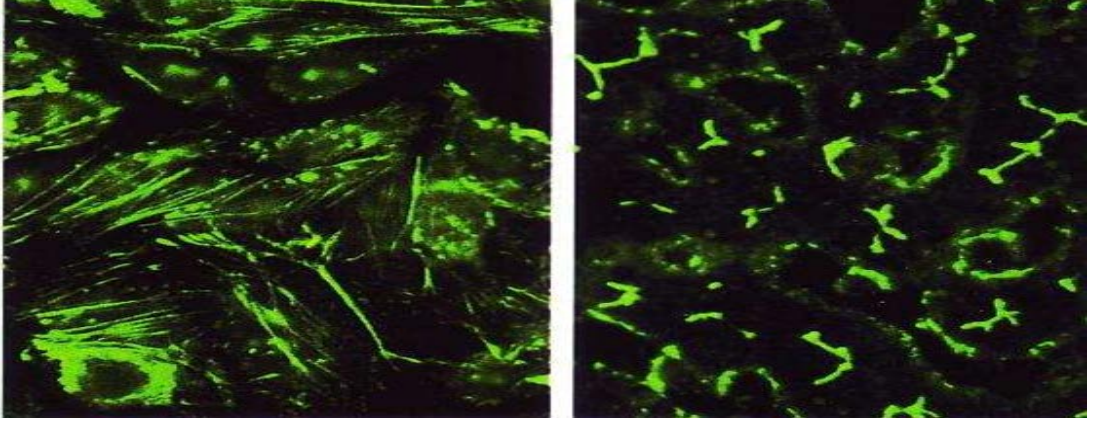


Şekil 2.33. Tropomiyosin boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

27) Aktin

İnce floresan fibriller hücre boyunca dağılmıştır. Bu otoantikorlar kronik aktif hepatitin teşhisinde önemlidir ama PBC ve konnektif doku hastalıklarını da içeren

çeşitli hastalıklarda da görülebilir. Kas kısalması ve intraselüler hareketler gibi hücrel hareketlerde görev alırlar (50).



Şekil 2.34. Aktin boyanmanın sırasıyla Hep-2 ve karaciğer dokularındaki görünümü (51).

2.3 Otoimmün hepatit

OİH, 1950'li yıllarda tanımlanmış bir hastalık olup; aminotransferaz yüksekliği, hipergamaglobunemi, otoantikör varlığı ve karaciğerde histolojik değişikliklerle karakterize bir kronik hepatit nedenidir (53). Başlangıçta sistemik lupus eritematozus'a (SLE) olan benzerliği nedeni ile lupoid hepatit olarak adlandırılmıştır. Ancak ilerleyen süreçte SLE de görülen organ tutulumlarının bu hastalarda görülmemesi üzerine bu terminoloji terk edilmiştir (54).

Tanısında otoantikör pozitifliği, transaminaz artışı, IgG yüksekliği, biyopside interfaz hepatiti varlığı önemlidir. Transaminaz ve IgG yüksekliği ile histolojik bulgular ve siroz varlığı ya da yokluğu arasında bir paralellik yoktur. Ayırıcı tanıda viral hepatiti B ve C, non-alkolik steatohepatit, ilaca bağlı karaciğer hastalığı ve Wilson gibi hepatit yapan diğer hastalıklar önemlidir (55,56).

Otoimmün hepatit ülkemizde kronik karaciğer hastalığının nisbeten seyrek görülen sebeplerinden biridir. Kadınlarda daha sık rastlanan otoimmün hepatitin immüno serolojik göstergelere göre üç tipi olmasına rağmen, vakaların % 85'i tip 1 dir. Otoimmün hepatitlerin % 5-10'unda ise iki otoimmün hastalığın özellikleri aynı vakada toplanmaktadır. Kortikosteroidler monoterapi veya azatioprin ile kombinasyon rejimi halinde kullanılırlar. Remisyon sağlanan vakalarda uzun süreli

sonuçlar çok iyidir, dekompanse karaciğer sirozuna ilerleyenlerde ise tek seçenek karaciğer transplantasyonudur (57).

Otoimmün hepatit otoantikörlerin varlığına göre sınıflandırılır: (57)

a) Klasik otoimmün hepatitler

Tip 1 otoimmün hepatit

Tip 2 otoimmün hepatit

Tip 3 otoimmün hepatit

b) Atipik otoimmün hepatitler

Overlap sendromlar

- Otoimmün hepatit + Primer bilier siroz overlap'i
- Otoimmün hepatit + Primer sklerozan kolanjit overlap'i (Otoimmün sklerozan kolanjit)
- Otoimmün hepatit + Kronik viral hepatit overlap'i

Sıradışı sendromlar

- Otoimmün kolanjit
- Kriptojenik kronik hepatit

2.3.1 Tip 1 Otoimmün Hepatit

OİH lerin %80-85 ini oluşturur. Serumda ANA ve ASMA bulunması ile karakterizedir ve hastaların %70'i kadındır (53). Hastalık her yaşta ortaya çıkabilir ancak sıklıkla 40 yaş öncesinde hastalar tanı alırlar. Ancak tanı gecikmeleri nedeniyle 50-60 yaş civarında tanı alan hasta sayısı hiç de az değildir. Hastaların %40'ında başka bir otoimmün hastalık (otoimmün tiroidit, sinovit, ülseratif kolit gibi) eşlik etmektedir (59).

Tip 1 OİH'in immunosüpresif tedaviye cevabı genellikle iyidir. Üç yıl içinde siroza ilerleme riski %43'tür (60). Tip 1 OİH'li hastalarda HLA A1, HLA B8 ve HLA

DR3/DR4 doku guruplarının bulunma sıklığı fazladır. HLA DR3 pozitif hastalar, HLA DR4 pozitif olanlara göre daha genç (<30 yaş) ve hastalık prognozu daha kötüdür. Bu hastalarda tedaviden sonra nüks ve karaciğer transplantasyon ihtiyacı fazladır (61).

2.3.2 Tip 2 Otoimmün Hepatit

Tip 2 OİH, anti-LKM1 pozitifliği ile birlikte dir. Bu hastalar tip 1 otoimmün hepatitlilere göre daha küçük yaşta dir. Çocukluk çağındaki (2-14 yaş) otoimmün hepatitlerin çoğunluğunu oluştururken, erişkinlerdeki oranı coğrafik farklılıklar göstermek üzere %5-20 civarındadır.

Hastalara diğ er otoimmün hastalıkların eşlik etme ve organ-spesifik otoantikörlerin (paryetal hücre, tiroid ve pankreas adacık hücrelerine yönelik) pozitif bulunma ihtimali (%30-40 civarında) yüksektir. Hipergamaglobulinemi, tip 1 otoimmün hepatite göre daha az belirgindir. IgA seviyeleri de düşük olabilir. İmmunosupresif tedavinin başarısı tip 1'e göre daha düşüktür ve siroza ilerleme riski daha fazladır (3 yıl içinde %82). Dolayısıyla tip 2 otoimmün hepatit, otoimmün hepatitlerin en ciddi formudur (60).

2.3.3 Tip 3 Otoimmün Hepatit

Serumda “soluble liver antigen”e karşı alınan antikör (anti-SLA) bulunması ile karakterizedir. Bu antikörler, direkt olarak, hepatosit sitokeratin 8 ve 18'e karşı olup, otoimmün hepatit için spesifiktirler. Anti-SLA pozitif hastalar, gençtir (ortalama yaş 37) ve ağırlıklı olarak kadındır (% 90). Hastaların % 75'inde diğ er otoantikörlerde birlikte pozitifdir. Örneğin ASMA, AMA (anti-mitokondrial antikör). Tip I otoimmün hepatitli hastaların yaklaşık % 10'nunda da anti-SLA pozitif olabilir (62). Bu grupta karaciğ er/pankreas proteinine karşı geliş en anti-LP (anti-liver/pancreas protein) otoantikör ve anti-LC1 otoantikörleri pozitifliği de saptanır (60).

Tablo 2.4. Otoimmün hepatit tip 1, 2, 3 ve özellikleri (60)

	Tip 1	Tip 2	Tip 3
Prevalans	OH'lerin %80'ini oluşturur.	Daha nadirdir (Avrupa'da OH'lerin %20'sini, USA'da ise %4'ünü oluşturur	%20 oranında görülür
Yaş	Her yaşta görülebilir. 15 yaş civarında (10-20) ve postmenopozal dönemde (45-70) iki pik yapar	2-14 yaşta görülür. Ortalama tanı yaşı 10	20-40 yaş
Cinsiyet	Kadın	Kadın	Kadın
Klinik seyir	Akut başlangıç nadir %25'i tanı sırasında siroz, 3 yıl içinde siroza ilerleme sıklığı %43	Başlangıçta fulminant seyredebilir. Siroza ilerleme riski %82	3 yıl içerisinde siroza ilerleme riski %75
Oto antikor	ANA,ASMA	LKM-1/ LC1	SLA/ LP
Oto antijen	Sentromer, S2K, SSA/RO, histon, ribonükleoprotein,aktin,tubulin, intermediate filament	Sitokrom monooksijenaz P450IID6, sitozolik protein	UGA suppressör tRNA ile ilişkili protein, sitozolik non-sitokeratinler
Genetik eğilim	HLA A1, B8, DR3, DR4	HLA B14, DR3, DR4	Yeterli bilgi yok
Steroide cevap	+++	++	+++

2.3.4 Primer biliyer siroz

Primer biliyer siroz (PBS); etyolojisi bilinmeyen kronik kolestatik bir karaciğer hastalığı olup, orta çaplı intrahepatik safra kanallarının süpüratif olmayan granulomatöz kolanjiti ile seyredir. Çocukluk çağında hiç tanımlanmamış olup hastaların %90'dan fazlasını kadınlar oluşturur. Kullanılan tanı kriterlerine göre prevalansı 1.9 - 40.2/100 000 gibi geniş bir aralıkta değişmektedir (63,64,65) .

Kesin PBS tanısı için karaciğer kolestatik enzimlerinde yükseklik, 1:40'in üzerinde AMA pozitifliği ve tanısal patolojik bulgulardan oluşan triadın bulunması gerekirken muhtemel PBS tanısı ise bu bulgulardan 2'sinin bulunmasıyla konulur (66). Rutin testlerle hastaların %90-95'inde AMA pozitif saptanırken daha duyarlı yöntemlerin kullanılması ile bu oran daha da artmaktadır (63,67). AMA negatif PBS hastalarının klinik seyri ve prognozu AMA pozitif hastalarla aynıdır (64).

AMA pozitifliği saptanan karaciğer enzimleri normal asemptomatik kişilerin karaciğer biyopsileri PBS ile uyumlu olup uzun dönem takiplerinde çoğunluğu semptomatik hale geçmektedir. Bu nedenle AMA pozitifliği saptanan asemptomatik

kişilerin de PBS gibi tedavi edilmeleri önerilmektedir. Nitekim PBS tanısı alanlar içinde asemptomatik kişilerin oranı %60'a yükselmiştir (67).

PBS seyrini yavaşlatan ve belki durduran tek ajan urso deoksikolik asittir (UDKA) (64,67). Ancak UDKA, PBS'in erken evrelerinde bilier epitel hücresi'ndeki (BEH) hasarı önleyebilirken oluşmuş olan fibrozisi geri döndürememektedir (68). Bu nedenle PBS düşünülen hastalara UDKA erken dönemde başlanmalıdır. İmmün supresif ilaçların kombinasyonu tedavide etkili değildir. İleri evre PBS hastalarında ise karaciğer transplantasyonunun zamanlaması önemli olup PBS gelişimi %15- 30 gibi yüksek bir orandadır (64,67,69).

2.3.5 Primer Sklerozan Kolanjit

Primer Sklerozan Kolanjit (PSK), her çaptaki intra ve ekstrahepatik safra kanallarını tutabilen kronik kolestatik bir karaciğer hastalığıdır (63,65). pANCA pozitifliği % 85 oranında ise de, diğer OİH'nin aksine otoantikör pozitifliğinin tanısal önemi yoktur. Tanı koydurucu patolojik bulgu olan fibro-obliteratif kolanjit hastaların ancak % 12'sinin karaciğer iğne biyopsilerinde saptanabilir. Klinik, biyokimyasal ve serolojik kriterler tanısal olmadığı için tanı kolanjiyografik bulgulara göre konur. Diğer yandan kolanjiyografi bulguları tipik olan hastalarda sekonder sklerozan kolanjit nedenlerinin olmadığı gösterilmesi gerekmektedir.

PSK'in klinik seyrini değiştirmese de kolestatik enzim yüksekliğini düzelttiği için tedavide ilk seçenek UDKA'dır. İmmüne supresif ajanlarının tedavide yeri yoktur. Palyasyon tedavisi ise safra kanallarında gelişen darlıkların endoskopik tedavisini ve gelişen portal hipertansiyon komplikasyonlarının tedavisini içerir (70).

2.3.6 Örtüşen Sendromlar

Örtüşen sendromlar (ÖS), birden çok otoimmün karaciğer hastalıkları'nın (OİKH) karakteristik bulgularını birlikte bulunduran hastaları sınıflamak üzere geliştirilmiş bir kavramdır. ÖS klinik önemi ve tanımı tam olarak aydınlatılmamıştır ve değişik şekillerde yorumlanabilir:

- Özelliklerini taşıdığı her iki OİKH'ndan farklı bir grup olarak değerlendirilebilir,
- Bir hastada değişik OİKH aynı anda bulunuyor gibi değerlendirilebilir,
- OİKH'nın tanısız bulguları diğer OİKH'nın klinik, serolojik, radyolojik ya da patolojik bulguların içerebileceği dolayısıyla gerçekte ÖS'in olmadığı şeklinde değerlendirilebilir (63).

ÖS tanısı konulan hastaların çoğunun 3. görüşe uyduğu düşünülmektedir. Diğer bir ifadeyle kolestatik ve hepatik tipteki OİKH bir spektrum oluşturmaktadır. ÖS kavramı, OİKH'nın etiolojisinin bilinmemesi ve her bir otoimmün karaciğer hastası için tanı kriterlerinin yetersiz kalmasından kaynaklanmaktadır.

ÖS tanımı net olmayıp iki tipte olabilir:

- Geçiş (crossover): Bir OİKH bulguları daha belirgin iken diğer bir OİKH'nın bazı özelliklerinin de olması.
- Gerçek örtüşme: Bir OİKH ile eş zamanlı ya da seyri sırasında diğer bir OİKH'nın karakteristik özelliklerinin saptanması.

ÖS'in en sık görülme şekli OİH ile PBS ya da PSK'in örtüşmesi olup (sırasıyla %2-8 ve %6-25) PBS ve PSK'in örtüşmesi daha nadirdir (69).

2.3.7 Kriptojenik hepatit

Otoimmün hepatiti düşündürülen bulgulara sahip olmalarına rağmen kriptojenik kronik hepatitli erişkin hastaların %13'ünde karakteristik otoantikörler tespit edilemez. Bu hastaların aile öyküleri ya da özgeçmişlerinde otoimmün hastalıkların bulunması tanı için tek ipucunu oluşturur (69).

2.3.8 Otoimmün Hepatitte Otoantikörler

Otoantikörler direkt olarak endojen antijenlere (otoantijenlere) karşı oluşmuş immünglobulinlerdir. Antikörlerin spesifiklikleri, indüksiyonları, etkileri ve klinik önemleri bakımından oldukça heterojen bir grubunu teşkil eden otoantikörler;

- Proteinlere (hücre içi enzimleri, reseptörler, yapısal proteinler gibi)
- Glikoproteinlere (beta-2 glikoprotein I)
- Nükleik asitlere (DNA, RNA)
- Fosfolipidlere (kardiyolipin)
- Glikosifingolipidlere (gangliosidler) karşı oluşabilirler.

Otoantikolar serum ve diğer vücut sıvılarında (sinoviyal sıvı, serebrospinal sıvı gibi) saptanabilirler. Tanıdığı hedef yapı tipine göre dokulara da bağlanabilirler veya doğal repartuarın bir parçası olarak böyle bir indüksiyon olmadan oluşabilirler. Doğal otoantikolar fizyolojik rolleri (örneğin, enfeksiyonlara karşı savunmanın ilk basamağı, immünregülasyon) değişken olabilirken doğal olmayan otoantikolarların patojenik etkileri (örneğin, reseptörlerin uyarılması veya bloke edilmesi) olabilmektedir (71).

Anti-LKM: İlk olarak karaciğer ve böbrek preparatlarının immünfloresan boyamalarında tespit edilmiş ve farklı özelliklerine göre tiplendirilmiştir.

Anti-LKM1, OİH tip2 için serolojik marker olarak rutinde kullanılmaktadır. Bu otoantikorun hedef molekülü, birçok ilacın ve çevresel kimyasalın metabolize edilmesinde görev alan p450IID6 (CYP2D6) adında 50 kDa molekül ağırlığında bir enzimdir. Anti-LKM2 ve anti-LKM3 immünfloresan boyamada anti-LKM1'e benzer boyanma özellikleri gösterebilirler de, OİH tip2'de çok düşük düzeylerde bulunurlar.

Anti-LKM2, p450 enziminin diğer izotipi olan CYP2D9'u hedef alır ve bazı tienilic asit kaynaklı ilaca bağlı hepatit vakalarında tespit edilmiştir. Bu ilaç son 20 yıldır kullanımda olmadığı için anti-LKM2'nin esasen rutin kullanımda sadece tarihi bir anlamı vardır.

Anti-LKM3, OİH tip2'li hastaların %5-10'unda anti-LKM1 ile veya tek başına bulunabilmektedir. Bu otoantikolar tipik olarak kronik hepatit D'li hastalarda %13 oranında görülmektedirler. Anti-LKM3 ilaç metabolizmalarında görevli UDP glukronil transferaz (UGT1) enzim ailesini hedef alırlar (72,73).

Anti-LC1: İlk kez 1988 yılında OİH'li hastalarda tespit edilmesine rağmen 1999 yılına kadar hedef antijenleri belirlenememiştir. Formimmunotransferaz

siklodeaminaz (FCTD) adında karaciğere spesifik olan bir enzimi hedef alan otoantikordur. İlk başlarda anti-LC1 otoantikoru yalnız anti-LKM1 varlığında OİH hastalarında bulunabildiği düşünülmüş, daha sonraki çalışmalar ışığında anti-LC1 otoantikorlarının diğer otoantikorla birlikte veya onlardan bağımsız olarak tek başlarına da bulunabildiği gösterilmiştir (72).

Anti-SLA/LP: 1980'lerin sonunda farklı çalışma gruplarının yaptıkları araştırmalarda birbirlerinden bağımsız olarak solubl karaciğer antijenine ve karaciğer pankreas antijenine karşı otoantikorlar tanımlanmış ve birbirlerinden farklı otoantikorlar oldukları düşünülmüştür. Daha sonra 2000'li yıllardaki gelişmelerle aynı otoantikorlar oldukları görülmüş ve tek bir isimde anti-SLA/LP otoantikoru olarak isimlendirilmiştir. Bu otoantikoru OİH hastalarında görülme sıklığı %30 olmakla birlikte pozitif prediktif değeri neredeyse %100 olarak bulunmuştur. 1992 yılında anti-SLA/LP otoantikoru hedef antijeninin bir tRNA-protein kompleksi olduğu bulunmuştur. Bu hedef antijen 50 kDa molekül ağırlığında ve selenoprotein biyosentezini düzenleyen intrasitoplazmik moleküldür (UDP-süpresor serine- tRNA protein kompleks) (74).

AMA: İlk kez primer biliyer sirozlu hastaların serumlarında, indirekt immunfloresan tekniğiyle saptanmıştır. Çeşitli submitokondrial fraksiyonların antijen olarak kullanılması ile AMA alt tipleri M1'den M9'a kadar ayrılmıştır. Bu alttiplerin değişik hastalıklarda sıklıkları değişmektedir (Tablo 4).

Bu çalışmada incelenen AMA-M2 alt tipi için pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksinin alt üniteleri olan enzim E2 ve protein X öncelikli hedef antijenlerdir.

ANA ve ASMA, otoimmün hepatitli (OİH) hastaların %50'den fazlasında bulunmaktadır. Anti-SLA/LP, OİH hastalarının %30'unda bulunmakta ve OİH hastalarının %15'inde yalnız bu otoantikor bulunmaktadır. ANA, ASMA ve anti-SLA/LP yalnız ve kombinasyonlar halinde birlikte bulunabilmektedirler. Anti-LKM1, OİH hastalarının %3'ünde ve tipik olarak diğer ANA, ASMA veya anti-SLA/LP otoantikorlarıyla birlikteliği olmadan bulunmaktadır. Ayrıca anti-LKM1 pozitif hastaların %30'unda anti-LC1 otoantikoru bulunabilmektedir (74).

Otoantikörlerin durumu hastalığın tanımlanmasında ve üç alttipin ayırımında yardımcı olur. OİH tip1, ANA ve ASMA varlığıyla, OİH tip2 ise anti-LKM1 ve/veya anti-LC1 varlığıyla, OİH tip3 ise anti-SLA/LP bulunmasıyla tiplendirilir (71,73,74).

Tablo 2.5. AMA alt tipleri ve buldukları hastalıklara göre sıklıkları (74)

Antikorlar	Buldukları Hastalık	Sıklık
AMA-M1	Sfiliz	% 100
	Sistemik Lupus Eritematozuz	% 50
	Sistemik sklerozis, Sjören Sendromu, Romatoid Artrit	% 5-15
AMA-M2	Primer Biliyer Siroz	% 96
	Diğer kronik kc hastalıkları	% 30
	Sistemik sklerozis	% 7-25
AMA-M3	Pseudolupus eritamatozuz	% 100
AMA-M4	Primer biliyer kc sirozu	% 55
AMA-M5	Tanımlanamayan kollajen hastalıkları	Nadir
AMA-M6	İlaç kaynaklı hepatitler	% 100
AMA-M7	Akut miyokardit	% 60
	Kardiyomyopatiler	% 30
AMA-M8	Primer biliyer kc sirozu	% 55
AMA-M9	Primer biliyer kc sirozu	
	M2 negatiflerde	%82
	M2 pozitiflerde	%37-44

Bu çalışmamızda antisentromer antikor pozitif hastalarda otoimmün karaciğer otoantikörleri sıklığı arasındaki ilişki amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji laboratuvarında Ocak 2015- Eylül 2015 tarihleri arasında, antisentromer antikor pozitif olan, etyolojisi bilinmeyen karaciğer enzim yüksekliği bulunan 39 hastanın karaciğer otoantikor sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Çalışmaya alınan hastaların; yaş, cinsiyet, ve otoantikor pozitiflikleri ile ilgili veriler hastanemizin medikal kayıt sisteminden elde edildi.

Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında; antisentromer antikor saptanması için indirekt immünfloresan mikroskopi ve karaciğer otoantikorların saptanmasında ise immunoblotting teknikleri kullanılmaktadır.

IIFA Test Yönteminin Uygulanması ve Prensibi:

IIFA testi invitro bir test tekniği olup, hücre çekirdeğinde ve hücre sitoplazmasında bulunan antijenik yapılara karşı oluşmuş otoantikorları saptama yöntemidir. Yöntemin sonuçları hem kalitatif hemde kantitatif olarak saptanabilmektedir.

Prensip: Serum inkübasyonu sırasında, hasta serumunda var olan antikorlar, slayt üzerindeki doku kesitlerinde veya fikse edilmiş hücrelerde bulunan ilgili antijenlere bağlanırlar. İnkübasyonu takiben gerçekleştirilen yıkama aşamasında bağlanmayan antikorlar ve serum içeriği ortamdaki uzaklaştırılır. Yıkama aşamasını takiben, ikinci kat, fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge antikor olan anti-IgG antikorlarıyla aynı doku alanları inkübe edilir. İlk inkübasyonda test serumundaki antikorlar antijenlere bağlandı ise, bağlanan antikora ikinci kat işaretli antikor da bağlanacaktır. Eğer ilk inkübasyonda hasta serumunda ilgili antikorlar yok ise, konjugat inkübasyonunda herhangi bir bağlanma olmayacaktır. Konjugat inkübasyonunu takiben slaytın yıkama işlemi tekrarlanır ve bağlanmamış fazla IgG konjugat slayt üzerinden uzaklaştırılır. Yıkama aşamasını takiben kit içeriğinde bulunan 'embedding medium'(kapatma medyumu) ile slaytların üzerine lameller kapatılır ve floresan mikroskopta değerlendirme yapılır.

Floresan ANA IIF Testinin Çalışılması:

1. Çalışılacak serum örnekleri ve ANA IIF kit içeriğinde bulunan ve test aşamasında kullanılacak tüm içerik oda sıcaklığına getirilir.
2. Oda sıcaklığına ulaşan serum örnekleri vortekslenerek karıştırılır.
3. Kit içeriğinde bulunan PBS (Fosfat Tuz Tamponu) (pH 7.2), 1L distile su içerisinde dilüe edilir.
4. Elde edilen PBS çözeltisine yine kit içeriğinde bulunan 1 tüp tween 20 solüsyonu eklenir ve homojen dağılabilmesi için karışım kabı yavaşça altüst edilir. Tween 20 deterjan yapısında bir solüsyon olup hızlı çalkalamalarda köpürmeye sebep olduğundan karıştırma işlemi yavaşça yapılır (Hazırlanmış olan PBS-Tween 20 karışımı bu test çalışmasında ve yıkama aşamalarında kullanılacak ortak karışımdır).
5. Hasta listesi önceden hazırlanır ve dilüsyon tüpleri numaralandırılır. Üretici firmanında önerdiği gibi başlangıç dilüsyonu 1:100 dilüsyonları yapıldı. 1:100 dilüsyon oranı elde etmek için 10 µL serum örneği 990 µL PBS-Tween 20 karışımı içeren polistiren tüpe eklendi.
6. Dilüe edilen serum örnekleri tekrar vortekslenir.
7. Dilüe edilen serum örneklerinden alınan 25 µL, inkübasyon tepsisi olarak adlandırılan numaralı hasta alanlarına sırası ile pipetlenir. Hücre ve doku içeren slaytlar bu inkübasyon tepsilerinin üzerine kapatılarak, serum inkübasyonu başlatılır.
8. İnkübasyon oda sıcaklığında, direkt güneş ışığından uzak bir şekilde 30 dakikada tamamlanır.
9. İnkübasyon sonrası slaytlar, PBS-Tween 20 karışımı ile doldurulmuş yıkama küvetlerine konur. Bu küvetlere konmadan önce slaytların üzerinden küçük bir beherle bir miktar PBS-Tween 20 karışımı dökülür ve slaytlar hemen yıkama küvetine konulur. Her bir yıkama küvetine maksimum 5 slayt konarak yıkama yapılır.

10. Yıkama küvetinde 5 dakika tutulan slaytlar, bu süre sonunda yeni bir yıkama küvetine aktarılarak 5 dakika daha yıkanır.

11. Bu aşamada yeni inkübasyon tepsileri hazırlanır. Hasta sayısı kadar alana bu defa kullanıma hazır IgG konjugat (20 mikrolitre) pipetlenir.

12. Slaytların sadece arka yüzeyi silinerek konjugat pipetlenmiş inkübasyon tepsilerinin üzerine kapatılır ve 30 dakika inkübe edilir. İnkübasyon doğrudan güneş ışığı almayan bir ortamda gerçekleştirilir.

13. Konjugat inkübasyonu tamamlandıktan sonra slaytlar, PBS- Tween 20 karışımı ile doldurulmuş yıkama küvetlerine konur. Bu küvetlere konmadan önce slaytların üzerinden küçük bir beherle bir miktar PBS-Tween 20 karışımı dökülür ve slaytlar hemen yıkama küvetine konur. Her bir yıkama küvetine maksimum 5 slayt konarak yıkama yapılır. Yıkama işlemi sürerken, kit içeriğinde bulunan lameller, inkübasyon tepsilerinin altında bulunan köpük alana yerleştirilir ve her bir hasta alanına denk gelecek şekilde, yine kit içeriğinde bulunan kapatma medyumu damlatılır.

14. Yıkama işlemi bittikten sonra slaytların sadece arka yüzeyi silinir ve üzerine lameller kapatılır.

15. Slaytlar, bu şekilde mikroskopik değerlendirmeye hazırlanır.

İmmunoblotting tekniğinde, AMA-M2, LKM-1, LC-1 ve SLA\LP (IgG) antikoları için kullanılan ticari kit 'Liver Profile' olup (EUROLINE, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika DG) uygun antijenlerin emdirildiği test stripleri içermektedir. Hasta serumlarıyla; kullanım talimatında belirlenen prosedüre göre yapılan test sonucunda, serumda aranan antikorun pozitif bulunması durumunda strip üzerinde uygun antijenin olduğu bölümde koyu renkte bir bant oluşarak pozitif sonuç vermektedir.

Bu kitte aranan antikolar için kullanılan antijenler:

1. AMA-M2 için pirüvat dehidrogenaz kompleksi
2. anti LKM-1 için sitokrom p450IID6,
3. anti LC1 için formimmunotransferaz siklodeaminaz,

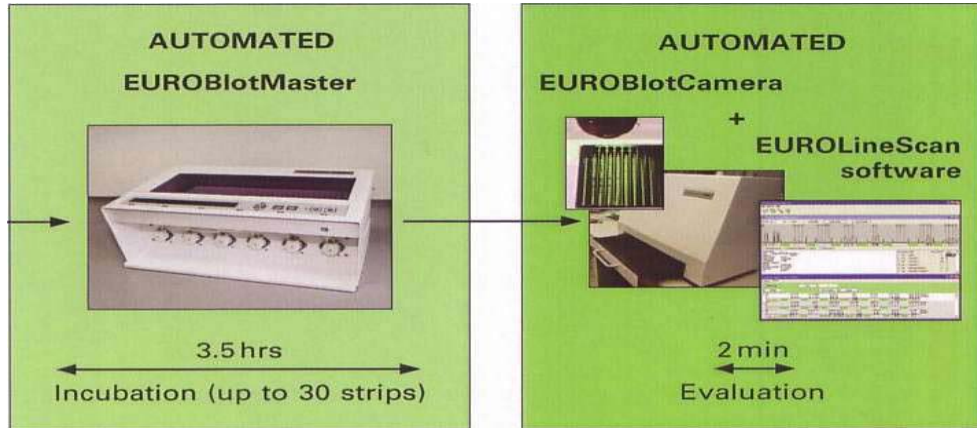
4. anti SLA\LP için solubl liver antigen - liver\pancreas antigen.

Test prosedürüne göre 1\101 oranında seyreltilen hasta serumu; daha önceden üzerine, afinite kromatografisi ile saflaştırılan antijenlerin bantlar şeklinde bağlandıkları test stripleri ile inkübe edilir. Bu ilk inkübasyon aşamasında eğer hasta serumunda aranan antikörler varsa kendilerine uygun antijenlerle, antijen-antikör kompleksleri oluşturacaklardır. Bu ilk aşamadan sonra yıkama işlemleri yapılır ve antijene bağlı olmayan moleküller ortamdaki uzaklaştırılır.

Daha sonra ikinci bir inkübasyon aşaması daha yapılır. Bu ikinci aşamada ortamda bulunan antijen antikör kompleksine bağlanacak enzim işaretli anti-human immunglobulin G'ler ortama eklenir. Daha sonra da anti-human immunglobulin G'lerin işaretlendiği enzim substratının da eklenmesiyle oluşan renk değiştirici reaksiyon sayesinde pozitif sonuçlar bantlardaki renk değişikliğine göre değerlendirilir.



Şekil 2.34. İmmunoblot Tekniğinde Kullanılan Test Stribi



Şekil 2.35. Otomatik İmmunoblot Cihazı

3.1 İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler "SPSS for Windows (versiyon 22.0)" paket programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Hastaların yaş ortalaması 'student t test', otoantikörlerin hastalıklar ile ilişkisi ki-kare istatistiksel yöntemi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

ACA pozitifliği olan toplam 39 hastanın 38'i kadın 1'i erkek idi. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalamaları kadınlarda $56,7 \pm 11,4$ (min:28; max: 80), erkek hastanın yaşı ise 66 idi.

Antisentromer antikor pozitif hastalar içinde sistemik skleroz tanılı hasta sayısı 16 (% 41), sistemik bağ dokusu hastalığı (SBDH) bulunan hasta sayısı 12 (%30,8), CREST tanılı hasta sayısı ise 11 (%28,2) olarak bulundu.

Antisentromer antikoru pozitif olan 39 hastanın 3'ünde (% 7,6) tek başına AMA-M2 pozitifliği görüldü. CREST'li hastalar içinde AMA-M2 otoantikoru pozitif olan 2 (% 18,2) hasta, sistemik bağ dokusu hastalığı olanlarda ise bir hastada da (%8,3) pozitiflik saptandı. AMA-M2 pozitif olan üç hastada kadındı. AMA-M2 pozitifliği ile sistemik bağ dokusu hastalığı ve CREST sendromu arasında anlamlı ilişki yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.6. Otoantikor Pozitifliğinin Hastalıklara Göre Dağılımı

	AMA-M2	LKM1	SLA/LP	LC1
CREST	2	0	0	0
Sitemik skleroz	0	0	0	0
SBDH	1	0	0	0
Toplam	3	0	0	0

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda antisentromer antikor ile otoimmün hepatit otoantikor pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

ACA'nın, sklerodermanın bir varyantı olan, kalsinosis olarak adlandırılan sınırlı deri tutulumu, Raynoud fenomeni, ösefagus dismotilitesi, sklerodaktili, telenjiektazi ile karakterize CREST sendromuna spesifik olduğu bilinmektedir. ACA, metafazdaki kromatine karşı gelişmektedir. IIFA yöntemiyle tespiti yapılan ACA interfazdaki hücrelerin nükleuslarında 40-60 arasında floresan boyalı nokta ile karakterizedir (50,75).

ACA genellikle tip1 otoimmun hepatitli hasta grubunda saptanır ve seropozitif otoimmun hepatitli hastalarda karaciğer hasarının daha hafif olduğu ve daha iyi prognozlu oldukları önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak CREST sendromuyla ilişkili otoimmun hepatitli bir hasta olgusunda hızlı gelişen hepatik yetmezlik de son yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Bu nedenle ACA pozitif hastalarda karaciğer hasarının ciddiyeti ve otoimmun hepatitli hastaların prognozu konusu tartışmalıdır (76,77,78).

Otoimmün hepatit akut veya fulminan gidişli tehlikeli bir tablo ile karşımıza çıkacağı gibi tam tersi asemptomatik de olabilir ve karaciğer fonksiyonu rutin biyokimyasal testlerde tesadüfen fark edilir. Otoimmun hepatit markerlarından anti-SLA/LP, anti-LKM1, anti-LC1 ve AMA-M2 otoantikörleri kabul edilebilir titrelerde pozitif olarak bildirildiğinden bu çalışmada İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji laboratuvarında Ocak 2015- Eylül 2015 tarihleri arasında, antisentromer antikör pozitif olan 38 kadın 1 erkek hastadan oluşan toplam 39 hastada karaciğer otoantikörleri sonuçları retrospektif olarak araştırıldı.

Takada ve ark.'nın (79) yaptığı çalışmada ACA pozitif hastalarda diğer otoantikörlerin durumu değerlendirilmiş ve 68 ACA pozitif hastanın 16'sında (%23,5) AMA-M2 pozitif bulunmuştur.

Zhang ve ark.'nın (80) Çin'de primer bilier siroz ve otoimmun hepatitli hastalarda yaptıkları çalışmada PBS li hastalarda ACA %28 oranında pozitif bulunmuştur. AMA (-) PBS hastalarında ACA %64,3 ile anlamlı derecede AMA (+) PBS hastalarından yüksek bulunmuştur. PBS tanılı hastalarda AMA-M2 antikörünün

duyarlılığının %92 olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışmada OİH'li hastalarda anti-LKM1 (%6,7), anti-LC1 (%2,2) ve anti-SLA/LP (%4,4) prevalansının düşük olduğu görülmüştür. Villalta ve ark.'nın (81) otoimmün karaciğer hastalıklarının tanısında kullanılmak üzere PBS'li hastalarının otoantikör profillerini değerlendirmek için yeni multipleks line blot yöntemi kullanılarak yaptıkları çalışmada, PBS'li 58 hastanın 3'ünde (%5,2) antisentromer antikoru, saptanmış AMA-M2 antikoru ise 45 (%77,6) hastada pozitif bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda 39 ACA pozitif hastanın 3'ünde (%7,6) AMA-M2 pozitif bulunmuş olup diğer otoantikörlerin negatif olduğu görüldü.

Cassani ve ark.'nın (82) yaptığı çalışmada ise farklı etyolojili karaciğer bozukluğu olan 221 hastada ACA pozitifliği, primer bilier sirozlu 83 hastanın 8'inde (%10), kronik aktif hepatit LKM (+) 20 hastanın 1'inde (%5), otoimmün hepatitli 31 hastanın 1'inde (%3), alkolik karaciğer hastalığı olan 43 hastasının 1'inde (%2) pozitif bulunmuş olup, 50 sağlıklı kontrol grubunda ACA negatif bulunmuştur.

Parveen ve ark.'nın (83) PBS tanı 25 hastanın dahil edildiği bir çalışmada, hasta serumlarının % 60 oranında ACA pozitif olduğu belirlenmiştir.

Himoto ve ark.'nın (84,85) yaptığı çalışmada 47 otoimmün hepatitli hastanın 8'inde (%17) antisentromer antikör pozitifliği görülmüştür. Çalışmada ayrıca eş zamanlı otoimmün hastalıklar içinde ACA-OİH birlikteliği %75 diğer OİH 'lerde %36, sjögren sendromunda ACA-OİH birlikteliği %50 diğer OİH 'lerde %15, otoimmün troidit de ACA-OİH birlikteliği %50 diğer OİH 'lerde %10, CREST sendromunda ACA-OİH birlikteliği %38 diğer OİH 'lerde %5 bulunması gibi sonuçlar elde edilmiş ve ACA-OİH birlikteliğinin diğer OİH'lere göre yüksek oranda olduğu belirtilmiştir. Farklı bir hasta grubunda yapılan çalışmada ise kronik hepatit C hastalığı bulunan 754 hastanın 8'inde (%1), PBS'li 57 hastanın 14'ünde (%25), otoimmün hepatitli 38 hastanın 6'sında (%16) ACA açısından pozitiflik bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da antisentromer antikör pozitif hastalar içinde CREST tanı 11 (% 28,2) olup bu hastalardan 2'si AMA- M2 pozitif ve sistemik bağ dokusu hastalığı tanı 12 (% 30,8) olup AMA-M2 pozitifliği olan bir hasta bulunmuştur.

Agmon-Levin ve ark.'nın (86) PBS'li hastaların serum otoantikörlerinin prevalansı ve klinik önemini saptamak için yaptıkları çalışmada, PBS'li 69 hasta ve 297 kontrol grubu içeren çalışmada antisentromer pozitifliği oranının; hasta grubunda %18 kontrol grubunda ise % < 1 az olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda portal hipertansiyonla OİH arasında gösterilen ilişkiyi kendi çalışma grubunda bulamamışlardır. Bizim çalışma grubunda kontrol grubunun olmaması çalışmanın dezavantajı olup ileriki çalışmalarda antisentromer negatif hastalarda otoimmün hepatit sıklığı araştırılabilir.

Bernstein ve ark.'nın (87) primer bilier sirozlu 110 hastada yaptıkları çalışmada antisentromer antikor pozitifliğini 10 (% 9,1) hastada tespit etmişlerdir. Antisentromer antikor pozitifliği olan hastalar skleroderma tanısı almış olanlardı. Bizim çalışmamızda ACA pozitiflik düzeyi en fazla olan hasta grubu sistemik skleroz (%41) olduğundan literatürdeki çalışmayla uyumlu bulunmuştur.

Acay ve ark.'nın (88) kronik viral hepatitlerde otoantikör sıklığının değerlendirilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada 67 kronik hepatit B hastası ,77 kronik hepatit C hastası ve 48 sağlıklı kontrol grubundan oluşan toplam 192 hasta örneğinde antisentromer antikorunun negatif olduğunu görmüşlerdir. Li ve ark.'ları (89) kronik viral hepatit ve otoimmün hepatitli hastalarda ACA pozitiflik durumunu araştırmış bunun sonucunda 36 otoimmün hepatitli hastanın 19'unda (%52,8), 53 primer bilier sirozlu hastanın 7'sinde (%13,2), 37 kronik viral hepatit C'li hastanın 2'sinde (%5,4), 15 kronik hepatit B'li hastanın birinde (%6,7) ACA pozitiflikleri elde edilmiş olup, 90 sağlıklı kontrol grubunda ise hiç ACA pozitifliğine rastlanılmamıştır. Bizim çalışma grubumuzda ise kronik viral hepatitli hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Assassi ve ark.'nın (90) PBS ve skleroderma (PBS-SS) birlikteliğinin olduğu 16 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada hastaların tamamında (%100) ACA pozitifliği görülmüştür. Rigamonti ve ark.'nın (91) yaptıkları çalışmada ise 43 PBS-SS hastasının 30'unda (%70) ACA pozitifliği olduğu görülmüştür.

Nakamura ve ark.'nın (92) yaptığı çalışmada PBS tanılı 276 hastanın 72'sinde (%26,1) ACA pozitifliği görülmüş yine aynı çalışmada otoimmün hepatitli 20 hastanın 5'inde (%25) ACA pozitifliği saptanmıştır. Makinen ve ark.'nın (93)

yaptığı başka bir çalışmada 48 PBS tanılı hastanın 14 'ünde (%29) ACA pozitifliği görülmüş, 30 otoimmün hepatitli hastanın 3'ünde (%10) ACA pozitifliği görülmüştür.

Granito ve ark.'nın (94) yaptıkları çalışmada 105 PBS-CREST tanılı hastanın 7'sinde (%7) ACA pozitifliği görülmüştür. Aynı çalışmada otoimmün hepatitli 110 hastada ACA pozitifliği saptanamamıştır. Shoji ve ark.'larının (95) yaptıkları çalışmada 41 PBS-CREST tanılı hastanın 10'unda (%24) ACA pozitifliği bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sistemik otoimmün hastalıklar önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Otoimmün hastalıklar birçok ortak özellik ve klinik belirtiyeye sahip olmalarına rağmen, klinik seyirlerinde önemli ayrımlar bulunmaktadır. Hücre içi antijenlere karşı üretilmiş olan antinükleer antikorlar gibi çeşitli otoantikorların varlığı otoimmün hastalıkların özelliklerindedir.

Otoimmün hastalıklar bir çok sistemi etkilediğinden bu hastalıkların tanı, tedavi ve takibinde kullanılmak üzere klinik uygulamalarda otoantikorların çalışılması gerektiği hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla önerilmektedir.

Otoimmün hepatitte anti-SLA/LP, anti-LKM1, anti-LC1 ve AMA-M2 otoantikorların önemli olduğu literatürde bildirilmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre bu otoantikorların otoimmün hepatit tanısında destekleyici markerlar olduğu görülmüş ve tanıda otoantikorların birlikte kullanılması gerektiği sonucuna varılmış olup, özgüllüğünün araştırılması için daha geniş çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

ÖZET

Bu çalışmada; çalışmaya dahil ettiğimiz antisentromer antikor pozitif hastalarda, anti-soluble liver antijen \ liver pancreas antijen (anti-SLA\LP), anti-liver cytosolic antijen 1 (anti-LC1), anti-liver kidney mikrozomal antijen 1 (anti-LKM1) ve antimitokondrial antikor M2 (AMA-M2) sıklığı ve bunun antisentromer antikor pozitifliği ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlandı.

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji laboratuvarında Ocak 2015- Eylül 2015 tarihleri arasında, antisentromer antikor pozitif olan, 39 hasta çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan hastaların, antisentromer antikor ve karaciğer otoantikor pozitiflikleri geriye dönük olarak tarandı.

Hastanemiz Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında antisentromer antikor pozitifliği; IIFA yöntemi ile, taradığımız karaciğer otoantikorları ise immunoblotting yöntemi ile çalışıldı. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta grubunda yaptığımız incelemede, 39 hastanın 3'ünde araştırılan otoantikorlardan sadece biri açısından pozitiflik bulundu (%7,6). Pozitif bulunan karaciğer otoantikorlarından hepsinin AMA-M2 otoantikoru olduğu diğerlerinin ise negatif olduğu görüldü. İstatiksel olarak antisentromer antikor ile otoimmün karaciğer otoantikorları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Otoimmün hastalıkların bir çok sistemi etkilediğinden bu hastalıkların tanı, tedavi ve takibinde kullanılmak üzere klinik uygulamalarda otoantikorların çalışılması gerektiği hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla önerilmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre bu otoantikorların otoimmün hastalıkların tanısında destekleyici markerlar olduğu görülmüş olup özgüllüğünün araştırılması için daha geniş çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

SUMMARY

In this study; the objective was to determine the density of anti-soluble liver antigen \ liver pancreas antigen (anti-SLA\LP), anti-liver cytosolic antigen 1 (anti-LC1), anti-liver kidney mikrozomal antigen 1 (anti-LKM1), and anti-mitokondrial antibody M2 (AMA-M2) in the patients involved in this study who were positive antibody anticentromere and the relation between the density and anticentromere antibody positiveness.

Totally 39 patients who are positive anticentromere antibody were involved in the study admitted Izmir Katip Celebi University Atatürk Training and Research Hospital, Microbiology laboratory between January 2015 and September 2015. The anticentromere antibody and liver autoantibody positiveness were scanned retrospectively of the patients.

Anticentromere antibody positiveness was studied by IIFA method, the scanned liver autoantibodies were studied by immunoblotting method in the medical microbiology laboratory of our hospital. In the patient group involved in our study, it is found that 3 patient out of 39 (%7,6) have positiveness at least with one of the autoantibodies under investigation. It was detected that all of the positive liver autoantibodies are AMA-M2 antibodies and the other antibodies were detected as negative. No statistically significant relation was found between anticentromere antibody and otoimmun liver autoantibodies.

It is advised to study autoantibodies in clinic implementation to evaluate disease activity in order to diagnose, treatment and follow the diseases as otoimmun diseases are affecting many systems. According to the results of the study, these antibodies are seen as supportive markers in diagnosis of otoimmun diseases and it is considered that it is necessaery to do extensive studies to investigate the specificity of autoantibodies.

KAYNAKLAR

1. Baskın Y, Afacan G, Erkunt SS, Yiğitbaşı T. Sistemik Otoimmün Hastalıkların Tanısında Yeni Bir Yöntem: Multipleks Test Sistemi ve Yöntem Performansları. Turk J Biochem 2008; 33; 19-24.
2. Hanly JG, Thompson K, McCurdy G, Fougere L, Theriault C, Wilton K. Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol Meth 2010; 147-52.
3. Ian R Mackay, Senga Whittingham, Shahnaz Fida, Mark Myers, Nobuhiro Ikuno, M. Eric Gershwin, Merrill J. Row-ley. The peculiar autoimmunity of primary biliary cirr-hosis. Immunological Reviews 2000; 174: 226-237.
4. Ahmad A, Thomas E. Autoimmune hepatitis-a diagnostic challange Tenn Med 2000; 93(3): 95-8
5. Tan MT. Autoantibodies in pathology and cell biology. Cell 1991; 67: 841-2
6. Abul K, Abbas AK and LichtmanAH (2007). Ed. Camcıoğlu Y ve Deniz G. Temel İmmunoloji. İstanbul Medikal Yayıncılık
7. Ian, R. Mackay, M.D. Fred, S. Rosen, M.D. Autoimmun diseases. N Engl J Med, 2001, 345 (5).
8. Terzioğlu E. Self Tolerans ve Otoimmünite. Pp: 55-57. In: Gümüşdiş G, Doğanavşargil E (eds). Klinik Romatoloji Kitabı. Deniz Matbaası, İstanbul
9. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. 2001, N Engl J Med 344, 655-664
10. Yeğın O. Temel İmmunoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları, Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya, 1992, s. 255-264
11. Bilgehan H. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yay. 5.Baskı, İzmir, 1992, s. 498-499
12. Fritzler MJ. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. Autoimmun Rev 2008; 7: 616-620.
13. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. Nat Clin Pract Rheumatol 2008;4(9):491-498.
14. Peng Y, Kowalewski R, Kim S, Elkon KB. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. Mol Immunol 2005; 42: 781-787.

15. Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun.* 2007; 29(4): 303-9.
16. Brostoff J, G, K. Scadding Male, I.M.Roith. Autoimmune diseases. A general introduction. *Clinical Immunology.* Gower Med. Publishing London 1991.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. (Y C, G D, eds.). Elsevier Health Sciences; 2014
18. Güneşçar R . Sistemik lupus eritematosus ve romatoid artritde otoantikorlar ve sIL reseptörünün araştırılması. Çukurova Üniversitesi, İmmunoloji B.D. Yüksek lisans tezi, Adana, 1994.
19. Karacaoğlan G. Streptokok enfeksiyonu ile ilişkili pediatrik otoimmün nöropsikiyatrik hastalıkta (pandas) MHC haplotiplerinin araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji A.B.D. Yüksek lisans tezi, Adana. 2010
20. Çağlayan ES. Antinükleer antikorların farklı yöntemlerle bakılması ve alt gruplarının karşılaştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Yüksek lisans tezi. 2006
21. Ruacan Ş. Otoimmünite. Pp: 245-249. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
22. Fagarasan S, Honjo T. T-independent immun response: new aspects of B cell biology. 2000, *Science* 290, 89-92
23. Keser G. Romatolojik Hastalıkların Tanısında Hematolojik, Biyokimyasal ve Serolojik İncelemeler. Pp: 147-159. In: Gümüşdiş G, Doğanavşargil E (eds). *Klinik Romatoloji.* Deniz Matbaası İstanbul, 1999.
24. Us DE. Antinükleer antikorlar ve hastalıklarla ilişkileri. *Mikrobiyoloji bülteni* 1992, 26, 379-389
25. Mongey AB, Hess EV: Antinuclear antibodies and disease specificity. In, *Advances in Pediatrics*, Stollerman GH, LaMont JT, Leonard JJ, Siperslein MD (Eds), Vol: 36, pp: 151-169, 1991, Mosby Year Book, USA.
26. Tan EM. Antinuclear Antibodies: Diagnostic markers for autoimmune disease probe for cell biology. *Adv. Immunol.* 1989, 44, 93-151
27. Kokuludağ A. Otoantikorların doğru kullanımı. 7. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 2005.
28. Theofilopolus AN, MD. Autoimmunity. Pp: 128-158. In: Stites DP, Stobo JD, Wells JW. *Basis & Clinical Immunology.* Sixth Edition, Appleton & Lange. USA

29. Fernandez MF, Mattioli M. (1976) Antinuclear antibodies: immunologic and clinical significance. *Seminars in Arthritis and Rheum* 6 (2), 83-124.
30. Monier JC. Antinuclear Antibodies: Detection and diagnostic value. *Nuc. Med. Biol.* 1990, 17(7), 713-718.
31. Chan EKL, Pollard KM. 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.
32. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv in Immunol.* 1982, 33, 167-240
33. Bernstein RM, Hobbs RN, Lea DJ et al. Patterns of antihistone antibody specificity in systemic rheumatic disease, systemic lupus erythematosus, MCTD, primary sicca syndrome and rheumatoid arthritis with vasculitis. *Arthritis Rheum.* 1985, 28, 285-293
34. Tan EM. Kunkell HG: Characteristic of a soluble nuclear antigen precipitating with sera patients with systemic lupus erythematosus, *Jimmunol*, 1966, 96: 464-471
35. Respaldiza N, Wichmann I, Ocana C, Garcia-Hernandez FJ, Castillo MJ, Magarino MI et al. Anti-centromere antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2006; 35: 290-4.
36. Şener S, Şenol M. Dermatoloji’de Otoantikorlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi (TAD)* 2008; 6: 105-15.
37. Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 118—27.
38. WHK A. The value of specific antinuclear antibodies determination in rheumatology. *Allergy*, 1987, 241-261
39. Reichlen M, Mattioli M: Description of a serological reaction characteristic of polymyositis. *Clin Immunol Immunopathol*, 5: 12-20, 1976.
40. TargoffIN, Reichlen M: The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis. *Arthritis Rheum*, 28: 796-803, 1985.

41. Nasuhbey N. Bölgemizdeki Bazı Otoimmün Hastalıklarda Antinükleer Antikor Prevalansı, ASO, CRP, RF İlişkisi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 1995.
42. Nakamura RM, Tan EM. Recent advances in laboratory tests and the significance of autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin. Lab. Med.* 1986; 6(1): 41-53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2420510>. Accessed November 3, 2014.
43. Reichlin M, Wasicek CA. Clinical biological significance of antibodies to Ro/SS-A. 1983 *Hum. Pathol* 14, 401-405
44. Emerk K. Romatizmal hastalıklarda laboratuvar bulguları. Pp: 51-87. In Tuna N (ed) Romatizmal hastalıklar, Taş Yay İstanbul, 1994.
45. 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
46. Chan EKL, Pollard KM. Autoantibodies to Ribonucleoprotein Particles by Immunoblotting. Pp: 755-761. In: Rose NR, Demarcio EC et al. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. ASM press, 1992.
47. Jitsukawa T, Nakajima S, Usui J, Watanabe H. Detection of anti-nuclear antibodies from patients with systemic rheumatic diseases by ELISA using HEp-2 cell nuclei. *J. Clin. Lab. Anal.* 1991; 5(1): 49-53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1999763>. Accessed November 3, 2014.
48. Muro Y. Antinuclear antibodies. *Autoimmunity* 2005; 38(1): 3-9.
49. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 71-81.
50. Bradwell AR, Huhges RG and Harden EL (2003). *Atlas of HEp-2 Pattern*. Second Edition, Drapkins & Co. Birmingham, UK.
51. Euroimmun . *Product Catalogue*. Germany, 2010.
52. Fritzler MJ, Ayer LM, Gohill J, O'Connor C, Laxer RM, Humbel RL (1987). An antigen in metaphase chromatin and the midbody of mammalian cells binds to scleroderma sera. *J Rheumatol*, 14(2), 291-294.

53. Schaefer EA, Pratt DS. Autoimmune hepatitis: current challenges in diagnosis and management in a chronic progressive liver disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2012; 24: 84-9.
54. Mackay IR, Taft LI, Cowling DC. Lupoid hepatitis and the hepatic lesions of systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1959; 17063: 65-9.
55. Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice*, 3rd ed. UK: Blackwell; 2007. p. 1089-101
56. Vergani D, Longhi MS, Bogdanos DP, Ma Y, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *Semin Immunopathol* 2009, 31(3):421-35
57. Kaymakoglu S. Otoimmun Hepatitler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2005; 24: 36-38.
58. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D. et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 2193-213.
59. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med.* 2006 5; 354: 54-66.
60. Cerit ET, Yurdaydin C. Otoimmun Hepatit ve Varyantları. *Güncel Gastroenteroloji*; 2006; 10; 246-257.
61. Czaja AJ, Manns MP. Advances in the diagnosis, pathogenesis, and management of autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 2010; 139: 58-72.e4.
62. Czaja AJ, Carpenter HA, Manns MP: Antibodies to soluble liver antigen, P450IID6, and mitochondrial complexes in chronic hepatitis. *Gastroenterology*, 1993; 105: 1522.
63. Woodward J, Neuberger J. Autoimmun overlap syndromes. *Hepatology.* 2001; 33: 994-1002.
64. Tahvarkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 2003; 362: 53-61.
65. Feld JJ, Heathcote EJ. Epidemiology of autoimmune Liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003; 18: 1118-28.
66. James OFW . Definition and epidemiology of primary biliary cirrhosis. "Primary biliary cirrhosis" (Ed. J Neuberger), West End Studios, Eastbom, 2000, 53-59.
67. Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2000. 31; 1005-13.

68. Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis: treat early to slow progression. *J Hepatology*. 2003; 39: 112-4.
69. Gish RG, Mason A. Autoimmun liver disease. Current standarts, future directions. *Clin Liver Dis*. 2001; 5: 287-334.
70. Vera A, Moledina S, Gunson B. ve ark. risk factors for recurrence of primary sclerosing colangitis if liver allograft. *Lancet*. 2003; 360: 1943-4.
71. Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology*. 2000; 32: 181-197.
72. Wies I, Brunner S, Henninger J, Kanzler S. Anti-SLA\LP as autoimmune hepatitis spesific autoantibodies: idendication of the target antigen. *Lancet*. 2000; 1510-5.
73. Reddy KR, Kravitt EL, Homberg JC, et al. Absence of LKM-1 antibody in hepatitis C viral infection in theUnited States. *J Viral Hepatol*. 1995; 2: 175-9.
74. Lapierre P, Hajoui O, Hormerg JC, Alvarez F. Formminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patiens with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1999; 116: 643-649.
75. Moroi Y, Peebles C, Flitzler MJ, Steigerwald J, Tan EM. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1627-31.
76. Cassani F, Bianchi FB, Lenzi M, Volta U, Pisi E. Immuno-morphological characterization of antinuclear antibodies in chronic liver disease. *J Clin Pathol* 1985; 38: 801-5
77. Terada S, Morshed SA, Nishioka M. Anti-nuclear anti-bodies in autoimmune hepatitis. In: Nishioka M, Toda G, Zeniya M, eds. *Autoimmune Hepatiis*. Amsterdam, Lonson, New York, Tokyo: Elsevier, 1994; 177-84.
78. Yabe H, Noma K, Tada N, Mochizuki S, Nagano M. A case of CREST syndrome with rapidly progressive liver damage. *Intern Med* 1992; 31: 69-73.
79. K Takada. K Suzuki, M Matsumoto, M Okada, T Nakanishi, H Horikoshi, T Higuchi, F Ohsuzu. Clinical characteristic of patients with both anti-U1RNP and anti- centromere antibodies. *Scand J Rheumatol* 2008; 37; 360-364

80. Shulan Zhang, Ping LI, Haixia Luan, Tao Dong, Ying Shen, Fengchun Zhang, Yongzhe LI. Liver-related autoantibodies in patients with autoimmune hepatitis or primary biliary cirrhosis in China. *International Journal of Rheumatic Diseases* 2010; 13 (Suppl.1): 27-34
81. Danilo Villalta, Maria Concetta Sorrentino, Elia Girolami, Marilina Tampoia, Maria Grazia Alessio. Autoantibody profiling of patients with primary biliary cirrhosis using a multiplexed line-blot assay. *Clinica Chimica Acta* 438 (2015) 135-138
82. F Cassani, F B Bianchi, M Lenzi, U Volta, E Pisi. Immunomorphological characterisation of antinuclear antibodies in chronic liver disease. *J Clin Pathol.* 1985 Jul; 38(7): 801-805.
83. Parveen S, Morshed SA, Nishioka M. High prevalence of antibodies to recombinant CENP-B in primary biliary cirrhosis; nuclear immunofluorescence patterns and ELISA reactivities.
84. Takashi Himoto, Masayuki Murota, Hirohito Yoneyama, Akihiro Deguchi, Kazutaka Kurokochi, Shoichi Senda, Reiji Haba, Seishiro Watanabe, Mikio Nishioka, Tsutomu Masaki. Clinical characteristics of patients with autoimmune hepatitis seropositive for anticentromere antibody. *Hepatology Research* 2010; 40: 786-792
85. Takashi Himoto, Noriyo Tanaka, Akiko Saito, Yoshinao Muro, Kazumitsu Sugiura, Joji Tani. Diversity of humoral responses to the centromere proteins among HCV-related chronic liver disease, PBC and AIH patients. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* Volume 39, Issue 2, April 2015, Pages 222–229.
86. Nancy Agmon-Levin, Yinon Shapira, Carlo Selmi, Ori Barzilai, Maya Ram, Martine Szyper-Kravitz, Sara Sella et. all. A comprehensive evaluation of serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Journal of Autoimmunity* 34 (2010) 55-58.
87. Berstein RM, Callender ME, Neuberger JM, Hughes GRV, Williams R. Anticentromere antibody in primary biliary cirrhosis. *Am Rheum Dis* 1982; 41: 612-14.

88. Acay A, Demir K, Asik G, Tunay H, Acarturk G. Assessment of the Frequency of Autoantibodies in Chronic Viral Hepatitis. *Pak J Med Sci* 2015; 31(1): 150-154.
89. Lu Li, Mikio Nishioka, Dong Yang Huang, and Mikio Nishioka. Frequency and significance of antibodies to chromatin in autoimmune hepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* Volume 15, Issue 10, pages 1176-1182, October 2000.
90. Assassi S, Fritzler MJ, Arnett FC, Norman GL, Shah KR, Gourh P, et al. Primary biliary cirrhosis, PBC autoantibodies, and hepatic parameter abnormalities in a large population of systemic sclerosis patients. *J Rheumatol* 2009; 36: 2250-6.
91. Rigamonti C, Shand LM, Feudjo M, Bunn CC, Black CM, Denton CP, et al. Clinical features and prognosis of primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis. *Gut* 2006; 55: 388-94.
92. Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 18-27.
93. Makinen D, Fritzler M, Davis P, Sherlock S. Anticentromere antibodies in primary biliary cirrhosis. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 914-7.
94. Granito A, Muratori P, Muratori L, Pappas G, Cassani F, Worthington J, et al. Antibodies to SS-A/Ro-52 kD and centromere in autoimmune liver disease: a clue to diagnosis and prognosis of primary biliary cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 831-8.
95. Shoji I, Takagi T, Kasukawa R. Anti-centromere antibody and CREST syndrome in patients with primary biliary cirrhosis. *Intern Med* 1992; 31: 1348-55.

