

20751

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
İmmünoloji Bilim Dalı

ROMATİZMAL HASTALIKLARDA ANTİKERATİN ANTİKORLAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Erdal BALCAN
Tıbbi BİYOLOG

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tefik F. AKOĞLU
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi

İstanbul-1992

YÜKSEKÖĞRETİM İKURULU
DOĞUMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ	1
1. OTOİMMÜNİTE VE OTOİMMÜN HASTALIKLAR	1
1.1. Otoimmün Hastalıkların Spektrumu	1
1.2. Otoimmün bozuklukların Birlikteliği (Çakışması)	3
1.3. Otoimmün Hastalıklarda Genetik Faktörler	3
1.4. Otoimmünitede Moleküler Görünümler	4
1.4.1. Otoantikor Kodlayan İmmünglobulin Genleri	4
1.4.2. Antijenik Taklitçilik	5
1.4.3. Otoimmün Yanıtın Etyolojisi	7
1.5. Lenfositler ve Otoimmünite	7
1.5.1. T Hücreleri Reseptör Genleri	8
1.5.2. Doğal Otoantikorlar	8
1.5.3. Ly-1 B Hücreler	9
1.5.4. Poliklonal B Hücreleri Aktivasyonu	10
1.5.5. Poliklonal T Hücreleri Aktivasyonu	11
1.6. Klas II Moleküllerinin Uygunsuz Ekspresyonu	12
2. İDİOTİPİK NETWORK ve OTOANTİKOR İDİOTİPLER	12
2.1. Şebeke Teorisi	14
2.2. Otoantikor İdiotipler	16
2.2.1. Otoantikor İdiotiplerin Yapısal Özelliği	16
2.2.2. Otoantikor İdiotiplerin Genetiği ve Çeşitliliği	17
2.2.3. İdiotipik Şebekeler ve Otoimmünizasyon	18
2.2.4. Otoantikor İdiotiplerin İmmünopatolojisi	18
3. ROMATOİD FAKTÖRLER	19
3.1. Romatoid Faktörlerin Spesifisiteleri	20
3.2. Romatoid Faktörlerin Biyolojik Özellikleri	21
3.3. Romatoid Faktörlerin Fizikokimyasal Özellikleri	22
3.3.1. IgM RF	22
3.3.2. IgG RF	22
3.3.3. IgA RF	23
3.4 Romatoid Faktörlerin Heterojenitesi	23
3.5. Romatoid Faktörlerin Saptanması	24
3.5.1. Aglütinasyon Teknikleri	25
3.5.2. Presipitasyon Teknikleri	25
3.5.3. İmmünoadsorbsiyon Teknikleri	25
3.6. Romatoid Faktörleri Hastalıklardaki Yeri	26

4. İMMÜN KOMPLEKSLER	27
4.1. İmmün Komplekslerin Doğası	27
4.2. İmmün Komplekslerin Biyolojik Özellikleri	28
4.3. İmmün Kompleksler ile Kompleman Fiksasyonu	29
4.4. İmmün Komplekslerin Hücre Yüzeyi Reseptörü ile Etkileşimleri	29
4.5. İmmün Komplekslerin Dokuda Birikimi	30
5. ROMATOİD ARTRİT (İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER)	31
5.1. Romatoid Artritte Otoantikolar	33
5.2. Sitokinler ve Romatoid Artrit	35
5.2.1. İnterlökin-1 Etkisi	36
5.2.2. TNF- α Etkisi	37
5.2.3. İnterlökin-6 Etkisi	37
5.2.4. İnterferon-gama ve Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Eden Faktör (GM-CSF)	38
5.2.5. Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ve Fibrinojen Growth Factor (FGF)	38
5.2.6. Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta)	38
6. SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZUS (SLE) (İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER)	39
6.1. SLE'de Otoantikolar	39
7. BEHÇET HASTALIĞI (İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER)	46
7.1. Behçet Hastalığında Viral Etyoloji	46
7.2. Behçet Hastalığında İmmün Komplekslerin Rolü	48
7.3. Dolanan İmmün Komplekslerin Patogenezdeki Rolü	48
7.4. Behçet Hastalığı ile HLA Arasındaki İlişki	49
7.5. Behçet Hastalığında Otoantikolar	50
7.6. Behçet Hastalarında Major İmmünglobulinler	51
8. KERATİNLER	52
8.1. Normal Epidermiste Keratin Ekspresyonu	54
8.2. Non-epidermal Epitelde Keratin Ekspresyonu	55
8.3. Kültür Hücrelerinde Keratin Ekspresyonu	56
8.4. Epidermisin Farklı Tabakalarında Keratin Ekspresyonu	58
8.5. Keratin Çiftleri	59
8.6. Keratinler ve Hastalıklar	61
9. STRATUM KORNEUM ANTİJEN ve ANTİKORLARI	62
10. ANTİ-KERATİN ANTİKORLAR (AKA)	64
10.1. Monoklonal Anti-keratin Antikolar	66
10.2. Anti-keratin Antikolar ve Hastalıklar	67
10.2.1. Romatoid Artritte Anti-keratin Antikolar	68

II. MATERYAL ve METOD	71
11.1 Hastalar	71
11.2 Metodlar	71
11.2.1. Anti-keratin Antikorlar (AKA)	72
11.2.2. Anti-nükleer Antikorlar (ANA)	73
11.2.3. Absorbsiyon Çalışmaları	73
11.2.4. Endotel Hücre Kültüründe AKA Saptanması	74
11.2.5. Western-Blotting	75
11.2.5.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	75
11.2.5.2. Blotting	76
11.2.6. Peroksidaz-Antiperoksidaz Yöntemi ile Bantların Saptanması	76
III. SONUÇLAR	78
12.1. Sığan Özofagusu Kesitinde AKA	78
12.2. Endotel Hücre Kültüründe AKA	80
12.3. Serumların Keratin ile Absorbsiyonu	80
12.4. Blotting	81
IV. TARTIŞMA	82
V. ÖZET	85
VI. SUMMARY	86
VII. KAYNAKLAR	87

AMAÇ

Otoantikolar otoimmün hastalıklarda önemli bir yere sahiptir. Bunlardan biri olan anti-keratin antikor (AKA), romatoid artritli hastaların serumlarında bulunmuş ve bu hastalık için oldukça spesifik olduğu öne sürülmüştür.

Behçetli hastalarda bazı otoantikolar bulunabilmektedir. Bu yüzden Behçet hastalığında otoimmün bazı mekanizmalar söz konusu olabilir. Anti-keratin antikor şimdiye kadar Behçetli hastaların serumlarında araştırılmamıştır.

Bu çalışmada başlıca, Behçetli hastaların serumlarında anti-keratin antikor varlığı araştırıldı. Bunun yanında romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, ankilozan spondilit gibi diğer bazı hastalık grupları da incelendi. İlk adımda, indirekt immünofloresan yöntem kullanılarak hastalık gruplarında sıçan özofagusunun stratum korneumuna karşı anti-keratin antikor varlığı araştırıldı. Antikor içeren hasta serumları endotel hücre kültüründe anti-keratin antikor aktivitesi açısından incelendi. Son olarak Western-Blotting yöntemi kullanılarak antikeratin antikorun keratinin hangi komponentine karşı ortaya çıktığı araştırıldı.

I. GİRİŞ

1. OTOİMMÜNİTE VE OTOİMMÜN HASTALIKLAR

İmmün sistemin en önemli görevlerinden biri, kendi antijenleri ile kendinden olmayanı ayırd edebilmesi ve yabancı antijenlere karşı konağı koruyabilmesidir. Otoimmünite, genel anlamda vücudun kendi antijenik yapılarına karşı immün reaksiyon göstermesi durumudur. Bu reaksiyonun bir parçası olan otoantikörler insan yada hayvanların kendi hücrelerinde ya da ekstrasellüler proteinlerinde bulunan antijenlerine bağlanabilen antikörlerdir. Otoantikörler otoimmün hastalıklarda oldukça geniş bir dağılım gösterirler. Bu antikörler hücre nükleusu, sitoplazması, hücre membranı, plazma proteinleri, hormonlar ve enzimlerdeki ve hatta fizyolojik ligant reseptörlerindeki antijenik determinantlara bağlanabilirler.

Otoantijenler ise, protein, nükleik asit, fosfolipit, lipoprotein, şeker ya da steroid yapısında olabilir(145).

1.1. Otoimmün Hastalıkların Spektrumu:

Son yıllarda otoimmün hastalıkların listesi büyümüştür. Bu hastalıkların çok sayıda ve birbirlerinden oldukça farklı olmaları nedeniyle patogenezleri halen tam olarak saptanmış değildir. Bu hastalıkların bazıları major histokompatibilite kompleks (MHC) I, II yada III lokusların allelleri ve Immunoglobulin allotipleri ile bir ilişki içerisindedir(37).

Otoimmün hastalıklar genelde bir spektrum oluşturur (Tablo 1). Bu spektrumun bir ucunda organa spesifik hastalıklar bulunur. Merkeze doğru gittikçe lezyonlar tek bir organa spesifik iken antikör non-organ spesifiktir. Bunun en tipik örneği primer bilier siroz'dur. Burada küçük safra kanalı inflamasyon ve infiltrasyonun ana hedefidir; fakat serumda bulunan anti-mitokondrial antikör karaciğere spesifik değildir. Spektrumun diğer ucunda ise non-organ spesifik hastalıklar bulunur. Bu grubun en tipik örneği sistemik lupus eritematozus, SLE'dir. Bu hastalıkdaki lezyonlar ve otoantikörler hiç bir organa sınırlı değildir. Primer lezyon genelde fibrinoid nekroz şeklinde bağ dokusunda görülür.

Bu hastalık deride, böbrek glomerüllerinde, eklemlerde, seroz membranlarda ve kan damarlarında görülebilir.

ORGAN SPESİFİK HASTALIKLAR	Hasimoto hastalığı Primer miksödem Tirotoksikoz Pernesiyöz anemi Otoimmün atropik gastrit Addison hastalığı Prematür menapoz (seyrek) Male infertilite (seyrek) Myastenia gravis Jüvenil diabet Goodpasture sendromu Pemphigus vulgaris Pemphigoid semfanetik oftalmia Fagojenik üvelt Otoimmün hemolitik anemi İdiopatik trombositopenik purpura İdiopatik lökopeni Primer bilier siroz Aktif kronik hepatit Cryptogenic siroz (seyrek) Ulseratif kolit Sjögren sendromu Romatoid artrit Skleroderma Dermatomyozit Diskoid lupus eritematozus Sistemik lupus eritematozus
NON-ORGAN SPESİFİK HASTALIKLAR	

Tablo 1: Otoimmün hastalıkların spektrumu

Organ spesifik hastalıklarda en çok hedef olan organlar tiroid, adrenaller, mide ve pankreasdır. Non-organ spesifik hastalıklarda ise en çok tutulan organlar deri, böbrek, eklemler ve kaslardır(138 a). Organ spesifik otoantikörler arasında en önemlileri peptid hormonlarına (insülin), reseptörlere (asetil kolin reseptörleri, tiotropin reseptörleri), pankreatik adacıkların insülin üreten beta hücrelerine ve tiroglubuline karşı direkt etkili olan otoantikörlerdir. Otoantijenler ise tüm nukleuslu hücrelerde ortaya çıkar. Bunlar genelde DNA, ribozomal RNA-protein parçaları, sitoplazmik ribonukleoproteinler, mitokondrial antijenler ve sitoskeletal proteinlerdir.

Bazı plazma proteinleri aynı zamanda güçlü otoantijendirler. Örneğin faktör VIII'e karşı oluşan otoantikörler şiddetli bir hemorojik bozukluğa neden olabilirler. Plazmadaki

bir diğerk önemli otoantijen ise IgG'nin ağır zincir sabit bölgesidir. Bu antijenle etkileşen otoantikora romatoid faktör (RF) denir.

Genelde yabancı proteinlerle immünizasyon sonucu ortaya çıkan antikorlar immünize hayvanın kendi proteininden farklı antijenik bölgelere spesifisite gösterir. Örneğın tavşanların fare sitokrom c ile immünizasyonu, antikor popülasyonlarının enzimim fareye spesifik domainlerine karşı ortaya çıkmasına neden olur. Fakat aynı serum tavşan sitokrom c'sine karşı da otoantikör içerir.

1.2. Otoimmün Bozuklukların Birlikteliğı (Çakışması):

Aynı kişide birden fazla otoimmün bozukluk bulunabilir. Bu durum genellikle spektrumun aynı grubundaki otoimmün hastalıklarla ilişkili olarak ortaya çıkar. Örneğın otoimmün tiroiditli (Hashimoto hastalığı ya da primer mixoedema) hastalar aynı zamanda yüksek oranda pernisiyöz anemiye de sahiptirler. Böyle bir ilişki Addison hastalığı ile otoimmün tiroid hastalığı arasında ve seyrek olarak da Addison hastalığı, hipoparatiroidizm, diabet ve tiroidit içeren poliendokrinopati ve pernisiyöz anemili juvenüllerde görülür. Otoimmün tiroid hastalarının (yaklaşık % 30'unun) serumlarında parietel hücre antikoru bulunurken pernisiyöz anemili hastaların % 50'sinde tiroid antikoru pozitifdir.

Spektrumun non-organ spesifik bölümünde SLE, klinik olarak RA ve diğerk bazı hastalıklarla (idiopatik lökopeni, trombositopenik purpura, dermatomiyosit ve Sjögren sendromu) ilişkilidir. Anti-nükleer antikor (ANA), non-organ spesifik kompleman fiksasyon reaksiyonları ve anti-globulin (romatoid faktör) bu hastalıkların genel immünolojik özellikleridir(139).

1.3. Otoimmün Hastalıklarda Genetik Faktörler:

Bazı bozuklukların ortaya çıkışında genetik etki olduğu bilinmektedir. Bu etki tek yumurta ya da çift yumurta ikizlerin ve örneğın tiroid antikorları ile X kromozomu anormalliğinin her iki bireyde de bulunması şeklinde görülebilir. Ailesel otoimmüniteye eğilim de genelde organ spesifik hastalıklarda görülür. Otoimmünitedeki genetik etkilere bir başka örnek ise Hashimoto hastalığıdır. Hashimoto hastalarının birinci derece akrabaları (kardeşler, ana-baba ya da çocuklar) yüksek titrede ve oranlarda tiroid

otoantikörleri içerirler. Aynı şekilde pernisiyöz anemili hastaların ailelerinde gastrik parietal hücre antikoru pozitif bulunabilir. Bu ailesel ilişkiler çevresel faktörler (örneğin infektif mikroorganizmalar) tarafından ortaya çıkarıldığı ileri sürülmüş olmasına karşın örneğin tirotoksikoz çift yumurta ikizlerinde değil tek yumurta ikizlerinde görülmektedir.

Bazı otoimmün hastalıklar ve özel HLA spesifisiteleri arasında çok güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Örneğin Hashimoto hastalığı DR5 ile ilişkilidir. HLA B5 ve DR3 haplotipleri özellikle organ spesifik otoimmün hastalıklarda oldukça sık bulunur. Romatoid artrit ise HLA-DR4 ile yakın ilişkilidir(138 a).

Otoimmünitenin genetik olarak oluşabildiği gerçeği spontan otoimmün hastalık geliştiren hayvan soylarında da gösterilmiştir. Buna örnek olarak otoimmün tirodit'li obez tavuk soyları ve otoimmün hemolitik anemili Yeni Zelanda siyah (NZB) fare soyları gösterilebilir. NZB'nin bir başka soy (NZW, beyaz) ile hibridi (NZB X NZW hibrit) LE hücresi, anti-nükleer antikör ve glomerülonefrite neden olan fatal bir immün-kompleks hastalığı geliştirir.

1.4. Otoimmünitede Moleküler Görünümler:

Günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerle otoimmün yanıtı neden olan molekülleri ve bazı hastalıkların düşünülen otoantijenlerini kodlayan genlerin klonlanması otoimmün yanıtın moleküler düzeyde incelenmesine yardımcı olmaktadır.

1.4.1. Otoantikör Kodlayan İmmünglobulin Genleri:

Antikör genleri, B hücresi gelişiminde tam transkripsiyonel üniteler oluşturan gen segmentlerinden (ağır zincir için değişim,V, farklılaşım,D ve birleşim,J; hafif zincir için V ve J) meydana gelmiştir (166). Bir çok otoantikör da örneğin insanda anti-DNA, romatoid faktör ve anti-Sm, farede anti-DNA, romatoid faktör, anti-histon, anti-bromelain-treated red blood cells (Br-RBC) ve anti-Sm, bir grup V, D ve J gen segmentleri ile kodlanır (162).

Genetik olarak farklı insanlardan elde edilen doğal otoantikörlerde ortak idiotiplerin varlığı, bazı otoantikörlerin germ-line V genleri ile kodlandığını göstermiştir. Örneğin

klonal olarak ilişkisiz Br-RBC otoantikörler özdeş $V_H/D/J_H$ ve V_K/J_K gen segmentleri ile kodlanırlar. İnsanda polispesifik ve romatoid faktör benzeri paraproteinler (VH genlerinin bir grubu ile kodlanmalarına karşın) genelde V_{KIIIb} genlerini kullanırlar. Diğer anti-self yanıtlar (insan lupusunda anti-DNA, lupuslu farelerde anti-DNA ve RF yanıtları) büyük oranlarda farklı immünoglobulin gen segmentleri kullanırlar(162). Fakat sayıları şu anda 100'den fazla olan bu otoantikörlerin kullandıkları V gen aileleri tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

Bilgiler sınırlı olmasına karşın mutasyona uğramamış germ-line V genlerinin otoantikör kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Örneğin bir MRL-lpr/lpr fare hibridoma soyu olan H130 tarafından sekrete edilen prototipik bir anti-DNA antikörü, H130'un germline V_H , D ve J_H gen segmentlerinin non-otoimmün BALB/c farelerdeki germ-line genleri ile özdeş olduğu, bu nedenle normal farelerin somatik mutasyona uğramadan lupus antikörünün ağır zinciri için gerekli yapısal bilgiyi içerdiği bulunmuştur(164). Monoklonal insan romatoid faktörlerin amino asit dizilimi analizleri mutasyonsuz bir germline geni ile kodlanan ve kendi içinde yinelenen bir V_K hafif zincir yapısı (monoklonal romatoid faktörlerinin yaklaşık % 50'sinde ortaya çıkan bir kross-reaktif idiotip) ortaya çıkartmıştır. Bu genin (V_{KRF}) amino asit dizilimi, çeşitli ilişkisiz hastalardan elde edilen monoklonal romatoid faktörlerin hafif zincir değişken bölgeleri ile benzerlik göstermektedir(29). Bu bulgular göstermiştir ki insan romatoid faktörleri mutasyona uğramamış germline genler ile kodlanabilmektedir.

1.4.2. Antijenik Taklitçilik:

Mikrobik antijenler memeli proteinleri ile homolog amino asit dizisi gösterebilir(124) (Tablo 2). Mikrobiyal peptidlerin tolerans kurallarını çiğneyip self peptidlere nasıl bağlandığı ve otoantikör yanıtı nasıl provoke ettiği tam olarak bilinmemektedir. Eğer mikrobik epitop bir T hücresi reseptörüne bağlanan "yabancı" bir domainden ve bir B hücresine bağlanmış "self" bir bölgeden oluştuysa immünolojik tolerans işlemeyecektir(Şekil 1)(145). Antijenik taklitçiliğe en iyi örneği A grubu streptokok enfeksiyonu ile epidemiyolojik olarak bağlantılı olan romatoid kardit oluşturur(34). Romatoid kardit'te iltihaplı miyokardium antikör ve kompleman birikimi içerir. Streptokokkal M proteinleri (bakterinin koruyucu yüzey antijenleri) myokardial hücrelerin iki büyük elemanı ile kross-reaktif epitoplar içerirler (34). Ayrıca pürifiye streptokokkal

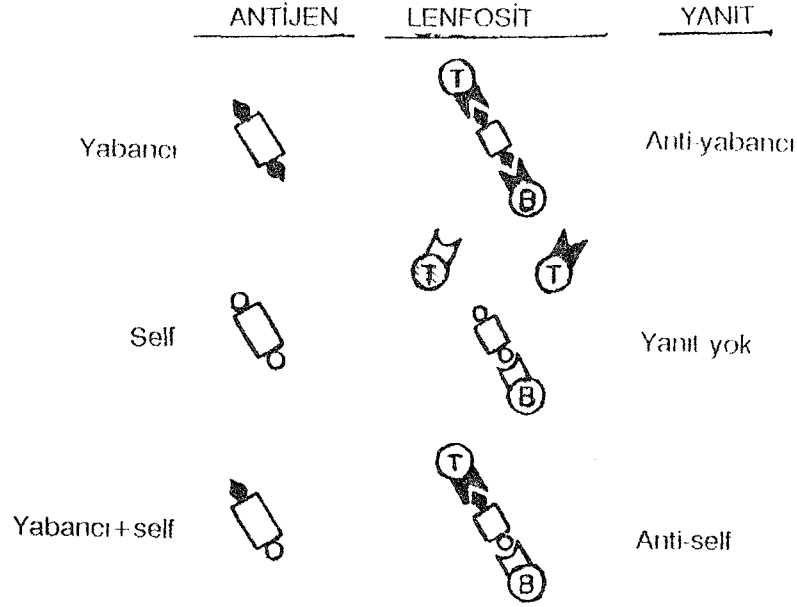
M proteinleri insan CD3 pozitif sitotoksik T hücrelerini kültür ortamındaki insan myokardial hücrelerinin lizisi için aktive ederler.

Yersinia basili Reiter hastalığında ve otoimmün tiroid hastalığında etkili olmaktadır. *Yersinia enterocolitica*'nın bir komponenti tirotropine bağlanabilir. Bunun yapısı tiroid epitel hücrelerinin TSH reseptörlerini taklit edebilir niteliktedir(175). TSH reseptörlerine karşı otoantikor oluşumu ile karakterize Grave's hastalığında, dolaşımdaki bu antikor basildeki TSH-bağlanma bölgelerine bağlanır.

Eksojen Antijen	Otoantijen	Ilgili Hastalık
Streptokok M protein	Kardiyak miyozin	RK
<i>M. tuberculosis</i>	Kartilaj proteoglikan	RA
<i>Klebsiella nitrogenase</i>	HLA-B27	RS
<i>Yersinia</i> 19 kd protein	HLA-B27	RS
<i>Yersinia</i> protein	TSH reseptör	GH
Adenovirus 72 kd protein	La (SS-B)	SS
Adenovirus E1B protein	A-gliadin	Celiac H.
Poliovirus VP2	Asetilkolin reseptör	MG
Papilloma virus E2	Insülin reseptör	Tip I diabet
Measles virus	Myelin-basic-protein	EAE
Visna polimerase	Myelin-basic-protein	EAE
Hepatit B polimeraz	Myelin-basic-protein	EAE
Retroviral p30 protein	U1 RNA	SLE
Bakteriyal fosfolipit	DNA	SLE
Mikrobiyal transfer RNA	Jo	Polimiyosit

Tablo 2: Antijenik taklitçilik örnekleri (RK: Romatizmal kardit; RA: Romatoid artrit; RS: Reiter sendromu; GH: Graves hastalığı; SS: Sjögren sendromu; MG: Myastenia gravis; EAE: Eksperimental allerjik ensefalomyelit)

Yersinia pseudotuberculosis klas I MHC antijenlerinden HLA-B27'ye karşı monoklonal antikorları tanıyan antijenik bir bölgeye sahiptir. Bu antijen ise Reiter hastalığı ve romatoid spondilitte sık görülür (28). Fakat bu taklitçiliğin bu hastalarda artritik lezyonlara neden oluş mekanizması bilinmemektedir.



Sekil 1: Antijenik taklitçilik. Yabancı antijene karşı B hücresi yanıtları genelde T hücresi yardımı ile olur. Bir otoantijen varlığında B hücreleri ya da sitotoksik T hücreleri yanıtsız kalır; çünkü gerekli T hücreler bastırılmış veya delesyona uğramıştır. Hem yabancı, hem de self epitoplara sahip bir mikrop, otoimmün bir yanıtı neden olabilir (antijenik taklitçilik). Yabancı epitop, immünglobulin üretecek B hücrelerinin T hücreleri ile uyarılmasını sağlar.

1.4.3. Otoimmün Yanıtın Etyolojisi:

Otoimmünitenin ne şekilde ortaya çıktığı konusunda bazı görüşler vardır. Organ spesifik antikorların oluş mekanizmasını açıklayan bir görüşe göre, antijenler organ içinde gizli bir yere yerleşir ve lenforetiküler sistem ile iletişim eksikliği yüzünden doğum öncesi immünolojik tolerans oluşturması yetersiz kalır. Daha sonra antijen salınımına neden olan her durum otoantikor oluşumu için bir fırsattır. Örneğin sperm, gözde lens ve kalbin dolaşıma saldıkları bazı komponentler otoantikor oluşumuna neden olabilir.

1.5. Lenfositler ve Otoimmünite:

Vakaların bir çoğunda dolaşımdaki lenfositler otoantijenlere (örneğin otoimmün hemolitik anemide eritrositler, SLE'de DNA ve organ spesifik otoimmünitede birçok yüzey reseptörü) otoantijenler duyarlıdır. Bununla birlikte T hücresinin bu antijeni tanınması

yeterli değildir. T hücrelerinin bir antijeni tanıması için klas II molekülü ile yeterli bir ilişki olmalıdır. Böylece dolaşımdaki bu komponentler antijen presente eden hücreler (APC) üzerinde, T-helper hücreler tarafından tanınmayı sağlayan yüksek bir konsantrasyon oluşturabilirler. Ayrıca klas II içermeyen hücrelerin yüzeyindeki potansiyel otoantijenler sessiz kalabilirler.

Normal bireylerdeki B hücrelerinin küçük bir bölümü yüzey reseptörü yardımıyla insan tiroglobulin, myelin-basic-protein ve DNA gibi otoantijenlere bağlanır. B hücreleri, bir çok vertebralı canlıda bu antijenlerle etkileşecek otoantikörleri sentezlemek için çeşitli yollarla uyarılabilirler.

T hücreleri klonları ve hibridomalar kullanılarak (ki bunlar spesifik olarak miyelin-basic-protein, tiroglobulin, tiroid yüzey antijenler ve kollajen gibi diğer antijenlerle etkileşirler) otoreaktif T hücrelerinin varlığı gösterilebilir. Oluşturulan T hücre soylarında self-klas II' ye karşı yanıt ortaya çıkar ve IL-2 salınımı olur.

1.5.1. T-Hücre Reseptör Genleri:

Delesyona uğramış ya da allelik T hücre reseptör genlerinin otoimmün hastalıkların gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir (162). MRL-lpr/lpr farelerin lenf düğüm T hücrelerinde V beta zincir genleri gösterilmiştir. Bu genlerin bulunması mutlaka otoimmün hastalıkla ilişkili olmamakla birlikte, bu genler MRL-lpr/lpr farelerde T hücrelerinin lenfoproliferatif bozukluklarını gösterebilir. MRL-lpr/lpr ve C3H/HeJ-gld/gld farelerde alışılmamış fenotiplerde T hücre alt grupları ortaya çıkar. Bunların bir çoğu Lyt-2-, L3T4-, Thy-1+ (double negatif) T hücreleridir. Bunlardan başka Lyt-2-, L3T4-, Ia-Thy-1- (null) hücrelerin oluşturduğu minör bir grup daha vardır. Her iki alt grup da V alfa ve V beta RNA kopyalayabilir(60).

Null hücreler anormal bir farklılaşma gösterirler. Bunlar alışılmış reseptör pozitif T hücrelerden farklı olarak Thy-1 normunda T hücre reseptör proteinlerini eksprese ederler.

1.5.2. Doğal Otoantikörler:

Normal insanlarda ve hayvanlarda B hücreleri otoantikör oluşturabilir. Bu doğal otoantikörler, genellikle yüksek oranlarda korunan moleküllere karşı olur. Bu moleküller

arasında xantin oksidaz, sitokrom-c, transferrin, myelin-basic-protein, nükleik asitler ve sitoplazmik filamentler vardır. Doğal otoantikolar normal hayvan serumlarında ve tüm yaş gruplarındaki normal insan serumlarında bulunmuştur(55). Bundan başka Pookewed mitojen, *Staphylococcus aureus* cowan I (SAC) ya da Epstein-Barr virus (EBV) ile in-vitro poliklonal uyarılar normal insan B hücrelerinde RF, anti-DNA ve IgM ve IgG sınıfından diğer başka otoantikoların oluşumuna neden olur(24,46,99).

Normal farelerin dalak B hücrelerinden elde edilen hibridomalar da organa spesifik olan ve her yerde bulunabilen otoantijenlere karşı antikor üretirler.

Doğal otoantikoların bakteriyel antijenlerin uyarımı sonucu da ortaya çıkabileceği gösterilmiştir. Örneğin normal farelerde bakteriyel dsDNA ile immünizasyon sonucu anti-dsDNA'da bir artış görülmüştür(49).

Tüm bu deneysel otoantikoların IgM izotipinde olduğu ve otoantijenler için düşük afinite gösterdiği saptanmıştır.

Doğal otoantikolar; a- Degrade olmuş otoantijenleri ve yaşlı hücreleri yok ederler.
b- Eksojen antijenlere karşı antikor prekürsörleri olarak görev yaparlar. Bunların yabancı antijenlerle kros-reaksiyonları immün sisteme bir avantaj oluşturur.

c- Otoantijenlerle kros-reaksiyon yapan çevresel epitoplara karşı immün sistemi törpüleyerek zararlı otoimmünizasyonu önler.

1.5.3. Ly-1 B Hücreler:

Fare Ly-1 B hücreleri ve bunların insanda karşılığı olan Leu-1 (CD5+) B hücreler doğal otoantikolar ile ilişkili hücrelerdir. Ly-1⁺ B hücreler somatik mutasyon olmadan (ya da çok az varken) primer olarak polireaktif IgM antikorları(muhtemelen istemeyerek) üreten, kendini yenileyen ve uzun ömürlü bir B hücre alt grubudur(162). Ly-1 ve Leu-1 molekülleri benzer primer yapıya sahiptir. İnsan fötüsünde lenfoid dokulardaki B hücrelerinin % 40-60'ı Leu-1 pozitifdir. Oysa yetişkinlerde lenf nodüllerindeki B hücrelerinin sadece % 2-3'ü Leu-1 pozitif bulunmuştur(4). Neoplastik B hücreleri, çeşitli B hücresi malignansilerinin yaklaşık % 25'inde ve kronik lenfositik lösemili (KLL) vakaların neredeyse tümünde Leu-1⁺ B hücreleridir(145).

CD5+ B hücrelerinin rolleri tam olarak bilinmemektedir, ancak polireaktiviteleri nedeniyle dolaşımdan antijen temizlenmesi ve/veya bakteri ve virus gibi yabancı ajanlara

etki edebileceği düşünülmektedir(25).

Ly-1⁺ ve Leu-1⁺ B hücreler doğal otoantikor oluşturmakla birlikte otoantikorların tek kaynağı değildir. Ly-1⁺ B hücreler, fare serumunda bazı doğal otoantikorların oluşumundan sorumludurlar. Normal insan serumlarındaki Leu-1⁺ B hücreler ise in-vitro anti-ssDNA antikor ve romatoid faktör üretirler(25,26). Bununla birlikte Leu-1-negatif B hücreler de doğal otoantikor oluşturabilirler. Ly-1⁺ B hücreler lupus eğilimli NZB farelerde 5-10 kat artmıştır. Bunların kültüre edildiği zaman in-vitro anti-DNA, anti-timosit antikorlar ve bromeleinin ile muamele edilmiş eritrositlere karşı otoantikor oluşturduğu gözlenmiştir(25,63).

Normal donörlerden alınan EBV-transforme insan Ly-1⁺ B hücreler romatoid artritte hiperaktif ve artmış, sistemik lupus eritematosusda normal sayıdadırlar. Romatoid artritli hastalarda EBV-transforme CD5+ B hücreler iki farklı tür romatoid faktör üretirler: birincisi, polireaktif (düşük afiniteye IgG Fc'ye bağlı) ve sağlıklı donörlerin CD5+ B hücreleri tarafından üretilene benzer romatoid faktörler; ikincisi, monoreaktif (yüksek afiniteye IgG Fc'ye bağlı) ve sadece romatoid artritli hastaların CD5+ B hücreleri tarafından üretilen romatoid faktörler(25,162).

Otoimmün hastalıklarda ve özellikle romatoid artritte bu CD5+ B hücresi alt grubunun patojenik rolü tartışma konusudur.

1.5.4. Poliklonal B Hücresi Aktivasyonu:

B hücresi aktivasyonunun bazı formları sistemik otoimmün hastalıkların gelişiminde önem taşımaktadır. Fakat yine de poliklonal B hücresi aktivasyonunun organ spesifik otoimmün hastalıklarda önemli bir role sahip olup olmadığı tartışmalıdır. MRL-lpr/lpr farelerin lenf nodüllerinde bulunan bir çok T hücresi olgunlaşmaz. Bu immatür T hücreler (Thy-1⁺, Lyt-1⁺, CD4-, CD8-; double negatif), normalde B hücrelerinde bulunan Ly-1 (insanda karşılığı CD5) ekspres ederler. Her ne kadar bu T hücresi popülasyonu MRL-lpr/lpr farelerde lpr gen etkisi ile bulunsa da bu fenotipteki T hücreler bu genin bulunmadığı MRL-+/, B/WF₁ ve SNF₁ farelerin dokularında da ortaya çıkar(36). MRL-lpr/lpr double negatif T hücreler çok az IL-2 üretirler(ya da hiç üretmezler). Buna karşılık bu hücreler "B hücresi farklılaşma faktörü, IL5" sekrete ederler. Böylece aktive B hücrelerinin IgG salınımına neden olurlar.

Murin lupusta double negatif T hücrelerinin rolü olduğu iki bulgu ile açıklanabilir:

birincisi, bu hayvanlarda nefrit gelişiminden hemen önce bu double negatif T hücrelerinin sayısı artar; ikincisi SNF_1 farelerin dalaklarında bulunan $L3T4^+/Lyt-2^-$ ve $L3T4^-/Lyt-2^-$ helper hücreler, B hücrelerinin katyonik IgG anti-DNA antikorunu üretmelerine neden olurlar. Bu antikor indükleyici etki $Thy1^+$ hücreler bağlıdır(36).

Bütün lupus fare soylarında otoreaktif $CD4^+$ T hücreleri bulunmaktadır ve bunlar double negatif T hücrelerinden daha güçlü birer katyonik IgG anti-DNA antikor indükleyicileridirler(140).

Poliklonal B hücre aktivasyonu şu durumlarda düzenlenebilir:

a- B hücrelerinin orijinlerindeki anormallikler,

b- T hücresi lenfokinleri ya da

c- Mitojenik bakteriyel ürünler gibi B hücrelerinin aktivasyonunu sağlayan maddeler.

İn-vitro poliklonal B hücresi aktivasyonu romatoid faktör, anti-DNA ve anti-eritrosit otoantikorların üretimini başlatabilmektedir. Farelerde bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS) tekrarlayan enjeksiyonları sonucu anti-DNA antikorlar ve anti-DNA içeren renal lezyonlardaki immün kompleksler gelişir. Erişkin dönemlerinde lupus nefrit oluşturan BXSB dişi farelerde LPS'in mitojenik bir fraksiyonu olan Lipit A'nın enjeksiyonu ile lupus nefritinin ileri bir formu ortaya çıkar.

Anti-DNA oluşturan B hücreleri normal ve otoimmün (NZB, BXSB ve MRL-lpr/lpr) farelerde aynı sıklıkta bulunur; fakat tüm B hücreleri karşılaştırıldığında bu hücrelerin lupusa yatkın fare soylarında normal farelerden 20 kat daha fazla bulunduğu ortaya çıkmıştır(145). Bu artış selektif değildir.

İnsan lupusunda ise poliklonal B hücresi aktivasyonu sonucu çeşitli virüslere karşı çok yüksek titrelerde antikorlar ortaya çıkar.

1.5.5. Poliklonal T Hücresi Aktivasyonu:

T hücrelerinin MRL-lpr/lpr farelerdeki rolü erken timektomi ile gösterilmiştir. Bu şekilde bu fare soylarında karakteristik olan masif lenfoadenopati ve nefrit ortadan kalkmaktadır.

MRL-lpr/lpr farelerin lenf nodüllerindeki T hücreleri bölünmez ve timüsteki bazı anormallikler sonucu bunlar tamamen farklılaşmadan perifere çıkarlar. Bu olgunlaşmamış T hücreleri ($Thy-1^+$, zayıf $Lyt-1^+$, $CD4^-$, $CD8^+$ double negatif)

normalde B hücrelerinde görülen alloantijen Ly-5 (B220) eksprese ederler(23).

1.6 Klas II Moleküllerinin Uygunsuz Ekspresyonu:

Klas II genleri deprese edildiğinde ve la molekülleri sentezlendiği zaman hafif oranda hücre yüzeyindeki moleküllerin güçlü bir otoantijenite gösterdiği sanılmaktadır. Gerçekten doku kültüründe insan tiroid hücreleri τ IFN ile uyarıldıktan sonra yüzeylerinde HLA-DR la molekülleri eksprese edebilirler. Ayrıca graves' hastalığı olanların (tirotoksikoz) tiroid bezlerinden alınan epitel hücrelerinin sitoplazmaları HLA-DR raegentleri ile güçlü bir şekilde boyanır(139).

Uygunsuz klas II ekspresyonu insan ve BB sıçan modellerinde, primer bilier sirozda safra kanallarında, endotel hücrelerinde ve diabetik pankreasta bazı beta hücrelerinde görülmüştür. Bununla birlikte bu hücrelerde IFN yardımı ile klas II ekspresyonunun, otoreaktif T helper hücreler yolu ile otoimmün proçesi başlatıp başlatmadığı ya da "herzaman aktif" T hücrelerinin IFN τ salınımıyla klas II indüklemesi ve hücreyi doku hasarı için cazip hale getirip getirmediği henüz bilinmemektedir(139).

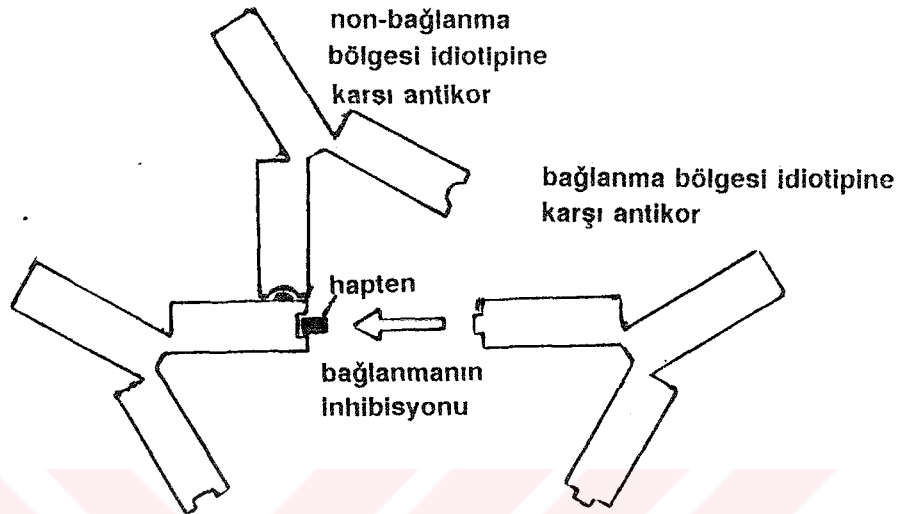
Şurası kesindir ki otoimmün hastalıklar multifaktoriyel etiyojolojiye sahiptirler. Muhtemelen birçoğunda farklı kombinasyonlarda farklı bozukluklar ortaya çıkabilir. Bu defektlerin orijini henüz belli değildir. Bunlar bilinmeyen bazı virus enfeksiyonları ile de olabilir.

2. İDİOTİPİK NETWORK ve OTOANTİKOR İDİOTİPLER

İmmünglobulinlerin ortak ve bireysel antijenik determinantlara sahip oldukları ilk kez Kunkel, Oudin ve Michel tarafından gösterilmiştir. Bir antikorun variable ve hipervariable bölgeleri antijenik determinantlar gibi hareket ederler. Anti-idiotip antikorların deneysel indüksiyonu ile lenfositler üzerindeki antikor ve reseptörlerin bağlanma bölgelerini tanıyan ve karşılıklı etkileşen lenfositlerin bulunduğu ortaya konmuştur. Bu şekilde, immün sistemde lenfosit ve antikorlar arasında antijen bağlama bölgeleri üzerinden karşılıklı etkileşimler olmaktadır. Buna göre bütün otoantikorların hipervariable bölgelerinde "idiotip" adı verilen antijenik determinantlar vardır. Bu idiotipler uygun anti-idiotip antikorlar ile tanınırlar(81).

Anti-idiotipler, bağlanma bölgelerindeki idiotiplerle direkt ilişkilidir. Hatta anti-idiotipler

bağlanma bölgeleri dışındaki idiotipler ile de etkileşebilirler. Ayrıca idiotip-anti-idiotip etkileşimi bağlanma bölgesine bir haptenin oturması ile inhibe olabilir. Böylece muhtemelen anti-idiotip, orijinal antijenin yerini alır(Şekil 2) ve antijen gibi immün yanıtı uyarır ya da baskılar(138 c). Anti-idiotip antikolar, yüzeylerinde idiotip bulunan klonlara özgün olarak bağlanırlar ve böylece idiotip-spesifik yanıtı düzenleyebilirler.



Sekil 2: Bir anti-idiotip serumda bağlanma bölgesine spesifik (site associated) ya da bağlanma bölgesi dışındaki idiotiplere spesifik (non-site associated) antikolar bulunabilir. Bağlanma bölgesine spesifik anti-idiotipik antikorun haptentle engellenebilir.

VDJH ve VJL rekombinasyonu sırasında ve somatik mutasyon aracılığı ile ortaya çıkan çeşitli değişken bölgeler birçok idiotipin ekspresyonuna olanak sağlar. İdiotip terimi hafif ve/veya ağır zincir V bölgesi ile ilişkili yapıları içerdiği için bazı yapılar (idiotipler) V bölgelerindeki homolojiler nedeniyle farklı immünglobulin moleküllerinde ortak olarak bulunurlar. Yani bu idiotipler farklı antijenlere özgü antikolar tarafından eksprese edilirler.

Monoklonal anti-idiotip antikolar immünglobulinlerde seyrek olarak eksprese olan idiotiplerin saptanmasında yardımcı olmaktadır.

Anti-idiotipik serumlar, farklı hücrelerdeki ve farklı ağır zincirlerdeki aynı V bölgelerinin gösterilmesinde, hasta serumlarındaki spesifik immün komplekslerin saptanmasında, Bence-Jones proteinleri ile ilişkili VL tip amiloidin ayırd edilmesinde yardımcı olurlar. Bununla birlikte anti-idiotip antikolar ile bir idiotipin B hücreleri için klonal bir marker olarak kullanılması oldukça sınırlıdır; çünkü bir çok vakada çeşitli

ilişkili (ve hatta ilişkisiz) klonlar, farklı immünglobulin molekülleri içindeki ortak idiotiplere bağlı olarak tek bir antikor tarafından tanınabilir. Aynı şekilde monoklonal anti-idiotip antikorlar da tam bir klonal marker olamazlar; çünkü immünglobulin repertuarı hem çok büyük hem de oldukça heterojen yapıdadır. Bu monoklonal anti-idiotipik antikorların, sadece immünglobulin V bölgeleri ile değil aynı zamanda B hücrelerinde bulunan "non-immünglobulin" yapılar ve lenfoid hücrelerle ilişkisi olmayan "non-immünglobulin" moleküllerle de etkileştiği gösterilmiştir.

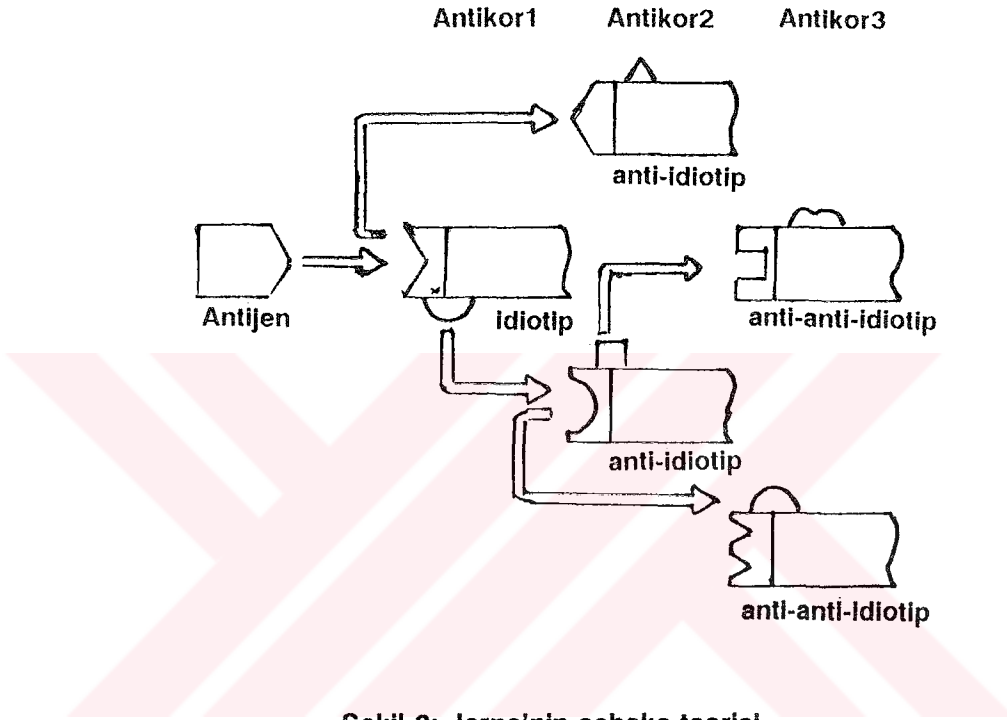
Son zamanlarda birçok ilginç antikor-idiotip etkileşimleri saptanmıştır. Bu etkileşimler yeni bir terminolojinin ortaya çıkmasına neden olmuştur: Bazı antikorlar, özellikle plazmasitoma protein, TEPC 15 (bu, fosforilkolin'e spesifiktir) kendi üzerlerine bağlanma özelliği gösterir. Bu ve benzer antikorlara "autobody" adı verilmiştir. Bir diğer özel anti-idiotipik antikor türü Bona ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu antikor sadece monoklonal insan anti-IgG (romatoid faktör) üzerindeki idiotiple değil, aynı zamanda insan IgG Fc hedef antijeni ile de etkileşmektedir. Böyle antikorlara ise "epibody" denilmiştir(17). Böyle bir epitopun yapısal temelini IgM hafif zincir ve IgG'nin Fc parçası ile ortak Ser.Ser.Ser. zincirine dayandığı öne sürülmüştür(30). Bu örnekler idiotip-anti-idiotip etkileşimlerinin oldukça heterojen olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte günümüzde bu antikorun fonksiyonel önemi konusunda çok fazla şey bilinmemektedir.

Özet olarak idiotipler ve anti-idiotip antikorlar B hücreleri tarafından eksprese edilen V bölgelerinin fonksiyonel analizinde ve serum antikor yanıtlarında gerekli bir araçtır. Bunlar, immünglobulin V genlerindeki genetik markerlerin kalıtımı, V genlerinin haritalanması ve V geni ekspresyonunun düzenlenmesi çalışmalarında da kullanılır.

2.1. Şebeke Teorisi:

Neils Jerne, 1974 yılında immün sistemin idiotip tanıma yoluyla düzenlendiğini öne sürmüştür. Onun bu düşüncesi immünglobulinlerin son derece heterojen değişken bölge yapılarından kaynaklanıyordu. Jerne, her immünglobulin molekülünün sadece (paratop olarak adlandırılan) özel bir antijen için nominal bir antijen bağlayan bölge içermediğini, aynı zamanda değişken bölgelerinde eksprese olan antijenik determinantlar (idiotipler) nedeniyle diğer antikor molekülleri tarafından da ayırd edilebildiğini öne sürmüştür. Jerne, paratopları tanıyan antikorları Ab1 olarak adlandırırken bu son sözü edilen antikorları da Ab2 (ya da anti-idiotipik antikorlar) olarak adlandırmıştır.

Jerne'nin hipotezine göre antijen çeşitli idiotipleri içeren orijinal idiotipe bağlanan antikorların (Ab1) oluşumunu uyarır. İdiotipler, oluşumlarını düzenleyen anti-idiotipleri (Ab2) uyarır. Anti-idiotipler ise anti-anti-idiotipler (Ab3) tarafından sıra ile düzenlenir. Anti-idiotiplerden biri, eksternal antijeni andıran bir idiotipe sahiptir ve buna antijenin iç hayali (internal image) denir. Bazı antikorlar orijinal idiotiple birlikte anti-idiotipleri ortaklaşa kullanır. Bu antikor-antikor etkileşimler paralel bir şekilde devam eder (şekil3,138c).



Sekil 3: Jerne'nin şebeke teorisi

Jerne'nin bu teorisi T hücrelerinin regulasyonunu kapsamaktadır. Fakat T hücreleri B hücreleri ile ve onların immünglobulin ürünleri ile de etkileşebilmektedir.

İdiotip-şebeke sisteminin, immün repertuarın kontrolü için çok önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Anti-asetilkolin reseptör antikorlara ya da romatoid faktörlere karşı anti-idiotipik antikorların in-vitro olarak antikor üretimini baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca insanlarda anti-DNA antikorlarda, antikorun dış bölgesindeki (noncombining framework) determinantlara karşı oluşan anti-idiotipler de anti-DNA antikorlarını baskılar. Bununla beraber anti-idiotip antikorların etkileri otoimmün

farelerde, in-vivo durumlarda karışık bir hal almaktadır. Farelerde spontan anti-DNA üretimi anti-idiotip antikolar ile geçici olarak baskılanır ve ilişkisiz idiotip içeren başka tip anti-DNA antikoların ortaya çıkması ile yeniden belirir(142).

2.2. Otoantikör İdiotipler:

İdiotipler, otoantikörler hakkında birtakım bilgiler sağlamada yardımcı olmaktadır. Otoantikör grupları arasındaki ilişkiler, otoantikör canlılığı, otoantikörlerin orijinleri ve fonksiyonel bir otoantikör şebekesinin bulunup bulunmadığı idiotiplerin sağladığı bilgilerden bazılarıdır.

2.2.1. Otoantikör İdiotiplerin Yapısal Özellikleri:

Otoantikör idiotipleri de diğer antikör idiotipleri gibi immünglobulinlerin hipervariable ya da framework bölgelerinde bulunurlar. Özel bir monoklonal romatoid faktörün idiotipik analizleri sırasında romatoid faktörün değişken bölgesine ve bununla ilgili antijen, IgG'nin, Fc bölümüne bağlanan ve "epibody" adı verilen bir anti-idiotip saptanmıştır (17). Bunun yapısı, IgM'in değişken bölgesi ve IgG'nin ağır zincir sabit bölgesinin 195 ile 197'nci residuelleri ile ortak olan Ser.Ser.Ser. zincirinden oluşmaktadır(30). Bir diğer otoantikör idiotip, İd62'dir. Bu idiotip monoklonal mürin anti-tiroglobulin antikorda bulunmaktadır. Bu otoantikörlerin H ve L zincirlerinin her ikisi de İd62 içermektedir.

Farklı antikör moleküllerinin ilişkili idiotiplere sahip olduğu bilinmektedir. Bu idiotipler incelendiğinde kros reaksiyon gösterdikleri saptanmıştır. Bu yüzden bunlara "ortak idiotipler" ya da "idiotip aileleri" adı verilmiştir. Ortak idiotiplere, soğuk aglütininer, romatoid faktörler, anti-asetilkolin reseptör antikoları, anti-tiroglobulin antikolar gibi çeşitli antikör sistemlerinde rastlamak mümkündür(66).

Oudin-Cazenave paradoksu (bir idiotip markerın farklı ligant bağlayan immünglobulinler tarafından ortaklaşa kullanılması), otoantikör idiotipler için önemli bir durumdur. Bu fenomen, eğer iki farklı antikör aynı idiotip belirleyen V gen segmentini kullanıyorsa ya da bir V geni mutasyonu antikörün idiotipini değil de etkilenme bölgesini etkilerse ortaya çıkabilir. Örneğin 3I olarak adlandırılan genel bir idiotip insan lupus anti-DNA antikörlerde ve anti-DNA antikör aktivitesi olan IgG myeloma proteinlerinde ortaya çıkar. Oudin-Cazeneva etkisi gösteren otoantikörler ilk kez MRL-lpr/lpr anti-DNA

antikorlarda gösterilmiştir. H130 olarak adlandırılan yüksek frekanslı bir idiotip, lupus eğilimli bu fare soyunda anti-DNA antikolarında bulunur. Bununla birlikte idiotip H130 pozitif immünglobulinlerin yaklaşık % 60'ı MRL-lpr/lpr farelerin serumlarında DNA'ya bağlanmamıştır. Böyle antijen negatif idiotipler, antijen pozitif idiotip oluşumunun düzenlenmesine katılabilirler(135).

Farklı bağlanma özellikleri gösteren otoantikolar arasındaki umulmayan ilişkiler idiotipik analizler yardımıyla ortaya çıkarılmıştır. Örneğin SLE'nin iki önemli markeri olması yanında çeşitli yapısal farklılıklara (tanıdıkları hedef antijenler gibi) sahip anti-DNA ve anti-Sm antikoların idiotipik olarak hem farede (131) hem de insanda(78) ilişkili olduğu bulunmuştur. İnsan romatoid faktörler ve anti-DNA antikolar da ortak idiotiplere sahip olabilirler(136). Bu bulgular farklı antijen bağlama özellikleri ile beraber otoantikoların ilişkili V genlerinden (ya da aynı idiotip şebeke içinde bulunmasından) ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.

2.2.2. Otoantikor İdiotiplerin Genetiği ve Çeşitliliği:

Otoantikolar hem özel hem de genel idiotipik markerlere sahiptir. Tek bir antikora özgü olan özel idiotipler otoantikor çeşitliliğini gösterebilirler. Bu durum romatoid artritli hasta serumlarındaki romatoid faktörler ile açıklanabilir. Makroglobulinemia'lı hastaların monoklonal RF'lerinin tersine, poliklonal RF'ler geniş bir idiotipik çeşitlilik gösterir(116). Bir çok farklı RF kodlayan V genlerinin ya da V gen mutasyonlarının (ya da her ikisi birden) ekspresyonu bu sonuçları doğurabilmektedir.

Genel idiotipik markerler de otoantikoların analizinde gereklidirler. Ly1⁺ ve Leu-1⁺ B hücreler tarafından ortaya çıkarılan doğal otoantikolar antijen bağlanma özellikleri göz önüne alınmadan ve farklı VH gen ailelerinden kök almış olsalar bile karakteristik olarak yüksek sıklıkta genel idiotipleri ortaklaşa kullanırlar. Bu tür kanıtlar kesin genetik göstergeler oluşturamaz, çünkü bir anti-idiotip reagent bir gen probu değildir. Klinik olarak normal kişilerde otoantikor idiotipleri görülebilir. Örneğin SLE'li hastaların birinci derece akrabalarının serumlarında lupus anti-DNA antikor idiotipleri, İd-16/6 ve 3I, artmış oranlarda bulunmaktadır. Benzer örnekler RF idiotipleri ve kryoglobulin idiotiplerde de bulunmuştur.

2.2.3. İdiyotipik Şebekeler ve Otoimmünizasyon:

Genel olarak idiyotipik şebekeler otoantikorların ya da anti-self T hücrelerinin üretimini inhibe edebilir ya da ilerletebilirler.

Jerne'nin hipotezine göre böyle bir şebekede temel komponentler otoantikor (Ab1) ve komplementer otoanti-idiyotip (Ab2) dir. Otoantiidiyotipler B/W F1 farelerde ve insan lupusunda bulunmuştur. Anti-DNA'ya karşı otoanti-idiyotiplerin normal insan serumlarında anti-DNA antikorlarının üretimini düzenlediği düşünülmektedir(145).

Otoantikora karşı otoanti-idiyotipler myastenia gravis ve otoimmün tiroid hastalığında da bulunmuştur. Fakat bu bulguların hiçbiri idiyotipik şebekenin otoantikorların üretimini düzenlediklerini tam olarak kanıtlayamamaktadır. B/W F1 farelerin anti-idiyotipe (ya da hatta idiyotip ile) muamelesi anti-DNA antikorların üretimini geçici olarak etkilemiştir.

Otoantikor üretiminin inhibisyonu yerine bir anti-idiyotip antikor eğer değişken bölgesi ile bir otoantijen taklidi (yani internal image etkisi) yapıyorsa otoantikor oluşumunu artırabilir.

SLE'li hastalarda DNA hücre yüzeyi reseptörüne bağlanan ve fonksiyonunu bloke eden otoanti-idiyotipler bulunmaktadır. Bu antikorlar dolaşımdan DNA klerensine zarar vererek hastalığın patogenezinde yardımcı olur(13).

Otoimmünitenin idiyotipler aracılığı ile gelişmesinin bir örneği de C3HSW dişi farelerle yapılan deneylerde görülmüştür. Bu fareler İd 16/6 bağlayan monoklonal anti-DNA antikor ile immünize edilmiştir. Bu fareler yüksek oranlarda anti-İd 16/6 oluşturmaları yanında anti-DNA aktivitesine sahip olan anti-[anti-İd 16/6] antikorları da içerirler. Aynı şekilde anti-Sm RNP, anti-Ro, anti-La ve anti-kardiolipin gibi diğer lupus antikorları da saptanmıştır. Ayrıca bu farelerin böbreklerinde immün komplekslerin İd 16/6 içerdikleri de bulunmuştur(108). İhtimal odur ki; İd 16/6 anti-DNA antikor, insan otoantikorumun değişken bölgesini taklit eden bir otoanti-idiyotip popülasyonu oluşumuna neden olur.

2.2.4. Otoantikor İdiyotiplerin İmmünopatolojisi:

İdiyotipik markerler otoimmün hastalıklarla ilişkili olan otoantikor popülasyonlarının

saptanmasında kullanılır.

İnsan anti-DNA'sına ait immünglobulin 16/6 ve 3I idiotipleri lupuslu hasta serumlarında hastalığın aktif fazında yüksek, remisyon sırasında düşük düzeylerde olduğu bulunmuştur(66). Bundan başka İd 16/6 taşıyan antikolar SLE'li hastaların renal ve deri lezyonlarında da bulunmuştur (67,68).

İdiotip 16/6 ve 3I, patojenik otoantikolar ile doğal otoantikolar arasında ortak noktalar bulunduğunu göstermiştir. İdiotip 16/6 normal serumlarda düşük afinitedeki IgM anti-DNA antikorda(102), germline kodlanan monoklonal IgM anti-DNA antikolarlarda(39) ve IgM Waldenstrom makroglobulinlerde ortaya çıkmaktadır. Bu durum aynı zamanda lupus lezyonları ile ilişkili IgG antikolarında da görülebilir.

3. ROMATOİD FAKTÖRLER

Romatoid faktörler Waaler'in ve daha sonra Rose'un romatoid artritli hasta serumlarının tavşan anti-koyun eritrosit antikoları ile kaplı koyun eritrositleri ile yapışmasını göstermesi sonucu ortaya çıktı. Daha sonra bu aglutinasyondan sorumlu olan serum faktörünün molekül ağırlığı yüksek, IgM sınıfından bir immünglobulin olduğu bulundu(100,104). Genel olarak romatoid faktör terimi IgG ile etkileşim gösteren bir grup otoantikor belirtmek için kullanılır. Daha özgün olarak bu anti IgG faktörler IgG molekülünün Fc parçasındaki yapılara spesifiktir(87). Kısaca romatoid faktörleri "insan ya da hayvan immünglobulin G'nin Fc parçasındaki antijenik determinantlara spesifik antikolar" şeklinde tanımlamak mümkündür. Bununla birlikte immünglobulinler üzerindeki çeşitli determinantlara karşı da bir çok antikor oluşmaktadır. Bu antikolar genel olarak anti-globulin olarak adlandırılırlar. Bu antiglobulinler IgG'nin yanısıra, hafif zincirlere, IgA, IgM ve IgE'ye karşı da ortaya çıkabilirler. Ancak bunlar IgG'nin Fc kısmındaki antijenik determinantlara karşı etkili olmadıkları için romatoid faktör olarak değerlendirilmezler.

Romatoid faktörler genelde immünglobulin M sınıfından olmaları yanında diğer immünglobulin sınıfı RF'lere de rastlanır. Ancak bu sınıflardaki RF'lerin hastalık ile ilişkileri, yoğunlukları ve serumdaki düzeyleri IgM RF'ler kadar iyi saptanamamıştır(87).

RF'ün varlığı ilk kez RA'lı ya da başka hasta serumlarının tavşan anti-koyun eritrositi antikoları ile kaplı koyun eritrositlerinin aglutinasyonu artırma kapasitesi ile gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarda ise böyle serumların anti-Rh antikoları ile kaplı

insan Rh(+) eritrositlerini (eritrositler pasif olarak normal IgG ile kaplıdır) ve insan gammaglobulin kaplı lateks partiküllerini de aglütine ettiği bulunmuştur.

3.1. Romatoid Faktörlerin Spesifisitelemi:

RF(+) serumlar insan IgG moleküllerine ek olarak tavşan, siğır, at ve domuz IgG'leri gibi çeşitli memeli immünglobulinleri ile de kros-reaksiyon göstermektedir.

İnsan IgG'si üzerinde yapılan serolojik ve biokimyasal analizler IgM-RF'ler için çeşitli antijenik determinantlar bulunduğunu göstermiştir. Bu determinantlar genetik yada nongenetiktir. Fc fragmentler üzerindeki genetik determinantlar IgG'nin Gm antijenleridir ve antijen ile direkt ilişkilidir. Nongenetik determinantlar ise tüm bireylerin IgG'lerinin bazı alt sınıflarında bulunur. Bu yüzden IgM RF otolog IgG genetik ya da non-genetik antijenik determinant bazına göre etkileşir.

RA'lı hastalarda IgM RF'ler Gm(a) (ya da Gm1 olarak da adlandırılabilen) ve diğer bir çok Gm antijenik determinantlara spesifisite gösterirler. Ayrıca bazı RF'ler çeşitli IgG alt sınıflarında ortak olarak bulunan antijenlere spesifiktirler. Bu tipteki antijenik determinantlara da Ga antijenler denir. IgM RF'ler en çok bu determinantlara spesifiktir.

IgM RF'ler üzerinde yapılan hemaglütinasyon-inhibisyon deneyleri RF'ler tarafından tanınan IgG alt gruplarının Fc fragmanları bölgelerinde lokalize olan çeşitli antijenik determinantların (Gm gruplarının) bulunduğunu ortaya koymuştur (Tablo 3).

Subklas	Ağır zincir sabit bölge	
	CH2	CH3
IgG1	Ga	Gm(a)
	Non-b1	Gm(x)
IgG2	Ga	Non-a
	Non-b1	
IgG3	Gm(g)	Non-a
	Gm(b1)	
	Non-b1	
IgG4	Ga	r4Non-a

Tablo 3: RF'lerle etkileşen IgG antijenlerinin lokalizasyonu

Tabloda görüldüğü gibi bir çok RF IgG1, IgG2 ve IgG4 moleküllerindeki Ga determinantlarına spesifiktir. Aynı şekilde IgG1'in C₂ bölgesinde lokalize olan Gm(a) ve Gm(x) determinantlarına ve IgG3'ün C₂ bölgesinde bulunan Gm(b1) ve Gm(9) determinantlarına spesifik determinantlar da bulunmaktadır. Ek olarak "non-a" ve "non-b1" izoallotipik determinantlarına spesifite gösteren RF'ler de vardır.

Romatoid anti-Gm faktörler uygun Gm pozitif IgG ile kolayca inhibe edilirken ısı ile agrege edilmiş Gm negatif IgG ile de reaktive olur. Bunun tersine sağlıklı kişilerde ortaya çıkan anti-Gm antikolar böyle denatüre Gm negatif IgG'ler ile çok zayıf etkileşim göstermiştir.

Özetlemek gerekirse RF ile etkileşen 5 antijenik bölge vardır. Bu bölgeler 4 IgG alt grubunda ve Fc fragmanlarının homolog bölgelerinde yerleşmiştir. Bunlardan üç tanesi (Gm[b1]/non-b1, Gm[9], Ga) C₂ domaininde, iki tanesi de (Gm[a]/non-a ve Gm[x]) C₃ domaininde lokalize olmuşlardır. Ga ve Gm(a)'ya spesifik RF'ler en çok görülenlerdir(87).

3.2. Romatoid Faktörlerin Biyolojik Özellikleri:

Yapılan araştırmalar sonucunda IgM RF'lerin komplemanı aktive edebildiği gösterilmiştir. Isı ile agrege IgG insan komplemanını fikse etmez; fakat IgM RF'ler için etkili bir polivalan antijendir. IgM RF'lerin bu agregatlara eklenmesi sonucunda insan komplemanı tüketilir. IgM RF'lerin koyun eritrositlerine eklenmesi kompleman fiksasyonunu ve hücre lizisini artırır. Ayrıca IgM RF'lerin IgG içeren solubl immün komplekslere bağlanması kompleman fiksasyonunu artırır. Son olarak, agrege insan IgG ile kaplı eritrositler IgM RF ve insan kompleman eklenmesi ile lize olur. Bütün bunlar IgM RF'lerin klasik kompleman yolunu aktive ettiğini göstermiştir.

IgM RF'lerin IgG molekülleri içeren immün komplekslere bağlanması fagositik hücrelerde bu komplekslerin Fc reseptörü ile olan karşılıklı etkileşimlerini azaltabilmektedir. Aynı şekilde IgM RF'lerin IgG molekülleri ile uyarılmış hücrelere bağlanması bu hücrelerin fagositlere bağlanmalarını azaltabilir. Çünkü fagositlerde IgM reseptörleri bulunmaz. Örneğin IgM RF'lerin IgG sınıfı antikolar ile kaplı bakterilere eklenmesi sonunda bu bakterilerin kompleman eksikliğinde polimorfonuklear lökositler tarafından fagositozu azalmıştır. Bununla birlikte IgM RF'lerin IgG sınıfından antikolar ile uyarılmış hedef hücrelerinin öldürülmesini antikora bağımlı cell mediated

sitotoksiste (ADCC) ile bloke ettiği bulunmuştur. Bu çalışmada hedef hücredeki IgG moleküllerine bağlı IgM RF'ler "killer" hücreler üzerindeki Fc reseptörleriyle IgG moleküllerinin reaksiyonlarını ortadan kaldırmıştır(104).

Poliklonal B hücresi aktivatörleri olan EBV ve Pokeweed mitojenin RA'lı hastalarda RF sentezini arttırdığı gösterilmiştir. RA'lı hastalarda düşük konsantrasyonlarda insan agrege IgG'nin periferik kan lökositlerinin IgM RF üretimini uyardığı, ancak aynı etkiyi normal insanların lenfositlerinde gerçekleştirmediği bulunmuştur(118).

3.3. Romatoid Faktörlerin Fizikokimyasal Özellikleri:

3.3.1. IgM RF: IgM RF'ler fizikokimyasal özellikleri bakımından diğer IgM moleküllerinden farklı değildir. Yapısal olarak molekül ağırlıkları 185.000 dalton olan beş özdeş alt gruptan oluşmuş 900.000 dalton ağırlığında bir moleküldür. Bu yapı disülfid bağları ile birleşerek pentamerik bir yapı oluşturur. Her subunit, iki hafif (kappa ya da lambda) ve iki μ tip ağır zincirden oluşur. Subunitler $C\mu 3$ domainleri arasında ortak disülfid bağları taşırlar. μ zincirler, δ zincirlerden amino asit dizilimleri ve sabit bölge domain sayıları ile farklılık gösterirler. Bir çok IgM molekülü J (joining) zincir içerir. J zinciri IgM yapısında iki ayrı monomerik subunitin iki μ zincirlerinin sondan bir önceki sistein yapılarına disülfid bağları ile bağlanır. Bu zincir polimerik IgA'nın yapısında da vardır(138 b). Analitik ultrasantrifügasyon ile bu subunitlerin immünglobulin ile soluble kompleksler oluşturduğu gösterilmiştir. IgM'in 10 antijenik bağlanma bölgesine sahip olduğu halde sitokimyasal çalışmalarla IgM RF'lerin yalnızca 5 IgG molekülü bağlayabildikleri ortaya çıkarılmıştır. Bunun nedeni atom düzenlenmesindeki engeller olabilir. Monoklonal RF'ler ile yapılan çalışmalar bazı durumlarda bunun doğru olabileceğini göstermiş ve molekülde sadece 5 reaktif bölge saptanabilmiştir; oysa triptik degradasyon ile üretilen Fab fragmanlarının sayısı 10 tane potansiyel bağlanma bölgesinin bulunduğunu göstermiştir.

3.3.2 IgG RF: Romatoid artritli hasta serumlarından izole edilen IgG RF'ler elektroforetik olarak heterojendir ve kappa ve lambda tip hafif zincir bağlayan moleküller içerirler. Aktivite, molekülün Fab fragmanı üzerindeki bir bölge ile ilişkilidir. IgG RF'ler kendileri ile ya da başka IgG molekülleri ile etkileşirler. Diğer IgG molekülleri ile IgG RF'lerin reaksiyonu bazı RA'lı hastaların serum ve eklem sıvılarında görülen "intermediate"

immüinkompleksleri oluşturur. IgG RF'ler normal IgG molekülleri ile etkileşebildikleri gibi daha çok kendileri ile etkileşirler.

3.3.3 IgA RF: IgA molekülleri polimerik ve ya monomerik yapıda olabilirler. İnsanlarda IgA'nın % 80'den daha fazlası monomeriktir. Ancak bir çok diğer memelide IgA, genellikle dimerden oluşan polimerik bir yapıya sahiptir. İnsanda serum IgA'larının bir çoğunun monomerik olmasına karşın sicca sendromlu hasta serumları ile yapılan çalışmalarda solid-faz RIA ile IgA'ların % 64-85'i polimerik IgA olarak bulunmuştur. Aynı şekilde RA'lı hasta serum ve eklem sıvılarına jel kromotografik fiksasyonu ile yapılan çalışmalarda IgA RF'lerin % 75'inden fazlasının (solid-faz RIA ile gösterilerek) polimerik IgA olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte düşük molekül ağırlıklı monomerik IgA RF'lere de rastlanabilir. RA serum ve eklem sıvılarındaki IgA RF'lerin IgA1 subgrubuna ait olduğu bulunmuştur(87).

3.4 Romatoid Faktörlerin Heterojenitesi:

Akraba olmayan bireylerin RF'lerindeki kros-reaktif idiotipler ilk kez 1973 yılında Kunkel ve arkadaşları tarafından mikst kryoglobulinemili hastalardan izole edilen monoklonal IgM RF'lerde saptanmıştır. Bu monoklonal IgM RF'lerde "Wa" ve "Po" adı verilen iki kros-reaktif idiotip bulunmuştur(116). Bu konuda yapılan diğer çalışmalar RF'ler üzerindeki Kros-reaktif idiotiplerin (CRI) poliklonal RF popülasyonları arasında ve bazı monoklonal ve poliklonal RF'ler arasında da bulunabileceğini göstermiştir. İnsan monoklonal IgM RF'lerin yaklaşık % 60'ı CRI'lerin iki büyük grubundan biri olan Wa grubunu içerirken % 20'si Po grubundandır. Wa ve Po pozitif RF'lerin amino asit zinciri analizleri sonucunda Wa grubunun VL bölgeleri ile homoloji gösterirken, Po grubunun homolog VH bölgeleri ile ortak olduğu bulunmuştur. Bu RF'lerin VL bölgeleri V_{κ} 'nın V_{κ} IIIb sub-sub grubuna aittir ve "Humkv325" germline geni ile kodlanır(11). Po grubu ise VHIII sub grubu ile ilişkilidir. Romatoid sinovyal dokularda Wa kros reaktif idiotipe spesifik antikorlarla etkileşen immünglobulinleri üreten plazma hücreleri bulunduğu saptanmıştır.

Wa pozitif IgM- V_{κ} IIIb RF'ler hafif zincirlerindeki ikinci ve üçüncü komplementer bölgede yerleşmiş primer yapıya bağımlı ve genetik olarak saptanmış PSL2 ve PSL3 idiotiplerini de eksprese ederler(50). Bunlar Humkv325 geninden alınan proteinler için çeşitli spesifiselerde serolojik markerlerdir(11).

Üçüncü grup kros reaktif idiotip ise Agnello ve arkadaşları tarafından saptanan "Bla"dır(3). Bla kros-idiotip antijen DNA-histon'a karşı antikor aktivitesi gösteren bir grup RF'de bulunmuştur(11). Wa CRI gibi Bla idiotip de hafif ve ağır zincirlere gereksinim duyan konformasyonel bir antijendir. Bla pozitif monoklonal RF'ün hafif zincirinde V_{KIIIb} hafif zincirler gibi ikinci komplementer bölge amino asit zincirine sahiptir ve PSL2 CRI pozitifdir; ancak PSL3 CRI negatiftir. Bla pozitif hafif zincirin büyük ihtimalle V_{KIII} sub-grubunun bir üyesi olduğu öne sürülmektedir. Bla hafif zincir amino-terminal uçtaki amino asit yapısının *Humkv325* geni ile özdeş olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle Bla hafif zincir V_{KIIIb} olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca Bla monoklonal RF'ün hafif zincirinde PSL2 idiotipi bulunması bunların *Humkv325* geni ürünü olabileceğini göstermektedir. Ancak PSL3 idiotip bulunmaması bu hafif zincirlerin somatik mutasyona uğramış *Humkv325* ya da Bu V_{KIII} ailesinde bu genden farklı başka bir genin ürünü olabileceğini düşündürmektedir(11).

Bunlardan başka son zamanlarda ELISA ve Western blotting çalışmaları ile bir dördüncü kros-reaktif idiotip grubu ortaya çıkarılmıştır. Monoklonal antikor 6B6.6, ilişkisiz bireylerin çeşitli monoklonal Igm RF'lerindeki kappa tipi hafif zincirlerinde bu CRI ile etkileşmektedir. Bu 6B6.6 CRI KIIa sub-sub grup hafif zincir ile ilişkilidir. Bu yüzden Wa, Po ve Bla CRI pozitif RF spesifisiteleri ile hiç bir ilişkisi yoktur ve monoklonal antikor 17.109 ile gösterilebilen KIIIb ilişkili CRI'lerden farklılık gösterir. 6B6.6 CRI pozitif hastaların serum ve eklem sıvılarının yaklaşık % 50'sinde poliklonal RF'ler üzerinde bulunmuştur. Ancak normal bireylerin serum ve eklem sıvılarında poliklonal RF ile ilişkili 6B6.6 CRI çok az oranlarda görülmüştür. RA serumlarında 6B6.6 CRI en çok IgM RF ve daha az oranlarda olmak üzere IgG ve IgA RF'lerde de görülmüştür. Bununla birlikte 6B6.6 CRI sayısı serum ya da sinovyal sıvı IgM RF'lerin miktarları ile ilişkili değildir (144).

3.5. Romatoid Faktörlerin Saptanması:

RF'lerin saptanması için kullanılan metodların birçoğu IgG kaplı hücreler ve partiküllerin aglütinasyonuna ya da flokülasyonuna dayanmaktadır. Lateks testi, bentonit flokülasyon testi, duyarlı koyun-hücre testi (SCAT ya da Waaler-Rose) ve duyarlı insan-D-hücre aglütinasyon testi en çok kullanılan testlerdir(104).

3.5.1. Aglutinasyon Teknikleri:

SCAT, teknik olarak çok kullanılan bir testtir. Ancak koyun eritrositlerindeki varyasyonlar ve deneysel farklılıklar (duyarlı hücrelerin konsantrasyonlarındaki, anti-sheep eritrosit antikorun uyarım dozundaki, reaksiyonun zaman ve ısısındaki değişiklikler) bu testin duyarlılığını etkiler. Bu test RF'lerin eritrositler üzerinde tavşan IgG'leri ile etkileşimleri temeline dayanır. Eritrositler koyun eritrositlerine karşı tavşan antiserumları ile duyarlı hale getirilir. Bu test lateks ve bentonit flokulasyon testlerinden daha az duyarlıdır; fakat RA için daha spesifiktir.

Lateks testi, SCAT testinin değişik bir şeklidir. Bu testte, koyun eritrositleri yerine polistren lateks partikülleri (ya da bentonit) kullanılır. Sensitizasyon için insan IgG'si kullanılır. Optimal sonuçlar için IgG preparasyonları bazı agrege materyaller (Cohn Fraksiyon II gibi) içermelidir. Serumlar alkolin fosfat tampon ile seyreltilirler ve IgG kaplı lateks partikül süspansiyonları ile inkübe edilirler (87).

Lateks fiksasyon testiyle RF'ler genel popülasyonun % 1-4'ünde pozitif bulunurken, SCAT ile genel popülasyonun % 1'inde saptanmıştır. Lateks fiksasyon testi ile 65 yaş üzerindeki RA'lılarda RF % 20 civarında pozitif bulunmuştur (100).

Pasif hemaglutinasyon testinde ise antijen (yani IgG) daha önce adsorptif kapasitenin artması için dilüe tannik asit ile muamele edilmiş koyun eritrositleri üzerine adsorbe edilir.

3.5.2. Presipitasyon Teknikleri:

Epstein ve arkadaşları Cohn-Fraksiyon II IgG'de RF ile prespite olabilen materyalleri göstermişlerdir. Farklı Cohn-Fraksiyon II preparasyonlarının RF'ü prespite etme kapasiteleri farklıdır. Bu preparasyonlar kapiller bir tüpte RF(+) serum üzerine bir tabaka şeklinde yayılırsa 2-30 dakika arasında presipitasyon görülür(87).

3.5.3. İmmünoadsorbsiyon Teknikleri:

RF'lerin insolubulize IgG üzerine adsorpsiyonu serum ve eklem sıvılarında radialimmunodiffuzyon (RID) IgG ve IgA RF'lerin ölçülmesini sağlayabilir.

İmmünassaylar: Radioimmunoassay (RIA), RF'lerin ölçümü için oldukça sensitif

ve spesifiktir. Bu metodların en temel özelliği karşılaştırılabilir olmasıdır. İnsan ya da hayvan orijinli IgG, bir test tübünde adsorbe ettirilerek solid-faz IgG hazırlanır ve yıkanır. Test serum, RF'lerin bağlanması için solid-faz IgG ile inkübe edilir. Daha sonra solid-faz test sistem bağlanmayana serum proteinlerinin uzaklaştırılması için yıkanır. Daha sonra bağlanma gösteren RF'ler IgM, IgA veya IgG'ye karşı spesifik antiserumlarla muamele edilerek IgM RF, IgA RF ve IgG RF'lerin varlığı saptanabilir. Değerlendirmeler çeşitli yaklaşımlarla (örneğin radyo-aktif işaretli spesifik antikolar [radioimmunoassay] ya da enzim bağlı spesifik antikolar [ELISA] kullanılarak) yapılabilir (104).

3.6. Romatoid Faktörlerin Hastalıklardaki Yeri:

RF'ler, RA'de diagnostik bir parametre olmasına rağmen, bir çok başka hastalık grubunda da gösterilmiştir. RA'lı hastaların yaklaşık 3/4'ü serumlarında RF taşımaktadır. RF, RA'den başka diğer romatolojik hastalıklarda (sistemik lupus eritematosus, skleroderma ve polimiyosit/dermatomiyosit) da bulunmuştur.

Konsantrasyonları seropozitif hastalardan önemli derecede düşük olmasına karşın, RF'ler sensitif RIA teknikleri kullanarak seronegatif hastalıklarda da gösterilebilir. Seropozitif RA ile HLA D4/DR4 arasında bir ilişki mevcuttur. Ancak bu ilişki seronegatif RA hastalarında gösterilememiştir. Subakut bakteriyel endokardit'li hastaların yaklaşık % 50'sinde RF saptanabilir. Genellikle IgM ve IgG sınıfından olan bu RF'lerin düzeyi hastalığın iyileşme fazında azalır.

RF'ler ayrıca lepra, tüberküloz, sifilis gibi kronik bakteriyel infeksiyonlarda, rubella, infeksiyöz mononükleoz, sitomegalovirus, influenza gibi viral hastalıklarda, parazitik infeksiyonlarda, sarkoidoz, pulmoner interstisyel hastalık ve karaciğer hastalıkları gibi etiyolojisi bilinmeyen kronik inflamatuvar hastalıklarda, mikst kryoglobulinemide ve hipergamaglobulinemik purpurada da görülebilmektedir(87).

Bunlardan başka geçici RF sentezi sağlıklı bireylerin ikincil immün yanıtlarına eşlik edebilir(144).

4. İMMÜN KOMPLEKSLER

Doku hasarının immünolojik mekanizmaları 5 grupta toplanabilir:

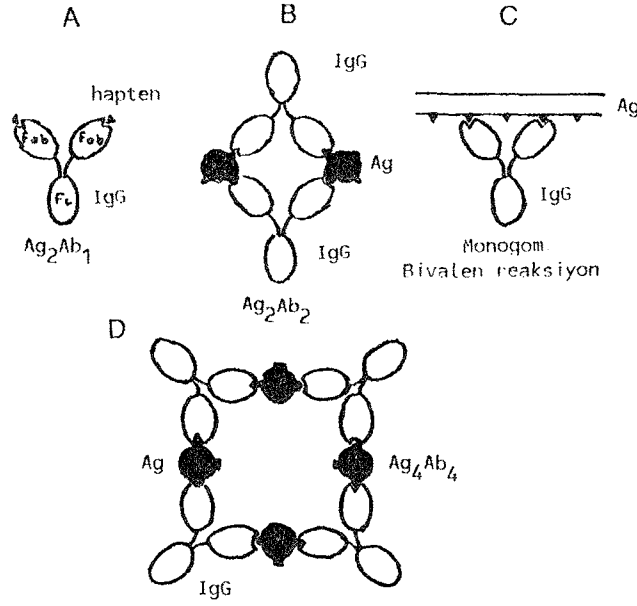
- 1- IgE aracılığı ile anaflaksi,
- 2- Komplemanın neden olduğu hücre lizisi,
- 3- İmmün kompleks aracılığı ile yıkım,
- 4- Duyarlı lenfositler ya da ADCC ile olan hücre aracılığı ile immün yıkım,
- 5- Biyolojik olarak aktif moleküllerin antikor aracılığı ile nötralizasyonu.

İmmün komplekslerin neden olduğu hastalıklarda doku yıkımı dokuda antijen-antikor komplekslerinin bulunmasından ileri gelmektedir. Kan damarlarının basal membranları, glomerül, choroid pleksus ve diğer başka organlar, immün komplekslerin depolandığı yerlerin başında gelir. İmmün kompleks dolaşımdaki antikor ile doku antijeni arasında olabileceği gibi, dolaşımdaki antijen ve antikor arasında da oluşabilir. İmmün kompleksler tarafından ortaya çıkarılan hastalıkların ortak patojenik mekanizmaları vardır. Ancak bir çok vaka, immünkomplekslerdeki antijenlerin farklı orijinlerinden dolayı farklılık gösterir. İmmün kompleks bozukluklarının ortak patolojik mekanizmaları nedeniyle bu hastalıkların bazı klinik belirtileri de birbirine benzemektedir(105).

4.1 İmmün Komplekslerin Doğası:

Bilindiği gibi immün komplekslerin en önemli bileşenleri antijen ve antikorlardır. İmmün kompleks içindeki antijen veya antikorların sayısı birleşme özelliklerine ve her birinin konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir. İmmün komplekslerin biyolojik özellikleri kompleksleri oluşturan moleküllerin yapısı ve her bir kompleksteki reaktanların sayısı ile ilişkilidir.

Antijen-antikor birleşimi ortaya çıktığında çok sayıda immünkompleks bir kafes yapısı oluşturabilir (Şekil 4).



Sekil 4: Çesitli kafes formasyonlarında immün kompleksler. A- İki küçük monovalan molekül (hapten) ile bir antikorun etkilesimi, B- Multivalan antijenler ile IgG moleküllerinin etkilesimi sonucu olufan basit bir immün kompleks kafes yapısı, C- Tekrarlayan antijenik determinantlarla bivalent etkilesim, D- İki farklı özellikteki antikor ile iki farklı antijenik determinantin etkilesimi sonucu ortaya çıkan geniş bir kafes formasyonu.

Bir çok antikorun bağlanma değeri genelde ikidir. Monovalan bir antijen ise sadece Ag2Ab1 kompleksi oluşturabilir. Multivalan antijenler ise büyük immün kompleks kafesleri oluşturabilir. Bundan başka antikorların afiniteleri de immün komplekslerin kafes oluşumlarını etkiler. Örneğin, düşük afiniteli antikorlar küçük kompleksleri oluştururken yüksek afiniteli antikorlar büyük immün kompleksleri üretirler.

4.2. İmmün Komplekslerin Biyolojik Özellikleri:

İmmün komplekslerin başlıca özellikleri şöyle sıralanabilir:

- 1- Kompleman sisteminin aktivasyonu,
- 2- Hücre reseptörleri ile etkileşmeleri,
- 3- Dokularda depolanabilmeleri.

Bu fonksiyonlar, immün kompleksdeki antikorun türüne ve kompleksin kafes yapısının derecesine bağlıdır. İmmün komplekslerin immün yanıt etkisi ve lenfosit fonksiyonlarını değiştirmesi gibi diğer özellikleri günümüzde tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Bununla birlikte immün kompleks aracılığı ile poliklonal B hücresi aktivasyonu otoimmün bozukluklarda önemli bir özellik taşımaktadır. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar sonunda antijen-antikor komplekslerinin antijene bağımsız B hücresi

proliferasyonunu ve immün komplekslerin bileşeni ile ilişkisi olmayan spesifik antikorların sentezini başlattığı bulunmuştur(115).

4.3. İmmün Kompleksler İle Kompleman Fiksasyonu:

İmmün kompleksler ile kompleman fiksasyonu, kompleman aktivasyonunun klasik ya da alternatif yolları ile olabilir. Klasik yol ile kompleman aktivasyonunun ilk adımı C1q'nun immün komplekslere bağlanmasıdır. Mevcut bulgular immün komplekslerin C1q'ya multivalan bağlarla bağlandığını göstermiştir. IgG moleküllerinin klasik yol aracılığı ile kompleman aktivasyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Bu yüzden IgG moleküllerinin sayısının artışı immün kompleksleri C1q bağlama ve kompleman sistemini aktive etme açısından daha etkili hale getirir. Bundan başka hücre yüzeyindeki IgM molekülünün klasik yoldan komplemanı aktive ettiği bilinmektedir. İmmün kompleks oluşturan diğer antikor sınıfları komplemanı fikse etmezler.

Alternatif kompleman yolu ise C3'ün aktive edilerek C3b üretilmesi ve bunu izleyen klasik kompleman yolunun aktive edilmesi şeklinde kullanılır.

4.4. İmmün Komplekslerin Hücre Yüzeyi Reseptörü İle Etkileşimleri:

İmmün komplekslerin hücreler ile primer etkileşimleri, nötrofiller, monositler (doku makrofajları, karaciğerdeki Kupfer hücreleri dahil), plateletler ve bazı lenfosit popülasyonlarındaki Fc reseptörleri aracılığı ile olur. Bu reseptörler IgG Fc'ye spesifiktir ve diğer immünglobulin sınıfları ile etkileşime girmezler. IgG moleküllerinin C₃ domaininin karboksi terminal sonu, bu hücrelerin Fc reseptörleri ile etkileşir. Bu Fc reseptörlere ek olarak fagositik hücreler ve bazı lenfositler kompleman reseptörlerine de sahiptir.

İmmün komplekslerin kafes yapısı, Fc reseptörleri ile etkileşimlerini kolaylaştırır. Monomerik IgG molekülleri bu reseptörlere zayıf bir şekilde bağlanırlar. Yeterli büyüklükte kafes oluşturmuş komplekslerin reseptörlere yapışması kolaylaşır ve bunların fagositozu ile sonuçlanır. Ancak monovalan ya da divalen antijenlerle oluşturulmuş küçük yapıları immün kompleks kafesleri birleştikleri nötrofil ya da monositler tarafından fagosite edilmezler. Büyük kafes oluşturan immün kompleksler (ikiden fazla antikor içeren kompleksler) Fc reseptörüne yapıştıktan sonra fagositoza

uğramadan önce daha geniş bir kafes oluşturmak için yoğunlaşırlar. Bu yoğunlaşma, monosit yüzeyindeki Fc reseptörü ile etkileşme esnasında soluble immün komplekslerin artan lokal konsantrasyonlarından dolayı olmaktadır(105).

Monomerik IgG1 ve IgG3, nötrofil ve monositlerde immün komplekslerin Fc reseptörüne yapışmasını inhibe etmede etkili olurken IgG2 ve IgG4 etkili olmamaktadır. Eğer immün kompleksler komplemanı aktive edecek kadar yeterli büyüklükte kafes yapısına sahipse immün komplekse bağlı C3b, monositler üzerindeki C3b reseptörleri ile etkileşerek bunların fagositozlarını kolaylaştırır. İnsan eritrositleri, immün komplekslerin bağlanmalarına aracı olan C3b reseptörlerine sahiptir. SLE'li hastaların eritrositlerinde bu reseptörler çok azdır ve bunun kalıtsal bir defekt olduğu düşünülmektedir(105).

4.5. İmmün Komplekslerin Dokuda Birikimi:

Organlarda immün komplekslerin varlığı inflamasyon ve doku hasarı ile ilişkilidir. Glomerül, renal peritubular kapillerler, renal tubular basal membranlar, bir çok organdaki küçük ve büyük kan damarları, dermal-epidermal bileşke, choroid pleksus, tiroid foliküllerinin basal membranları, sinovyal dokuların interstisyel sahası ve artikular kıkırdakda immün kompleksler birikebilmektedir. Bu bölgelerde immün kompleksler, ya dolanan immün komplekslerin depolanmasından ya da lokal antijen ile antikor birleşiminden ileri gelmektedir(105).

Yapılan çeşitli çalışmalar, RF'ün, immün komplekslerin fiziksel ve biyolojik özelliklerini modüle etmede önemli bir role sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Soluble immün komplekslerin IgM RF ile etkileşimlerinden sonra komplemanı fikse eden kuvvetli agregatlar oluştuğu gösterilmiştir.

IgG komplekslerin fagositlerle birleşmesi üzerine RF'lerin ne şekilde etkili olacağı bilinmemektedir. Ancak bazı IgG agregatlarının RF varlığında polimorfonükleer lökositler (PMN) ve makrofajlar ile birleştiği gösterilmiştir(87).

Dolanan immün kompleksler özellikle IgM RF ve IgG RF pozitif RA'lılarda sıkça görülmesine karşın, bunların düzeylerinin saptanmasının klinik açıdan faydası bilinmemektedir.

5.ROMATOİD ARTRİT (İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER)

Romatoid artrit (RA), romatizmal hastalıkların en büyük grubunu oluşturan yaygın, sistemik ve eklemden inflamasyon yapan bir bozukluktur. Otoimmün mekanizmaların bu hastalığın patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Artrit, eklemlerin sinovyal boşluklarına infiltre olan çeşitli hücreler (ve bunların soluble ürünleri) ile sinovyal hücrelerin etkileşimleri sonucu ortaya çıkar. Eklem lezyonlarının gerçek nedeni bilinmemektedir. Bilinmeyen bir ajan ya da mekanizma ile sinoviumda inflamatuvar bir yanıt başlar. Küçük kan damarları hasar görür, lenfositler ve monositler perivasküler alana toplanır. CD4+ T hücreler ilk inflamatuvar lezyonlarda sayıca çoktur. Makrofaj benzeri sinovyal (lining) hücreler ve özellikle parmak eklemlerinde sıkça bulunan sinovial fibroblastlar (ya da sinovial dendritik hücreler) proliferer olur ve bol miktarlarda klas II MHC antijenleri ekspres ederler. Bunlar helper T hücrelerini aktive ederler ve MHC antijenlerini ekspres etmeleri için yol gösterirler. Aktive olan T helper hücreler sinoviyuma infiltre olmuş B hücrelerini immünglobulin üretmek için uyarabilir. Lokal olarak üretilen bu antikörlerin bir çoğunun spesifitesi bilinmemektedir; fakat bazı IgG RF'ler eklemden immün kompleks oluşturmak için başka IgG moleküllerine bağlanmaktadır. İmmün kompleksler kompleman kaskadını aktive eder, böylece vasküler permeabilite artımına, inflamatuvar hücrelerle infiltrasyon ve nötrofil akımına neden olur. Polimorfonükleer lökositler ve fagositik sinovyal hücreler immün kompleksleri içine alarak uyarılırlar ve çeşitli lizozomal proteazlar, serbest radikaller ile prostoglandinler ve lipogenez yolunun inflamatuvar ürünleri gibi çeşitli arakidonik asit metabolitleri salınımı artar. Tüm bu solubl ürünler eklemden kollajen ve kartilaj matriksini hasara uğratar. Makrofajlar ayrıca, aktive T hücreleri tarafından üretilen çeşitli lenfokinler (örneğin IFN) tarafından da aktive olur. Makrofajlar plazminojen aktivatörleri ve kollajenazları üretmek ve proliferer etmek için sinovyal dendritik hücreleri ve kondrositleri uyaran IL-1'i üretir. Plazminojen aktivatörleri inflamasyonu olan eklemden plazminojenleri plazmine dönüştürür. Böylece fibrin, soluble ürünlerine dönüşür ve kollajenazları aktive eder. Lizozomal proteazlar eklemde kartilaj,

ligament ve tendonlarının matrikslerini oluşturan kollajen ve proteoglikanları bozarlar. Bu yüzden inflamatuvar infiltratlar, romatoid eklemden kartilaj ve diğer komponentlerde kronik bir granülomatoz lezyon oluşturan sinovyal hücrelerin proliferasyonunu başlatır.

Romatoid faktörler, RA'lı bir çok hastanın serumunda bulunmaktadır. Ancak RF, juvenil RA'lı (JRA) hastalarda sadece % 5-10 oranında pozitifdir. IgM RF'ler hastalık tanısında kullanılmasına karşın, eklem lezyonlarında rolü olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte IgM/IgG immün kompleksler RA'de sistemik vaskülitik komplikasyonları kolaylaştırır. RA'de serum IgG'nin C δ 2 bölgesinin azalan glikolizasyonu vardır(129). Bu anomali, hastalardaki B hücrelerinin azalmış galaktozil transferaz aktivitesi ile ilişkili olabilir. RF'lerin IgG'nin C δ 2-C δ 3 birleşme domainlerine bağlanmaları nedeniyle bu bölgedeki IgG'nin düşük galaktolizasyon anormalliği molekülü immünojenik hale getirebilir(129).

IgM RF'ler eksojen antijenlere yanıt sırasında normalde de üretilir. IgM ve IgG RF'ler RA'dan başka diğer hastalıklarda (özellikle kronik bakteriyel ve parazitik enfeksiyonlarda) görülebilir. Ancak bu bozukluklarda, RF'ler RA'dakinin tersine eklemler içinde üretilmezler.

HLA D bölgesi üzerine yapılan bir çok tarama DR ve DQ genlerinin, RA'nın klinik görüntüsüne yardımcı olabileceğini göstermiştir. DR antijenleri hafif RA'lılarda sık iken, DQ antijenlerine hastalığı şiddetli olan kişilerde sıkça rastlanmaktadır.

RA ile HLA DR4 sıklığı arasında önemli bir ilişki vardır. Şiddetli RA'lı hastalarda DR4 ile birlikte DQW7 de yüksek oranlarda bulunmaktadır(154). Buna karşılık, Wallin ve arkadaşları(171), Festenstein ve arkadaşları(43) ve Clarkson ve arkadaşları(31) RA'lı hastalarda DR4 ile ilişkili DQW7 antijenine rastlamamışlardır. Mc Cusker ve arkadaşları, hafif RA'lı hastalarda DR1'in yüksek oranlarda bulunduğunu saptamışlardır (107). DR1 ayrıca DR4(-) RA'lı hasta popülasyonlarında da oldukça yüksek oranlarda bulunmuştur. Bu nedenle DR1'in hastalığın şiddeti ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Fakat bunun tersine Olsen ve arkadaşları(126) DR1'in RF ve klinik durumla bir ilişkisi olmadığını öne sürmüşlerdir. Şiddetli RA'lı hastalar ile hafif RA'lı hastalar karşılaştırıldığında DR4'ün şiddetli hastalarda daha yüksek oranlarda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca DR4'ün subtipleri olan DW4 ve DW14 ise hem şiddetli, hem de hafif

RA'lı populasyonlarda önemli oranlarda artar(107). Bu antijen grubunun özellikle seropozitif RA'lılarda yüksek oranlarda arttığı saptanmıştır.(117).

Yapılan çalışmalar ile HLA antijenlerinin çeşitli etnik gruplara üye RA'lı hastalarda farklılık gösterdiği saptanmıştır. Örneğin DR4'ün subtipleri olan DW4 ve DW14, Kafkasya kökenli hastalarda yüksek oranlarda bulunurken DW15 Japon hasta gruplarında yükselir. Buna karşılık, Yahudi hastalarda yüksek oranlarda bulunabilen DR4 subtipi DW10 ile DW13'ün RA ile bir ilişkisinin olmadığı bulunmuştur. Yine Yahudi RA'lılarda DR1 yüksek oranlarda bulunabilir(107).

HLA-DR beta zincir moleküllerinin beta1 domaininin 3'ncü hipervariable bölgesindeki amino asit dizilimlerinin farklı RA'lı hastalarda homoloji gösterdiği bulunmuştur(52). Klas II MHC molekülünün N-terminal beta 1 domaininin bu bölgesi antijen bağlanma bölgesi oluşumunda ortak olduğu için, bu ortak dizinler RA'da otoimmün yanıt için önemli olabilmektedir. Klinik olarak aktif RA'lıların perifer kanlarında ve eklem sıvılarında yüksek oranlarda DR+ T hücresi bulunduğu saptanmıştır. Searles ve arkadaşları(147) ayrıca RA'lı hastalarda serum anti-DR antikorları varlığını göstermiştir. Bu antikorlar SLE ve Hodgkin's hastalığında da bulunmuştur. Searles ve arkadaşları bundan başka RA'lı hasta serumlarında anti-DR antikorlara karşı anti-idiotip antikorların bulunduğunu da göstermişlerdir(147).

Klinik aktivitenin DR+ T hücreleri ve anti-DR antikor varlığı ile pozitif bir ilişkisi varken, anti-idiotip antikorlar ile negatif bir ilişkiye sahiptir. Bu sonuçlar RA'de klinik aktivite ile DR+ T hücreler, anti-DR ve anti-idiotip antikorlar arasında bir ilişkinin olabileceğini göstermektedir(147).

5.1. Romatoid Artritte Otoantikorlar:

Konnektif doku hastalığı olan kişilerde, hastalığa spesifik ya da klinik semptomlarla ilgili çeşitli otoantikorlar bulunmaktadır. Bu antikorların saptanması, tanıda, prognozda ve tedavi metodunun saptanmasında önemli olabilmektedir.

RA'lı hasta serumlarında RF ve RANA (Romatoid Artrit Associated Nükleer

Antigen) antikorlar gibi bazı otoantikorlar saptanmıştır. Abe ve arkadaşları double immünodiffüzyon ile insan karaciğer supernatantlarını antijen olarak kullanarak "Hat-1" ve "Hat-2" adlı iki yeni otoantikor bulmuşlardır. Özellikle "Hat-1" antikorun RA'li hastalar için oldukça spesifik olduğu düşünülmektedir(1).

Bundan başka Hassfeld ve arkadaşları HeLa hücrelerinin soluble nükleer ekstratları ile yaptıkları immünoblotting analizler sonunda 95 RA'lı hastanın % 36'sının serumlarında molekül ağırlığı yaklaşık 33000 olan bir antijene karşı ortaya çıkan bir antikor grubu bulmuşlardır. RA33 adı verilen bu antijenin, RA serumları ile etkileşen ssDNA ya da histon gibi diğer nükleer antijenlerin tersine RA spesifitesi oldukça yüksek olduğu öne sürülmüştür (62).

Bir çok araştırmacı, pasif hemaglutinasyon, radioimmunoassay, immunofloresans ve ELISA gibi çeşitli metodlar kullanarak RA'lı hastaların serum ve eklem sıvılarında çeşitli tiplerde kollajenler ile reaksiyon veren antikorlar saptamışlardır (160).

RA'li hastalarda doğal (nativ) tip II kollajene karşı antikor sıklığı % 3-71 arasında bulunmuştur. Bu hastalarda IgM ve IgA sınıfından anti-kollajen tip II antikorlara rastlansa bile, genelde IgG sınıfından antikorlar daha sıktır. IgG1 ve IgG3 bu antikorların en sık görülen subsınıflarıdır. Diğer doğal kollajenlere karşı antikorlar RA'lı hastaların eklemlerinde % 2-3 arasında bulunurken, denatüre tip I ve denatüre tip XI kollajene karşı antikorlar yaklaşık % 15 oranında pozitifdir (113). Morgan ve arkadaşları da RA'lı hastalarda doğal ve denatüre kırıldak kollajenlerine (tip II, IX ve XI) ve tip I kollajene karşı antikorları saptamışlardır (114). Bu tip kollajenlere karşı antikorlar genellikle anti-doğal tip II kollajen pozitif hastalarda bulunur. Terato ve arkadaşları ELISA ile RA'lı hasta serumlarının yaklaşık % 15'inde Tip I ile hiç bir şekilde kros-reaksiyon vermeyen spesifik anti-tip II kollajen antikorları bulunduğunu göstermişlerdir(160).

Denatüre kollajenlere karşı oluşan antikorlar doğal kollajene karşı oluşan antikorlardan daha yaygındır. RA'de anti-tip II kollajen antikorla hastalık arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak bazı çalışmalar bu antikorlar ile hastalık aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar ayrıca anti-kollajen antikorların uzun hastalık süresi; kollajenlere yanıtın ise ve hastalığın şiddetiyle ilişkili olabileceğini

öne sürülmüştür(160).

Anti-doğal tip II kollajen antikoruna sahip RA'li hastalar genetik bir alt grup oluşturabilirler. Bu hastalarda HLA-DR3 ve DR7 (ya da her ikisi birden) veya DR2 antijenleri büyük ölçüde artmıştır(113). Ayrıca HLA-DRW4 pozitif RA'lı hastaların da in-vitro kollajene bir yanıt oluşturduğu ancak HLA-DRW4 pozitif normal bireylerde de böyle bir aktivasyonun olduğu gösterilmiştir.

5.2. Sitokinler ve Romatoid Artrit:

Sitokinler, RA'de inflamasyon ve eklem yıkımının önemli mediatörleri olarak kabul edilirler. Bir çok in-vitro ve in-vivo çalışmada, sitokinlerin, dokulara hasar veren enzimlerin salınımından sorumlu hücre-hücre etkileşimlerinin düzenlenmesinde etkili oldukları gösterilmiştir.

Romatoid eklemde klas II MHC (HLA-DR) kısıtlı antijen sunan hücreler, T hücrelerini IFN-gama ve diğer sitokinlerin salınımı için uyarırlar. T ve diğer lenfoid hücrelerdeki bilinmeyen faktörlerin, makrofajları IL-1, TNF α ve IL-6 sentezi için uyardığı saptanmıştır. Alternatif bir hipoteze göre ise sinovyal makrofajlar preaktivasyon halindedirler ve devamlı indüksiyon olmadan sitokin salarlar; ya da bunlar parakrin ya da otokrin bir uyarı oluşturabilirler. Örneğin yapılan çalışmalarda makrofajlar tarafından salınan TNF α , kültüre insan romatoid sinovyal hücrelerinde IL-1 üretiminin indüksiyonundan sorumlu bulunmuştur(21).

IL-1 ve TNF α , artiküler kıkırdakta yerleşmiş bulunan kondrositler ve sinovyal fibroblastlardan kollajenaz ve diğer nötral proteazların üretimini indükleyebilirler. Bu enzimler kıkırdak yıkımı ile sonuçlanan proteoglikanların ve kollajenin degradasyonunu sağlarlar. GM-CSF, makrofajlarda ve diğer antijen-sunan hücrelerde HLA-DR ekspresyonunu arttırarak hücre-hücre etkileşimini büyütür(Tablo 4).

Faktör	Etki
IL-1	Hücre migrasyonu, doku yıkımı
TNF- α	IL-1'e benzer etkiler
IL-6	IL-1 ve TNF- α 'nin indüksiyonu; akut faz proteinlerin ve immünglobulinlerin üretimi
GM-CSF	HLA-DR ekspresyonunun artışı ve monositlerden IL-1 üretimi
PDGF	Fibroblast proliferasyonunun uyarılması
TGF-beta	Matriks üretiminin uyarılması ve immünsupresif etki

Tablo 4: RA'de sitokinlerin etkileri

5.2.1. İnterlökin-1 Etkisi:

IL-1, genellikle monosit ve makrofajlar tarafından salınan 17 kd'luk bir sitokindir. Endotelial hücreler, keratinositler, mesengial hücreler, astrositler, B lenfositleri ve aktive T lenfositleri de IL-1 üretebilir. IL-1'in alfa ve beta olmak üzere iki formu vardır. IL-1 α , membrana bağlı molekül olarak fonksiyon gösterir. IL-1 alfa ve IL-1 beta hedef hücrelerde aynı reseptöre bağlanabilir ve aynı biyolojik aktiviteye sahip olabilir.

IL-1, RA'li hastalarda immün ve inflamatuvar hücrelerde çeşitli lokal etkilere sahiptir. Bu etkiler: T ve B hücre fonksiyonlarının artırılması; nötrofillerin, lenfositlerin ve monositlerin kemotaksisi; fibroblastların proliferasyonu ve sinovyal fibroblastlar ve kondrositler tarafından prostoglandin E2 (PGE2) ve kollajenaz salınımıdır. Ayrıca IL-1, diğer kemoatraktanların sitokinleri indüksiyonu yolu ile de kemotaksisi indirekt olarak arttırabilir. PGE2 ve kollajenaz üretiminin IL-1 ile indüklenmesi sonucu hastalığın geç dönemlerinde kemik rezorpsiyonu ve kırıkta harabiyeti ortaya çıkar. Ayrıca IL-1, Platelet Derived Growth Faktör (PDGF) indüksiyonu ile fibroblast proliferasyonunu uyararak eklem hasarını ve fibrozisi arttırabilir.

Bunlardan başka IL-1, kollajen üretiminde değişiklik yapabilir: tip II kollajen sentezini azaltırken tip I ve tip III kollajen sentezini arttırır. Eklem kırıktağında tip II kollajenin

önemli bir destekleyici etkisi olduğu için, IL-1'in bu supresif etkisi romatoid eklemi zayıflatır.

Dolayısıyla IL-1, RA'de doku hasarına neden olabilen önemli bir mediatördür(7).

5.2.2. TNF α Etkisi:

TNF α , genelde monosit ve makrofajlar tarafından salınan 17 kd'luk bir başka sitokindir. Hedef hücrelerde farklı reseptörlere bağlansa bile, IL-1 ile ortak bir çok biyolojik aktiviteye sahiptir. Örneğin sinovyal fibroblast ve kondrositler tarafından in-vivo kollajenaz ve PGE2 üretimini uyarır.

Seropozitif RA'lilerde eklem sıvılarının % 50'sinden fazlasında TNF α 'ya rastlanmıştır.

5.2.3. İnterlökin-6 Etkisi:

IL-6, monositler, T lenfositleri ve fibroblastlar tarafından üretilen 26 Kd'luk bir sitokindir. IL-1 ve TNF α , IL-6 sentezini indükleyebilir. Ayrıca IL-6'nın biyolojik aktiviteleri IL-1 ve TNF α 'nın aktivitelerine benzer. Ancak farklı olarak IL-6, kondrositler ve sinovyal fibroblastlarda PGE2 ve kollajenaz üretimini uyarmazlar. Hatta IL-6 in-vitro bu hücrelerde IL-1 tarafından indüklenen PGE2 üretimini bloke edebilir.

RA'li hastaların inflamatuvar eklem sıvılarında yüksek düzeylerde IL-6 bulunmaktadır. Bu eklem sıvılarındaki IL-6 düzeyi IL-1 ve TNF-6'nın düzeylerinden daha fazladır ve bu, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve akut faz proteinlerin artması gibi hastalık aktivitesinin sistemik parametreleri ile ilişkilidir(15). Romatoid sinovyumda immünohistolojik boyanmalar IL-6'nın öncelikle fibroblastlarda bulunduğunu göstermiştir. Bu yüzden, romatoid sinovyumda IL-6'nın rolü IL-1 ve TNF α 'nın bazı etkilerini genişletmektedir. Ayrıca IL-6, akut-faz proteinlerinin sentezinin indüksiyonunda ve RF üretiminin lokal uyarılmasında etkili olabilmektedir.

5.2.4. İnterferon-gama ve Granülosit Makrofaj-Koloni Stimüle Eden Faktör (GM-CSF):

IFN-gama ve GM-CSF, sinovyal doku makrofajları ve fibroblastlarda HLA-DR ve DQ ekspresyonunu uyarabilir. Bu etki, lenfosit stimülasyonunun artışı ve lokal bir immün yanıt ile inflamatuvar siklusun büyümesini sağlayabilir. Bununla birlikte, romatoid eklem sıvısında IFN-gama'ya çok az oranlarda rastlanmıştır.

CSF'ler, hemopoetik kolonilerin üretimine neden olan kemik iliği progenitor hücreler üzerine etki eden heterojen bir sitokin grubudur. GM-CSF, makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücreleri ve aktive lenfositler tarafından sentezlenebilen güçlü bir büyüme faktörüdür. GM-CSF üretimi, IL-1, TNF ve IL-6 tarafında uyarılabilir. Ayrıca GM-CSF, IL-1 üretimini uyarabilir, nötrofilleri aktive edebilir ve monositlerde HLA-DR ekspresyonuna neden olabilir(176).

Son çalışmalar, romatoid eklem sıvılarının önemli oranlarda GM-CSF içerdiklerini göstermiştir(176). Ayrıca romatoid sinovyal eksplantların İn-vitro GM-CSF ürettikleri gösterilmiştir.

5.2.5. Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ve Fibrinojen Growth Factor (FGF):

PDGF ve FGF, artrit noninflamatuvar formlarındaki eklem sıvılarında gösterilmiştir. Ayrıca PDGF, romatoid eklem sıvılarında da bulunmuştur. PDGF ve FGF makrofajlar tarafından üretilir ve DNA sentezini ve insan sinovyal fibroblastların proliferasyonunu uyarabilirler. Bundan başka PDGF, romatoid eklemde fibroblastların agresif üretiminden ve proliferasyonundan sorumlu olabilir.

5.2.6. Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta):

TGF-beta, platelet, makrofajlar, lenfositler ve sinovyal fibroblastlar tarafından üretilen 25 kd'luk bir sitokindir. Bu sitokin, bir çok etkisinin yanında en büyük etkisini matriks sentezini uyararak ve matriks degradasyonunu azaltarak yapar (7). TGF beta, çeşitli hücrelerde kollajen ve fibronektin genlerinin transkripsiyonunu artırır,

proteazların sekresyonunu azaltır ve proteaz inhibitörlerinin üretimini artırır. Ayrıca TGF-beta monositler için kemotaktiktir ve bu hücrelerde IL-1 üretimine neden olur. Bunlardan başka TGF beta, insan hücrelerinde IFN-gama tarafından indüklenen HLA-DR ekspresyonunu azaltır.

RA'lı hastaların sinovyal sıvılarında TGF-beta yüksek oranlarda bulunur. İn-vitro olarak TGF-beta'nın romatoid eklem dokularında üretildiği bulunmuştur.

6. SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOSUS (İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER)

SLE, farklı klinik özellikler gösteren multisistemik bir hastalıktır. SLE'nin etyolojisi bilinmemektedir(47). SLE'li hastalar otoimmünitenin çeşitli belirtilerini gösterirler. Bu hastaların bazıları, anormal T hücresi fonksiyonu ile ilişkili olabilir. Bu hastalardaki defektif lenfosit fonksiyonunun, B hücresi yanıtlarındaki anormallikleri, mitojen ile indüklenen T hücresi proliferasyonunu ve T süpressör aktivitesinin oluşturulmasını içerdiği son on yıl içinde öne sürülen düşüncelerdir(156).

SLE, çok çeşitli otoantikor oluşurması ile karakterize bir hastalıktır. Bununla birlikte, çift sarmal DNA'ya (ds-DNA'ya) karşı otoantikor oluşumu SLE için oldukça spesifiktir. Hastaların büyük bir bölümünde bu antikor pozitifdir ve bu antikorum düzeyi hastalık aktivitesi ile paralellik göstermektedir. Anti-DNA antikorlar dolanan DNA ile immünkompleksler oluşturur. Bu kompleksler glomerular basal membranda depolanır ve bir inflamatuvar yanıt oluşturur. Bu immün kompleksler ayrıca bir çok kros-reaktiviteden sorumludur. Örneğin histonlarla kros-reaktif monoklonal bir anti-DNA, uygun şekilde purifiye edildiğinde, ya da DNaz ile muamele edildiğinde immün komplekslerle birlikte anti-histon antikorlar da ortadan kalkar(22).

Bazı araştırmacılar, otoantikor oluşumunu intrinsik B hücresi hiperaktivitesi veya T lenfosit süpressör hücre yetersizliği ile açıklamaya çalışmışlardır.

6.1 SLE'de Otoantikorlar:

SLE'de otoantikorları iki grupta incelemek mümkündür. Birinci grupta dokuya

spesifik olmayan ancak bir çok doku ve organda bulunabilen antijenlerle etkileşen antikorlar bulunur. Bu gruba örnek olarak nükleer ve sitoplazmik antijenlere karşı oluşan antikorlar verilebilir. İkinci gruptaki antikorlar ise dokuya spesifiktir. Bu gruba da örnek olarak hemopoetik sistemin hücresel elemanlarına (eritrositler, lökositler ve plateletler gibi) karşı oluşan antikorlar ile dokuya spesifik antijenlere (örneğin tiroid, karaciğer, kas, mide ve adrenal bez gibi) karşı oluşan otoantikorlar verilebilir.

Lupuslu hastalardan elde edilen hibridomaların ürettiği monoklonal otoantikorlarla yapılan çalışmalar, anti-DNA otoantikorların polispesifik olabileceğini göstermiştir. Bu antikorların ssDNA ve dsDNA yanında sentetik polinükleotidlere, fosfolipitlere, sitoskeletal proteinlere ve diğer moleküllere de bağlandığı saptanmıştır. Anti-DNA otoantikorların polispesifisiteleri lupusun değişik özelliklerini açıklayabilir. Örneğin, plateletlere bağlanma özelliği de gösterebilen bir anti-DNA antikorunu immüntrombositopenia'dan sorumlu olabilir(145).

SLE'deki otoimmün yanıt nükleoprotein yapısındaki spesifik epitoplara karşı oluşur. En önemli lupus antijenleri nukleozom, U1 SnRNP, ve Ro ScRNP'dir. Bu otoantijenler anti-nükleer antikorların oluşumundan sorumludurlar.

DNA, RNA, histonlar ve RNA-protein kompleksleri (örneğin RNP ve Sm) gibi çeşitli hücresel komponentlere karşı oluşan anti-nükleer antikorlar (ANA) dört ana gruba ayrılabilirler:

- 1- dsDNA'ya karşı oluşan antikorlar,
- 2- ssDNA'ya karşı oluşan antikorlar,
- 3- Histonlara karşı oluşan antikorlar,
- 4- Non-histon nükleer proteinler ya da nükleik asit-protein kompleksine karşı oluşan antikorlar (Tablo 5).

Antikor Spesifisitesi	SLE'de Klinik Özellik
1- ds-DNA (dsDNA ve ssDNA'da bulunan antijenik determinant).	Hastaların % 60-70'inde görülür.
2- ss-DNA (uygun pürin ve pirimidinler ile ilgili antijenik determinant).	Hastaların % 60-70'inde görülür.
3- Histonlar (tüm subklaslarda H3, H4 ve H2A/H2B, H3/H4 komplekslerdeki antijenik determinantlar)	Hastaların % 70'inde görülür. İlacı bağlı lupusta (procanamid ve hidralazin) % 95 'den fazla sıklıkta bulunur.
4- Non-histon antijenler	
a) Sm antijenler (Smith antijeni)	Hastaların % 30-40'ında görülür, diagnostik bir markerdir.
b) U1-RNP (U1-RNA ile kompleks protein(ler)in oluşturduğu antijenik determinantlar).	Hastaların % 35-45'inde görülür, MKDH olanların % 95'inde pozitifdir
c) SS-A/Ro (Antijenik determinant bilinmiyor, muhtemelen RNA'ler ile kompleks oluşturan protein(ler)den ibarettir	Hastaların % 30-40'ında görülür. Neonatal lupus ile ilişkili. Sjögren sendromlu hastaların % 60-70'inde görülür.
d) SS-B/La (Antijenik determinant RNA ile kompleks oluşturmuş 43kd'luk bir proteindir).	Hastaların % 15'inde, Sjögren sendromlu hastaların % 45-60'ında görülür.
e) Ma antijen (Antijenik determinant tripsine duyarlı, DNaz ve RNaz'a dirençli bir yapıdır).	Hastaların % 20'sinde görülür.
f) PCNA (Antijenik determinant 33kd'luk bir proteindir).	Hastaların % 3'ünde görülür.

Tablo 5: SLE'de ANA'ların dağılımı (MKDH: Mikst konnektif doku hastalığı, PCNA: Proliferating cell nuclear antigen).

dsDNA'ya karşı antikorlar dsDNA ve ssDNA'nın her ikisinde de bulunan bir antijenik determinanta bağlanır. Genel olarak anti-dsDNA antikorunun titrasyonu önemli derecede artmış ise bunun SLE için diagnostik bir marker olabileceği düşünülmektedir. Anti-ssDNA antikorlar ssDNA'daki pürin ve pirimidinlerle ilişkili antijenik determinantlara karşı ortaya çıkar. Bu antikor da SLE'li hastaların % 60-70'inde pozitifdir. Bu antikora diğer romatizmal hastalıklarda da rastlamak mümkün olduğundan SLE için diagnostik bir marker olarak kabul edilmez. Anti-ssDNA antikoru SLE'li hastaların böbrek glomerüllerinde de saptanmıştır(159).

Radioimmunoassay yöntemleri ile anti-DNA antikorlar, SLE'li hastaların yaklaşık % 50'sinden fazlasında pozitif bulunmuştur (58).

Anti-DNA antikolar, çeşitli doku komponentleri ile kros-reaksiyon sonucu, dokulara direkt olarak bağlanabilirler. Anti-DNA antikoların, bazı polinükleotidler, fosfolipitler, proteoglikanlar ve dekstran sülfat gibi polinegatif yapılarla kros-reaksiyon gösterdiği bulunmuştur. Diğer kros-reaksiyon hedefleri ise membranla ilişkili proteinler, sitoskeleton ile ilişkili proteinler ve histon ya da DNA-histon kompleksleridir.

Histonlara karşı otoantikolar ise SLE'li hastaların yaklaşık % 70'inde pozitifdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda anti-histon antikoların, histonların H1, H2A, H3 ve H4 alt grupları ile ve H2A/H2B ve H3/H4 kompleksleri ile etkileştiği bulunmuştur(159).

Anti-Sm antikolar da SLE'li hastalarda oldukça sık olarak bulunmakta ve hastalığın tanısında yardımcı olmaktadır. Bu antikor üridinden zengin "Smith" antijenine bağlanır. Smith antijeni en az 9 protein molekülünden (A, B, B', C, D, E, F, G ve 68 kd'luk bir protein) ve bir tane U1 RNA'dan oluşmuş bir komplekstir (58). Borg ve arkadaşları ise bu antijenin en az beş küçük RNA'dan oluşan (U1, 2, 4, 5 ve 6) ve onbir ya da daha fazla polipeptid (A, A', B, B', B'', C, D, E, F, G proteinler ve 70 kd olarak adlandırılan bir protein) ile ilişkili bir yapı olduğunu öne sürmektedir(20). Bu antikor lupuslu hastaların yaklaşık % 30-40'ında bulunmasına karşın hastalıktaki patolojik rolü bilinmemektedir. Ancak anti-Sm antikoruna spesifik B hücrelerinin, anti-dsDNA'ya spesifik hücrelerden bağımsız olarak aktive olduğu bulunmuştur(20). Anti-Sm antikolar genellikle anti-U1 RNP antikolar ile birlikte bulunur(58).

U1RNP (nRNP), tüm ökaryotik hücrelerde bulunan bir makromoleküldür. Bu proteinin RNA "splicing" de bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Bu proteinin asıl bileşeni, A1 denilen 34 kd'luk bir proteindir. Komplementer DNA (cDNA) klonlanması yöntemi ile bu proteinin farklı yapılarda iki domainden oluştuğu bulunmuştur. N-terminal domain, UP1 olarak adlandırılan ssDNA bağlanma proteinine özdeş bir yapı içerir. C-terminal domain ise insan epidermal keratin ile kısmen homoloji gösteren glisinden zengin bir polipeptiddir. Rekombinant DNA teknikleri ile yapılan çalışmalarda anti-A1 antikoları, SLE'li hastaların % 23 ile % 37'sinde pozitif bulunmuştur. Ayrıca anti-A1 antikolar RA ve JRA'lı hasta serumlarında da saptanmıştır. Bu çalışmalar sonunda SLE ve RA'lı hasta serumlarındaki ilgili antikoların A1 proteinlerindeki farklı epitoplarla etkileştiği gösterilmiştir. SLE hastalarında antikoların N-terminal domain ile, RA serumlarında ise

antikorların hem N-terminal, hem de C-terminal domaine karşı olduğu saptanmıştır. Bu yüzden RA'ye spesifik olduğu öne sürülen anti-keratin antikorların (AKA) kros-reaksiyon ile, bu hastalardaki anti-A1 reaktivitesinden sorumlu olduğu da düşünülmektedir(112).

İnsan serumlarında membran, sitoplazma ve nükleer determinantları tanıyan otoantikorlar mevcuttur. Anti-sitoskeletal antikorlar da bunlardan biridir. Sitoskeleton, sitoplazmada bulunan filamentlerden oluşur. Bu filamentler 3 grupta incelenebilir:

- 1- Mikrofilamentler (primer olarak aktin içerirler),
- 2- Mikrotübüller (tübülün filamentlerini içerirler),
- 3- Intermediate filamentler (beş ana antemediate filament belirlenmiştir; bunlar, vimentin, prekeratin, desmin, glial filament proteinler ve nörofilament proteinlerdir)(148).

Senecal ve Rauch, SLE'li hastalardan elde edilen hibridoma intermediate-reaktif SLE otoantikorların immünoblot analizlerle vimentin, sitokeratin ve desmine karşı spesifisite gösterdiklerini bulmuşlardır. Bu antikorların iki alt grubu olduğu bulunmuştur. Bunlardan birincisi sadece sitoskeletal proteinlerdeki epitoplara tanırken, ikinci grup antikorlar DNA ve bazı sitoskeletal proteinlerdeki ortak epitoplara tanımaktadır(149). Dighiero ve arkadaşları ise bu epitoplara DNA ve sitoskeletal proteinlerdeki α -heliks ya da α -helikal ilişkili yapılar olabileceğini öne sürmüştür (40).

SLE'li hastaların bir çoğunda anti-IgE antikorlar bulunmuş ve bu antikorların artiküler ve vasküler lezyonların oluşumuna katkıda bulunabileceği düşünülmüştür (54).

Nöropsikiatrik bulgular, SLE'li hastaların yaklaşık % 70'inde mevcuttur. Bu hastaların beyin-omurilik sıvılarında ve serumlarında nöronal hücre membranları ile etkileşen ve/veya lenfositlerle kros-reaksiyon veren antikorlar bulunmuştur. Bunların varlığı nöropsikiatrik SLE'nin oluşumu ile ilişkili olabilir. Bu anti-nöronal antikorların, en azından bazılarının, direkt olarak sitoplazmik antijenlere karşı olduğu düşünülmektedir(137). Konnektif doku hastalığı olan kişilerin serumlarında anti-sitoskeletal antikorlar artmış oranlarda bulunur. Anti-nörofilament antikor (ANFA), nöropsikiatrik lupusluların % 41'inde bulunmuştur(148). ANFA, SLE'den başka, RA'lılarda, bazı nörolojik bozukluğu olanlarda, nörofizyolojik semptomları bulunmayan SLE'lilerde ve sağlıklı kişilerde de görülebilir. Ancak bunların inisidansı oldukça

düşüktür(137).

Robbins ve arkadaşları anti-nörofilament antikor negatif nöropsikiatrik SLE'lilerde anti-kardioliipin antikorlarının artmış olduğunu bulmuşlardır(137). Lupus antikoagulanı ve antikardioliipin, SLE'li ve diğer bazı otoimmün bozukluğu olan hastalarda bulunan antifosfolipit antikorlardır. Bunlar, venöz ve arteryal tromboz, nöropsikiatrik bozukluklar, trombositopeni ve "antifosfolipit sendromu" belirtileri gibi klinik bazı belirtilerle yakından ilişkilidir(101). Cervera ve arkadaşları antikardioliipin antikorların SLE'li hastaların klinik özelliklerini belirtmede önemli olabileceğini öne sürmektedir(27). Pürifiye lupus antikoagulanın protrombin ve faktör Xa'nın fosfolipitlere kalsiyum aracılığı ile bağlanmasını inhibe ettiği bilinmektedir. Bu nedenle lupus antikoagulanlarının, protrombini trombine dönüştüren Xa-Va-Ca-fosfolipit kompleksinin aktivasyonunu in-vitro olarak bloke ettiği düşünülmektedir. Lupus antikoagulan, SLE'li hasta serumlarında % 0.4 ila % 65 arasında değişen oranlarda(128) (ortalama % 34 oranında) pozitif bulunmuştur. Anti-kardioliipin antikorlar ise SLE'lilerin yaklaşık % 44'ünde bulunmuştur. RA'li hastalarda ise bu oran % 4 ila % 49 arasında değişmektedir(101).

Yapılan çalışmalarla lupus antikoagulanı ile antikardioliipin antikorların benzer antijenik determinantları tanıdığı ortaya çıkmıştır (48,165,174). İn-vitro çalışmalar, bu antikorların yüksek afinitelerde, kardioliipin, fosfatidil serin, fosfatidil inozitol, fosfoditik asit gibi anyonik fosfolipitlere; düşük afinitelerde ise nötral fosfolipitlere, VDRL antijenlerine veya DNA'ya bağlandığını göstermiştir (48,130).

Anti-fosfolipit sendromlu hastaların serumlarında büyük miktarlarda anyonik fosfolipitlere karşı antikorlar gelişmektedir. SLE ve anti-fosfolipit sendromu arasında bir ilişki olduğu ve bir çok anti-fosfolipit sendromlu hastanın SLE ye benzer klinik belirtiler gösterdiği bilinmektedir.

SLE'de antifosfolipit antikor ve anti-DNA antikorlar, muhtemelen, endojen bakterilerin varlığında benzer yabancı antijenlere bir yanıt oluşturabilirler. Ayrıca bazı monoklonal antifosfolipit ve anti-DNA antikorlar ortak idiotipik determinantlar gösterebilirler. Bazı araştırmacılar antifosfolipit ve anti-DNA (ss ya da dsDNA) antikorlar arasında kros-reaktivite bulunduğunu savunmalarına karşın, bir çok araştırmacı böyle bir kros-reaktivite bulamamıştır (181).

SLE'de ribozomların da otoantijenler içerdiği bilinmektedir. P0, P1 ve P2 lupuslu hastalarda otoantikörlere hedef olan en önemli ribozomal proteinler arasındadır. Bu proteinlerin, protein sentezinde faktör-ribozom etkileşimleri için gerekli GTPaz aktivitesinde önemli bir görevi vardır. Bonfa ve arkadaşları SLE'li hasta serumlarının % 11'inde "S10" adı verilen 20.000 molekül ağırlıklı bir ribozomal subünit proteine karşı oluşan bir otoantikör grubu saptamışlardır. Bu anti-S10 antikörları anti-Sm ve anti-ribozomal P protein antiköru içeren lupuslu hastaların ve anti-Sm antiköru içeren MRL/lpr fare soylarının serumlarında oldukça sık olarak bulunmaktadırlar(18).

SLE'de bulunan iki antinükleer antikör grubu Sjögren sendromlu hastalardaki ANA'lar ile ilişkilidir. Bu ANA'lar, anti-SS-A/Ro ve Anti-SS-B/La antikörlardır. Anti-SS-A/Ro antikörlar SLE'li hastaların % 30-40'ında görülürken Sjögren sendromlu hastalarda görülme sıklığı % 70 civarındadır. Anti-SS-B/La antikörlar ise SLE'li hastalarda % 15 oranında pozitifdir. Bu oran Sjögren sendromunda % 45-60 arasında değişir. Anti-SS-B/La antikörlar, Anti-SS-A/Ro antikörlar ile birlikte bulunabilir (58). Ayrıca Anti-SS-A/Ro ile neonatal lupus arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir (159).

Tüm bu antikörlardan başka SLE'de iki ANA alt grubu daha vardır. Bunlar, anti-Ma antijen ve anti-PCNA(Proliferating Cell nuclear Antigen) antikörlarıdır. Anti-Ma antikör SLE'de % 20 oranında bulunurken anti-PCNA, % 3 gibi düşük bir oranda bulunur.

Lupusta genetik faktörlerin önemli olduğu bilinmektedir. MHC genleri SLE hastalarında önemli bir etkiye sahiptir. HLA-DR2 ve HLA-DR3, SLE'li hastalarda önemli oranlarda (% 40-60 arasında) artmıştır.

SLE'de bazı antikör yanıtları, DR antijenleri ile güçlü bir ilişki içerisindedir. Örneğin anti-ssDNA antikörun DR2 ile, anti-Ro(SS-A)/anti-La(SS-B) antikör sisteminin DR3 ile yüksek oranlarda, DR2 ile daha düşük oranlarda ilişkili olduğu bulunmuştur. Bunun yanında anti-Sm ve anti-RNP ile HLA arasında bir ilişki bulunamamıştır(8).

SLE'de bir başka genetik faktör ise, kompleman komponentlerini kodlayan MHC klasIII bölgesidir. C4A, immün komplekslerin elimine edilmesinde önemli bir role sahiptir. Bu yüzden C4A'nın eksikliği (C4A "null" fenotipi), SLE'li hastalarda immün kompleks reaksiyonlarını kolaylaştırmaktadır. C4A eksikliği SLE'li hastaların yaklaşık % 11'inde görülür. Ayrıca C4A "null" fenotipi gösteren SLE'li hastaların yaklaşık %

50'sinde HLA-B8/DR3 haplotipi ile ilişkili olduğu bulunmuştur(82).

7. BEHÇET HASTALIĞI (İMMÜNOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER)

Behçet hastalığı, mukukotanöz, oküler, artiküler, intestinal, ürogenital, vasküler ve nörolojik tutulum yapabilen bir multisistem hastalığıdır. İlk kez Hulusi Behçet tarafından genital ülser, oral aft ve göz bulguları ile ilişkili bir sendrom olarak gösterilmiştir.

Behçet hastalığının etiyolojisi bilinmemektedir. İmmünolojik bozuklukların patogeneizde önemli olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, genetik faktörler, viral infeksiyon, streptokoklara karşı gecikmiş aşırı duyarlık, organik maddelere karşı toksik yanıt ve otoimmünite Behçet hastalığı patogenezinde olası faktörlerdir. Behçet hastalığının bazı bulgularının otoimmün özelliği, mukoza ve mikrobik ajanlara ve hastaların damar duvarlarında bulunan çeşitli yapılara karşı otoreaktif antikorların saptanmış olmasından ileri gelmektedir(96).

Behçet hastalığının önemli immünolojik bulguları aşağıda özetlenmiştir:

- 1- Behçetli hastalarda HLA-B5, az da olsa HLA-DRw52 ve DR7 artmıştır.
- 2- T4 helper/inducer hücrelerde azalma yanında, T8 supressör/sitotoksik hücreler normal oranlarda bulunmuştur.
- 3- Non-spesifik dolanan immün kompleksler ve özellikle mukozal dokulara karşı oluşan antikorlar bulunmaktadır.
- 4- Anormal kemotaksis ve nötrofillerin artmış fagositozu vardır.

Bu bulgular, Behçet hastalığında immünogenetik bir temel olduğunu ve immünregülasyonda T hücresi defektinin mikrobik ajanlara bir yanıt oluşturabileceğini düşündürmektedir(97).

7.1. Behçet Hastalığında Viral Etijoloji:

Viral enfeksiyonlarda, interferon üretimi, iki şekilde olabilir. Birincisi, virus infekte

hücreler ya da dokuları infiltre eden lenfositler yardımı ile interferon-alfa (α -IFN) üretimini direkt olarak indükleyebilir. İkinci olarak duyarlı T lenfositleri, infekte hücrelerin yüzeylerindeki viral antijenleri tanır ve böylece immünolojik olarak spesifik bir mekanizmayla interferon-gamma (δ -IFN) sentezini başlatırlar(38).

Behçetli hastalarda IFN-alfa ve IFN-beta'nın artmadığı bulunmuştur(9,153). Bunun yanında, aktif Behçetli hastaların serumlarında IFN-gama'nın önemli oranlarda arttığı saptanmıştır (120). Behçet hastalarında tekrarlayan oral ve genital ülserasyonların herpes simpleks virusu (HSV) tip1 ve tip2 infeksiyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir(97). Behçet hastalığında ve diğer konnektif doku bozukluğu olan hastalarda yapılan çalışmalar sonunda lenfositlerin diğer duyarlı hücreler üzerindeki virus enfeksiyonuna karşı bir koruyuculuk özelliği taşıdığı bulunmuştur(38). Gerçekten solid faz radioimmünoassay yöntem yardımı ile artrit ve oküler tip Behçetli hastalarda IgG anti-HSV1 antikörlerinin yüksek oranlarda bulunduğu gösterilmiştir (artritik % 60, oküler % 61)(97).

T4 ve T8 hücrelerin HSV1'e karşı in-vitro polireaktif yanıtları incelendiğinde hastalığın oküler ve artritik tiplerinde HSV1'e karşı T4 yanıtlarının düştüğü, T8 yanıtlarının ise arttığı bulunmuştur(132)(Tablo 6). Pugh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Behçetli hastalarda, HSV1'e karşı T8'in artış gösterdiği, T4'ün ise bir yanıt oluşturmadığı bulunmuştur. T4'deki bu azalmanın nedeninin bu hücrelerdeki ya da antijen salınan monositlerdeki bir defekt sonucu ortaya çıktığı sanılmaktadır(132).

Klinik Tip	Grup I		Grup II	
	Oküler	Artritik	Nörolojik	Mukokutanöz
HLA	B5, DR7	B12/DRW52	DR7, DRW52	B12/DR7
PEG IC'DE anti-HSV1	+	+	±	±
Lenfoid hücrelerde HSV1 genomu	+	+	-	-
T4 sayısı	↓	↓	BY	BY
HSV1'e karşı T4 proliferasyonu	↓	↓	BY	BY
HSV1'e karşı T8 proliferasyonu	↑	↑	BY	BY

Tablo 6: Behçet hastalığında bazı klinik belirtilerin immünolojik parametrelerle ilişkisi (PEG: Polietilen glikol; BY: Bilgi yok).

7.2. Behçet Hastalığında İmmün Komplekslerin Rolü:

Behçet hastalığında immün komplekslerin artmış oranlarda bulunduğu ve bunların hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceği bilinmektedir. Hastaların % 23-63'ünde serum immün komplekslerin artış gösterdiği saptanmıştır. Behçet hastalığında görülen bu immün komplekslerin bir çoğu IgG ve IgM sınıfından immünglobulinleri içerir. IgG kaplı lateks partikülleri ve anti-IgG serum kullanılarak yapılan koagülasyon-inhibisyon yöntemi ile Behçet hastalarının % 60'ında soluble IgG immün komplekslerin pozitif olduğu bulunmuştur(98). İmmün komplekslerin Behçet hastalarının serumlarında bulunmalarına karşın çeşitli tip lezyonlarda rastlanmamıştır. Bu yüzden immün komplekslerin lokal olarak doku hasarı ile bir ilişkisi olmadığı düşünülmektedir.

7.3. Dolanan İmmün Komplekslerin Patogenezdeki Rolü:

Üveit, eritema nodosum ve artritinin klinik göstergelerinin immün komplekslerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu ve bazı antikörlerin saptanması ve kompleman komponentlerindeki anormallikler, immün komplekslerin Behçet hastalığında etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Polietilen glikol (PEG) testi ve platelet agregasyon metodu ile yapılan tetkiklerde, Behçet hastalığında hastalık aktivitesi ile dolanan immün kompleksler arasında güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur. Hashimoto ve arkadaşları, PEG testi ile Behçetli hastaların % 23'ünde, platelet agregasyon metodu ile % 43 oranında dolanan immün komplekslere rastlamışlardır(59). Gupta ve arkadaşları ise, Behçetli hastalarda Raji hücresi metodu ile % 44, C1q-bağlı radioimmünassay ile % 50 oranında dolanan immün komplekslere rastlamışlardır(56).

Behçet hastalarında immün kompleksleri oluşturan antijenler bilinmemektedir. Ancak çeşitli doku antijenleri, özellikle mukozal antijenler ve viral antijenlerin etkili olduğu sanılmaktadır.

Behçet hastalığında bir çok lezyon, histolojik olarak polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) yoğun bir infiltrasyonu ile beraber akut inflamasyon ile karakterizedir. Behçet hastalarında kemotaksis artışının, PMNL'lerin ve makrofajların fagositik aktivitelerinde de bir artışa neden olabileceği düşünülmüş(110), ancak yapılan çalışmalar, Behçetli hastalarda, fagositozun genellikle azaldığı(93) ya da normal düzeylerde olduğunu (44) göstermiştir.

Matsumura ve arkadaşları Behçetli hastalarda T hücresi popülasyonunun artmış, B hücresi popülasyonunun ise azalmış olduğunu bulmuşlardır(106). Ancak bunun tersine, Kansu ve arkadaşları Behçetli hastalarda T helper ve T supressör hücrelerin, kontrollere oranla önemli düzeylerde düşüş gösterdiğini ve Th/Ts oranının sabit kaldığını, bunun yanında B hücre düzeylerinin değişiklik göstermediğini bulmuşlardır (79).

Bang ve arkadaşları, Behçetli hastalarda serum-çinko düzeyleri ile lenfosit sub-popülasyonları arasındaki ilişkiyi incelediklerinde, supressör T lenfositlerinin, düşük serum-çinko düzeylerine sahip olan Behçetli hasta grubunda önemli oranlarda arttığını, normal serum-çinko düzeyine sahip hastalarda ise bir artış görülmediğini, T helper hücrelerin ise azaldığını ve serum-çinko düzeyi ile bir ilişki içerisinde bulunmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca hastalardaki total T lenfosit miktarında da kontrol grubuna oranla bir değişiklik bulamamışlardır. Th/Ts oranının ise düşük serum-çinko düzeyine sahip Behçetlilerde azaldığını, normal serum-çinko düzeyine sahip hastalarda değişmediğini saptamışlardır. Bu araştırmacılar ayrıca, Behçet hastalarında B lenfosit miktarının arttığını ancak serum-çinko düzeyleri ile bir ilişki içerisinde olmadığını göstermişlerdir (10).

7.4. Behçet Hastalığı ile HLA Arasındaki İlişki:

Çeşitli etnik gruplarda Behçet hastalığı ile HLA-B5 arasında önemli bir korelasyon olduğu, bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. HLA-B5, Japon hastaların % 60-75'inde, Türk hastaların % 84-86'sında, İngiliz hastaların ise yaklaşık % 20'sinde bulunmaktadır. HLA-B5, Bw51 ve Bw52 olmak üzere iki alt komponentten oluşmaktadır.

HLA-Bw51 Behçetli hastalarda önemli oranlarda artış gösterirken Bw52'de bir değişiklik olmadığı bulunmuştur(121).

HLA-B5'den başka diğer bazı HLA antijenleri de Behçet hastalarında görülebilir. Örneğin, HLA-Aw31, Bw51, DRw6 ve DRw2 (MT2), Behçetli hastalarda artmış oranlarda bulunabilir. Bununla birlikte HLA-Aw31 Bw51 haplotipinin Behçet hastalığındaki rolü tam olarak bilinmemektedir(143). Okuwaki ve arkadaşları Japon hastalarda yüksek oranlarda (erkeklerde % 50, kadınlarda % 75) HLA-A26 antijenlerinin de bulunduğunu göstermişlerdir(123). Arber ve arkadaşları HLA-Bw51 ve HLA-Bw52'nin İsraili hastaların % 30'unda bulunduğunu ve HLA-B5 pozitif gruplarda bu sendromun ailesel bir etkiye sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir(5,6). Fakat hastalığın bu antijenlerle arasındaki ilişki henüz tam anlaşılabilmiş değildir.

Bu artmış ilişkinin tersine, HLA-DR1 ve HLA-DQW1 antijenleri Behçetli hastalarda önemli oranlarda azalmış olarak bulunmuştur (121). Bu antijenleri taşıyan kişilerde Behçet hastalığının gelişmediği düşünülmektedir. Ayrıca hastalığa direncin immünsupressif genler tarafından kontrol edilebileceği ve bunun bazı endojen ajanlara karşı atipik immün yanıtı bastırabileceği düşünülmektedir(122).

7.5. Behçet Hastalığında Otoantikolar:

Otoimmün mekanizmaların Behçet hastalığının patogenezinde kısmen rol oynayabileceği düşünülmektedir. Behçet hastalarının serumlarında çeşitli otoantikolar bulunduğu bilinmektedir. Bunun yanında, nükleer, tiroid, düzkas ve gastrik parietal hücre antikoları ile RF, Behçetli hastalarda negatif bulunmuştur(86). Noguchi ve arkadaşları, Behçetli hastaların serum ve eklem sıvılarında pasif hemaglütinasyon yöntemi ile yüksek titrelerde lipopolisakkarite (LPS) karşı IgM sınıfından otoantikora rastlamışlardır. Ancak bu antikoların RA ve SLE'de de bulunması, bunların Behçet için spesifik olmadığını düşündürmektedir. Demiyelinizasyon antikoları ile beyin gangliositlerine karşı oluşan antikoların özellikle nöro-Behçetli hastalarda ortaya çıktığı bulunmuştur(119).

Yasuda ve arkadaşları çeşitli glikolipitlere karşı otoantikor varlığını araştırmışlar

ve Behçetli hastalarda anti-GA2, GA1, GM1 ve GM3 antikorlarının arttığını ortaya çıkarmışlardır(177). GA2 kobayda major glikolipit, GA1, farede NK hücresi markeridir, GM1 ise, beyinin membran fraksiyonunda bulunur. GA1'e karşı oluşan antikorlar Behçetli hastalarda klinik tip ve aktiviteye bağlı kalmaksızın artmış olarak bulunur. SLE'li hastalarda da görülebilen bu antikorun özellikle nöro-Behçet semptomlarından sorumlu olduğu düşünülmüştür (65). Daha çok multiple skleroz'lu hastalarda görülen demiyelinizasyon antikoru nöro-Behçetli hastaların % 70'inde pozitif ve hastalık aktivitesi ile ilişkilidir. Bu antikorun in-vitro, kompleman varlığında miyelin yıkılımına neden olduğu ve bu nedenle nörolojik bozukluklardan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Bundan başka Akoğlu ve arkadaşları Behçetli hasta serumunda intermediate filament antijenlerinden vimentine karşı IgG sınıfından otoantikorların da bulunduğunu göstermişlerdir. Bu antikor, hastaların % 47'sinde pozitif olarak bulunmuştur. Bunun yanında SLE'li hastaların % 16'sında, RA'lı hastaların % 35'inde, normal populasyonun ise % 9'unda bu antikora rastlanmıştır. Aktif hastalar dikkate alındığında ise bu antikorların Behçet hastalığındaki pozitiflik oranı % 75'lere kadar çıkabilmektedir. Ayrıca bu antikorun hasta serumlarında arttığı bilinen akut faz reaktanlarından C9 ve CRP ile paralellik gösterdiği de saptanmıştır(2).

Görüldüğü gibi, bazı otoantikorların Behçetli hastalarda pozitif olması, bu hastalıkta otoimmün mekanizmaların en azından kısmen etkili olabileceğini düşündürmektedir.

7.6. Behçet Hastalarında Major İmmünglobulinler:

Behçetli hastaların serumlarında IgA'da hafif bir artış olduğu saptanmıştır. Sharief ve arkadaşları, aktif nöro-Behçetli hastaların beyin omurilik sıvılarında (BOS) oligoklonal IgA ve IgM'lerin bulunduğunu ve nörolojik belirtiler ortadan kalktığında bu immünglobulinlerin de kaybolduğunu; ayrıca oligoklonal IgG'lerin hastalık ile ilişkisi olmadığını rapor etmişlerdir(152). Bu yüzden BOS'da oligoklonal IgM ve IgA'nın nöro-Behçetlilerde merkez sinir sistemi bozukluğu aktivitesinin ölçülmesinde ve hastalığın patogenezinin anlaşılmasında önemli olabileceği düşünülmektedir(152).

Ayrıca, eritrosit sedimentasyon hızı, CRP pozitifliği, lökositoz, serum sialik düzeyi, serum mukoproteinleri, serum amiloid A proteini gibi bazı akut faz reaktanlarının Behçet hastalığı için spesifik olmadığı saptanmıştır. Dolayısıyla bunların tanı amacı ile kullanılmaları mümkün değildir. Ancak hastalığın aktif dönemlerini inaktif dönemden ayırt etmede az da olsa katkıları olabilmektedir.

8. KERATİNLER

Omurgalı canlılarda, hücrelerin bir çoğunda, aktin içeren mikrofilamentler, tubulin içeren mikrotubuller ve çapları 7-11 nm arasında değişen orta-boy filamentler bulunur. Orta-boy filamentler genelde, farklı hücre tiplerinde morfolojik olarak birbirlerine benzerlik göstermeleri yanında bunların antijenik determinantları da ortak olabilir. Bunlar düşük ya da yüksek tuz konsantrasyonlarında ve non-iyonik deterjanlarda çözünmezler.

Yapılan immünolojik ve biyokimyasal analizler sonunda beş farklı orta-boy filament ortaya çıkmıştır:

1- Vimentin filamentleri; mezenkimal hücrelerde, astrositlerde, sertoli hücrelerinde, vasküler düz kas hücrelerinde ve bir çok hücre kültürlerinde bulunur.

2- Desmin filamentleri; miyojenik hücrelerin bir çoğunda bulunur.

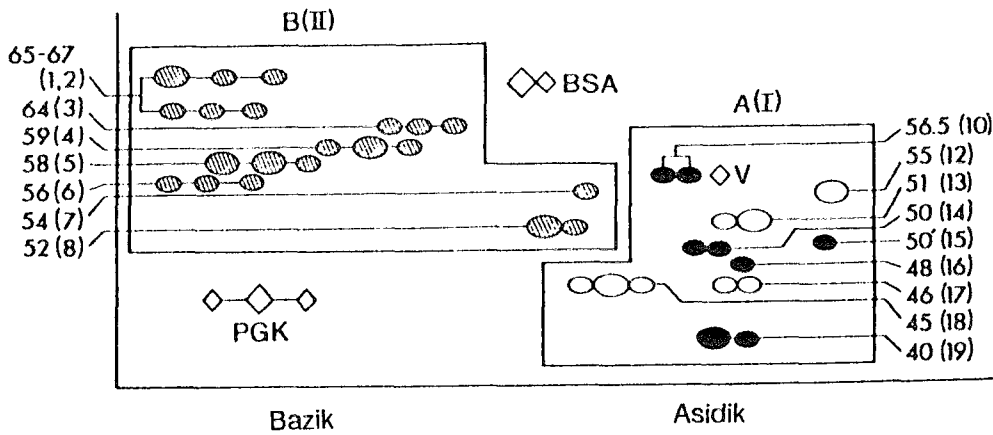
3- Nörofilamentler; nöronal hücrelerde bulunur.

4- Glial filamentler; astrositlere özgüdür. Hücre transformasyonu ve tümör oluşumu sırasında, bu filamentler geniş oranlarda muhafaza edilir. Bu yüzden tümörlerin kendi spesifik filamentleri ile saptanması histolojik tanıda önem taşımaktadır.

5- Keratin ve benzeri proteinler içeren filamentler (bunlara sitokeratinler de denir), epitel hücrelerinde bulunurlar.

Vimentin, desmin ya da glial filamentler, genellikle tek tip subunit protein içermelerine karşın, sitokeratinler birçok farklı polipeptitten oluşmuş büyük bir ailedir (111). Keratin molekülleri merkezi bir sarmal domain ile sarmal olmayan iki uç içerir. Keratin ailesinin ortalama 30 çeşit protein içerdiği bilinmektedir. Bu proteinler genelde alfa ve beta olmak üzere iki formdan oluşur. Beta form kıvrımlı tabakalardan meydana gelir, ipekte ve kuşların pençe ve gagalarında bulunur. Alfa form ise daha geniş bir grup

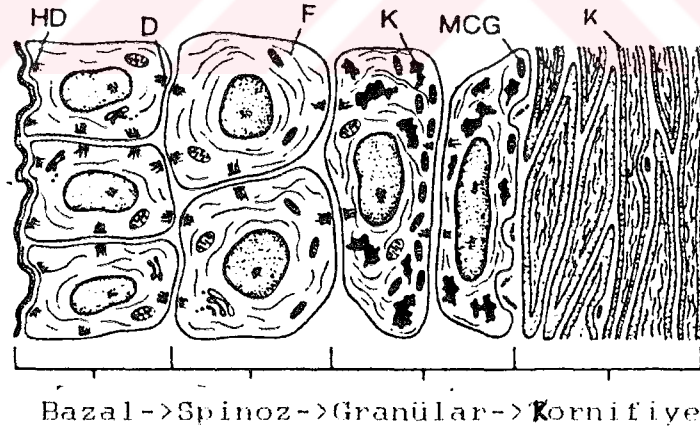
oluşturur ve deri, saç ve tırnaklarda bulunur. Alfa keratinlerin molekül ağırlıkları 40.000-68.000 arasında değişir. İki boyutlu jel elektroforezi ile insanda 17-19 çeşit alfa keratinin bulunduğu ortaya çıkmıştır. Alfa keratinler immünolojik etkileşimleri ve pH değerlerine göre iki büyük gruba ayrılırlar: Birinci grup (bu gruba tip II de denir), 65-67 (Moll'un sınıflandırmasına göre no 1, no 2), 64 (no 3), 59 (no 4), 58 (no 5), 56 (no 6), 54 (no 7) ve 52 (no 8) kilodaltonluk keratinleri içerir. Bu gruptaki keratinlerin tümünün pH'ı 6.0'dan büyüktür ve dolayısıyla bunlar bazik sitokeratinlerdir. Bu keratinlerin antijenik determinantları ortaktır. Bunlardan 58K, 56K, 54K ve 52K zincir homolojisi gösterir. İkinci grupta (bu gruba tip I de denir) ise 11 tane keratin vardır. Bunlar, 64.5 (no 9), 56.5 (no 10), 56' (no11), 55 (no 12), 51 (no 13), 50 (no14), 50'(no 15), 48 (no 16), 46 (no 17), 45 (no 18) ve 40 (no 19) kilodaltonluk keratinlerdir. Bunların pH'ı ise 5.7'den düşüktür ve bu yüzden asidik molekülüdür ve bir çoğu (56.5K, 50K, 50'K, 48K ve 40K) ortak determinantlara sahiptir. Bu asidik keratinlerden 50K, 46K, 45K ve 40K dizi homolojisi gösterirler. Peptid haritalanması ile 50K, 48K ve 46K keratinlerin yapısal olarak benzer olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 5)(111,155,157,173). Bu iki keratin sınıfı, pH'dan başka, immünoreaktivite, mRNA hibridizasyon, peptid haritaları ve amino asit yapıları bakımından da farklılık gösterir.



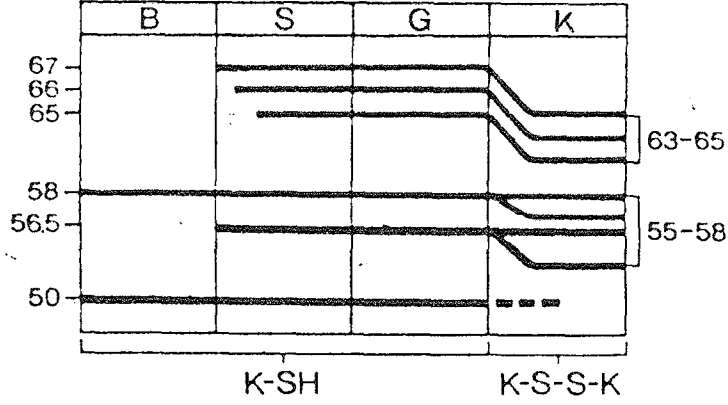
Şekil 5: İnsan epidermal keratinlerin izoelektrik pI ve ağırlıklarına göre sınıflandırılması

8.2. Normal Epidermiste Keratin Ekspresyonu:

Epidermis, bazal, spinoz, granüler ve kornifiye tabakalardan oluşmuştur (Şekil 6) (157). Normal insan epidermisinde 4 büyük keratin sınıfı bulunmaktadır. Genelde, epidermin iç tabakalarındaki hücreler küçük keratinleri, dış tabakalarındaki hücreler ise daha büyük molekülü keratinleri içerir. Buna göre bazal tabakada bazik 58K ve asidik 50K keratinler oldukça fazladır. Bu keratinlere diğer tabakalarda da rastlamak mümkündür. Bunlardan başka suprabazal tabakalarda 56.5K ve 65-67K keratinler de görülebilir. Şekil 7’de, epidermal tabakalarda keratin ekspresyonu görülmektedir. Korneal tabakadaki keratinler birbirlerine disülfid bağları ile bağlanırken, bazal, spinoz ve granüler tabakalardaki keratinler bu şekilde bağlanmazlar, bu yüzden üre, SDS (sodyum dodesil sülfat) ile kolaylıkla ayrılabilirler.



Şekil 6: Memeli epidermisinde tabakaların sıralanışı (HD: Hemidesmozom, D: Desmozom, F: Tonofilament, K: Keratohyalin granülleri, MKG: Membran kaplı granüller, KK: Kornifiye kılıf)



Sekil 7: Epidemal tabakalardaki keratin ekspresyonu
(B:Bazal, S:Spinoz, G:Granular, K:Kornifiye tabakalar)

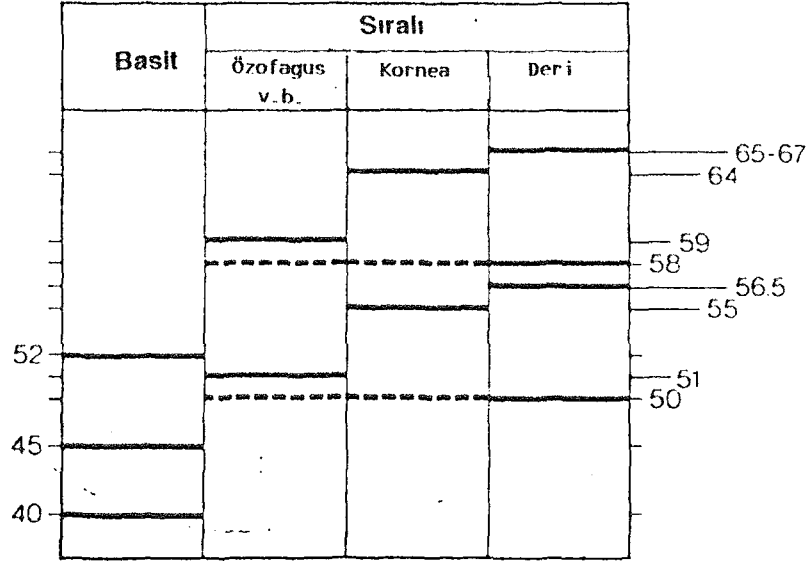
8.2. Non-epidermal Epitelde Keratin Ekspresyonu:

Keratinlerin farklı yerleşim bölgelerinde hücresele heterojenite gösterdikleri bilinmektedir(125). Örneğin, asidik 56.5K ve bazik 65-67K keratinler epidermis ve timik Hassal's cisimcikleri içeren keratinize dokularda bulunur. 55k ve 65K keratinler korneal epitelde, 51K ve 59K keratinler ise özofageal, dil ve diğer sıralı epitelde eksprese edilir. 50K/50'K ve 58K keratinler çeşitli miktarlarda tüm sıralı squamoz epitelde bulunurlar. Bunun yanında 45K ve 52K keratinlere bir çok basit epitelde sıkça rastlanabilir (Şekil 8)(157). Örneğin Takeda ve arkadaşları, farelerde 45 kd'luk keratinin circumvalat papilla'daki "tat alma" hücrelerinin saptanmasında immünohistokimyasal bir marker olabileceğini öne sürmüşlerdir(158). Tablo 7 'de keratinlerin çeşitli doku ve hücre gruplarındaki spesifisiteleri gösterilmektedir.

İnsan karsinomlarında yapılan biyokimyasal analizler, farklı tip epitell içeren tümörlerin, farklı tip sitokeratin taşıdığını göstermiştir. Bir tümör tipindeki sitokeratinlerin, metastaz ve primer tümörlerdeki ile özdeş olduğu bulunmuştur. Genelde epitel kaynaklı tümörler bir çok keratin polipeptidlerini eksprese ederler(111).

NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
MOLEKÜL AĞIRLIK	67	65	64	59	58	56	54	52	64	56.5	56	55	51	50	50	48	46	45	40
İZOELEKTRİK pH	7.8	7.8	7.5	7.3	7.4	7.8	6.0	6.1	5.4	5.3	5.3	4.9	5.1	5.3	4.9	5.1	5.1	5.7	5.2
A. NORMAL EPİTEL																			
- Epidermis (çeşitli lokalizasyonlar)	+	(+)			+	+			+	++	++	+	+++++	++	(+)	+	(+)	(+)	(+)
- Ayak tabanı epidermisi	+	(+)			+	+								++	(+)				
- Kornea	+	(+)			+	+								++	(+)				
- Portio uteri (exocervix)	+	(+)			+	+								++	(+)				
- Dil epiteli	+	(+)			+	+								++	(+)				
- Epiglottis epiteli	+	(+)			+	+								++	(+)				
- Özofagus epiteli	+	(+)			+	+								++	(+)				
- Trake epiteli	+	(+)			+	+								++	(+)				
- Amnion epiteli	+	(+)			+	+								++	(+)				
- İnce barsak mukozası	+	(+)			+	+								++	(+)				
- Hepatositler	+	(+)			+	+								++	(+)				
B. TÜMÖRLER																			
- Hepatoselüler karsinom																			
- Kolon adenokarsinomu (tip1)																			
- Kolon adenokarsinomu (tip2)																			
- Mide adenokarsinomu																			
- Özofagus adenokarsinomu																			
- Pankreas adenokarsinomu																			
- Basal hücre epitelomasi																			
- Deri skuamoz hücre karsinomu																			
- Dil skuamoz hücre karsinomu																			
- Epiglottis skuamoz hücre karsinomu																			
- Özofagus skuamoz hücre karsinomu																			
- Rektal-anal bölgede skuamoz hücre karsinomu																			
- Cioacogenic karsinom																			
C. HÜCRE KÜLTÜRLERİ																			
- A431																			
- HeLa																			
- Henle-407																			
- KB																			
- MCF-7																			
- HT-29																			
- MMSV-1																			
- K562																			

Table 7. Keratinlerin, dokular, tümörler ve hücre kültürlerindeki dağılımları.



Sekil 8: Bazı keratinlerin doku dağılımları. 46K, 48K asidik ve 54K ve 56K bazik keratinler epitelial hücre tipleri ile fazla ilişkili olmadıkları için diagrama alınmamışlardır.

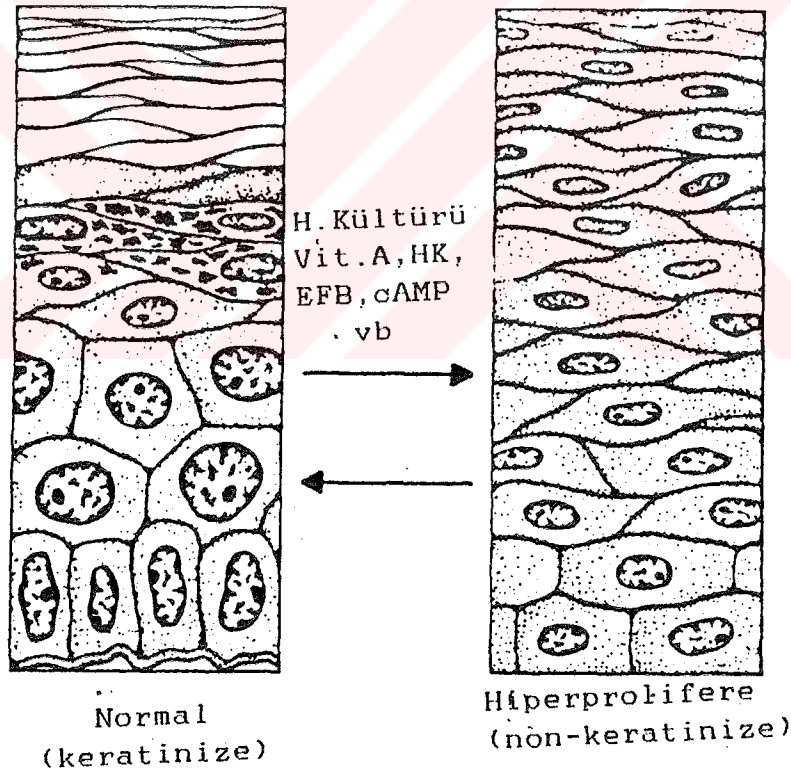
8.3. Kültür Hücrelerinde Keratin ekspresyonu:

Farklı epitel hücrelerin ve tümörlerin kendilerine özgü sitokeratin polipeptidleri içermeleri gibi, bazı epitel ya da karsinom hücre kültürü soyları da kendilerine özgü sitokeratinleri eksprese ederler(111). Örneğin MMSV-1 hücre soyu 7, 8, 18 ve 19 no'lu keratinleri eksprese eder(12). Yine aynı şekilde Western blotting ve monoklonal antikor çalışmaları sonunda K562 eritrolökemi hücre soylarının 52K (no8), 46K (no18) ve 40K (no19) keratinlerini içerdiği, bunların ekspresyonunun 12-O-tetradeganoylphorbol-13-13-asetat (TPA) ile muamelesi sonucunda artış gösterdiği bulunmuştur(75). Genellikle sıralı squamos epitel hücreleri, kültür ortamında morfolojik ve biyokimyasal bazı değişikliklere uğrar. Bu nedenle kültüre hücrelerin keratin ekspresyonu da farklı olur. Örneğin kültüre edilmiş insan epidermal, korneal ve özofageal epitel hücreleri in-vivo formlarında bulunan 56.5K/65-67K, 55K/64K ve 51K/59K keratin çiftleri gibi farklılaşmaya spesifik keratinleri eksprese etmezler; bunların yerine 50K/58K, 48K/56K ve 46K keratin içerirler.

Bu kültür epitelileri in-vivo formlarından farklı olarak non-keratinizedirler (hiperproliferatifirler). Bu hücreler, vitamin A, hidrokortizon, epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi uyarıcı maddelerden mahrum edilirse tekrar keratinize hale dönebilmektedir (Şekil 9)(157). Örneğin 56.5K ve 65-67K keratinler non-keratinize özofagus, konjonktival ve korneal epitelde bulunmazken, bu dokular vitamin A eksikliği ile keratinize hale gelir.

Bunlardan başka kültüre fetal ve erişkin keratinositlerin, in-vivo formlarından farklı olarak sitokeratin içerdikleri saptanmıştır. Ayrıca fetal ve yetişkin formlar arasında da sitokeratin ekspresyonu farklılık gösterebilir. Örneğin 54K ve 40K keratinler fetal deride zayıf bir şekilde eksprese edilir; yetişkinde ise yoktur. Ayrıca bazı kültür hücrelerinde ise kuvvetli boyanmalar göstermektedir.

Kültür hücreleri keratinden başka vimentin de eksprese ederler. Sitokeratin ve vimentinin birlikte ekspresyonunun hücrenin proliferasyonu ile ya da hücrelerin kültür durumuna uyumu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir(125).



Şekil 9: Hücre kültürünün üretimi indükleyici çeşitli materyellerle değişliğe uğraması (HK: Hidrokortizon, EBF: Epidermal büyüme faktörü, cAMP: Siklik adenozin monofosfat, KT: Kolera toksini).

8.4. Epidermisin Farklı Tabakalarındaki Keratin Ekspresyonları:

Epidermis, farklı yapı ve özellikte hücreler içeren çeşitli tabakalardan oluşmuştur. Bunlardan sadece bazal tabaka çoğalma özelliğine sahiptir. Embriyonik ve fetal gelişim sırasında epidermis, periderm kaplı tek bir hücre tabakasından, kompleks, katmanlı bir epitele, buradan da keratinize epidermise dönüşür(125). Hücreler bazal tabakadan ayrılarak yüzeye doğru göç ederler. Granular tabakada hücreler anabolik durumdadır. Daha sonra sitoplazmik organeller elimine olur ve keratinler sitoplazmik protein olarak en dış tabakayı (stratum korneumu-SC) kaplar. SC'daki hücreler metabolik aktiviteye sahip değildir. Bu tabakadaki keratinlerin epidermisin diğer tabakalarındaki keratin moleküllerinden büyüklük olarak daha farklı olduğu, bu farklılığın SC ile kültür hücreleri arasında da bulunduğu saptanmıştır. Bunun yanında SC keratinleri ile kültür hücreleri keratinleri arasında immünolojik reaktivite ve polipeptid yapısı bakımından da farklılık olduğu bulunmuştur. Bir çok epidermis tipinde SC, 65K, 56.5K ve 55K keratinleri eksprese eder. SC'ü ince olan deride, diğer tabakalardaki keratinler daha yoğundur; oysa kalın SC'lu deride (örneğin palmar epidermiste-ki burada SC'un, 63K'luk keratin ekspresyonu oldukça fazladır) SC keratinleri diğer tabakaların keratinlerinden daha fazladır.

67K protein alt epidermal tabakalarda keratinlerin yaklaşık % 10'unu oluştururken, SC'da hiç yoktur. 65K keratin, total keratinin % 5-23'ünü oluşturur. 63K keratin ise dermal tabakalarda % 5 oranında bulunurken SC'da % 44 oranında eksprese edilir (Tablo 8)(45).

Tabaka	46K	50K	55K	56K	56.5K	58K	63K	65K	67K
Dermal	8	22	-	25	-	27	5	-	13
Basal ve Spinoz	7	15	-	10	4	15	14	12	16
Granular	3	5	10	7	10	6	26	16	17
SC	-	1	15	-	15	2	42	23	-
Kültür	25	19	-	32	-	24	-	-	-

Tablo 8: Çesitli epidermal tabakalarda bulunan keratinlerin karşılaştırılması. Tablodaki degerler total keratinlerin yüzdeleri şeklinde verilmiştir.

8.5. Keratin Çiftleri:

Keratinlerin epitelyal farklılaşmadaki morfolojik ve fizyolojik değişiklikler ile ilişkisini anlamak için yapılan çalışmalar sonunda her iki gruptaki (tip I ve tipII) keratinler arasında bir ilişki olduğu ve epitelyumun, bu iki gruptan en az bir keratin eksprese ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, asidik 40K keratin hariç (çünkü bu keratin geniş bir dağılım gösterir) her asidik keratin, bir bazik keratinle birlikte bir "keratin çiftini" oluşturur. Her çift içinde bazik keratin, asidik keratinden aşağı yukarı 8 kd daha büyüktür. Bunun sonucunda 6 tane keratin çifti ortaya çıkmaktadır:

1-56.5K/65-67K: "Deri tipi" farklılaşmanın markeridir. Bu keratinler epidermal keratinizasyonun ileri evrelerinde eksprese edilirler. Bunlar hücre kültürü ortamında, non-keratinize epidermiste ve hastalıklarda bulunmazlar. Bu keratin çifti, vitamin A eksikliğinde dokular keratinizasyona maruz kaldığında, kornea, özofagus ve konjonktivada görülür. Embriyonik epidermiste ise, morfolojik keratinizasyon görünmezden önce, bu keratin çifti ortaya çıkar.

2-55K/64K: Bu keratin çifti, "korneal tip" epitelyal farklılaşmanın markeridir. 55K/64K keratin çifti gibi bu çift de epitelyal hücre kültürlerinde yoktur. Bu çiftin

55K/64K keratin çifti gibi bu çift de epitelyal hücre kültürlerinde yoktur. Bu çiftin ekspresyonu farklılaşmaya bağlıdır.

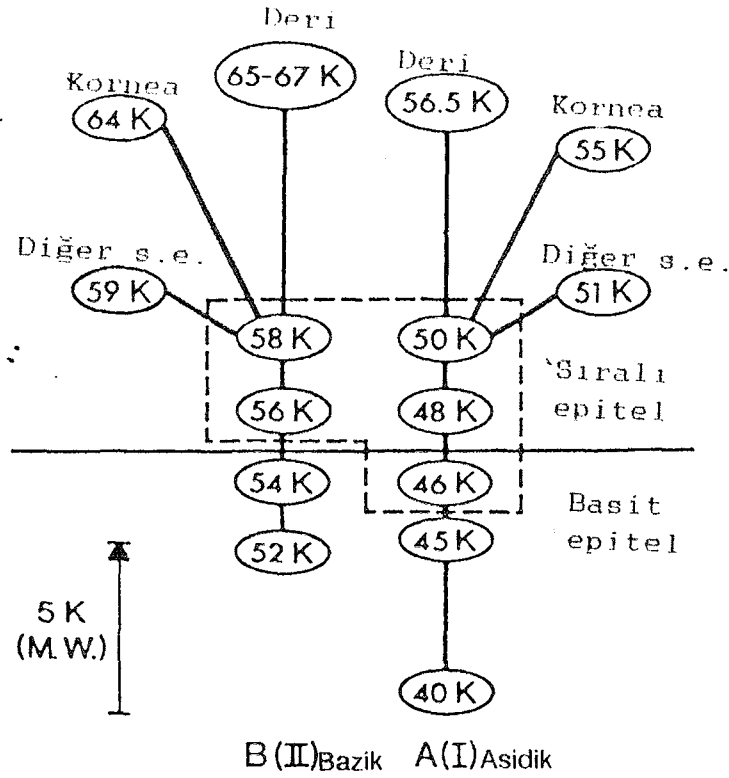
3-51K/59K: Bu çift keratin dil ve özofagusu da kapsayan iç organların sıralı squamoz epitelyumunun markeridir. Buna "özofageal tip" farklılaşma markeri de denir.

4-50K/58K: Bu keratin çifti ise, keratinosit markeridir. Bu iki keratin, korneal epitelyum haricinde aşağı yukarı tüm sıralı epitelde bulunur. Bu keratinler epidermis, henüz basit bir epitelyum iken 10 haftalık embriyonik insan derisinde görülmüştür. Bu bulgu, bu keratin çiftinin epidermal hücrelerde sürekli olarak eksprese edildiğini düşündürmektedir. Kültür ortamında, sıralı epitelin bir çoğu 50K/58K keratin çiftini eksprese ederler. Ancak bazı durumlarda sıralı epitel bu keratinleri kaybedebilir. Örneğin, SV40-transforme kültüre keratinositler bu çift keratinleri kaybederler.

5-48K/56K Bu keratin çifti ise "hiperproliferatif/de-diferantiate" keratinlerin markeridir. Bu keratinler; hiperproliferatif epidermal hastalıkların bir kısmında, keratinosit kültürleri ve deri, korneal, konjonktival ve özofageal epitel kaynaklı karsinomlarda ve hiperproliferatif normal insan epidermisinde görülür.

6-45K/52K: Bu keratin çifti 46K/54K olarak da gösterilebilir. Bunlar basit epitelyal markerlerdir.

Şekil 10'da şimdiye kadar sözü edilen keratin grupları ve keratin çiftleri şematize edilmiştir. Bu diagramda her iki ailedeki keratinler, molekül ağırlıklarına göre sıralanmışlardır. 51K/59K, 55K/64K ve 56.5K/65-67K keratinler, sıralı epitel farklılaşma markeridirler. Bu şekil aynı zamanda büyük molekül ağırlıklı keratinlerin sıralı epitelde, küçük molekül ağırlıklı keratinlerin ise basit epitelde eksprese edildiğini göstermektedir(157).



Sekil 10: Keratinler ve yerlesim bölgeleri. Asidik ve bazik keratinler molekül ağırlıklarına göre vertikal olarak dizilmiştir. Yatay çizginin üzerindeki keratin grupları ve çiftleri kabaca sıralı skuamöz epitel tarafından eksprese edilir. Çizginin altında kalanlar ise basit epitelde eksprese edilirler. En üstte görülen üç keratin çifti kornea, deri ve özofageal tip farklılaşma markeridir. Bu üç farklılaşmaya spesifik keratin çifti, hastalık ya da doku kültürü ortamında epitelin dediferansiye hale gelmesi ile kaybolur. Kesikli çizgili kutu içindeki keratinler ise, bazı tümörlerde, kültürde ve hastalıklarda bulunur (s.e. sıralı epitel).

8.6. Keratinler ve Hastalıklar:

Keratinlerin bir çok deri hastalığında (örneğin, kutaneus graft-versus-host, lichen planus, kronik diskoid lupus eritematosus gibi) artış gösterdiği bilinmektedir. Bu keratinler, apoptotik keratinosit ölümü ile ortaya çıkarlar(53). Bundan başka, mutant basal epidermal keratin geni eksprese eden transgenik farelerin ve bunların kültüre keratinositlerinin biyokimyasal analizleri sonucunda, bunların "epidermolisis bullosa simpleks" (EBS) olarak bilinen bir grup otozomal dominant insan deri hastalığına benzeyen bir fenotip gösterdiği bulunmuştur(167). Bonifas ve arkadaşları, RFLP analizleri

ile 50K (14 no'lu) keratin geninin hastalıkla ilişkili olduğunu bulmuşlardır(19). Coulombe ve arkadaşları, EBS'nin bir sub tipi olan Dowling-Meara'lı iki hastada, K14 geninde nokta mutasyonu saptamışlardır(32).

Psoriasisde, psoriatik lezyonlardaki keratinlerin maturasyon yollarının normal epidermisten farklı olduğu öne sürülmüştür(172).

Saku ve arkadaşları, Sjögren's sendromlu hastaların tükürük bezi hücrelerindeki bazı komponentleri tanıyan anti-tükürük bezi antikolarının aslında anti-keratin antikoları olabileceğini, bunların Sjögren's sendromu için diagnostik bir değer taşıyabileceğini öne sürmüşlerdir(141).

9. STRATUM KORNEUM ANTİJEN ve ANTİKORLARI

Hemen hemen tüm insan serumlarının stratum korneuma (SC) karşı antikor oluşturduğu bilinmektedir. SC'un çeşitli antijenlerine karşı oluşan bu antikorlar, immün adherens, mikst aglütinasyon testi, indirekt hemaglütinasyon, indirekt immünfloresan, enzim immünoassay ve immünoblotting gibi yöntemlerle saptanabilir. SC'daki antijenler, genelde hücre membranı ve/veya intersellüler bölümler ile ilgilidir(88,89,90,91,92,134). SC'daki bu antijenik determinantlara karşı oluşan antikorlar normal serumlardan başka çeşitli otoimmün hastalıklarda ve psoriasis gibi bazı deri bozukluklarında görülebilir. Psoriasis olan tüm aktif hastalarda, immünglobulinlerin SC'a in-vivo olarak bağlandığı gösterilmiştir. Bu etkileşimin, egzama, lichen planus, diskoid lupus eritematosus ve pustulosis palmaris et plantaris gibi bazı dermatozlarda da görüldüğü saptanmıştır (35,134). Bunlardan başka SC antikorları fetal serumlarda ve normal infantların serumlarında da bulunur.

SC antikorları, genelde vücudun her yerinde bulunabilir. Bu antikorlar, çoğunlukla IgM ve IgG sınıfındadır; ancak IgM antikora daha fazla rastlanır. İndirekt immünofloresan yöntemi ile IgA ve IgE SC antikora da rastlanılmıştır. IgM SC antikorlar, ölü doğanlarda ve yaşamın ilk iki ayındaki infantlarda bulunmazlar. Bu durumda IgG antikor titreleri de çok düşüktür.

SC antijenleri ile etkileşen antikorlar iki gruba ayrılabilir: Birincisi, tripsin-fenol-su

(TPW) metodu ile ekstrakte edilen antijenlere karşı oluşan ve pasif hemaglutinasyon ve immün adherens ile saptanabilen antikolar, ikincisi normal insan derisindeki "callus"dan elde edilebilen antijene karşı etkili ve indirek immünofloresan yöntemi ile gösterilebilen antikolar(134). Yapılan bazı çalışmalarda, SC'a karşı oluşan antikoların indirek immünofloresan ile keratin intermediate filamentlere (KIF) karşı ortaya çıktığı öne sürülmüştür. Hintner ve arkadaşları, indirek immünofloresan yöntemi kullanarak, serumları, SC içermeyen epidermisten elde ettikleri KIF ve SC içeren normal insan callus'u üzerindeki KIF ile absorbe ettiklerinde, KIF'lerin SC ve üst sitoplazmik antikolar için antijenik bir determinanat olduğunu göstermişlerdir. SC ve üst sitoplazmik antikoların aynı insan serumunda birlikte buldukları bilinmektedir. Ancak SC antikoları ile üst sitoplazmik antikoların aynı antijenik determinant(lar)a bağlanıp bağlanmadığı ya da aynı KIF proteinini tanıyıp tanımadığı bilinmemektedir(64). Qutaishat ve arkadaşları ise anti-SC antikorları için normal insan serumlarını TPW-SC antijen ve KIF ile absorpsiyonundan önce ve sonra pasif hemaglutinasyon ile araştırdıklarında serumların KIF'ler ile absorpsiyonunun anti-TPW-SC antikoların titrelerini etkilemediği, ancak anti-KIF antikor titrelerinde bir düşüş olduğunu, bir başka deyişle, anti-KIF antikoların TPW-SC antijenden etkilenmediğini bulmuşlar, bu yüzden de SC antijenlerine karşı oluşan antikoların anti-KIF antikolardan farklı olduklarını öne sürmüşlerdir(134). Ayrıca SC antijenler ile KIF arasında amino asit dizilimleri açısından da farklılıklar bulunmuştur.

Bu araştırmalar, insan serumlarında SC'a karşı oluşan antikoların, aslında çeşitli SC antijenlerine karşı oluştuğunu, KIF'lerin de bunlardan biri olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bir çok insan serumunda en azından iki tür SC antijeninin bulunduğu öne sürülmüştür. Bunlardan TPW-SC antijeni, boynuzsu tabakanın hücre kılıfında, KIF antijeni ise intersellüler bölgede yerleşmiştir(134)

Jablonska ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, tam lezyon oluşturan psoriasisli hastaların yaklaşık % 80'inde, erken ya da linear lezyon gösteren psoriasisli hastaların ise yaklaşık % 50'sinde SC'da komplemana rastlanmıştır(73). SC, serum ile etkileştiğinde alternatif yoldan komplemanı aktive eder. SC kornifiye kılıfının kemotaktik aktivitesinin keratin fraksiyonundan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Taze

insan serumlarında ortokeratotik SC homojenatları, C3'ü C3a ve C3b'ye dönüştürür. Ayrıca SC'un, C5a (anafilotoksin) üretimi için komplemanı alternatif yoldan aktive ettiği bulunmuştur. SC'un bu aktivasyonu nasıl oluşturduğu tam olarak bilinmemektedir(161). Yine aynı şekilde pustulosis palmaris et plantaris'li hastaların pustular lezyonlarda da anti-SC antikorların komplemanı aktive ettiği düşünülmektedir(35).

SC'daki otoantijenlerin antikor üretimini nasıl uyardığı tam olarak bilinmemektedir. Bu antijenlerin SC'a bağlı olduğu sanılmaktadır(88). SC antikorlarının in vivo bağlanması, kompleman fiksasyonu ile birlikte RF ile ilişkili olduğu, bu yüzden de otoimmünite ve bazı dermatozların patogeneğinde etkili olduğu düşünülmektedir. Gerçekten psoriasiste lezyonların IgG, IgA, IgM, SC antikorları, RF ve C3 içerdiği görülmüştür(73,89). Ayrıca RF'ün SC antikorlarının Fc parçasına in-vivo bağlandığı öne sürülmüş, bu yüzden psoriatik bölgelerin RF benzeri bir aktiviteye sahip olduğu düşünülmüştür(72). Aynı şekilde psoriatik bölgelerde IgG'lerin lokalizasyon yerleri ile SC antijenlerinin lokalizasyon bölgelerinin birbirine uygunluk gösterdiği saptanmıştır (14,16,72).

Bir serumdaki SC antikor titrelerinin farklı deri örneklerinde farklı oranlarda bulunmuş ve bu antikorların insan serumunda bir allospesifisite gösterdiği öne sürülmüştür(33).

Özetlemek gerekirse, SC antikorları genellikle IgG ve IgM sınıfından olan ve komplemanı fikse eden antikorlardır. Bunlar otoimmün ve çeşitli dermatozlar yanında normal insanlarda da bulunabilirler ve SC'un çeşitli determinantlarına karşı ortaya çıkabilirler(14,16,90,91,92).

10. ANTI-KERATİN ANTİKORLAR (AKA)

Epitelyal sitolazmik antijenlere karşı antikorların çeşitli hasta gruplarında ve normal insanlarda bulunduğu bilinmektedir. Bu anti-keratin antikorlar (AKA), çeşitli immünofloresan yöntemlerle, ELISA ve immünoblotting gibi tekniklerle saptanabilir. AKA'lar çeşitli dermatozlarda, myelomlarda, kemik iliği transplantasyonu sonrasında, çeşitli tümörlerde, RA'de ve bir çok kollajen hastalıklarda artabilmektedir(64,70,150).

Birçok anti-epidermal antikor, çeşitli keratin polipeptidlerine karşı oluşabilir. Genelde düşük molekül ağırlıklı keratinleri tanıyan antikorlar epidermin bazal tabakalarında bulunurken, yüksek molekül ağırlıklı keratinlere karşı oluşan antikorlar, epidermin üst tabakalarında bulunur(51). Örneğin Iwatsuki ve arkadaşları immünoelot tekniği ile çeşitli hastalık gruplarında ve normal bireylerde AKA'ları araştırdıklarında, bu antikorların SC'da 67 kd'luk keratinlere, üst tabakalarda ve tüm epidermiste 58-56 kd'luk ve 67-63 kd'luk keratinlere, bazal hücre tabakalarında ise 63 kd'luk (zayıf olarak da 50 kd'luk) keratinlere karşı ortaya çıktığını göstermişlerdir. Ayrıca üst tabaka antikorların, suprabazal keratinositlerin tonofilamentleri ile, bazal hücre tabakasındaki antikorların ise bazal hücrelerin tonofilamentleri ile etkileştiği de saptanmıştır(71). Genel ve üst epidermal hücrelerdeki otoantikorların titreleri her ne kadar bazı cilt bozukluklarında ve malignansilerde artış gösterse de bu bozukluklarda tanı koydurucu bir öneme sahip değildir. Bazal tabaka antikorlar ise normal insanlarda daha seyrek ve genellikle ilaç reaksiyonları ve yanıklar ile ilişkilidir. Ayrıca bazı malign ve selim cilt hastalıklarında artış gösterirler.

Serre ve arkadaşları ELISA ve indirekt immünoelot yöntemleri ile IgG antikeratin antikorların SC ve suprabazal tabaka (SBL) ile; IgM antikeratin antikorların ise SC, SBL ve bazal tabaka (BL) ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür(150). Grubauer ise IgM AKA'ların basal keratinositlerde bulunan 51 kd' ve 58 kd'luk keratinlere karşı oluştuğunu göstermiştir(53).

Çeşitli in-vitro çalışmalar virus transforme B hücrelerinin ya da insan hibridoma hücrelerinin keratin içeren çeşitli hücreyel komponentlere karşı otoantikor oluşturduğunu göstermiştir(46,61).

AKA'lar da diğer hücre organellerine karşı oluşan antikorlar gibi otoantikor sınıfındadır. Böyle antikorların oluşumu immünoelotik uyarı veya B hücresi transformasyonu ile artmaktadır. Doğal (non-immünize) ve immünize farelerin hibrit dalak hücreleri kullanılarak AKA'ların oluşumu araştırıldığında AKA üreten B hücrelerinin non-immünize farelerde yüksek oranlarda bulunduğu, bunun yanında farelerin keratinler ile spesifik ve hatta keratinlerle ilişkisi olmayan (aktive T hücreleri, yetişkin T-hücresi lösemi lizatları ve HTLV-1 gibi) çeşitli immünojenlerle non-spesifik immünizasyonu

sonucunda da çeşitli tip AKA oluşumuna neden olduğu ortaya çıkmıştır(70). Bu yüzden bu antikoların, spesifik antijen uyarımı ve in-vivo poliklonal B hücresi aktivasyonu ile artış gösterdiği öne sürülebilir.

Apoptotik keratinosit ölümünün keratinler için önemli bir kaynak oluşturduğu ve AKA'lar ile etkileşim gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca, AKA'ların keratin proteinlerini opsonize ettiği ve nötrofiller aracılığı ile fagositozuna neden olduğu öne sürülmüştür (53).

10.1. Monoklonal Anti-keratin Antikolar:

Çeşitli keratin polipeptidlerine karşı spesifisite gösteren antikolar üretmek mümkündür. Böyle antikolar bilinen poliklonal metodlarla ya da hibridoma teknolojisi kullanılarak spesifik monoklonal metodlarla oluşturulabilir. Monoklonal antikolar, poliklonal antikolardan bazı avantajları nedeniyle daha önemlidir. Bu avantajları şöyle sıralamak mümkündür:

- 1- Monoklonal antikolar genellikle monospesifiktir,
- 2- Monoklonal antikolar tarafından tanınan antijenler genellikle küçük ve spesifik bir moleküldür,
- 3- Monoklonal antikoların spesifitesi genellikle değişmez,
- 4- Büyük miktarlarda spesifik monoklonal antikor üretmek mümkündür(41).

Sitokeratinlere karşı oluşturulmuş bir çok monoklonal anti-keratin antikor bulunmaktadır. Bunlar arasında EKH1, EKH4, AE1, AE2, AE3, 34betaE12 ve 34betaB4 sayılabilir (Tablo 9)(41,42,51).

Monoklonal Antikor	Antijen Spesifitesi	Normal İnsan Epidermisinde Boyanma Yerleri
AE1	Keratin (50,56 kd)	Basal hücre tabakası
AE2	Keratin (50,58,65-67 kd)	Suprabasal tabakalar
AE3	Keratin (52,58,65-67 kd)	Tüm tabakalar
EKH4	Keratin (50 kd)	Alt kısımda 2-3 tabaka
EKH1	Tüm orta boy filament sınıfları (K,D,V,GFAP)	Tüm tabakalar
34betaE12	Keratin (66,57,51,49 kd)	SC
34betaB4	Keratin (66,57,51,49 kd)	SC

Tablo 9: Çeşitli monoklonal antikeratin antikorlar (K:keratin,D: desmin, V:vimentin, GFAP:glial fibriller asidik protein).

10.2. Anti-keratin Antikorlar ve Hastalıklar:

AKA'lara çeşitli hastalarda rastlamak mümkündür, ancak bunların fonksiyonu henüz bilinmemektedir. İmmünohistolojik olarak lichen planusta, sitoid yapılarda, lichenoid ve makular amiloidozlarda (LA ve MA) amiloid depolarında immünoglobulin birikimine rastlanmıştır. LA ve MA'da bu amiloid depolarının keratin polipeptidleri içerdiği ve bu immünglobulinlerin keratinlere bağlandığı bulunmuştur(69). Monoklonal anti-keratin antikorlar kullanılarak, lichen planus ve diskoid lupus eritematosus'ta sitoid yapıların ve "skin-limited" amiloidlerin major prekürsörlerinin epidermal keratinler olduğu gösterilmiştir(42). Aynı şekilde, Yoneda ve arkadaşları kutaneus amiloidosis'de monoklonal AKA EAB-903'ün önemli diagnostik bir değere sahip olduğunu öne sürmüştür(178).

Bunlardan başka, RA'lı hasta serumlarının sıçan özofagusunun SC'una spesifisite gösteren AKA'ların bulunduğu gösterilmiştir(180). Fakat AKA ile pustulosis palmoplantaris ya da psoriasis ile ilişkili eklem hastalıkları arasında bir ilişki bulunamamıştır(77).

10.2. 1. Romatoid Artritte Anti-keratin Antikorlar:

1979 yılında Young ve arkadaşları, bir çok RA'lı hasta serumunda sıçan özofagusunun keratinize tabakasına karşı oluşan AKA bulunduğunu saptamışlardır (180). RA'de bu antikorun varlığı çeşitli laboratuvarlar tarafından araştırılmış ve RA'lı hasta serumlarında % 36'dan % 80'lere varan oranlarda pozitif bulunmuştur (57,80,83,84,95,103,109,127,133,146,168,179).

RA'de AKA ile anti-intermediate filament antikorlar, anti-düz kas antikor ve anti-nükleer antikorlar gibi diğer otoantikokorlar arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu bulgu AKA oluşumuna neden olan faktörlerin, diğer otoantikokorların oluşumuna neden olan faktörlerden farklı olabileceğini düşündürmektedir(133). Bunun yanında bazı yazarlar, AKA pozitifliğinin ANA ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir(127,146).

Yapılan çalışmalarda RA'de AKA'lar ile ilgili değişik sonuçlar elde edilmiştir. Ordeig, AKA pozitifliğinin yaşlı hastalarda artış gösterdiğini, bu antikorun, subkutan nodüllerle, hastalığın sistemik belirtileri ve aktivitesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir(127). Quismorio ve Youinou, AKA ile HLA-DR4 arasında hiç bir ilişkinin bulunmadığını bildirmişlerdir(133,179). Bunun yanında, AKA ile IgM RF arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinmektedir(83,103,133). AKA'un RA için oldukça spesifik kabul edilirken, SCAT'ın AKA'dan daha sensitif olduğu bildirilmiştir(57). Bunun yanında AKA sensitivitesi RF negatif hastalarda % 18-38 arasında değişmektedir(83). Mallya ve arkadaşları(103) ve Hajiroussou ve arkadaşları(57), CRP ile AKA arasında bir ilişki bulunduğunu, bu ilişkinin SCAT pozitifliği ile bir bağlantısının olmadığını saptamışlardır. Mallya ayrıca, AKA'un anti-ssDNA antikor, eritrosit sedimentasyon hızı, artikular indeks, serum amiloid-A konsantrasyonu ile de ilişkili olduğunu öne sürmüş, ekstra artikular özellik gösteren RA'lı hastalarda AKA sıklığının yüksek olduğunu belirtmiştir(103). Kirstein ve arkadaşları(83) ise AKA ile yaş, cinsiyet, erozyon, nodüller, hastalık süresi, sabah sertliği ve eritrosit sedimentasyon hızı arasında bir ilişki olmadığını öne sürmüştür. Scott(146), AKA aktivitesinin, diğer anti-doku antikorları (anti-retikülin, anti-gastrik-parietal hücre, anti-düz kas, anti-mitokondria ve anti-nükleer antikorlar) ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür. Bunun yanında Kirstein'in sonuçlarına benzer bir şekilde, sabah sertliği,

eritrosit sedimentasyon hızı ve akut faz proteinleri (CRP ve haptoglobulin) ile AKA arasında ilişki bulunmamıştır(146). Scott ayrıca, RA'lı hastalarda AKA aktivitesinin, sıçan özofagusunun anatomik bölgelerinde değişiklik gösterdiğini, bazı RA'lı hasta serumlarının sadece sıçan özofagusunun 1/3 orta parçasındaki keratinler ile etkileştiğini, bazı RA'lı hastaların ise gastro-özofagal bölgede reaksiyon verdiğini, diğer bazı hastaların ise her iki bölgede keratinler ile etkileştiğini ileri sürmüştür(146). Vincent ve arkadaşları AKA insidansının hastalık süresine bağlı olmadığını, bunların hastalık şiddeti ve aktivitesi (ya da her ikisi) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu araştırmacılar epidermal keratinlere karşı oluşan otoantikorların RA için spesifik olmadığını bulmuşlardır(168). Vincent son yaptığı bir çalışmada ise anti-epidermal sitokeratin antikorların (AESAs) AKA'ların tersine serum IgG konsantrasyonları ile paralellik gösterdiğini, bu antikorların IgM RF, eritrosit sedimentasyon hızı ve C-reaktif protein ile ilişkili olmadığını, dolayısıyla AKA ile AESA'ların farklı antikorlar olduklarını bulmuştur(169).

RA'de, genelde, IgG sınıfından AKA'ların bulunduğu ve bu sınıf antikorların RA için spesifik olduğu saptanmıştır. Bunun yanında IgM ve IgA sınıfından da AKA'lara rastlanmış, ancak bunların diagnostik bir öneme sahip olmadığı kanıtlanmıştır(127,133,151,168). Radial immünodifüzyon ile RA'de AKA'ların subklasları araştırıldığında IgG1'in oldukça yüksek, bunun yanında, IgG2'nin ise oldukça düşük olduğu bulunmuştur (IgG1: % 87, IgG2: % 19, IgG3: % 13, IgG4: % 35)(170). AKA'lar, bazı RA'lı hastaların eklem sıvılarında da bulunmuştur. Youinou (179), RA hastalarının yaklaşık % 48 'inde eklem sıvılarında AKA'lara rastlamıştır. Kirstein ise eklem sıvılarının % 80'inde AKA'a rastlamıştır. Bu durumda AKA'ların RA'lı hastaların eklem sıvılarında lokal olarak üretildiği düşünülebilir(84).

AKA'un komplemanı fikse etme özelliği ve bazı RA'lı hastaların eklem sıvılarında bulunması, bunların patojenik bir öneme sahip olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, AKA'un soluble immün kompleksler oluşturabileceği ve sinovyal inflamasyonun patogenezinde etkili olabileceği sanılmaktadır(133).

Sıçan özofagusuna karşı serum AKA'lar RA'dan başka sistemik sklerosis'de % 8 oranında, psoriasis'de % 7 oranında, ankilozan spondilit'de (AS) % 6 oranında ve

SLE'de % 3 oranında bulunmuştur(179). Bununla birlikte Quismorio(133) AKA'u AS'de % 25 oranında, Scott(146), progresif sistemik sklerozis'de (PSS) % 50 oranında, Johnson(76) ise SLE'de % 25 oranında pozitif bulmuştur. Meyer ve arkadaşları da seronegatif romatoid artritte % 41 oranında, seropozitif romatoid artritte ise % 58 oranında AKA'a rastlamışlar ve bu antikörlerin romatoid artrit için diagnostik bir marker olabileceği görüşünü savunmuşlardır(109).

Günümüzde AKA'ların RA'daki önemi tartışma halindedir. Bazı yazarlar (57,80,83,95,127,151,179,180) bu antikörlerin RA için oldukça spesifik olduğunu ve hastalığın tanısında, özellikle RF negatif hastalarda diagnostik bir öneme sahip olduğunu savunurken, AKA'un RA için spesifik olmadığı görüşünü savunan yazılar da vardır(76,133,146).



II. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Behçetli hastaların Anti-keratin antikorun (AKA) sıklığını ve keratinin hangi komponentine karşı ortaya çıktığını araştırmak amacı ile yapıldı. Ayrıca kontrol amacı ile romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, sistemik skleroz gibi bazı hastalık grupları da araştırma kapsamına alındı.

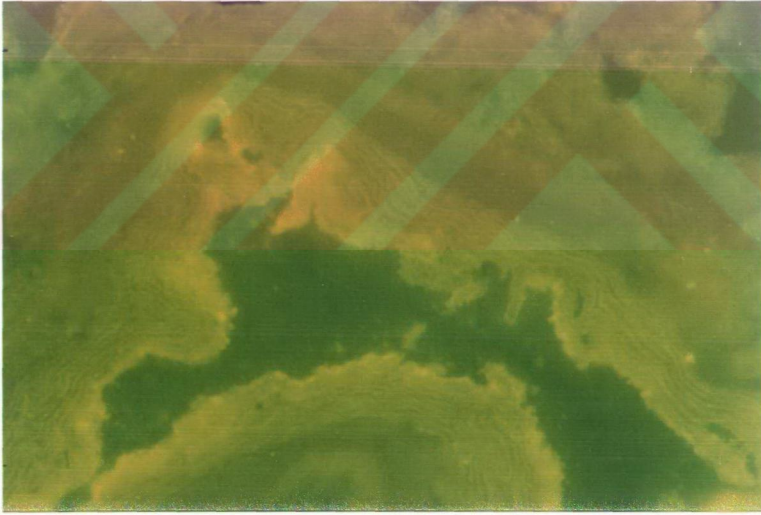
11.1. Hastalar: Bu çalışma, Mart 1990 ile Aralık 1991 tarihleri arasında, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalında takip edilen poliklinik hastaları ile Marmara Üniversitesi Hastanesi Hematoloji-İmmünoloji Bilim Dalında takip edilen hastaların serumları ile yapıldı. Çalışmada 126 Behçetli hasta, 44 seronegatif ve seropozitif romatoid artrit, 17 sistemik lupus eritematozus, 8 diğer hasta (4 progresif sistemik skleroz (PSS), 3 ankilozan spondilit (AS) ve 1 Reiter hastalığı) serumu kullanıldı. Negatif kontrol olarak hastane çalışanları ile Tıp Fakültesinin 4 ve 5. sınıflarında eğitim gören öğrencilerden sağlanan 29 ayrı serum kullanıldı. Hasta ve kontrollerden toplanan serumlar eppendorf tüplerine alınarak -70°C derin dondurucuda saklandı. Tablo 10'da hastalar ile ilgili genel bilgiler verilmiştir.

Hastalık Grupları	Test Edilen Serum sayısı	Yaş (Ort ± SD)	Yaş Sınırları	Cinsiyet (E/K)
RA	44	47.5 ± 13.1	19 - 68	15/29
Behçet	26	32.8 ± 8.57	15 - 65	108/18
SLE	17	26.2 ± 5.7	21 - 40	4/13
PSS	4	46.0 ± 9.7	33 - 56	0/4
ANA(-)	81	35.3 ± 18.0	7 - 65	24/57
Anti-DNA(-)	33	30.1 ± 20.0	5 - 80	12/21
Kontroller	29	25.8 ± 2.4	23 - 32	14/15

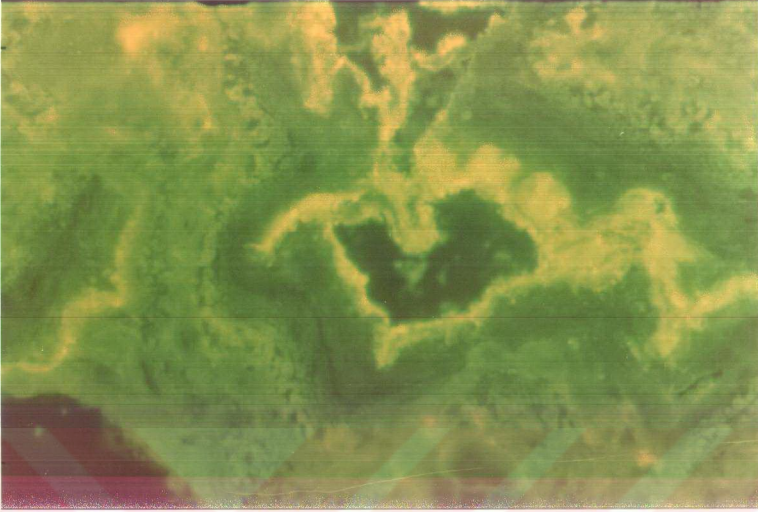
Tablo 10: Hastalar hakkında genel bilgiler.

11.2. Metodlar: Bu çalışmada hasta ve kontrol serumlarında AKA pozitifliği araştırıldıktan sonra, pozitif bulunan serumlarda bu antikorun hangi keratin komponentine karşı oluştuğunu saptamak için Western-Blotting yöntemi kullanıldı.

11.2.1. Anti-keratin Antikorlar(AKA): AKA tayini Young'un tarif ettiği indirekt immüno floresans yöntem(180) ile yapıldı. Vistar sıçanların özofaguslarının 1/3 orta parçaları antijen substratı olarak kullanıldı. Tragocauth jel içine gömülen doku -80°C'de donduruldu. Daha sonra dokudan -25°C'deki "mikro-kesici"de (Microm Heidelberg) 5µ'luk kesitler alındı ve kullanılıncaya kadar -20°C derin dondurucuda saklandı. Değerlendirilmeye alınan tüm serumlar fosfat tamponlu tuz solusyonu (PBS) (pH 7.4) ile 1:10 oranında seyreltildi. Seyreltik serumlar, doku kesitleri üzerine ilave edilerek oda ısısında 30 dakika süre ile bekletildi, PBS ile 5 dakika yıkandı. Daha sonra doku kesitleri 1:20 seyreltik floresan isotiyosiyanat işaretli (FITC) keçi anti-insan IgM, IgA (Kallestad, ABD) ve tavşan anti-insan IgG antiserumları (Behring, Almanya) ile oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi, PBS ile yıkandı. Floresans mikroskopta (NIKON, Excitation filter 330, EFD, Dichroic ayna DM400, Barrier filter BA420, Japonya) incelendi. Özofagus kesitlerinin korneal tabakaya sınırlı çizgisel boyanma göstermesi AKA varlığı olarak kabul edildi (Şekil 11 a, b).



Sekil 11 a: Sıçan özofagusunda SC'a sınırlı linear boyanma, AKA(+) görünüm.



Şekil 11 b: Siçan özofagusunda AKA(-) görünüm, SC'da boyanma yok.

11.2.2. Anti-nükleer antikorlar (ANA): ANA, bilinen indirekt immünofloresan metotla tayin edildi. Kısaca normal beyaz fareden alınan mide-böbrek-karaciğer dokularının kompozit blokları antijen substratı olarak kullanıldı. Dokular 5μ 'luk kesitler halinde lamlar üzerine alındı. AKA tayinine benzer yöntemle 20 dakika 1:10 dilüe hasta serumları ile inkübe edildi, 10 dakika PBS (pH 7.4) ile yıkandı ve FITC işaretli keçi anti-insan IgM, IgA ve tavşan anti-insan IgG seumları ile 20 dakika inkübe edildi, tekrar yıkandı. Floresan mikroskopta nükleus boyanması gösteren serumlar ANA(+) olarak kabul edildi.

Hastaların sedimantasyon hızı, RF, HLA-B5 ve paterji testi gibi diğer bulguları Cerrahpaşa Tıp fakültesi Romatoloji Bilim Dalı hasta arşivinden sağlandı.

11.2.3. Absorbsiyon Çalışmaları: Absorbsiyon çalışması için AKA (+) 5 RA'li, 2 Behçetli hasta serumu ve monoklonal anti-sitokeratin antikor 8.60 (Sigma, ABD)

kullanıldı. PBS (pH 7.4) ile 1:10 seyreltilen 100 µl'lik serumlara (monoklonal antikor 100 kez seyreltildi) 10 ve 20 µl insan epidermal keratin (Sigma) ilave edildi ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi. Daha sonra +4°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı ve santrifüj edilip indirekt immünofloresans yöntemi ile aktivite kaybının varlığı araştırıldı.

11.2.4. Endotel Hücre Kültüründe AKA Saptanması: Endotel hücre kültürü Jaffe'nin bildirdiği metoda göre yapıldı(74). Buna göre Zeynep Kamil Hastanesinde doğum sırasında yeni-doğan göbük kordonları 30-35 cm. olacak şekilde her iki ucundan kapatılarak laktatlı ringer içine alındı ve 4-6 saatlik süre içinde çalışıldı. Steril laminar hava akımlı kabin içinde alkolle yıkanan göbük kordonlarının venleri 19 numara kelebek setle kateterizasyon sonrası ilk aşamada % 0.9 NaCl ya da laktatlı ringer solüsyonu ile, gelen materyal berraklaşana dek yıkandı. Daha sonra % 0.1'lik Tip I kollajenaz (Sigma) 1 mg/ml olacak konsantrasyonda laktatlı ringer ile sulandırılıp göbük venine dolduruldu. Göbük kordonu 10-15 dakika süreyle 37°C'de inkübe edildikten sonra yeniden laktatlı ringer ile yıkandı ve göbük kordonu veninden elde edilen endotel hücreleri tüplere aktarıldı ve santrifüj edilerek dibe çökmesi sağlandı. Buradan toplanan hücreler steril Terasaki plaklarına (Greiner, Almanya) ekilerek, 48-72 saat 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde kültürü yapıldı. Kültür, RPMI-1640, ısı ile inaktive edilmiş % 10 fetal dana serumu (FCS, Gibco, İngiltere), 100 U/ml penisilin (Gibco), 100 mikrogram/ml streptomisin (Gibco), 2 mmol/ml L-Glutamine (Gibco) ve 2.25 µg/ml NaHCO₃ ile yapıldı. Kuyular endotel hücreleri ile tam kaplandıktan sonra sulandırılmış hasta ve kontrol serumları ile 30 dakika inkübe edildi, PBS (pH 7.4) ile 10 dakika yıkandı. FITC işaretli tavşan anti-insan IgG serum ile yarım saat tekrar inkübe edildi ve PBS ile yıkandı. Sonuçlar floresan mikroskopta değerlendirildi (Şekil 12).



Şekil 12: Endotel hücre kültüründe AKA'nın görünümü

11.2.5. Western-Blotting:

11.2.5.1. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE):

SDS-PAGE, Laemmli yöntemi ile yapıldı(94). İki cam plakanın aralarında boşluk bırakacak şekilde, izole bantlarla birleştirilmesi ile oluşturulan kasete üst kısımda 1.5-2 cm boşluk bırakılarak "alt jel" (separating gel) döküldü. Kasetin üstte boş kalan kısmına jelin kurumaması için distile su eklendi. Bu şekilde jelin sızdırmamasına dikkat ederek bir gece bekletildi. (Alt jel; 0.37M Tris-HCl, % 0.1 SDS (Merck, Almanya) % 30 akrilamid (Merck), % 0.026 N,N'-metilen bisakrilamid (Merck), % 0,1 amonyum peroksidisülfat (APS) (Merck) ve % 0.5 N'N'N'N'-Tetrametil-etilendiamin (TEMED) (Sigma)

ile pH 8.8 olacak şekilde hazırlandı). Ertesi gün kasetin üst kısmındaki distile su atılarak yerine üst jel döküldü ve jel üzerinde örneğin tatbiki için gerekli çukurların oluşumunu sağlayacak tarak kasete yerleştirildi. (Üst jel; 0.125M Tris-HCl, % 0.1 SDS, % 4 akrilamid % 0.04 N,N'-metilen bisakrilamid, % 0.1 amonyum peroksidisülfat ve % 0.5 TEMED, pH 6.7 olacak şekilde hazırlandı). 1-2 saat jelin donması için beklendi. Bu arada, 35 µl insan epidermal keratin (Sigma), 465 µl % 0.9'luk NaCl ve 100 µl örnek tampon'dan oluşan tatbik solusyonu buz üzerindeki eppendorf tübüne konup kaynayan suda 2 dakika hacmi değişmeden denatüre edildi (Örnek tamponu; 0.125M Tris-HCl tampondan 7ml, 3.6ml gliserin, 1gr SDS, 0.93 gr dithiothreitol (DTT) (Sigma), distile su ile 10ml'ye tamamlandı. 0.5ml porsiyonlanarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı). Bu işlemde sonra örnekler (keratin) jel üzerinde açılan çukurlara 50 µl'lik hacimlerde tatbik edildi ve jel, içinde elektroforez tamponu bulunan tank içinde önce yarım saat 20 mA'de, daha sonra 3.5-5 saat 30 mA'de elektroforez yapıldı. (Elektroforez tamponu; 0.05M Tris-HCl (Merck), 0.384M glisin (Merck), % 0.1 SDS pH 8.3 olacak şekilde hazırlandı).

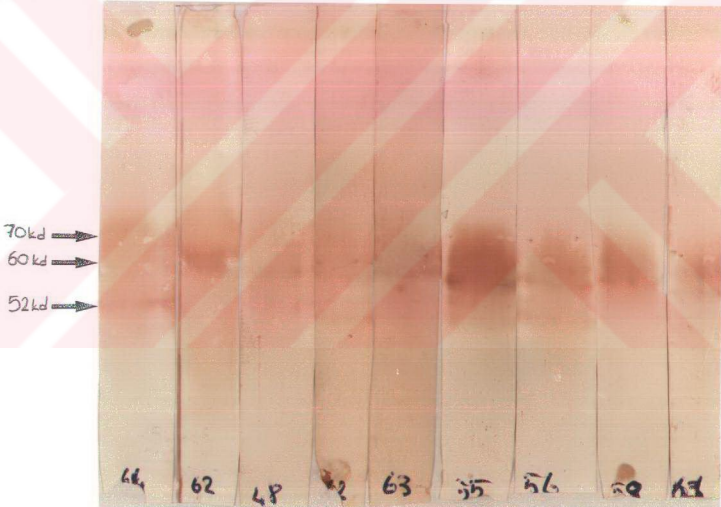
11.2.5.2. Blotting:

Elektroforez işleminden sonra Towbin'in(163)tarif ettiği gibi, jel içindeki keratin proteinleri nitrosellüloz membrana transfer edildi. Bunun için elektrobloeting aleti (LKB, ABD) kullanıldı. Jel nitrosellüloz membranla (Sartorius, Almanya) arasında hiç hava kalmayacak şekilde kapatıldı. Jel-membran kompleksi, emici kağıt ve sünger ile her iki taraftan sandwich edildi ve bir kafes yardımı ile sıkıca kapatıldı. Sistem, içinde blotting tampon bulunan tank içine yerleştirildi ve 14 mA'de bir gece boyunca jeldeki proteinlerin membrana transferi gerçekleştirildi. (Blotting tampon; 20mM Tris-HCl, 150mM glisin, % 20 metanol (Merck) pH 8 olacak şekilde hazırlandı).

11.2.6. Peroksidaz-Antiperoksidaz Yöntemi ile Bantların Saptanması:

Proteinler membrana transfer olduktan sonra membran 1 saat blocking tamponda (PBS + % 0.1 kazein) (Dibco) çalkalanarak bloke edildi. Nonspesifik bağlanmayı önlemek için daha sonra 10 dakika % 0.1 Tween 20 (Merck) içeren PBS ile yıkandı.

PBS + % 0.1 siğir serum albumin (BSA, Sigma) karışımı ile 1:20 oranında seyreltilen hasta serumları şeritler halinde kesilen membranlar ile birlikte plastik poşetlerin içinde 1 saat oda ısısında çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyondan sonra şeritler poşetlerden çıkarılarak yarım saat süre ile çalkalanarak Tween 20 + PBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra şeritler, PBS + % 0.1 BSA ile 1:100 dilüe edilmiş peroksidaz işaretili protein A (Sigma) ile yine poşetler içinde, oda ısısında çalkalanarak 1 saat süre ile ikinci kez inkübe edildi. Yıkama işlemi yarım saat süre ile bu kez normal PBS (pH 7.4) ile yapıldı. Bu sırada buz üzerinde ve karıştırılarak % 0.05'lik 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Sigma) boya solüsyonu hazırlandı ve süzüldü. Yıkama işlemi bittiğinde şeritler boyanmadan önce boya solüsyonuna % 0.1 H₂O₂ eklendi. Böylece karanlıkta boya ile muamele edilen şeritlerde 1-15 dakika süre içinde bantların oluştuğu gözlemlendi. Bantlar oluştuktan sonra şeritler distile su ile yıkanarak boyanma işlemi sonlandırıldı (Şekil 13).



Şekil 13: Western-blotting yöntemi ile antikor-keratin komponentleri etkileşimi. 1 ve 2. ci şeritler monoklonal AKA K 8.60 ve K 8.13 (Sigma), 3, 4, 5, ve 6'ncı şeritler, sıçan özofagusunda AKA(+), RA'lı, 7ve 8. şeritler AKA(+), Behçet'li hastaları gösteriyor. 9. şerit ise AKA(-) kontrol serumu.

III. SONUÇLAR

12.1. Sıçan Özofagus Kesitinde AKA:

1/3 sıçan özofagusunun keratinize tabakasına karşı oluşan anti-keratin antikorlar (şekil 11 a), 44 RA'lı hastanın 24'ünde (% 54.5), 126 Behçetli hastanın 27'sinde (% 21.4) pozitif bulundu. Buna karşılık 17 SLE'li hastada 1, 81 ANA(-) hastada 2 ve 33 anti-DNA(-) hastada 2 AKA pozitif bulundu. 29 sağlıklı kontrolde ise boyanma görülmedi (Tablo 11).

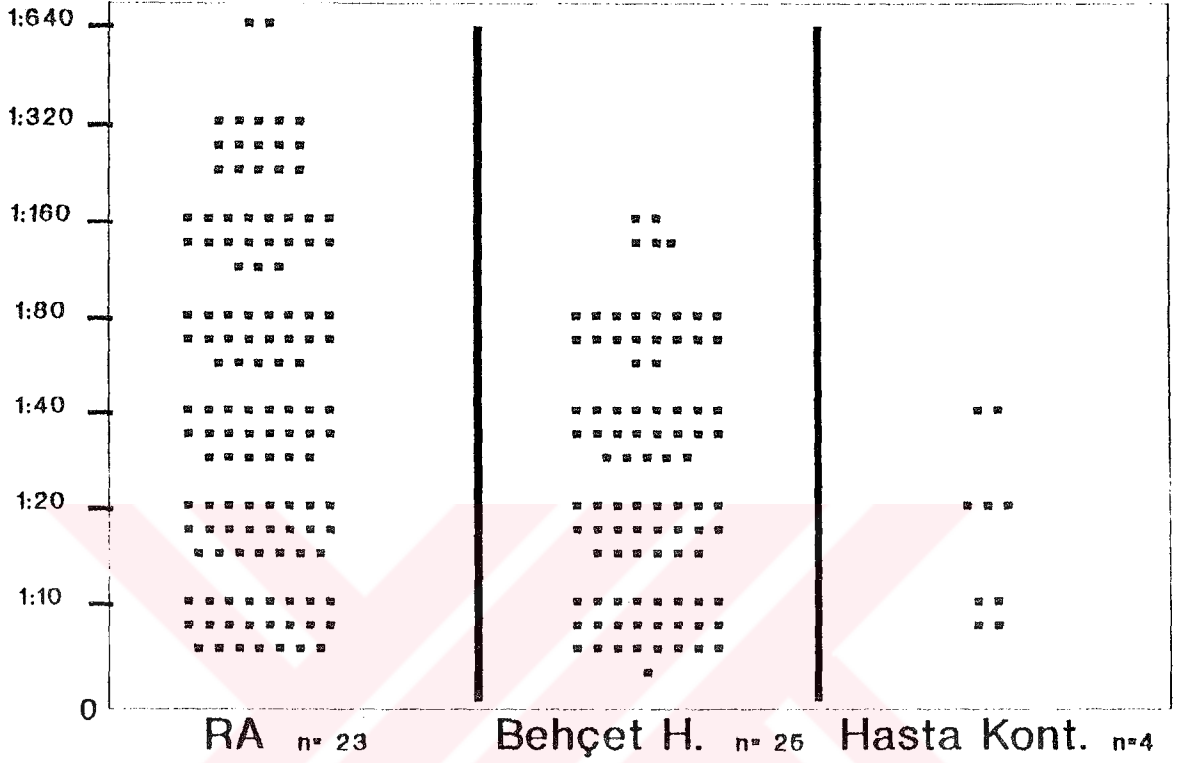
Hastalık Grupları	Test Edilen Serum Sayısı	AKA(+) (n)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
Behçet Hastalığı	126	26	21.4	86.30
Romatoid Artrit	44	24	54.5	89.50
Sistemik Lupus Eritematozus	17	1	5.8	83.70
Progresif Sistemik Skleroz	4	0	-	-
Reiter Hastalığı	1	0	-	-
Ankilozan Spondilit	3	0	-	-
ANA(-)	81	2	2.4	-
Anti-DNA(-)	33	2	6.0	-
Kontroller	29	0	-	-

Tablo 11: AKA'un çeşitli hastalıklardaki sensitivite ve spesifisiteleri

AKA(+) hasta serumları FITC işaretli anti-insan IgG, IgA ve IgM antiserumlar ile ayrı ayrı sıçan özofagusunda indirekt immünofloresan yöntemi ile incelendiğinde, tüm anti-keratin antikorların IgG sınıfına ait olduğu görüldü.

RA'li, Behçetli ve kontrol AKA(+) hasta serumlarının titrasyonları şekil 14'de görülmektedir.

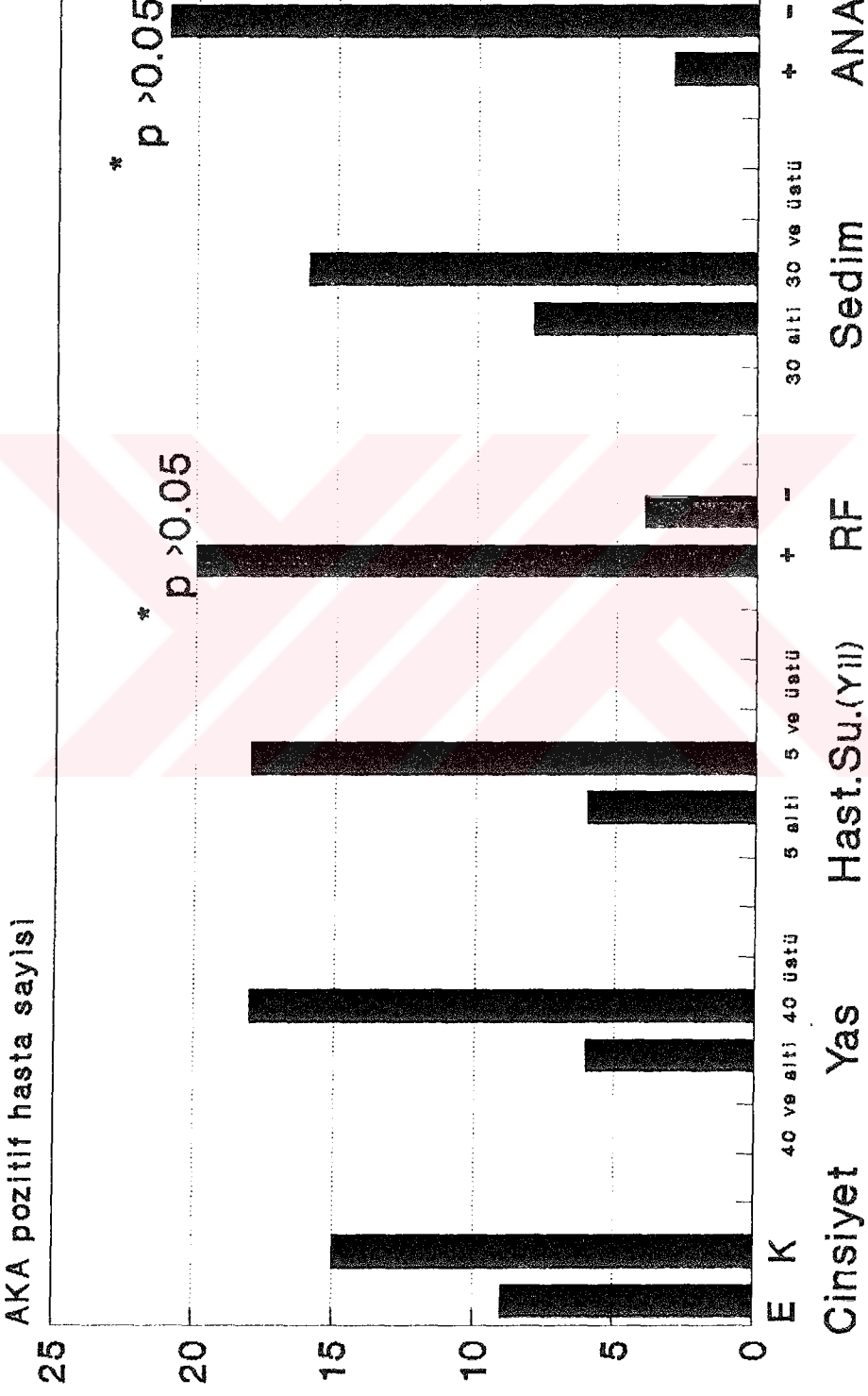
AKA(+) Hastalarda Titre Değerleri



Sekil 14: RA, Behçet ve Hasta Kontrollerin Titreleeri

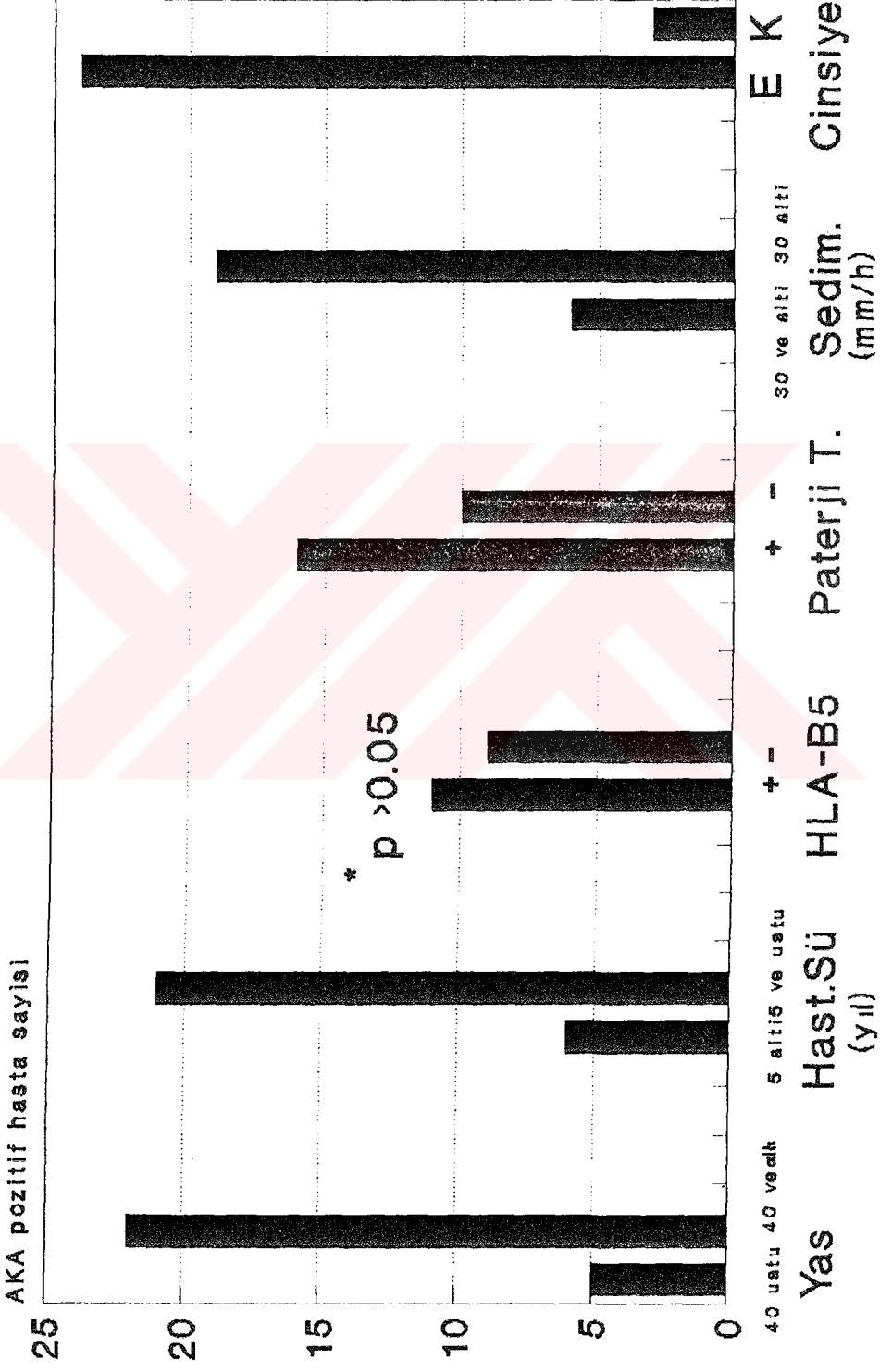
AKA ile bazı klinik ve laboratuvar bulgular karşılaştırıldığında RA'de AKA ile cinsiyet, sedimantasyon hızı ve ANA pozitifliği ile bir ilişki bulunmazken, bu antikörün RF(+), yaşlı ve hastalık süresi uzun grupta daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 15 a, b). Behçet hastalığında ise AKA ve diğer klinik ve laboratuvar parametreler arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki bulunamadı (Şekil 15 c). Behçetli ve RA'li hastalarda AKA pozitifliği ile ANA arasında hiçbir ilişki bulunamadı.

Sekil 15a: RA'li AKA(+) Hastalarda Bazı klinik ve Laboratuvar Parametreler



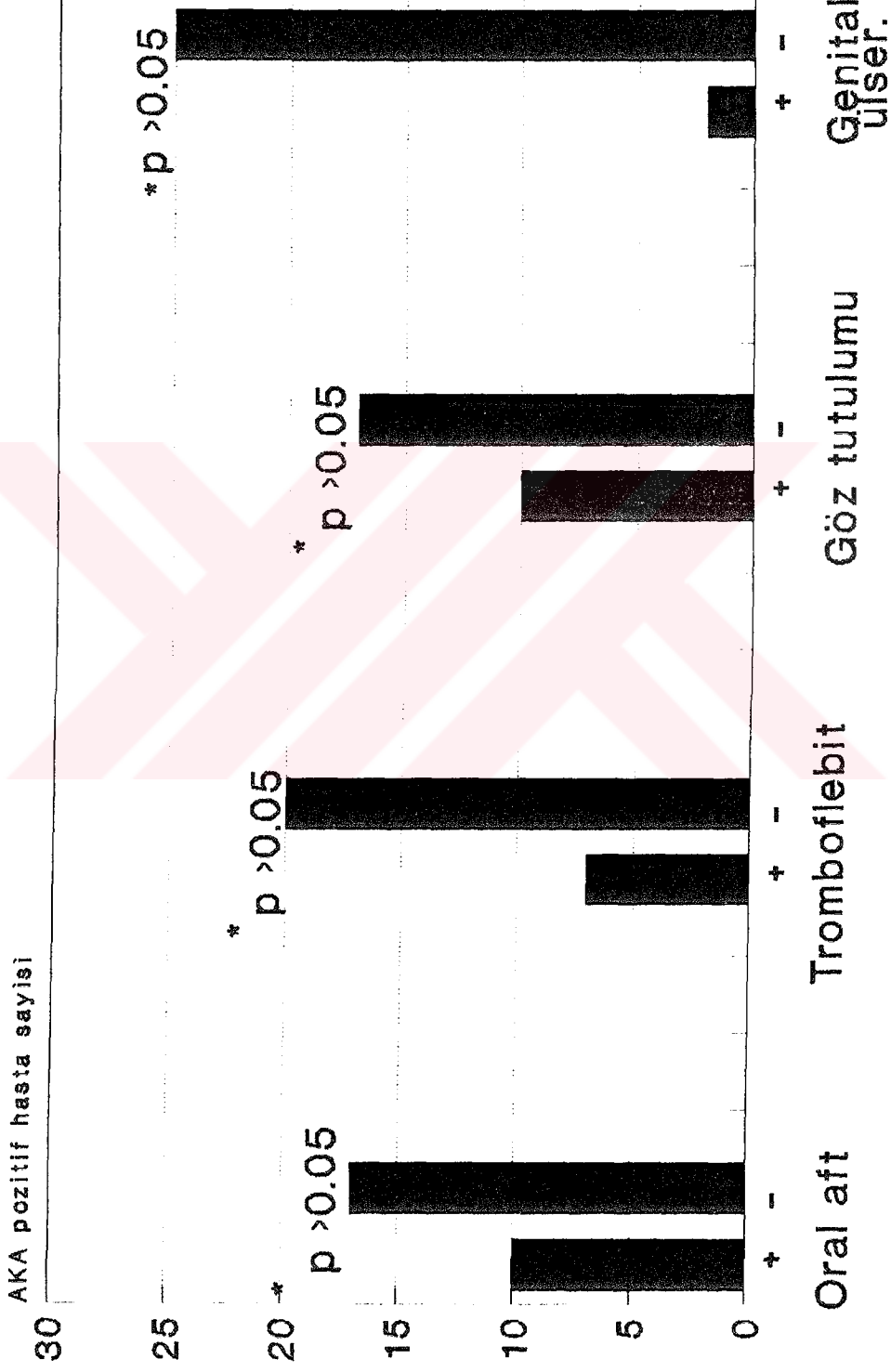
* Ki-kare testi kullanıldı

**Sekil 15b: Behçetli AKA(+) Hastalarda
Bazı Laboratuvar Parametreler**



* Ki-kare testi kullanıldı

Sekil 15c: Behçetli AKA(+) Hastalarda Bazı Klinik Parametreler



* Ki-kare testi kullanıldı

12.2. Endotel Hücre Kültüründe AKA:

Sıçan özofagusunda AKA(+) bulunan 24 Behçetli ve 21 RA'li hastanın serumu ile AKA(-) 5 Behçetli ve 5 RA'li hasta serumu ve 8 normal insan serumu endotel hücre kültüründe AKA yönünden test edildi. Yirmi bir AKA(+) RA'li hastanın 12 tanesi (% 57.15) endotel hücrelerinde kuvvetli pozitif, 3 tanesi (% 14.28) hafif boyanma gösterirken, 6 tanesi (% 28.57) hiçbir boyanma vermedi. Behçette ise, 24 AKA(+) hastanın sadece 5 tanesi (% 20.83) pozitif, 6 tanesi (% 25) çok hafif pozitif bulundu. Geriye kalan 13 serum (% 54.16) ise endotel hücrelerinde boyanma göstermedi. AKA(-) RA'li kontrollerde, yalnızca 1 serumda çok hafif boyanmaya rastlanırken, AKA(-) Behçetli hastalarda ve normal insan serumlarında hiç boyanma görülmedi (Tablo 12).

	+	±	-
	n (%)	n (%)	n (%)
AKA(+) Romatoid Artrit (n:21)	12 (57.15)	3 (14.28)	6 (28.57)
AKA(+) Behçet Hastalığı (n:24)	5 (20.83)	6 (25)	13 (54.16)
AKA(-) Romatoid Artrit (n:5)	-	1	4
AKA(-) Behçet Hastalığı (n:5)	-	-	5
Normal İnsan Serumu (n:8)	-	-	8

Tablo 12: Endotel Hücre Kültüründe AKA varlığı, +: kuvvetli boyanma, ±: zayıf boyanma, -: boyanma yok.

12.3. Serumların Keratin İle Absorbsiyonu:

Absorbsiyon çalışması için AKA(+) 5 RA'li ve 2 Behçetli hasta serumu ile monoklonal anti-sitokeratin 8.60 kullanıldı. Serumların ve monoklonal antikorun epidermal keratin ile absorbsiyonu sonucunda hiçbir hasta serumunda aktivasyon kaybının olmadığı, bunun yanında monoklonal anti-sitokeratin 8.60'ın aktivitesinin kaybolduğu görüldü.

12.4. Blotting:

AKA(+) 11 RA ve 14 Behçetli hasta ile 9 normal insan serumunda Western Blotting yöntemi ile AKA'un keratinin hangi komponentine karşı oluştuğu araştırıldı (Şekil 13). 14 hastada (3 RA, 10 Behçet, 1 kontrol) sadece 70 kd'a karşı, 8 hastada (3 RA, 2 Behçet, 3 kontrol) hem 70 kd, hem de 60 kd'a karşı antikor varlığı görüldü. Üç hastada (RA) 70, 60 ve 52 kd'a karşı antikor, 1 hastada (Behçet) 70 ve 52 kd'a karşı, 1 hastada (RA) sadece 49 kd'a karşı ve 1 hastada (kontrol) sadece 52 kd'a karşı antikor oluştuğu gözlemlendi (Tablo 13). Kontrollerdeki bant şiddeti 1:500 dilüe kullanılmış monoklonal antikorun oluşturduğu banttan çok daha zayıf olarak bulundu ve kontrollerdeki bant şiddeti (\pm) olarak değerlendirildi.

Keratin	RA'li Hasta Sayısı	Behçetli Hasta Sayısı	Kontrol
70 kd	3	10	1
60 kd	1	1	4
70 ve 60 kd	3	2	3
52 kd	-	-	1
70 ve 52 kd	-	1	-
70,60 ve 52 kd	3	-	-
49 kd	1	-	-

Tablo 13: AKA'un keratin komponentlerine ve hastalıklara göre dağılımı.

VI. TARTIŞMA

Otoantikörlerin, otoimmün hastalıkların gelişiminde, patogeneğinde ve diağnozunda önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Bu otoimmün hastalıklardan özellikle SLE ve RA'de otoantikör çeşitliliği dikkati çekmiştir. Otoimmün bir hastalık olduğu her ne kadar tartışmalı olsa da Behçet hastalığında da bazı otoantikörlere rastlanmış, bu nedenle bazı taraflarca otoimmün bir bozukluk olarak görülmüştür. RA ve SLE'deki otoantikörler genellikle nükleer komponentlere karşı oluşmaktadır. Ancak Young ve arkadaşları(180) RA'li hastalarda sıçan özofagusunun keratinize tabakasına karşı ortaya çıkan antikörlerin (AKA) bu hastaların serumlarında oldukça yüksek oranlarda bulunduğunu göstermiştir.

Keratinler, çeşitli doku, tümör ve bazı kültür hücrelerinde bulunabilen fibröz, solubl bir moleköl grubudur. Keratinlere karşı oluşan antikörler, çeşitli dermatozlarda, myelomlarda, psoriasisde, bazı tümörlerde, kollajen doku hastalıklarında ve normal insan serumlarında görülebilir(64, 70, 150).

Bu çalışmada indirekt immünofloresan yöntemi ile sıçan özofagusunun keratinize tabakası antijen substratı olarak kullanılarak Behçetli ve RA'li hastaların serumlarında AKA varlığı araştırıldı. Ayrıca, AKA varlığı saptanan hastaların serumlarında Western Blotting yöntemi ile bu antikörün keratinin hangi komponentine karşı oluştuğu araştırıldı. İndirekt immünofloresan yöntemi ile özofagus korneal tabakaya sınırlı çizgisel boyanma (AKA pozitif) RA'de % 54.5 oranında bulunurken Behçetli hastalarda bu oran % 21.4, SLE'de % 5.8 oranında bulundu. Sağlıklı kontrol grubunda ise pozitif boyanma görülmedi. AKA yüzdesi ANA(-) ve anti-DNA(-) hastalarda ise sırasıyla % 2.4 ve % 6.0 olarak bulundu(Tablo 11). İstatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmese de AKA'un RF(+), yaşlı ve hastalık süresi uzun RA'lı gruplarda daha fazla bulunduğu, bunun yanında ANA pozitifliği, cinsiyet ve sedimantasyon hızı ile bir ilişkisi olmadığı bulundu (Şekil 15 a). Behçet hastalarında AKA ile cinsiyet, hastalık süresi, yaş, sedimantasyon hızı, HLA-B5 pozitifliği ve paterji testi pozitifliği arasında bir ilişki bulunamadı. Behçette ayrıca AKA, oral aft, genital ülserasyon lezyonları, tromboflebit

ve göz tutulumu ile karşılaştırıldığında bir ilişki bulunamadı(Şekil 15 b, c).

Bazı araştırmacılar(57,80,95,127,134,151,179,180), AKA'un RA için oldukça spesifik olduğunu ve hastalığın tanısında, özellikle RF(-) RA'lı hastalarda tanı koydurucu olarak önemli bir yer işgal ettiğini savunmaktadırlar. Bizim RA'lı hastalarda AKA'u % 54.5 gibi yüksek bir oranda bulmuş olmamıza karşın Behçetli hastalarda bu antikoru % 21.4 gibi bir oranda bulmamız son derece ilginçtir. RA'lı hastalarda daha önce yapılan çalışmalar ile bu çalışma Tablo 14'de karşılaştırılmıştır.

AKA RA'de bir çok kez araştırılmış olmasına karşın Behçet hastalığında hiç araştırılmamıştır. AKA'un Behçetli hastalarda da bulunması, bu antikorun RA için spesifik olduğunu savunan görüşleri büyük ölçüde çürütmektedir. Behçet hastalığında otoimmünitenin ne denli sorumlu olduğu tartışmalıdır. Ancak bu hastalıkta bir çok akut faz reaktanının ve bu arada bazı otoantikorların pozitif olduğu bilinmektedir. Bu hastalarda AKA pozitifliğinin rolü ve akut dönemlerde görülen enflamasyonun bir sonucu olarak mı ortaya çıktığı da bilinmemektedir.

AKA'ların her üç hastalık (Behçet, RA, SLE) ve normal kontrol grubunda IgG sınıfından antikorlar bulundu.

Hastalık gruplarında AKA titreleri karşılaştırıldığında RA'de bazı serumların 1:640 dilüsyonlara kadar çıkabildiği, bunun yanında Behçet ve kotrollerde titre oranlarının 1:160 ve 1:40 düzeylerinde kaldığı bulundu (Şekil 14). Behçet hastalarında antikor titrelerinin bu düzeylerde olması Kirstein(83) ve Youinou'nun(179) 1:20 ve 1:40 üzerindeki titrelerin RA için spesifik bir marker olacağı görüşüne ters düşmektedir.

Yapılan absorpsiyon çalışmalarında AKA(+) RA ve Behçetli hastalarda aktivasyon kaybı bulunmaması, bunun yanında monoklonal anti-sitokeratin antikor 8.60'da aktivasyon kaybının olması, bu hastalardaki sıçan özofagusunun keratinize tabakasına karşı oluşan anti-keratin antikorlar ile epidermal keratine karşı oluşan anti-keratin antikorların birbirlerinden farklı antikorlar olduğu görüşünü düşündürmektedir. Gerçekten Western Blotting yöntem kullanıldığında AKA(-) sağlıklı kontrollerde de bant bulunması bunu doğrulamaktadır. Western Blotting yöntemle RA'lı ve Behçetli hastaların yanında kontrollerde de 70,60 ve 52 kd'luk keratinlere karşı antikor

YAZARLAR YIL	YOUNG 1979	SCOTT 1981	JOHNSON 1981	MALLYA 1983	QUSMORIO 1983	YOUINOU 1983	ORDEIG 1984	HAIJIROUSSOU 1985	KATAAHA 1985	MEYER 1986	KIRSTEIN 1987	VINCENT 1989	BU CALIŞMA
RA'İ HASTA SAYISI	129	99	102	98	80	421	131	204	72	122	156	178	44
SENSİTİVİTE	58.14	36.36	50.98	69	57.50	37.05	54.20	59.31	54.17	54.92	46.79	56.18	54.5
SPESİFİSİTE	99.36	87.88	97.44	-	93.13	96.31	97.93	94.00	100.00	96.16	98.58	95.43	89.50
HASTALIK SUBESİ							-	-		-	-	-	+/-
HASTALIK AKTİVİTESİ		-		+/-									
SUBKUTAN NODÜLLER		-		+++		+	+	++		-	-	+	
ESR		-		+++						+++	-	+	-
CRP		-		+++				+++				+++	
APNF			+						-				
CİNSİYET (c) İLE İLİŞKİ							-	++		-	-	-	-
YAŞ İLE İLİŞKİ							+	-		+	-	-	+/-
IgM RF	+	+	+	+++			++	+		+	+	+++	+
ANA		-		+	-		+	+		-		-	-
SOLUBL İMMÜN KOMPLEKSLER			+++									+++	+++
KOMPLEMAN												-	-

Tablo 14: Çeşitli yıllarda RA'de AKA ile laboratuvar ve klinik bulguların karşılaştırılması ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı, CRP: C-reaktif protein, APNF: Anti-perinükleer faktör

bulunmuştur.

Günümüzde AKA'un RA ve diğer bazı hastalıklarda ortaya çıkmasının nedeni bilinmemektedir. Bu antikorun Behçetli hastalarda da bulunması bu hastalarda otoimmün bazı mekanizmaların varlığını düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda Behçet ve RA'de AKA ile ANA arasında bir ilişki bulunamadı. Bu durum AKA oluşumuna neden olan mekanizmaların otoimmünitede görülen diğer antikorların oluşumuna neden olan mekanizmalardan farklı olduğunu düşündürmektedir.



V. ÖZET

Otoimmünitenin hiç kuşkusuz en önemli nedenlerinden biri, vücudun kendi antijenik determinantlarına karşı otoantikör oluşturmasıdır. Bu nedenle otoimmün hastalıklarda bir çok antikör söz konusu olmaktadır. Özellikle sistemik lupus eritematozus ve romatoid artritte otoantikörler oldukça fazla sayıdadır.

Behçet hastalığı mukokutanöz, oküler, artriküler, intestinal, ürogenital ve nörolojik tutulum yapabilen bir hastalıktır. Etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, otoimmün bazı mekanizmaların patogeneizde rol aldığı düşünülmektedir. Gerçekten, Behçetli hasta serumlarında bazı otoantikörlerin bulunması bu düşünceyi doğrulamaktadır.

Keratinler, heterojen, fibröz ve solubl proteinlerdir. Çeşitli hastalıklarda (örneğin, kutaneus graft-versus-host, lichen planus, kronik diskoid lupus eritematozus) ve bazı normal insanlarda keratinlere karşı antikörler ortaya çıkmaktadır.

Biz bu çalışmada indirekt immünofloresan yöntemi ile Behçetli hastalar ve romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi diğer bazı hastalık gruplarında sıçan özofagusunun keratinize tabakasına karşı anti-keratin antikör (AKA) varlığını araştırdık. AKA varlığı saptadığımız hasta serumlarında, bu antikörlerin keratinin hangi komponentine karşı oluştuğunu anlamak için Western-Blotting yöntemini kullandık.

Sonuçta indirekt immünofloresan yöntemi ile AKA, RA'li hastaların % 54.5'de pozitif görülürken Behçetli hastaların % 21.4'ünde pozitif bulundu. Ayrıca RA'de AKA ile ANA, cinsiyet, eritrosit sedimantasyon hızı gibi parametreler arasında bir ilişki bulunamadı. Bunun yanında romatoid faktör ile AKA arasında istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte bir ilişki olduğu saptandı. Behçet hastalığında ise AKA ile klinik ve laboratuvar bulgular arasında önemli bir ilişki bulunamadı.

RA ve Behçetli hastaların serumlarında bulunan AKA'un Western-Blotting yöntemi ile yapılan incelemesinde farklı molekül ağırlığı olan keratin komponentlerine karşı antikör oluştuğu görüldü ve hastaların klinik bulguları ile keratin molekül ağırlıkları arasında belirli bir ilişki bulunamadı.

VI. SUMMARY

ANTIKERATIN ANTIBODIES in RHEUMATOLOGICAL DISEASES

Autoimmunity is generally associated with different autoantibodies specific to patients own antigenic determinants. Thus, various autoantibodies are found in various autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA).

Behçet's disease is a multisystemic disorder that shows mucocutaneous, ocular, articular, intestinal, urogenital and neurological manifestations. Although etiology is not well established, it has been suggested that some autoimmune mechanisms may play a role in the pathogenesis.

Keratins are heterogeneous, soluble and fibrous proteins. In various disorders (i.e. cutaneous graft vs host disease, lichen planus, and discoid lupus erythematosus) and some normal human sera, antibodies that react with keratins may be seen.

In this study, by indirect immunofluorescence technique, and keratinized layer of rat oesophagus as an antigen substrate, we investigated the presence of antikeratin antibodies (AKA). We found 54.5 % AKA in RA and 21.4 % in sera of the patients with Behçet's disease.

Western-Blotting analysis indicated that antibodies that react with human epidermal keratins are possible different from those antibodies that react with rat oesophagus. It has been suggested that different epitope(s) should have been responsible from this discrepancy.

VII KAYNAKLAR

- 1- Abe Y; Inada S, Torikai K (1988): A new autoantibody in patients with rheumatoid arthritis: characterization of the anti-Hat-1 antibody system **Arthritis Rheum** 31(1): 135-139.
- 2- Akoğlu T, Kozakoğlu H, Akoğlu E, Erken E (1986): Antibody to intermediate filaments of the cytoskeleton in patients with Behçet's disease **Recent Advances in Behçet's Disease** (edited by T. Lehner & CG Barnes) **Royal Society of Medicine Services London New York** sayfa 81.
- 3- Agnello V, Arbetter A, deKasep GI, Powell R, Tan EM, Joslin F (1980): Evidence for a subset of rheumatoid factors that cross-react with DNA-histone and have distinct cross-idiotype **J Exp Med** 151: 1514-1527.
- 4- Antin JH, Emerson SG, Martin P, Gadol N, Ault KA (1986): Leu1⁺ (CD5⁺) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: Phenotypic and functional studies **J Immunol** 136(2): 505-510.
- 5- Arber N, Klein T, Weinberger A (1989): Epidemiology, clinical data and HLA typing in Israeli patients with Behçet's syndrome and their families **Behçet's Disease 5th International Conference Book of Abstracts, Mayo**.
- 6- Arber N, Klein T, Meiner Z, Pras E, Weinberger A (1991): Close association of HLA-B51 and B52 in Israeli patients with Behçet's syndrome **Ann Rheum Dis** 50: 351-353.
- 7- Arend WP, Dayer JM (1990): Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis **Arthritis Rheum** 33(3): 305-315.
- 8- Arnett FC (1985): Immunogenetics and arthritis **Arthritis and Allied Conditions** (edited by DJ McCarty, 10th edition) Chapter 25, 405-414.
- 9- Bacon TH, Özbakır F, Elms CA, Denman AM (1984): Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome **Clin Exp Immunol** 57: 541-547.
- 10- Bang D, Kim YA, Lee S, Lee SH (1989): Evaluation of lymphocyte subpopulations in the patients with Behçet's syndrome showing low serum zinc **Behçet's Disease 5th International Conference Book of Abstracts, Mayo**.
- 11- Barnes JL, Goni F, Heyermann H, Frangione B, Agnello V (1990): Human rheumatoid factor cross-idiotypes III. Bla monoclonal rheumatoid factor, prototype of the BLA cross-idiotype group, has distinct kappa chains related to the VKIII Subgroup and VH4 Heavy chains **Arthritis Rheum** 33(11): 1710-1715.
- 12- Bartek J, Bartkova J, Lalani EN, Brezina V, Taylor PJ (1990): Selective immortalization of a phenotypically distinct epithelial cell type by microinjection of SV40 DNA into cultured human milk cells **Int J Cancer** 45(6): 1105-1112.
- 13- Bennett RM, Kotzin BL, Merritt MJ (1987): DNA receptor dysfunction in SLE and kindred disorders **J Exp Med** 166(4): 850-863.
- 14- Beutner E, Jablonska S, Chorzelska MJ, Marciejowska E, Rzeska G, Chorzelski TP (1975): Studies in immunodermatology VI. IF studies of autoantibodies to the stratum corneum and of in-vivo fixed IgG in

- stratum corneum of psoriatic lesions. **Int Archs Allergy appl Immun** 48: 301-323.
- 15- Bhardwaj N, Santhanam U, Lau LL, Tatter SB, Ghrayeb J, Rivelis M, Steinman RM, Sehgal PB, May LT (1989): IL-6/IFN β 2 in synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides Identification of several isoforms and studies of cellular sources **J Immunol** 143(7): 2153-2159.
- 16- Binder WL, Beutner EH, Jablonska S (1980): Studies in immunodermatology VIII. Immunofluorescence studies of stratum corneum antibodies **Int Archs Allergy appl Immun** 61: 407-416.
- 17- Bona CA, Finley S, Waters S, Kunkel HG (1982): Anti-immunglobulin antibodies derived from normal, neonatal mice **J Exp Med** 156: 986-999.
- 18- Bonfa E, Parnassa AP, Rhoads DD, Roufa DJ, Wool IG, Elkon KB (1989): Antiribosomal S10 antibodies in humans and MRL/lpr mice with systemic lupus erythematosus **Arthritis Rheum** 32(10): 1252-1261.
- 19- Bonifas JM, Rothman AL, Epstein EH Jr (1991): Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities **Science** 254: 1202-1205.
- 20- Borg EJ Ter, Horst G, Hummel D, Jaarsma D, Limburg PC, Kallenberg CGM (1988): Sequential development of antibodies to specific Sm polypeptides in a patient with systemic lupus erythematosus: evidence for independent regulation of anti-double-stranded DNA and anti-Sm antibody production **Arthritis Rheum** 31(12) 1563-1567.
- 21- Brennan FM, Chantary D, Jackson A, Maini R, Feldmann M (1989): Inhibitory effect of TNF α antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis **Lancet** II: 244-247.
- 22- Brinkmann K, Termaat R, Berden HM Jo, Smeenk RJT (1990): Anti-DNA antibodies and lupus nephritis: the complexity of crossreactivity **Immunol Today** 11(7): 232-234.
- 23- Budd RC, MacDonald HR, Lowenthal JW, Davignon JL, Izui S, Cerottini JC (1985): Growth and differentiation in vitro of the accumulating Lyt-2 $^-$ /L3T4 $^-$ subset in lpr mice **J Immunol** 135(6): 3704-3710.
- 24- Cairns E, Germain J St, Bell DA (1985): The in vitro production of anti-DNA antibody by cultured peripheral blood or tonsillar lymphoid cells from normal donors and SLE patients **J Immunol** 135(6): 3839-3844.
- 25- Casali P, Notkins AL (1989): CD5 $^+$ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire **Immunol Today** 10(11): 364-368.
- 26- Casali P, Burastero SE, Nakamura M, Inghirami G, Notkins AL (1987): Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1 $^+$ B-cell subset **Science** 236: 77-81.
- 27- Cervera R, Font J, Soto AL, Casals F, Pallares L, Bove A, Ingelmo M, Marquez AU (1990): Isotype distribution of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus: prospective analysis of a series of 100 patients **Ann Rheum Dis** 49: 109-113.
- 28- Chen JH, Kono DH, Yong Z, Park MS, Oldstone MMBA, Yu DTY (1987): A *Yersinia pseudotuberculosis* protein which cross-reacts with HLA-B27 **J Immunol** 139(9): 3003-3011.

- 29- Chen PP, Albrandt K, Orida NK, Radoux V, Chen EY, Schrantz R, Liu FT, Carson DA (1986): Genetic bases for the cross-reactive idiotypes on the light chains of human IgM anti-IgG autoantibodies **Proc Natl Acad Sci USA 83(21): 8318-8322.**
- 30- Chen PP, Fong S, Houghten RA, Carson DA (1985): Characterization of an epitope. An antiidiotypic that reacts with both the idiotype of rheumatoid factors (RF) and the antigen recognized by RF **J Exp Med 161: 323-331.**
- 31- Clarkson R, Bate AS, Grennan DM, Chattopadhyay C, Sanders P, Davis M, Kelly C (1990): DQw7 and the C4B null allele in rheumatoid arthritis and Felty's syndrome **Ann Rheum Dis 49: 976-979.**
- 32- Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS, Fuchs E (1991): Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses **Cell 66: 1301-1311.**
- 33- Dabski K, Beutner EH, Jablonska S (1983): Studies in immunodermatology XI. Demonstration of allospecificity of stratum corneum antibodies and antigens by indirect immunofluorescence **Int Archs Allergy appl Immun 71: 210-213.**
- 34- Dale JB, Beachey EH (1982): Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with sarcolemmal membrane protein of human heart **J Exp Med 156: 1165-1176.**
- 35- Danno K, Okamoto H, Imamura S, Ofuji S (1982): Assessment of anti-stratum corneum antibody titres in pustulosis palmaris et plantaris **Br J Dermatol 107: 183-188.**
- 36- Datta SK, Patel H, Berry D (1987): Induction of a cationic shift in IgG anti-DNA autoantibodies. Role of T helper cells with classical and novel phenotypes in three murine models of lupus nephritis **J Exp Med 165: 1252-1268.**
- 37- Demaine AG (1989): The molecular biology of autoimmune disease **Immunol Today 10(11): 357-361.**
- 38- Denman AM, Hylton W, Pelton BK, Palmer RG, Topper R, Burchenell CS (1986): The viral aetiology of Behçet's syndrome **Recent Advances in Behçet's Syndrome (edited by T Lehner & CG Barnes) Royal Society of Medicine Services sayfa 23-29.**
- 39- Dersimonian H, Schwartz RS, Barrett KJ, Stollar BD (1987): Relationship of human variable region heavy chain germ-line genes to genes encoding anti-DNA autoantibodies **J Immunol 139(7): 2496-2501.**
- 40- Dighiero G, Lymberi P, Mazié JC, Rouyre S, Butler-Browne GS, Whalen RG, Avrameas S (1983): Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens **J Immunol 131(5): 2267-2272.**
- 41- Eto H, Hashimoto K, Kobayashi H, Matsumoto M, Kanzaki T, Mehregan AH, Weiss RA (1985): Monoclonal antikeratin antibody: Production, characterization, and immunohistochemical application **J Invest Dermatol 84(5): 404-409.**
- 42- Eto H, Hashimoto K, Kobayashi H, Fukaya T, Matsumoto M, Sun TT (1984): Differential staining of cytotoid bodies and skin-limited amyloids with monoclonal anti-keratin antibodies **Am J Pathol 116: 473-481**

- 43- Festenstein H, Awad J, Hitman GA, Cutbush S, Groves AV, Cassell P, Ollier W, Sachs JA (1986): New HLA DNA polymorphisms associated with autoimmune disease **Nature** **322**: 64-67.
- 44- Fordam JN, Davies PG, Kirk A, Currey HLF (1982): Polymorphonuclear function in Behçet's syndrome **Ann Rheum Dis** **41**: 421-425.
- 45- Fuchs E, Green H (1980): Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte **Cell** **19**: 1033-1042.
- 46- Garzelli C, Taub FE, Scharff JE, Prabhakar BS, Fellner FG, Notkins AL (1984): Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes produce monoclonal autoantibodies that react with antigens in multiple organs **J Virol** **52(2)**: 722-725.
- 47- Gharavi AE, Chu JL, Elkon KB (1988): Autoantibodies to intracellular proteins in human systemic lupus erythematosus are not due to random polyclonal B cell activation **Arthritis Rheum** **31(11)**: 1337-1345.
- 48- Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR (1987): Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity **Ann Rheum Dis** **46**: 1-6.
- 49- Gilkeson GS, Grudier JP, Karounos DG, Pisetsky DS (1989) Induction of anti-double stranded DNA antibodies in normal mice by immunization with bacterial DNA **J. Immunol** **142(5)**: 1482-1486.
- 50- Goni FR, Chen PP, McGinnis D, Arjonilla ML, Fernandez J, Carson D, Solomon A, Mendez E, Frangione B (1989): Structural and idiotypic characterization of the L chains of human IgM autoantibodies with different specificities **J Immunol** **142(9)**: 3158-3163.
- 51- Gown AM, Vogel AM (1984): Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins II. Distribution of filament proteins in normal human tissues **Am J Pathol** **114**:309-321.
- 52- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis **Arthritis Rheum** **30(11)**: 1205-1213.
- 53- Grubauer G, Romani N, Kofler H, Stanzl U, Fritsch P, Hintner H (1986): Apoptotic keratin bodies as autoantigen causing the production of IgM-anti-keratin intermediate filament autoantibodies **J Invest Dermatol** **87**: 466-471.
- 54- Gruber BL, Kaufman LD, Marchese MJ, Roth W, Kaplan AP (1988): Anti-IgE autoantibodies in systemic lupus erythematosus Prevalence and biologic activity **Arthritis Rheum** **31(8)**: 1000-1006.
- 55- Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S (1982): Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera I. Detection, isolation, and characterization **J Immunol** **128(6)**: 2779-2787.
- 56- Gupta RC, O'Duffy JD, McDuffy FC (1978): Circulating immune complexes in Behçet's disease **Clin Exp Immunol** **34**: 213-218.
- 57- Hajiroussou VJ, Skingle J, Gillett AP, Webley M (1985): Significance of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis **J Rheumatol** **12(1)**: 57-59.

- 58- Hardin JA (1986): The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus **Arthritis Rheum** 29(4): 457-460.
- 59- Hashimoto T, Yanagida T, Okamoto S, Toyama T (1982): immunochemical properties of circulating immune complexes in Behçet's disease **Behçet's Disease. Pathogenetic Mechanisms and Clinical Future (edited by G Inaba, University of Tokyo Press) sayfa 391-403**
- 60- Hashimoto Y, Yui K, Littman D, Grenee MI (1987): T cell receptor genes in autoimmune mice: T cell subsets have unexpected T cell receptor gene programs **Proc Natl Acad Sci USA** 84(16): 5883-5887.
- 61- Haspel MW, Onodera T, Prabhakar BS, McClintock PR, Essani K, Ray UR, Yagihashi S, Notkins AL (1983): Multiple organ-reactive monoclonal autoantibodies **Nature** 304: 73-6.
- 62- Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, Kolarz G, Scherak O, Graninger W, Thumb N, Smolen JS (1989): Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis **Arthritis Rheum** 32(12): 1515-1520.
- 63- Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD (1984): Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies **Proc Natl Acad Sci USA** 81(8): 2494-2498.
- 64- Hintner H, Lawley TJ (1984): Keratin intermediate filaments bear antigenic determinants for stratum corneum antibodies **J Invest Dermatol** 82(5): 491-495.
- 65- Inaba G, Aoyama J (1982): Anti-glycolipid antibodies in neuro-Behçet's syndrome **Behçet's Disease. Pathogenetic Mechanisms and Clinical Future (edited by G Inaba, University of Tokyo Press) sayfa 145-152.**
- 66- Isenberg DA, Madaio MP, Reichin M, Shoenfeld Y, Rauch J, Stollar BD, Schwartz RS (1984): Anti-DNA antibody idiotypes in systemic lupus erythematosus **Lancet II**: 417-422.
- 67- Isenberg DA, Collins C (1985): Detection of cross-reactive anti-DNA antibody idiotypes on renal tissue-bound immunoglobulins from lupus patients **J Clin Invest** 76(1): 287-294.
- 68- Isenberg DA, Dudeney C, Wojnaruska F, Bhogal BS, Rauch J, Schattner A, Naparstek Y, Duggan D (1985): Detection of cross reactive anti-DNA antibody idiotypes on tissue-bound immunoglobulins from skin biopsies of lupus patients **J Immunol** 135(1): 261-264.
- 69- Ito K, Hashimoto K (1989): Antikeratin autoantibodies in the amyloid deposits of lichen amyloidosis and macular amyloidosis **Arch Dermatol Res** 281: 377-382.
- 70- Iwatsuki K, Imaizumi S, Hashizume H, Sugaya K, Takigawa M, Yamada M (1990): Production of antikeratin autoantibodies by hybrid spleen cells of naive mice **Br J Dermatol** 123: 735-744.
- 71- Iwatsuki K, Viac J, Reano A, Morera A, Staquet MJ, Thivolet J, Monier JC (1986): Comparative studies on naturally occurring antikeratin antibodies in human sera **J Invest Dermatol** 87(2): 179-184.
- 72- Jablonska S, Chorzelski TP, Chorzelska MJ, Beutner EH (1975): Studies in immunodermatology VI. Four-compartment system studies of IgG in stratum corneum and of stratum corneum antigen in biopsies of psoriasis and control dermatoses **Int Archs Allergy appl Immun** 48: 324-340.

- 73- Jablonska S, Chorzelska MJ, Beutner EH, Rzesa G, Maciejowska E, Chorzelski TP (1979): Clinical relevance of stratum corneum antibodies in psoriasis **Immunopathology of the Skin, Wiley Medical Publication, sayfa 427-443.**
- 74- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins. Identification by morphologic and immunologic criteria **J Clin Invest 52: 2745-2758.**
- 75- Jarvinen M, Andersson LC, Virtanen I (1990): K562 erythroleukemia cells express cytokeratins 8,18, and 19 and epithelial membrane antigen that disappear after induced differentiation **J Cell Physiol 143(2): 310-320.**
- 76- Johnson GD, Carvalho A, Holborow EJ, Goddard DH, Russel G (1981): Antiperinuclear factor and keratin antibodies in rheumatoid arthritis **Ann Rheum Dis 40: 263-266.**
- 77- Jurik AG, Graudal H, Kirstein H (1989): Lack of antikeratin antibodies in patients with palmoplantar pustular eruptions and arthropathy **Arch Dermatol Res 281: 185-187.**
- 78- Kaburaki J, Stollar D (1987): Identification of human anti-DNA, anti-RNP, anti-Sm, anti-SS-A serum antibodies bearing the cross-reactive 16/6 idiotype **J Immunol 139(2): 385-392.**
- 79- Kansu E, Ünal S, Karacadağ S, Telatar H, Akkaya S, Kazokoğlu H, Dündar S, Batman F, Zileli T (1986): T lymphocyte subsets in Behçet's disease **Recent Advances in Behçet's Syndrome (edited by T Lehner & CG Barnes) Royal Society of Medicine Services sayfa 53.**
- 80- Kataaha PK, Milani SMM, Russel G, Holborow EJ (1985): Anti-intermediate filament antibodies, antikeratin antibody, and antiperinuclear factor in rheumatoid arthritis and infectious mononucleosis **Ann Rheum Dis 44:446-449.**
- 81- Kearney JF (1989): Idiotypic networks **Fundamental Immunology (second edition, edited by WE Paul, Raven Press Ltd, NY) sayfa 663-676.**
- 82- Kemp ME, Atkinson JP, Skanes VM, Levine RP, Chaplin DD (1987): Deletion of C4A genes in patients with systemic lupus erythematosus **Arthritis Rheum 30(9): 1015-1022.**
- 83- Kirstein H, Mathiesen FK (1987): Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. Methods and clinical significance **Scand J Rheumatol 16: 331-337.**
- 84- Kirstein H, Hjarvard K, Hansen TM (1989): Antikeratin antibodies in synovial fluid in rheumatoid arthritis **APMIS 97(2): 185-189.**
- 85- Klymkowsky MW (1991): Getting under the skin **Nature 354: 264-265.**
- 86- Koniçe M, Dilşen N (1979): Autoantibodies, serum immunoglobulins and C3 in Behçet's disease **Behçet's Disease (Proceedings of an International Symposium on Behçet's Disease, editors: N Dilşen, M Koniçe & C Övül Excerpta Medica, Amsterdam) sayfa 236-241.**
- 87- Koopman WJ, Schrohenloher RE (1985): Rheumatoid Factor **Rheumatoid Arthritis, Etiology, Diagnosis, Management (J.B. Lippincott Co., edited by PD Utsinger, NJ Zvaifler, GE Ehrlich) Chapter 12, sayfa 217-241.**

- 88- Krogh HK, Tönder O (1979): Stratum corneum antigens and antibodies **Immunopathology of the Skin, Wiley Medical Publication, sayfa 413-425.**
- 89- Krogh HK, Tönder O (1973): Antibodies in psoriatic scales **Scand J Immunol 2: 45-51.**
- 90- Krogh HK (1968): Role of complement in the adherence of erythrocytes to stratum corneum **Int Arch Allergy 34: 379-408.**
- 91- Krogh HK (1969): Antibodies in human sera to stratum corneum **Int Arch Allergy 36: 415-426.**
- 92- Krogh HK, Maeland JA, Tönder O (1972): Indirect haemagglutination for demonstration of antibodies to stratum corneum of skin **Int Archs Allergy 42: 493-502.**
- 93- Kudo H, Sakamoto S (1982): Study on the phagocytosis of neutrophils in patients with Behçet's syndrome for rabbit anti-human Ig immunobeads **Medicine and Biology 105: 111-117.**
- 94- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ **Nature 227: 680-685.**
- 95- Larsen HL (1991): Antikeratin-antistoffer ved reumatoid arthritis **Ugeskr Laeger 153(22): 1567-1571.**
- 96- Lee S, Kim DH, Bang D, Lee KH, Nam IW, Park K (1986): Immunological aspects of the four types of Behçet's syndrome **Recent Advances in Behçet's Syndrome (edited by T Lehner & CG Barnes) Royal Society of Medicine Services sayfa 47-50.**
- 97- Lehner T (1986): The role of a disorder in immunoregulation, associated with herpes simplex virus type 1 in Behçet's disease **Recent Advances in Behçet's Syndrome (edited by T Lehner & CG Barnes) Royal Society of Medicine Services sayfa 31-36.**
- 98- Lehner T (1979): Immunological aspects of Behçet's syndrome **Behçet's Disease (Proceedings of an International Symposium on Behçet's Disease, editors: N Dilşen, M Koniçe & C Övül Excerpta Medica, Amsterdam) sayfa 203-211.**
- 99- Levinson AI, Dalal NF, Haidar M, Tar L, Orlov M (1987): Prominent IgM rheumatoid factor production by human cord blood lymphocytes stimulated in vitro with *Staphylococcus aureus* cowan I **J Immunol 139(7): 2237-2241.**
- 100- Linker JB, Williams RC (1986): Tests for detection of rheumatoid factors **Manual of Clinical Laboratory Immunology (3rd edition, edited by NR Rose, H Freldman, JL Fahey, American Society for Microbiology, Washington D.C.) sayfa 759-761.**
- 101- Love PE, Santoro SA (1990): Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance **Ann Int Medicine 112: 682-698.**
- 102- Madaio MP, Schattner A, Shattner M, Schwartz RS (1986): Lupus serum and normal human serum contain anti-DNA antibodies with the same idiotypic marker **J Immunol 137(8): 2535-2540.**
- 103- Mallya RK, Young BJJ, Pepys MB, Hamblin TJ, Mace BEW, Hamilton BD (1983): Anti-keratin

- antibodies in rheumatoid arthritis: frequency and correlation with other features of the disease **Clin Exp Immunol** 51:17-20.
- 104- Mannik M (1985): Rheumatoid factors **Arthritis and Allied Conditions (edited by DJ McCarty, 10th edition) Chapter 41, 660-667.**
- 105- Mannik M (1985): Characteristics of immune complexes and principles of immune complex diseases **Arthritis and Allied Conditions (edited by DJ McCarty, 10th edition) Chapter 23, 379-391.**
- 106- Matsumura Y, Mizushima Y, Morito T, Sano Y, Matsumura N (1979): Disorders of inflammatory and immunological responses in Behçet's disease **Behçet's Disease (Proceedings of an International Symposium on Behçet's Disease, editors: N Dilişen, M Konıçe & C Övül Excerpta Medica, Amsterdam) sayfa 215-218.**
- 107- McCusker C, Reid B, Green D, Gladman DD, Buchanan WW, Singal DP (1991): HLA-D region antigens in patients with rheumatoid arthritis **Arthritis Rheum** 34(2): 192-197.
- 108- Mendlovic S, Brocke S, Shoenfeld Y, Bassat MB, Meshorer A, Bakimer R, Mozes E (1988): Induction of a systemic lupus erythematosus-like disease in mice by a common human anti-DNA idiotype **Proc Natl Acad Sci USA** 85(4): 2260-2264.
- 109- Meyer O, Fabregas D, Cyna L, Ryckewaert (1986): Les anticorps anti-kératine. Un marqueur des polyarthritides rhumatoïdes évolutives **Revue du Rhumatisme** 53(11): 601-605.
- 110- Mizushima Y (1986): Chemotaxis and phagocytosis of leukocytes in Behçet's disease: an overview **Recent Advances in Behçet's Syndrome (edited by T Lehner & CG Barnes) Royal Society of Medicine Services sayfa 85-87.**
- 111- Moll R, Franke WW, Schiller DL (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells **Cell** 31: 11-24.
- 112- Montecucco C, Caporali R, Negri C, Gennaro F De, Cerino A, Bestagno M, Cobiانchi F, Ricotti GCBA (1990): Antibodies from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus recognize different epitopes of a single heterogeneous nuclear RNP core protein. Possible role of cross-reacting antikeratin antibodies **Arthritis Rheum** 33(2): 180-186.
- 113- Morgan K (1990): What do anti-collagen antibodies mean? **Ann Rheum Dis** 49:62-65.
- 114- Morgan K, Clague RB, Collins I, Ayad S, Phinn SD, Holt PJL (1989): A longitudinal study of anticollagen antibodies in patients with rheumatoid arthritis **Arthritis Rheum** 32(2): 139-145.
- 115- Morgan EL, Weigle WO, (1983): Polyclonal activation of murine B lymphocytes by immune complexes **J Immunol** 130(3): 1066-1070.
- 116- Nelson JL, Nardella FA, Oppliger IR, Mannik M (1987): Rheumatoid factors from patients with rheumatoid arthritis possess private repertoires of idiotypes **J Immunol** 138(5): 1391-1396.
- 117- Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilkse KR, Stage D, Nepom BS (1989): HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide

probes **Arthritis Rheum** 32(1): 15-21.

118- Neshier G, Moore TL, Osborn TG, Dorner RW (1991): Production of IgM rheumatoid factor by normal lymphocytes after stimulation with preparations containing IgM rheumatoid factor from patients with juvenile rheumatoid arthritis **Ann Rheum Dis** 50: 142-146.

119- Noguchi Y, Furusawa S (1982): Study of anti LPS antibodies in Behçet's disease **Behçet's Disease. Pathogenetic Mechanisms and Clinical Future** (edited by G Inaba, University of Tokyo Press) sayfa 369-375.

120- Ohno S (1982): Clinical and immunological studies on ocular lesions in Behçet's disease **Behçet's Disease. Pathogenetic Mechanisms and Clinical Future** (edited by G Inaba, University of Tokyo Press) sayfa 127-136.

121- Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M (1982): Close association of HLA-BW51, MT2 and Behçet's disease **Behçet's Disease. Pathogenetic Mechanisms and Clinical Future** (edited by G Inaba, University of Tokyo Press) sayfa 73-79.

122- Ohno S, Matsuda H (1986): Studies of HLA antigens in Behçet's disease in Japan **Recent Advances In Behçet's Syndrome** (edited by T Lehner & CG Barnes) Royal Society of Medicine Services sayfa 11-15.

123- Okuwaki K, Ishikawa (1986): Analysis of HLA antigen in Behçet's disease **Recent Advances In Behçet's Syndrome** (edited by T Lehner & CG Barnes) Royal Society of Medicine Services sayfa 17.

124- Oldstone MB (1987): Molecular mimicry and autoimmune disease **Cell** 50: 819-820.

125- Oliver AM (1990): The cytokeratin expression of cultured human foetal keratinocytes **Br J Dermatol** 123: 707-716.

126- Olsen NJ, Callahan LF, Brooks RH, Nance EP, Kaye JJ, Stastny P, Pincus T (1988): Association of HLA-DR4 with rheumatoid factor and radiographic severity in rheumatoid arthritis **Am J Med** 84: 257-264.

127- Ordeig J, Guardia J (1984): Diagnostic value of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis **J Rheumatol** 11(5): 602-604.

128- Padmakumar K, Singh RR, Malaviya AN, Saraya AK (1990): Lupus anticoagulants in systemic lupus erythematosus: prevalence and clinical associations **Ann Rheum Dis** 49: 986-989.

129- Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizouchi T, Taniguchi T, Matsuta K (1985): Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG **Nature** 316: 452-457.

130- Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ (1987): Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants **Blood** 70: 69-76.

131- Pisetsky DS, Hoch SO, Klatt CL, O'donnell MA, Keene JD (1985): Specificity and idiotypic analysis of a monoclonal anti-Sm antibody with anti-DNA activity **J Immunol** 135(6): 4080-4085.

- 132- Pugh CJ, Lehner T (1986): The proliferative response of separated and reconstituted T4⁺ and T8⁺ cells to herpes simplex virus in Behçet's disease **Recent Advances In Behçet's Syndrome** (edited by T Lehner & CG Barnes) Royal Society of Medicine Services sayfa 43-46.
- 133- Quismorio FP Jr, Kaufman RL, Beardmore T, Mongan ES (1983): Reactivity of serum antibodies to the keratin layer of rat esophagus in patients with rheumatoid arthritis **Arthritis Rheum** 26(4): 494-499.
- 134- Qutaishat S, Kumar V, Beutner EH, Jablonska S (1990): Stratum corneum antibodies detected by hemagglutination are not directed against keratin intermediate filaments **Arch Dermatol Res** 282:89-92.
- 135- Rauch J, Murphy E, Roths JB, Stollar BD, Schwartz RS (1982): A high frequency idiotypic marker of anti-DNA autoantibodies in MRL- lpr/lpr mice **J Immunol** 129(1): 236-241.
- 136- Rauch J, Massicotte H, Tannenbaum H (1985): Specific and shared idiotypes found on hybridoma anti-DNA autoantibodies derived from rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients **J Immunol** 135(4): 2385-2392.
- 137- Robbins ML, Kornguth SE, Bell CL, Kalinke T, England D, Turski P, Graziano FM (1988): Antineurofilament antibody evaluation in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Combination with anticardiolipin antibody assay and magnetic resonance imaging **Arthritis Rheum** 31(5): 623-631.
- 138- Roitt IM, Male D, Brostoff J (1989): **Immunology, Gower Medical Publications**
a- Autoimmunity and autoimmune diseases, sayfa 23.1-23.11
b- Molecules which recognize antigen, sayfa 5.1-5.11
c- Regulation of immune response, sayfa 10.1-10.10
- 139- Roitt IM (1988): Autoimmune diseases. I. Scope and aetiology **Essential Immunology, English Language Book Society, Blackwell Scientific Publications 6th edition** sayfa 238-253.
- 140- Sainis K, Datta SK (1988): CD4⁺ cell lines with selective patterns of autoreactivity as well as CD4⁻ CD8⁺ T helper cell lines augment the production of idiotypes shared by pathogenic anti-DNA autoantibodies in the NZB x SWR model of lupus nephritis **J Immunol** 140(7): 2215-2224.
- 141- Saku T, Shibata Y, Cheng J, Okabe H, Ikari N, Yagi Y (1990): Autoantibodies to keratin in Sjogren's syndrome **J Oral Pathol Med** 19(1): 45-48.
- 142- Sasaki T, Tamate E, Muryoi T, Takai O, Yoshinaga K (1989): In vitro manipulation of human anti-DNA antibody production by anti-idiotypic antibodies conjugated with neocarzinostatin **J Immunol** 142(4): 1159-1165.
- 143- Sasazuki T, Nishimura YK, Mineshita S, Miyashita H, Inaba G (1982): Genetic analysis of Behçet's disease **Behçet's Disease. Pathogenetic Mechanisms and Clinical Future** (edited by G Inaba, University of Tokyo Press) sayfa 33-40.
- 144- Schrohenloher RE, Accavitti MA, Bhowan AS, Koopman WJ (1990): Monoclonal antibody 6B6.6 defines a cross-reactive kappa light chain idiotope on human monoclonal and polyclonal rheumatoid factors **Arthritis Rheum** 33(2): 187-198.

- 145- Schwartz RS, Datta SK (1989): Autoimmunity and autoimmune diseases **Fundamental Immunology (second edition, edited by WE Paul, Raven Press Ltd, NY) sayfa 819-866.**
- 146- Scott DL, Delamere JP, Jones LJ, Walton KW (1981): Significance of laminar antikeratin antibodies to rat oesophagus in rheumatoid arthritis **Ann Rheum Dis 40: 267-271.**
- 147- Searlaes RP, Savage SM, Brozek CM, Marnell LL, Hoffman CL (1988): Network regulation in rheumatoid arthritis. Studies of DR+ T cells, anti-DR, antiidiotypic antibodies, and clinical disease activity **Arthritis Rheum 31(7): 834-843.**
- 148- Senecal JL, Oliver JM, Rothfield N (1985): Anticytoskeletal autoantibodies in the connective tissue diseases **Arthritis Rheum 28(8): 889-898.**
- 149- Senecal JL, Rauch J (1988): Hybridoma lupus autoantibodies can bind major cytoskeletal filaments in the absence of DNA-binding activity **Arthritis Rheum 31(7): 864-875.**
- 150- Serre G, Vincent C, Viraben R, Soleilhavoup JP (1987): Natural IgM and IgG autoantibodies to epidermal keratins in normal human sera. I: ELISA-titration, immunofluorescence study **J Invest Dermatol 88: 21-27.**
- 151- Serre G, Vincent C, Fournie B, Lapeyre F, Soleilhavoup JP, Fournie A (1986): Anticorps anti-stratum corneum d'oesophage de rat, auto-anticorps anti-keratines epidermiques et anti-epiderme dans la polyarthrite rhumatoide et differentes affections rhumatologiques. Interet diagnostique, aspects fondamentaux **Revue du Rhumatisme 53(11): 607-614.**
- 152- Sharief MK, Hentges R, Thomas E (1991): Significance of CSF immunoglobulins in monitoring neurologic disease activity in Behçet's disease **Neurology 41(9): 1391-1401.**
- 153- Shishido A, Kohase M, Saito S, Kohno S, Kobune F, Inaba G (1982): Interferon response of patients with Behçet's disease **Behçet's Disease. Pathogenetic Mechanisms and Clinical Future (edited by G Inaba, University of Tokyo Press) sayfa 65-71.**
- 154- Singal DP, Reid B, D'Souza M, Kassam YB, Bensen WG, Adachi JD (1987): HLA-DQ beta-Chain polymorphism in HLA-DR4 haplotypes associated with rheumatoid arthritis **Lancet II:1118-1120.**
- 155- Steinert PM (1990): The two-chain coiled-coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer **J Biol Chemistry 265(15): 8766-8774.**
- 156- Stekman IL, Blasini AM, Ponte ML, Baroja ML, Abadi I, Rodriguez MA (1991): Enhanced CD3-mediated T lymphocyte proliferation in patients with systemic lupus erythematosus **Arthritis Rheum 34(4): 459-467.**
- 157- Sun TT, Tseng SCG, Huang AJW, Cooper D, Schermer A, Lynch MH, Weiss R, Eichner R (1985): Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review **Ann NY Acad Sci 455:307-329.**
- 158- Takeda M, Obara N, Suzuki Y (1990): Keratin filaments of epithelial and taste-bud cells in the circumvallate papillae of adult and developing mice **Cell Tissue Res 260(1): 41-48.**
- 159- Tan EM (1985): Systemic lupus erythematosus: immunologic aspects **Arthritis and Allied**

Conditions (edited by DJ McCarty, 10th edition) Chapter 62, 936-941.

160- Terato K, Shimozuru Y, Katayama K, Takemitsu Y, Yamashita I, Miyatsu M, Fujii K, Sagara M, Kobayashi S, Goto M, Nishioka K, Miyasaka N, Nagai Y (1990): Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis **Arthritis Rheum** **33(10)**: 1493-1500.

161- Terui T, Kato T, Tagami H (1989): Stratum corneum activation of complement through the antibody-independent alternative pathway **J Invest Dermatol** **92**: 593-597.

162- Theofilopoulos AN, Kofler R (1989): Molecular aspects of autoimmunity **Immunol Today** **10(6)**: 180-183.

163- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications **Proc Natl Acad Sci USA** **76(9)**: 4350-4354.

164- Trepicchio W Jr, Maruya A, Barrett KJ (1987): The heavy chain genes of a lupus anti-DNA autoantibody are encoded in the germ line of a nonautoimmune strain of mouse and conserved in strains of mice polymorphic for this gene locus **J Immunol** **139(9)**: 3139-3145.

165- Triplett DA, Brandt JT, Musgrave KA, Orr CA (1988): The relationship between lupus anticoagulants and antibodies to phospholipid **JAMA** **259(4)**: 550-554.

166- VanDijk KW, Schroeder HW Jr, Perlmutter RM, Milner ECB (1989): Heterogeneity in the human Ig V_H locus **J Immunol** **142(7)**: 2547-2554.

167- Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E (1991): Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease **Cell** **64**: 365-380.

168- Vincent C, Serre G, Lapeyre F, Fournie B, Ayrolles C, Fournie A, Soleilhavoup JP (1989): High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called 'antikeratin antibodies' **Ann Rheum Dis** **48**: 712-722.

169- Vincent C, Serre G, Fournie B, Fournie A, Soleilhavoup JP (1991): Natural IgG to epidermal cytokeratins vs IgG to the stratum corneum of the rat oesophagus epithelium, so-called 'antikeratin antibodies', in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases **J Autoimmun** **4(3)**: 493-505.

170- Vincent C, Serre G, Basile JP, Lestra HC, Girbal E, Sebbag M, Soleilhavoup JP (1990): Subclass distribution of IgG antibodies to rat oesophagus stratum corneum (so-called anti-keratin antibodies) in rheumatoid arthritis **Clin Exp Immunol** **81**: 83-89.

171- Wallin J, Carlsson B, Ström H, Möller E (1988): A DR4-associated DR-DQ haplotype is significantly associated with rheumatoid arthritis **Arthritis Rheum** **31(1)**: 72-79.

172- Watanabe S, Wagatsuma K, Ichikawa E, Takahashi H (1991): Abnormal distribution of epidermal protein antigens in psoriatic epidermis **J Dermatol** **18(3)**: 143-151.

173- Weaver W (1988): The keratins: their expression and role in epithelial classification **Qualityline (Is a publication from ICN Biomedicals Inc.)** **3(1)**: 4-8.

174- Weidmann CE, Wallace DJ, Peter JB, Knight PJ, Bear MB, Klinenberg JR (1988): Studies of IgG, IgM and IgA antiphospholipid antibody isotypes in systemic lupus erythematosus **J Rheumatol 15(1): 74-79.**

175- Weiss M, Ingbar SH, Winblad S, Kasper DL (1983): Demonstration of a saturable binding site for thyrotropin in *Yersinia enterocolitica* **Science 219: 1331-1333.**

176- Xu WD, Firestein GS, Taetle R, Kaushansky K, Zvaifler NJ (1989): Cytokines in chronic inflammatory arthritis. II. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid synovial effusions **J Clin Invest 83(3): 876-882.**

177- Yasuda T, Ueno J, Matuhasi T (1982): Antiglycolipid antibodies in Behçet's disease **Behçet's Disease. Pathogenetic Mechanisms and Clinical Future (edited by G Inaba, University of Tokyo Press) sayfa 413-420.**

178- Yoneda K, Watanabe H, Yanagihara M, Mori S (1989): Immunohistochemical staining properties of amyloids with anti-keratin antibodies using formalin-fixed, paraffin-embedded sections **J Cutan Pathol 16: 133-136.**

179- Yoinou P, Goff PL, Colaco CB, Thivolet J, Tater D, Viac J, Shipley M (1985): Antikeratin antibodies in serum and synovial fluid show specificity for rheumatoid arthritis in a study of connective tissue diseases **Ann Rheum Dis 44: 450-454.**

180- Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDG, Clark CJM, Hamblin TJ (1979): Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis **BMJ 2: 97-99.**

181- Young CM (1990): Antiphospholipid antibodies: more than just a disease marker? **Immunol Today 11(2): 60-65.**