



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNDİREKT FLORESAN ANTİKOR YÖNTEMİ İLE ‘GRANÜLER +
GRANÜLER KROMOZOM’ PATERNİNDE ANA POZİTİFLİĞİ SAPTANAN
HASTALARDA, İMMÜNBLÖT YÖNTEMİ İLE ANTİ DFS-70
ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI**

İrem GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fahriye EKŞİ

Gaziantep

2018

T. C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNDİREKT FLORESAN ANTİKOR YÖNTEMİ İLE ‘GRANÜLER +
GRANÜLER KROMOZOM’ PATERİNDE ANA POZİTİFLİĞİ SAPTANAN
HASTALARDA, İMMÜNBLÖT YÖNTEMİ İLE ANTİ DFS-70
ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI**

İrem GÜNEŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fahriye EKŞİ

Gaziantep

2018

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNDİREKT FLORESAN ANTİKOR YÖNTEMİ İLE ‘GRANÜLER +
GRANÜLER KROMOZOM’ PATERNİNDE ANA POZİTİFLİĞİ SAPTANAN
HASTALARDA, İMMÜNBLÖT YÖNTEMİ İLE ANTI DFS-70
ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI**

İrem GÜNEŞ

Tez Savunma Tarihi: 10.01.2018
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fahriye EKŞİ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL

Prof. Dr. Fahriye EKŞİ

Prof. Dr. Ayşen BAYRAM

İmzası

TEŞEKKÜR

Çalıőmam boyunca desteğini ve yardımını esirgemeyen, sadece öğrencilik hayatımda değil meslek hayatımda da çok emeği geçen başta tez danışman hocam Prof. Dr.Fahriye EKŞİ'ye, değerli hocalarım, Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL ve Prof. Dr. Yasemin ZER'e teőekkürlerimi sunarım.

Her anımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme, dostluklarını ve desteklerini her an yanımda hissettiğim Hilal Sümeyra KARALAR, Ayőe Büyüктаő MANAY ve Semih TEKEREKOğLU'na, yardımlarından dolayı yüksek lisans arkadaőım Ban Ali HASSAN' a teşekkür ederim.

10.01.2018

İrem GÜNEŞ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMALAR.....	vi
TABLOLAR DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. İmmunoloji.....	5
2.3. İmmün yanıtın özellikleri.....	5
2.3.1. Spesifite.....	6
2.3.2. Çeşitlilik (Diversity).....	6
2.3.3. Hafıza (Bellek).....	6
2.3.4. Otoimmünite.....	6
2.3.5. Kendini (self'i) yabancı olandan ayırt etme (self-non self ayrımı).....	7
2.4. İmmünolojik tolerans.....	7
2.4.1. Santral tolerans.....	8
2.4.2. Periferal tolerans.....	9
2.5. Otoimmünite.....	9
2.6. Otoimmünite mekanizmaları.....	10
2.6.1.Moleküler taklit.....	10
2.6.2. Normal proteinlerde değişim.....	11
2.6.3. Hapsedilmiş antijenlerin salınması.....	11
2.6.4. Epitop yayılması.....	12
2.8. Otoimmün hastalıklar.....	13
2.8.1. Organa özgül (lokalize) otoimmün hastalıklar.....	15
2.8.1.1. Tiroid.....	16
2.8.1.2. Mide- Barsak.....	16
2.8.1.3. Pankreas.....	16
2.8.1.4. Adrenal Bez.....	17
2.8.1.5. Böbrek.....	17

2.8.1.6. Sinir sistemi	17
2.8.1.7. Karaciğer.....	17
2.8.1.8. Göz.....	18
2.8.1.9. Kan Hastalıkları	18
2.8.1.10. Deri	18
2.8.2. Organa özgül olmayan (sistemik) otoimmün hastalıklar	18
2.8.2.1. Sistemik lupus eritematozus	19
2.8.2.2. Romatoid artrit.....	22
2.8.2.3. Sjögren sendromu	24
2.8.2.4. Skleroderma	24
2.9. Otoimmün hastalıkların epidemiyolojisi	25
2.10. Otoantikolar	26
2.10.1. Romatolojik hastalıkların tanısında otoantikolar	30
2.10.1.1. Doğal antikolar	31
2.10.1.2. Patojenik otoantikolar.....	31
2.11. Anti-nükleer antikolar	31
2.12. ANA saptanmasında IFA, immünoblot testleri ve standardizasyon.....	34
2.12.1. İndirekt floresan antikor yöntemi (IFA)	34
2.12.2. ANA IFA' da mikroskopik değerlendirme	35
2.12.2.1. Homojen boyanma.....	39
2.12.2.2. Nükleer membran boyanma.....	39
2.12.2.3. Granüler (Benekli) boyanma	40
2.12.2.4. Büyük benekli (nükleer matriks) tarzda boyanma.	40
2.12.2.5. Kaba benekli boyanma.....	40
2.12.2.6. İnce Benekli boyanma	41
2.12.2.7. Granüler + granüler kromozom (Yoğun İnce Benekli-DFS-70) boyanma.....	41
2.12.2.8. Çok biçimli benekli (polimorfik) (PCNA) boyanma.....	43
2.12.2.9. Sentromer boyanma	44
2.12.2.10. Nükleer az nokta (p80-coilin) boyanma	44
2.12.2.11. Nükleer nokta (Sp100) boyanma.	45
2.12.2.12. Nükleolar boyanma.....	45
2.12.2.13. Nükleolar homojen boyanma.....	45
2.12.2.14. Nükleolar küme (clumpy) boyanma	45

2.12.2.15. Nükleolar benekli boyanma	46
2.12.2.17. Sitoplazmik ince benekli boyanma	46
2.12.2.18. Sitoplazmik büyük benekli boyanma.....	47
2.12.2.19. Sitoplazmik kaba benekli ipliksi (mitokondri) boyanma.....	47
2.12.2.20. Sitoplazmik homojen (ribozomal) boyanma.....	47
2.12.2.21. Sitoplazmik sitoskeleton boyanma	47
2.12.2.22. Sitoplazmik golgi boyanma	47
2.12.2.23. Sentirol boyanma	48
2.12.2.24. NuMA boyanma	48
2.12.2.25. Midbody (MSA-2 antikorları) boyanma.....	48
2.12.2.26. CENP-F / p330d boyanma	48
2.12.2.27. SCL-70 boyanma	48
2.12.2.28. Anti-nükleozom (kromatin) antikorları	49
2.12.3. İmmünoblot Yöntemi.....	49
2.12.4. Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi	50
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	54
3.1. Hasta bilgisi	54
3.2. Araştırma Yöntemi	55
3.2.1 ANA IFA Yöntemi	55
3.2.2. İmmünoblot Yöntemi.....	57
4. BULGULAR.....	60
5. TARTIŞMA	69
6.KAYNAKLAR	74
7. ÖZGEÇMİŞ	82

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACA	: Anti- kardiyolipin antikoları
AMA	: Anti- mitokondriyal antikor
ANA	: Anti- nükleer antikor
Anti- CCP	: Anti- siklik sitrülünlenmiş peptit antikor
ATP	: Adenozin trifosfat
APC	: Antijen sunucu hücreler
CENP	: Sentromer protein
CREST	: Kalsinozis, Raynaud fenomeni, özofagial disfonksiyon, sklerodaktili ve telenjiyektazi
CTLA-4	: Sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen 4
DM	: Diabetes mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Çift zincirli DNA
ELISA	: Enzim bağlı immunosorbent assay
ENA	: Ekstrakte edilebilir nükleer antijenler
FITC	: Floresan izotiyosiyonat
GBM	: Glomerül bazal membran
GGK	: Granüler + granüler kromozom
HEp- 2	: İnsan epitelial hücre serisi- 2
hnRNP	: Heterojen ribonükleoprotein
IDDM	: İnsüline bağlı diabetes mellitus
IFA	: İndirekt Floresan Antikor
Ig	: İmmünoglobülin
IL	: İnterlökin
İK	: İmmün kompleks
Jo-1	: Sitoplazmik histidil tRNA sentetaz
kDa	: Kilodalton
La	: Sjögren sendromu antijeni- B, SS-B
LC-1	: Karaciğer sitozolik antijen-1
LKM	: Karaciğer böbrek mikrozomal antikor
M2	: Pirüvat dehidrojenaz kompleksi- E2
MCTD	: Miks bağ doku hastalığı
MSA	: Mitotik iğ iplikleri aparatı
Na	: Sodyum
NOR	: Nükleolar organize edici bölge proteini
nRNP/Sm	: Nükleer ribonükleoprotein/ Smith antijeni
NuMA	: Nükleer mitotik iğ iplikleri aparatı
OİH	: Otoimmün hastalıklar
PBS	: Primer biliyer siroz
PCNA	: Prolifere olan hücre nükleer antijeni
PM	: Polimiyozit
PML	: Promiyelositik lösemi proteini
PM-Scl	: Polimiyozit- skleroderma
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
RA	: Romatoid artrit
RES	: Retikulo- endotelial sistem

RF	: Romatoid faktör
RIA	: Radio immün assay
RNA	: Ribonükleik asit
Ro	: Sjögren sendromu antijeni, SS-A
SLA/LP	: Çözünebilir karaciğer antijeni/ Karaciğer pankreas antijeni
SLICC	: Systemic Lupus International Collaborating Clinics
SS	: Sjögren sendromu
TH-1	: Yardımcı T lenfositleri
TCR	: T hücre reseptörleri
BCR	: B hücre reseptörleri
Ts	: Sitotoksik T hücreleri
FasL	: Fas ligand
HLA	: İnsan lökosit antijeni
Treg	: Regülatör T hücreleri
UV	: Ultraviyoleet
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Otoimmün hastalıklarda bağışıklık yanıtının tipi	14
Tablo 2: Otoimmün hastalıklar	15
Tablo 3: SLE'li olgularda, laboratuvar belirtilerinin sıklığı	21
Tablo 4: SLE'de sık olarak görülen otoantikolar ve ilişkili klinik tablolar.....	22
Tablo 5: Otoantikoların klinik yaygınlığı ve hastalıklarla olan ilişkileri	26
Tablo 6: DFS70 Pozitifliğinin Klinik Yaygınlığı ve Hastalıklarla Olan İlişkileri.....	28
Tablo 7: Organa özgül otoimmün hastalıklar ve hastalık patogenezinde rol oynayan antijenler	29
Tablo 8: Sistemik otoimmün hastalıklar ve hastalık patogenezinde rol oynayan antijenler	30
Tablo 9: Pozitif ANA sonucunun tanı koydurucu etkisi ve görülme sıklığı.	33
Tablo 10: Sık saptanan ANA IFA paternleri ve ilgili antijenler.....	38
Tablo 11: Anti-DFS-70 antikor pozitif bireylerin cinsiyet dağılımı.	54
Tablo 12: Hastaların bölümlere göre dağılımı.	55
Tablo 13: ANA IFA sonuçları.	60
Tablo 14: Granüler + granüler kromozom tarzında ANA pozitifliği le birlikte saptanan diğer paternlerin dağılımı.....	60
Tablo 15: İmmüno blot yöntemi ile anti-DFS-70 antikor pozitifliği.	62
Tablo 16: İmmüno blot ile anti- DFS-70 antikor beraberinde saptanan diğer antikorlar.	62
Tablo 17: Hastaların ön tanı bilgileri.	62
Tablo 18: Hastaların ön tanıları esas alınarak demografik verileri, İmmüno blot ve ANA IFA sonuçları.	64

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Homojen paterni	39
Resim 2: Nükleer membran paterni	40
Resim 3: Granüler (benekli) paterni	41
Resim 4: Granüler + granüler kromozom (Yoğun İnce Benekli-DFS-70) paterni	42
Resim 5: Sentromer paterni	44
Resim 6: Nükleolar paterni	46
Resim 7: IFAT Mosaic: HEp-20-10/ Liver, (Euroimmun, Almanya)	56
Resim 8: Euroline ANA Profile 3 plus DFS (IgG) Strip sonuç değerlendirmesi	59
Resim 9: IFA'da granüler + granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği	61
Resim 10: İmmüno blot ile anti-DFS-70 antikoru pozitifliği.	61



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: HEp-2 hücresi ince yapısı	35
Şekil 2: Mitoz bölünme evreleri ve bu evrelerde görülen pozitif kromozom bantları ..	36
Şekil 3: İnterfaz evresinde ve mitozun farklı evrelerinde görülen kromozom alanları ..	37
Şekil 4: HEp-2 ve karaciğer hücrelerindeki nükleuslarda interfaz evresinde görülen boyanmalar.....	37
Şekil 5: Sırasıyla ENA paneli, ANA paneli, miyozit paneli ve otoimmün karaciğer paneli.....	50



ÖZET

İNDİREKT FLORESAN ANTİKOR YÖNTEMİ İLE ‘GRANÜLER + GRANÜLER KROMOZOM’ PATERNİNDE ANA POZİTİFLİĞİ SAPTANAN HASTALARDA, İMMÜNBLÖT YÖNTEMİ İLE ANTI DFS-70 ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI

İrem GÜNEŞ

Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahriye EKŞİ
Ocak 2018, 82 sayfa

Hücre içi antijenlere karşı otoantikörlerin varlığı sistemik bağ dokusu hastalıklarının önemli göstergelerindendir. İndirekt Floresan Antikör (IFA) yönteminde nükleus ve sitoplazmik otoantikör pozitiflikleri klinik açıdan hastalıklarla ilişkilendirilebilen farklı boyanma paternleri gösterirler. Bu çalışmada, IFA yöntemi ile granüler + granüler kromozom paterninde Anti Nükleer Antikör (ANA) pozitifliği saptanan hasta serumlarında immünoblot yöntemi ile anti-DFS-70 antikörlerinin araştırılması amaçlandı.

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinden Nisan 2016-Eylül 2016 tarihleri arasında gönderilen hasta serumlarında IFA yöntemi ile granüler + granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği saptanan 100 hasta serumunda immünoblot yöntemi ile 16 farklı antijene karşı oluşan antikörler araştırıldı. Çalışma kapsamına alınan hastaların demografik bilgileri kaydedildi. Çalışma süresi içinde çeşitli kliniklerden gönderilen 4440 serum örneği IFA yöntemi ile ANA açısından değerlendirmeye alındı ve örneklerin 81'inde (% 1.82) tek olarak granüler +granüler kromozom tarzında ANA pozitifliği, 19'unda (%0.42) ise farklı paternlerle beraber granüler +granüler kromozom tarzında ANA pozitifliği saptandı. Pozitiflik saptanan 100 örnek immünoblot yöntemi ile çalışmaya alındı ve 70'inde (% 70) tek olarak anti-DFS-70 antikörü, 30'unda (% 30) ise anti-DFS-70 ile birlikte farklı antikör pozitiflikleri saptandı. Anti sentromer pozitifliğine hiçbir hastada rastlanmadı.

IFA yöntemi ile granüler +granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği anti-DFS-70 antikörü varlığı ile ilişkilendirilmektedir, bizim sonuçlarımızda bunu doğrulamaktaydı. Ancak birden fazla antijene karşı ANA pozitifliği olduğu durumlarda IFA ile boyanma paternlerinin birbirlerini maskeleyebileceği görüldü. İmmünoblot yönteminin birden fazla antikör varlığında oldukça yararlı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler : ANA, DFS-70, IFA, immünoblot

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTI DFS-70 ANTIBODIES BY IMMUNBLOT METHOD IN PATIENTS WITH ANA POSITIVITY IN GRANULAR-GRANAULAR CHROMOSOME PATTERN DETECTED WITH INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY METHOD

İrem GÜNEŞ

Master Thesis, University of Gaziantep,
Institute of Medical Sciences Department of Medical Microbiology

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Fahriye EKŞİ

January 2018, 82 pages

The presence of autoantibodies against intracellular antigens is an important indicator of systemic connective tissue diseases. In the Indirect Fluorescent Antibody (IFA) method, nucleus and cytoplasmic autoantibody positivity show different patterns of staining that can be clinically associated with diseases. In this study, it was aimed to investigate anti-DFS-70 antibodies by Immunoblot method in serum of patients with Anti-Nuclear Antibody (ANA) positivity in granular + granular chromosome pattern by IFA method. Antibodies against 16 different antigens were investigated by immunoblot method in 100 serum of patients from IFA and granular + granular chromosome patterns of patient sera sent from various clinics of Gaziantep University Medical Faculty Sahinbey Research and Application Hospital between April 2016 and September 2016. Demographic information of the patients included in the study was recorded.

Between April 2016- September 2016, 4440 serum samples from various clinics were evaluated in terms of ANA by IFA method and alone granular + granular chromosome style ANA positivity in 81 samples (1.82%), combination with other pattern Granular + granular chromosome-like ANA positivity in 19 samples (0.42%) has been determined. 100 samples determined positivity studied by immunoblot method and anti-DFS-70 antibody positivity as single in 70 (70%), different antibody positivity with anti-DFS-70 positivity in 30 (30%) has been detected. Anti-centromere positivity has not been detected in any patients.

ANA positivity in the granular + granular chromosome pattern by the IFA method is associated with the presence of anti-DFS-70 antibody that our results confirm this. However, in cases where there is an ANA positivity against more than one antigen, it has seen that IFA staining patterns could mask each other. It was concluded that immunoblot method is useful in the presence of more than one antibody.

Key words: ANA, DFS-70, IFA, immunoblot

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hücre içi antijenlere karşı anormal düzeyde otoantikörlerin mevcudiyeti sistemik bağ dokusu hastalıklarının önemli göstergelerindedir. İndirekt Floresan Antikör (IFA) testi ANA'ların rutin olarak tayininde ilk olarak tanımlandıkları 1954 yılından beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Testte hayvan (fare, sıçan, maymun gibi) karaciğer, böbrek, mide doku kesitleri substrat olarak kullanılmış olup, günümüzde epitelyal kültür hücreleri (insan larenks karsinoma hücreleri, İnsan epitelyal hücre serisi- 2 (HEp-2), Amerikan doku koleksiyonu CCL-23) daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücreler düz cam yüzeylerde gelişebilir ve fikse edildiklerinde antikörlerin hücrelerin içine girmeleri mümkün olur. Hücre siklusunun değişik aşamalarında eksprese olan antijenlere karşı antikörler doku substratlarında saptanamazken kültür hücrelerinde tespit edilebilirler (1).

ANA IFA yönteminde nükleus ve stoplazmik otoantikör pozitiflikleri sayısı otuza yakın farklı boyanma modeli gösterirler. Romatolojik hastalıklarda ANA pozitiflikleri tanıda destekleyici önem taşır. Otoantikör pozitifliklerinde gözlenen boyanma modelleri, klinik açıdan hastalıklarla ilişkilendirilebilir. ANA IFA testinde laboratuvar test sonuç raporunda, testte kullandığı substrat doku veya hücrelerini, tarama titresini (1/100 veya 1/160), titreyi (ileri dilüsyon çalışmasındaki pozitiflik saptanan en yüksek titre), floresans şiddetini (otoantikör derişimiyle ve titreyle ilişkili olup 1+, 2+, 3+, 4+ olarak verilir), hücrenin nükleus, nükleolus, nükleus membranı, stoplazma, diğer organellerde ve mitotik hücrelerde gözlenen boyanma modeli/modellerini, ilişkili olabilecek otoantikörleri belirtilmektedir (2).

ANA varlığını araştırmada IFA yöntemi altın standart yöntemdir. İmmunblot yöntemi ile saflaştırılmış ve membran şeritlere aktarılmış özgül antijenlere karşı blotlama yöntemi ile antikör saptanmakta, tek reaksiyonda farklı antikörler saptanabilmektedir. Enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile antikör titrelerinin takibi gerçekleştirilmektedir. HEp-2 hücrelerinin fiksasyon işlemleri ve ayrıca bazı paternlerin birbirlerini maskeleymesi sonucu bir takım antikörlerin saptanması IFA yöntemi ile zor olabilmektedir. Bu gibi durumlarda ANA negatif bulunmasına rağmen ELISA veya immünblot yöntemlerinde bazı paternler pozitif bulunabilir. ANA saptamada ve takibinde bu yöntemlerin yerinde uygulanması önemlidir. Otoantikör pozitifliklerinin klinik verilerle birlikte değerlendirilmesi, klinik bulgusu olmayan ancak otoantikör

pozitifliği saptanan olguların uzun süreli takibi önerilmektedir. Yoğun ince benekli (DFS-70) boyanma modelinde nükleoplazma yoğun ince benekli tarzda boyanırken benzer benekler mitotik hücrelerin kromozomlarında da gözlenir (3).

HEp-2 metafaz ve interfaz evresindeki hücrelerde floresan alımı gözlemlenir. Metafazlardaki boyanma genellikle interfazlardaki boyanmadan daha kuvvetlidir. Maymun karaciğer hücresinde genellikle boyanma gözlenmez (4).

Anti DFS-70 antikoruna sağlıklı bireylerde %4.2-33.1 oranlarında görülebildiğine dair çalışmalar mevcuttur. İzole DFS-70 antikor pozitifliği genellikle tanıyı, sistemik romatizmal hastalık tanısından uzaklaştırmaktadır (5).

Atopik dermatit, intersistiyel sistit, alopesia areata, astım, pediatrik kronik yorgunluk sendromu gibi sistemik olmayan otoimmün hastalıklarda ayrıca çeşitli kanserler ve göz hastalıklarında da DFS-70 pozitifliği görülebildiği bildirilmektedir. ANA IFA yönteminde yöntemin dezavantajı olarak bazen paternler birbirini maskeleyerek, mikropaternalerde sorunlar yaşanabilmektedir. Yukarıda anlatılan nedenlerle IFA yöntemi ile granüler + granüler kromozom tarzında ANA pozitifliği saptanan hastalardaki antikorların tek tek saptanması, DFS-70 varlığının kesinleştirilmesi hastanın kliniği açısından çok önemlidir (6).

Bu çalışmada, otoimmün hastalık şüphesi ile laboratuara gönderilen hasta serumlarında IFA yöntemi ile granüler + granüler kromozom tarzında ANA pozitifliği saptanan hasta serumları İmmunblot yöntemi ile değerlendirmeye alınarak, hastaların klinik ve diğer laboratuvar verileri ile beraber değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İmmunoloji

İmmunoloji, bir konaktaki tüm immün yanıt mekanizmalarını ve sonuçlarını inceleyen bilim dalıdır. Vücudun kendisini yabancı maddelere ve enfeksiyon etkenlerine karşı savunma ve koruma yeteneğine immünite ya da bağışıklık adı verilir. Bu amaca yönelik olarak gerçekleşen olayların tümünden immün yanıt mekanizması sorumludur. İmmünite ve immün yanıtın gelişiminde büyük bir uyum içinde rol alan organ ve dokular, hücreler ve çözünür moleküller immün sistemin oluşumunda rol oynar. İmmün sistemin en önemli özelliği yabancı maddeleri (antijen) kendi (öz;self) yapılarından ayırt edebilmek, yabancıları tanıyarak onları vücuttan elimine etmek ve aynı antijenle tekrar karşılaştığında onu hatırlayarak (immunolojik bellek) enfeksiyona karşı bir direnç göstermektir. İmmün sistemin tüm komponentleri arasındaki karmaşık ilişkiler, otokrin ve endokrin fonksiyon gösteren çok sayıda aracı (mediyatör) ve düzenleyici (regülatör) sinyal proteinleri (sitokinler) tarafından sağlanır. Ayrıca tüm immün yanıt tipleri, homeostazın sağlanmasına yönelik düzenleyici birçok mekanizma tarafından kontrol edilmektedir (7).

2.2. İmmün yanıt

İmmün yanıtı başlatan yabancı maddeler antijen veya immünojen olabilir. İmmünojen kavramı, sadece immün yanıt oluşturma yeteneğindeki herhangi bir madde için kullanılır. Antijen ise bir molekülün, spesifik immünitenin ürünleri ile reaksiyona girebilme yeteneğini tanımlar, her zaman spesifik immüniteyi oluşturması beklenemez. Bütün immünojenlerin antijen olduğu ifade edilir, ancak bunun aksi her zaman geçerli değildir. Yeryüzünde yaklaşık 10^9 sayıda antijenin var olduğu kabul edilmektedir. Hastalık yapan mikroorganizmaların çoğu iyi bir antijen yapısına sahiptir (8).

2.3. İmmün yanıtın özellikleri

İmmün yanıt, birbirinden farklı milyonlarca antijene yanıt verebilir. Uzun süreli bir belleğe sahiptir. Bellek T hücreleri ve bellek B hücrelerinin üretimi nedeniyle ilk karşılaşmadan yıllar sonra bile aynı ajana yanıt verebilir. İmmün yanıtın etkileri, bu yanıtı başlatan antijene özgün olarak yönelmiştir (9).

2.3.1. Spesifite

Antijenlerin lenfositler tarafından spesifik olarak tanınan kısımlarına “antijenik determinant” ya da epitop adı verilir. Henüz spesifik antijen ile karşılaşmamış bir konakçıda her türlü antijeni tanıyıp reaksiyon verebilecek, antijen spesifik lenfosit klonları mevcuttur. Yabancı antijen organizmaya girdiği anda kendine özgü yüzey reseptörünü taşıyan lenfosit klonunu seçer ve aktive olur, çoğalır. Bir kısmı bellek hücresi, bir kısmı hafıza hücresi olarak farklılaşır. Bu olaya “primer immün yanıt” adı verilir. Aynı antijen ile tekrar karşılaşıldığında; önceki karşılaşmada gerçekleşen immünizasyon sonucu, antijen spesifik lenfositlerin klonal olarak genişlemesi ile immün yanıt daha erken ve daha kuvvetli gelişir. Buna “sekonder immün yanıt” denir (10).

2.3.2. Çeşitlilik (Diversity)

Memelilerde immün sistemin 10^9 farklı antijeni tanıma kapasitesi bulunduğu düşünülmektedir. Bu özellik “Lenfosit Repertuarı” olarak bilinir. Bir klondaki lenfositlerin antijeni tanıyan reseptörleri aynıdır. Her lenfosit klonunun antijen reseptöründe antijen bağlanma yerinin farklı olması repertuarın ne kadar geniş olabileceğini göstermektedir (10).

2.3.3. Hafıza (Bellek)

İmmün sistemin bir antijenle tekrar karşıdığında daha kuvvetli ve hızlı immün yanıtın sağlanır. Bu özelliğe immünolojik bellek veya immunolojik hafıza adı verilir. Antijene her maruziyet o antijen için spesifik olan klonun veya klonların artmasına sebep olur. Antijenik uyarı ile oluşan bellek hücreleri uzun ömürlü hücrelerdir (10).

2.3.4. Otoregülasyon

Antijenik uyarıyı takiben normal immün yanıt kendi kendini sınırlar. İmmün yanıt, zararlı olanı ve onu taşıyan hücreyi yok etmeyi hedefler. Bu hedefe ulaşıldığında antijenik uyarı ortadan kalkmış olacağından immün yanıt tamamlanmış olur (10).

2.3.5. Kendini (self'i) yabancı olandan ayırt etme (self-non self ayrımı)

İmmün sistem kendine ait olan antijenleri yabancılardan ayırt etme özelliğini lenfositlerin gelişme sürecinde primer lenfoid organlarda kazanır. Kendine ait yapılara karşı immün yanıt oluşturmaz. Bu duruma self tolerans veya immün tolerans denir. Self toleransın bozulması ile otoimmün hastalıklar meydana gelebilir (10).

2.4. İmmünolojik tolerans

Organizmanın immün sisteminin, belirli bir antijene karşı yanıtızsız kalması durumuna immünolojik tolerans denir. Bu yanıtızsız kalma durumunun organizmanın kendisine ait olup immünojenik özellik gösteren determinantlara karşı gelişmesine doğal immünolojik tolerans (self tolerans), yabancı antijenlere karşı gelişmesine ise kazanılmış immünolojik tolerans adı verilmektedir (11).

Toleransa neden olan antijenlere 'tolerojenler', immün cevaba yol açarlara ise 'immünojenler' adı verilir. Normal koşullarda bütün öz antijenler tolerojen olarak nitelendirilir. İmmünojenik antijenler ise spesifik immüniteyi uyarırlar ve bu antijenlerle tekrarlanan karşılaşmalar sonucunda sekonder immün cevap artar (12).

Normal şartlar altında immün sistemin kendi antijenik yapılarına karşı bir immün yanıt oluşturmadağı bilinmektedir. Fakat her bireyin kanında, konnektif dokularında ve hücrelerinde immün yanıt oluşturabilecek yapılar bulunmaktadır. Bu antijenlere self-antijen veya otoantijen denir. Lenfositler ile otoantijenler sıklıkla karşılaşmalarına rağmen immün yanıt oluşturmamaktadırlar. Bu spesifik yanıtızsız kalma durumundan çeşitli mekanizmalar sorumludur (11,13,14).

Bu mekanizmalar :

a) Klonal delesyon: Bu mekanizma, self antijenler ile reaksiyon veren T lenfositleri timusta olgunlaşmadan apoptoz yoluyla ortadan kaldırılmasıdır. Timustan kaçarak perifere geçmeyi başarabilen T lenfositler ise yine apoptoz ile elimine edilmektedir.

b) Saklı antijenler: Beyin, testis ve göz gibi organlarda bulunan antijenler immün sistem ile karşılaşmadıkları için bunlara karşı bir immün yanıt gelişmemektedir.

c) Antijeni görmezden gelme: Antijen sunucu hücrelerin (APC) yüzeyinde bazı self antijenler yoğun bir biçimde sergilendikleri için bu antijenlere karşı ne immün yanıt, ne de tolerans gelişmektedir.

d) Anerji: APC tarafından T lenfositlerine karşı yöneltilen tanıma sinyali bu hücrelerin aktive olması için yeterli olmamaktadır.

e) Supresyon: Birçok bireyde self antijenler ile güçlü reaksiyon veren B hücreleri bulunmaktadır. Uygun CD4 (+) Th hücrelerinin Treg hücreleri (Ts) ile self reaktif B lenfositlerinin baskılanması sonucunda ortadan kalkmakta veya anejik fazda kalarak aktive olamamaktadır. Yani self-reaktif B lenfositleri Ts hücreleri ile dolaylı yoldan baskılanmaktadır (11,13,14).

2.4.1. Santral tolerans

Kemik iliğinde T hücre grubuna farklılaşan lenfositler timusa gelerek burada olgunlaşmalarını tamamlar. Bu dönem içinde T lenfositlerinde T hücre yüzey reseptörleri (TCR), CD4 (+) ve CD8 (+) yardımcı molekülleri oluşmaktadır. Farklı APC hücreleri tarafından bu olgunlaşma döneminde T lenfositlerine doku uygunluk kompleksine (MHC) bağlı self antijenler sunulmaktadır. MHC-self antijen kompleksine düşük afiniteyle bağlanmış olan T lenfositleri sinyal alamadıkları için spontan bir şekilde apoptozdan korunur ve timusta ölürler. Bu komplekse yüksek afiniteyle bağlanan T lenfositleri ise apoptoz ile ortadan kaldırılır ve bu olay negatif seleksiyon olarak adlandırılır. MHC molekülüne bağlı self yapılara orta düzeyde afinite gösteren diğer T lenfositleri ise timusta olgunlaşmasını tamamladıktan sonra perifere ulaşmayı başarırlar. Bu olay ise pozitif seleksiyon olarak adlandırılır. Santral toleransın oluşabilmesi için otoantijenlerin timusta T hücrelerine tanıtılması gerekmektedir ve timusta bulunmayan self yapılara karşı tolerans oluşumu için periferel toleransa ihtiyaç duyulmaktadır (15,16).

T lenfositlerinin aksine B lenfositleri antijen üzerindeki uygun epitoplara antikor adını verdiğimiz B hücre yüzey reseptörleriyle (BCR) antijen sunumu olmadan veya MHC molekülüyle ilişki kurmadan bağlanmaktadır. Bu nedenle pozitif seleksiyon oluşmamaktadır. Ancak kemik iliğinde negatif seleksiyonla self reaktif, olgunlaşmamış B lenfositleri elimine edilmektedir (17).

2.4.2. Periferal tolerans

T hücrelerinin aktifleşebilmesi için APC tarafından verilen tanıma sinyali tek başına yeterli olmamakta, aynı zamanda yine APC tarafından alınacak kostimülator (sekonder) sinyale de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu olay interlökin 2 (IL-2) gibi T-hücre büyüme faktörü olarak adlandırılan maddelerin salınımına yol açacaktır. Kostimülator sinyali alamayan T hücreleri ise uzun süren bir yanıtsızlık dönemine, yani anerjik faza geçmektedirler. APC yüzeyinde kostimülator moleküllerin sergilenememesi durumunda bu hücrelerin aktive edeceği self reaktif T lenfositleri anerjik hale geçer. IL-2 sentezleyemeyip kısa süre içinde ölürler. Bunun yanında yüksek konsantrasyondaki antijenler, spesifik T hücrelerini sürekli olarak uyarmakta ve onların Fas ligand (FasL) aracılığıyla, apoptozis sonucu ölümüne yol açmaktadır. Bazı lenfositler ise anerjik olmadıkları halde Ts hücreleri tarafından inhibe edilmektedirler. Bu mekanizmaların yanında T lenfositlerinin bazı antijenlere karşı duyarsız kaldığı bilinmektedir (18,19).

B hücrelerinin periferde aktifleşebilmeleri için Th hücrelerinin yardımı gerekmektedir. B hücre yüzeyindeki CD40 ligandı ile aktive olmuş T hücrelerinin yüzeyindeki CD40 ligandı etkileşmekte ve Th2 hücreleri IL-4 ve IL-5 gibi sitokinler salgılamaktadır. Bu yolla, immatur B hücreleri aktive olabilmektedir. B lenfositlerinde tolerans oluşumu için gerekli antijen miktarı T hücrelerine oranla daha fazladır. Böylece dolaylı yoldan daha kolay oluşan bir T hücre toleransı, B hücrelerinin de kolay bir yoldan tolerize edilmesini sağlamaktadır (20,21).

2.5. Otoimmünite

Vücudun kendi antijenlerine karşı yanıtsızlık halinin hasar görmesi ya da kaybolması otoimmünite gelişimini tetiklemektedir. Konağın kendi antijenlerine karşı hücresel ve humoral immün yanıt oluşturması otoimmünite olarak adlandırılır. Otoimmünite reaksiyonlarının neden olduğu doku harabiyeti sonucu oluşan klinik tablolar otoimmün hastalıklar (OİH) olarak tanımlanır. Otoimmün hastalıkların oluşmasında çevresel, genetik ve endojen faktörler rol oynamaktadır (7).

Otoimmünitenin oluşmasında etkin olduğu düşünülen önemli bazı immünolojik mekanizmalar:

- Lenfoid organ ve lenfosit bozuklukları.

- Santral tolerans bozukluğu.
- Periferel toleransın yetersiz kalması durumu.
- Konak antijenlerine benzeyen veya aynı olan mikrobiyal antijenler ile çapraz reaktivite (moleküler taklit) (örn. *Klebsiella pneumoniae* ile ankikolazan spondilit; *Streptococcus pyogenes* ile romatizmal ateş ilişkisi).
- Poliklonal lenfosit aktivasyonu (bakteriyel lipopolisakkaritler, süperantijenler, bazı virüsler).
- Süpresör T (Treg) hücre eksikliği veya fonksiyon bozukluğu.
- Saklı kalmış antijenlerin travma, operasyon ya da enfeksiyonlar sonucu açığa çıkması.
- Konağın kendi antijenlerinde mikroorganizmalar, ilaçlar, vb. tarafından oluşturulan değişiklik (çapraz reaktivite gösteren yani antijenlerin oluşması).
- Mikrobiyal antijenler tarafından ASH uyarımı ve sitokin üretiminin artırılması.
- Belirli HLA tiplerinin varlığı (ankilozan spondilit için HLA-B27, sistemik lupus için HLA-DR3, romatoid artrit için HLA-DR4 varlığı risk teşkil eder) (7).

2.6. Otoimmünite mekanizmaları

Organizmanın kendi dokularına karşı immün sistemin yanıtsız kalması immünolojik tolerans mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. İmmün sistemin bu görevinin aksaması ise otoimmüniteye neden olmaktadır (22).

Otoimmünite gelişiminin temel mekanizmaları;

2.6.1.Moleküler taklit

Çeşitli bakteri ve virüsler, yardımcı T veya B hücrelerin etkinleşmesini tetikleyen çapraz tepki verici antijenlerin kaynağı olarak suçlanmıştır. Örneğin, Reiter sendromu Shigella veya Chlamydia enfeksiyonlarından sonra ve Guillain- Barre sendromu Campylobacter enfeksiyonlarından sonra görülür. Bu olayları açıklayabilmek için 'moleküler taklit' kavramı kullanılır. Dış ortamdan gelen uyarılar, çapraz tepkime veren vücut yapıtaşına yönelik bir bağışıklık saldırısını başlatmaya yetecek oranda bir vücut yapıtaşına benzer (taklit eder). Moleküler takliti en iyi karakterize eden

örneklerden bir tanesi *S.pyogenes*' in M proteini ile kalp kası miyozini ilişkisidir. Bazı M proteinlerine karşı gelişen antikolar, ateşli romatizmaya yol açmak üzere kardiyak miyozin ile çapraz tepkime verirler. Moleküler taklit varsayımını destekleyen ek kanıtlar arasında, bazı viral proteinler ile bazı insan proteinlerinin aynı amino asit dizilerine sahip olması vardır. Örneğin, hepatit B polimeraz ile insan miyelin bazik proteini aynı amino asit dizilerine sahiptir (23).

2.6.2. Normal proteinlerde değişim

İlaçlar normal proteinlere bağlanabilir ve bunları immünojenik hale getirebilirler. Prokainamid ile sistemik lupus eritematozus arasındaki bağlantı, bu mekanizmaya örnektir (23).

2.6.3. Hapsedilmiş antijenlerin salınması

Sperm, merkezi sinir sistemi, gözde lens ve uveal yolu gibi bazı dokular, antijenleri bağışıklık sistemi ile karşılaşmayacak şekilde kapatılmıştır. Bunlara immünolojik olarak ayrıcalıklı noktalar adı verilir. Böyle bir antijen, örn. harabiyetten sonra görüldüğü gibi kazara dolaşıma geçecek olursa hem hücre içi hem de hücre dışı yanıt tetiklenir ve sırasıyla aspermatogenez, ensefalit veya endoftalmite neden olur. Bağışıklığın olgunlaşmasından sonra gelişmesi ve buna karşın normalde immün bir saldırıya maruz kalmaması nedeniyle özellikle spermin immünolojik olarak ayrıcalıklı bir yerde hapsedilmesi zorunludur. DNA, histonlar ve mitokondri enzimleri gibi hücre içi antijenler normalde bağışıklık sisteminden gizlenmiştir. Öte yandan, bakteriyel veya viral enfeksiyon hücreleri tahrip edebilir ve bu hapsedilmiş antijenleri bir bağışıklık yanıtı aktive etmek üzere serbest bırakabilir. Otoantikolar bir kez oluştu mu, hapsedilmiş antijenlerin daha sonra serbest kalması immün karmaların oluşmasına ve otoimmün hastalığa ait semptomların belirlenmesinde neden olur. Enfeksiyona ek olarak ışınlar ve kimyasallar gibi dış etkenler de hücreleri tahrip edebilir ve hapsedilmiş hücre içi bileşenlerin serbest kalmasına neden olabilir. Örneğin güneş ışığının sistemik lupus eritematozusu bulunan hastalarda deri döküntülerini alevlendirdiği bilinmektedir. UV ışınının hücreleri tahrip ettiği, bu durumun hastalığın esas antijenleri olan ve normalde hapsedilmiş bulunan histonları serbest bıraktığı düşünülmektedir (23).

2.6.4. Epitop yayılması

Epitop yayılması, viral enfeksiyonların sebep olduğu hücre harabiyeti sonucu, hapsedilmiş otoantijenlerle yeni bir karşılaşmayı tanımlamak için kullanılır. Bu yeni karşılaşılacak otoantijenler yardımcı T hücrelerini uyarır ve otoimmün hastalık gelişimine neden olur (23).

2.7. Otoimmünite oluşumunu etkileyen faktörler

Otoimmün hastalıkların oluşmasına; genetik, çevre, stres, hormonlar ve immünolojik faktörler gibi birden çok değişken sebep olabilir. Romatoid Artrit’li, Sistemik Lupus Eritematozus’lu, Fibromiyalji Sendrom’lu ve Jüvenil Kronik Artrit’li hastaların %80’ninin, bu otoimmün hastalıkların oluşmasından önce duygusal stres yaşadığı ileri sürülmektedir (24,25).

Çocukluk çağlarında yaşanan travmatik stresin, yetişkin dönemde otoimmün hastalıkların oluşmasını arttırdığı yönünde çalışmalarda mevcuttur. Bu şekilde toleransın bozulmasında, en çok çevresel faktörlerin ve takiben genetik değişimlerin etkisi gösterilebilir (26).

Genetik değişiklikler, periferik ve immün sistemdeki lenfositlerin otoreaktivitesini değiştirir. Farklı koşullarda yaşayan, genetik olarak benzer popülasyonlarda yapılan çalışmalar otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasında çevresel faktörlerin önemini göstermiştir. Monozigotik ikizlerde bile aynı hastalığın görülme sıklığının %50’lilerde oluşu ve etnik kökenden bağımsız olarak hastalık insidansının belirli coğrafi bölgelerde yaşamayla artması sonucu tetikleyici çevresel faktörler üzerinde araştırmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır. Çevresel faktörler arasında en fazla üzerinde durulan konu enfeksiyonlardır. Enfeksiyonların otoimmün hastalıkların gelişimi üzerinde iki yönlü etkisi vardır. Enfeksiyonların otoimmün hastalıkların oluşumunu tetikleyebileceği gibi, son yıllarda giderek artan sayıda veri, bazı enfeksiyonlarında otoimmünitenin gelişimini önlediğini düşündürmektedir (27).

Self toleransın işlev görmemesi ve otoantikör üretimi, otoimmün hastalıkların oluşmasına neden olacaktır. Oluşan otoimmün hastalıklar sonucu otoantikör aracılı doku hasarı ortaya çıkmaktadır. Otoantikörler, hücrenin çeşitli antijenik yapılarına karşı oluşabilmektedir. Sistemik otoimmün hastalıklarda mevcut olan otoantikörlerin büyük

bir kısmı, bu hastalıkların ayırt edici tanısında kullanılabilir. Otoimmün hastalıkların çoğunda self reaktif T hücreler temel olayların başlatıcısı ve yürütücüsüdür. T hücrelerin saptanması zor olduğu için otoimmün hastalık araştırmalarında, serum örneklerinden otoantikör tayini daha rutin bir yaklaşım şeklidir (28).

1960 ve 1970'lerde, birçok araştırmacı, sistemik otoimmün hastalıkların tanısı için otoantikörler ile çalışılması konusunda çeşitli çalışmalar yapmış ve bazı immünolojik hastalıkların tanısında otoantikörlerin çok önemli klinik belirteçler olduğu konusunda hem fikir olmuşlardır (29).

Nükleer ve sitoplazmik birçok otoantikör karakteristik olup, tanıda oldukça yararlıdır. Titre ve boyanma şekline dayalı pozitif ANA tarama testlerini mutlaka ekstrete edilmiş hücre antijen (ENA) testi takip etmelidir. Eğer ANA tarama testi negatif çıkarsa, diğer tanımlama testlerinin yapılmasına büyük ölçüde gerek olmayacaktır (30).

2.8. Otoimmün hastalıklar

Otoimmünite, öz antijenlere yönelik immün aktivasyon yanıtın gelişmesi olarak tanımlanan önemli bir hastalık nedenidir (31).

Erişkin bir konak genel olarak, fetal yaşam sırasında kendine sunulmuş olan ve kendi özüne ait olarak tanıdığı doku antijenlerine karşı tolerans gösterir. Öte yandan, bazı durumlarda bu tolerans kaybolabilir ve otoimmün bir hastalığa yol açmak üzere konak antijenlerine karşı bağışıklık yanıt gelişebilir. Otoimmün hastalığın oluşmasında en önemli basamak, yardımcı (CD4) T hücrelerinin etkinleşmesidir. Bu yardımcı Th-1 veya Th-2 hücreler, sırasıyla hücre aracılı otoimmün tepkimeleri dürtüleyebilir (23).

Otoimmün hastalıkların çoğu antikör aracılıdır (Tablo1) (23).

Tablo 1: Otoimmün hastalıklarda bağışıklık yanıtının tipi (23).

Bağışıklık yanıtının tipi	Otoimmün hastalık	Bağışıklık yanıtının hedefi
<u>Reseptörlere karşı antikorlar</u>	Myastenia gravis	Asetil kolin reseptörü
	Graves hastalığı	TSH reseptörü
	İnsüline dirençli diabet	İnsülin reseptörü
	Lambert-Eaton myastenisi	Kalsiyum kanal reseptörü
<u>Reseptörler dışında diğer hücre yapıtaşlarına karşı antikor</u>	Sistemik lupus eritematozus	dsDNA, histonlar
	Romatoid artrit	Eklemlerde IgG
	Ateşli romatizma	Kalp ve eklem dokusu
	Hemolitik anemi	Alyuvar zarı
	İdiyopatik trombositopenik purpura	Trombosit zarları
	Goodpasture sendromu	Böbrek ve akciğer bazal membranı
	Pernisyöz anemi	İntrinsik faktör ve parietal hücreler
	Hashimoto tiroiditi	Tiroglobülin
	İnsüline bağımlı diabetes mellitus	Adacık hücreleri
	Addison hastalığı	Böbreküstü kabuğu
	Akut glomerülonefrit	Glomerüler bazal membran
	Periarteritis nodosa	Küçük ve orta çaplı arterler
	Guillain – Barre sendromu	Miyelin proteini
	Wegener granülomatozu	Nötrofillerin sitoplazmik enzimleri
Pemfigus	Deri sıkı kavşaklarında desmolein	
<u>Hücre aracılı (T hücreleri ve makrofajlar)</u>	Alerjik ensefalomyelit ve multipl skleroz	Miyelin proteinlerine karşı tepki beyinde demiyelinizasyon yapar

Otoimmün hastalıklar konusunda giderek artan bilgilere karşın, insanlarda otoimmün hastalıkların heterojen olması, birçok etkiye bağlı olarak gelişebilmesi, immün yanıtı başlatan ve hedefi olan öz antijenlerin sıklıkla bilinmemesi, otoimmün tepkimenin hastalığın ortaya çıkmasından çok önceleri başlaması gibi nedenlerle, araştırmalar sürmektedir. Toplumda otoimmün hastalıkların % 1–2 oranında olduğu tahmin edilmektedir (31).

Otoimmün hastalıkların tamamında, hastalığın nedeninden bağımsız olarak saptanabilen otoantikolar bulunur ve bu antikorların saptaması, laboratuvar tanısında oldukça önemlidir. Hastalığa özgün antikorların kullanımı; klinik bulguları olan olgularda hastalığın tanılanmasını; klinik bulguları belirsiz olan olgularda hastalığın dışlanmasını sağlar. Otoantikoların ayrıca belirlenebilmesi ve nicel olarak ölçülmesi ile hastalıkların alt gruplarının belirlenmesi, hastalık şiddetinin ve sağaltıma yanıtların izlenmesi mümkün olmaktadır (32).

Tablo 2: Otoimmün hastalıklar (33).

Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar	Sistemik Otoimmün Hastalıklar
Hashimoto Tiroiditi	Romatoid Artrit
Otoimmün Hemolitik Anemi	Sistemik Lupus Eritematozus
Pernisiyöz Anemi	Sjögrens Sendromu
Adisson Hastalığı	Skleroderma
Otoimmün Ensefalomyelit	Polimiyozit-Dermatomyozitis
Goodpasture Sendromu	Reiter Sendromu
Otoimmün Trombositopeni	Karışık Bağ Doku Hastalıkları

2.8.1. Organa özgül (lokalize) otoimmün hastalıklar

Organ spesifik otoimmün hastalıklarda, hastalık semptomları otoimmün yanıtın türüne göre tek bir organla veya dokuyla sınırlı kalmakta ve hastalığın gerçekleştiği dokunun dışında kalan kısımlar otoimmün mekanizmalardan etkilenmemektedir. Dolayısıyla organ spesifik otoimmün hastalıklar, hastalığın meydana geldiği organ veya dokuya göre sınıflandırılmaktadırlar (33).

Bu hastalıklara örnek olarak, kan hücrelerinin harabiyetine yol açan otoimmün hemolitik anemi ve trombositopeni; tiroidi tutan Hashimoto tiroidi ve Graves hastalığı; pankreası etkileyen tip- 1 diyabet; gastrointestinal organları etkileyen pernisiyöz anemi, çölyak ve Crohn hastalığı; karaciğeri tutam otoimmün hepatit ve primer biliyer siroz; deriyi tutan pemhigus vulgaris; kas-iskelet sistemini etkileyen myastenia gravis; beyin ve omuriliği etkileyen multipl skleroz; böbrek ve karaciğeri tutan Goodpasture hastalığı verilebilir (7).

2.8.1.1. Tiroid

Bunların başında Hashimoto tiroidi gelir. Guatr ile birlikte hipotiroidizm bulunmaktadır. Başlangıçta tiroid uyarıcı hormon (TSH) düzeyi ve tiroid fonksiyonları normal olduğu halde guatr gelişebilmekte, ancak ilerleyen dönemlerde TSH artmakta ve T4 seviyesi düşmektedir. Bu hastalıkta yüksek titrede otoantikolar görülmektedir. Genellikle tiroglobüline karşı otoantikolar gelişmektedir. Bunun yanı sıra tiroid yüzey antijeni ve ikinci bir kolloid antijenine karşı da antikor oluştuğu görülmektedir. Mikrozoamlara karşı oluşan antikorlar ve özel olarak programlanmış T hücrelerinin etkisi sonucu doku zarar görmekte ve sonuç olarak miksödem oluşmaktadır. Normal tiroid bezinde foliküler hücreler kolloid aralıkta sıralanmakta ve bu aralığa tiroglobulin salgılamaktadırlar. Hashimoto tiroidinde bu normal yapı hemen hemen yok olmuş ve koloidal aralığı lenfosit ve makrofajlar doldurmuştur. Sonuç olarak rejeneratif tiroid folikülleri oluşmakta, bezde destriksüyon ve fibrozis gelişmektedir (34, 35).

2.8.1.2. Mide- Barsak

Pernisiyöz anemide, otoimmün hasara yol açan anti periyatal hücre antikorları oluşmaktadır. Bu otoantikolar asit sekresyonu yapan H-K ATPaz enzimine karşı oluşan periyatal hücre antikorlarını hedef almakta ve intrinsek faktör yapımını azaltmaktadır. Bu duruma yol açan iki tip antikor bulunur. Bunlardan biri intrinsek faktörün B12 vitaminine bağlanmasını engelleyen bloke edici antikorlar, diğeri ise intrinsek faktörün ileuma bağlanmasını engelleyen bloke edici antikorlardır (34).

2.8.1.3. Pankreas

İnsüline bağlı Tip 1 diabetes mellitus (Tip 1 IDDM) hastalığında pankreatik beta hücrelerine karşı hücre adacık antikorları gelişmektedir. Bu antikorlar hastalık klinik

olarak gelişmeden yıllar önce ortaya çıkabilmektedir. Otoimmün hasarın oluşumu adacık hücrelerinin etrafındaki lenfositik hücre infiltrasyonundan anlaşılmaktadır. IDDM hastalarının yaklaşık % 90'ında HLA-DR3 veya DR4 alleli bulunmaktadır. Ayrıca insüline karşı otoantikorların oluşumu ilerleyen dönemlerde hastalarda IDDM gelişme ihtimalini düşündürmektedir (34).

2.8.1.4. Adrenal Bez

Adrenal bezin tüberküloz sebebiyle hasar görmesi sonucu adisson hastalığı oluşmaktadır. Hiperpigmentasyon, hipoglisemi, kilo kaybı ve adrenokortikal hormonlarda eksiklik görülmektedir. Mineralokortikoid eksikliği sonucu böbreklerde Na ve K tutulması asidoza yol açar. Adrenal bezin her üç tabakasına karşı da otoantikorlar gelişmektedir. En sık olarak adisson hastalığında görülmektedir (34).

2.8.1.5. Böbrek

Glomerulonefrit, glomerular bazal membranda bulunan nefritojenik antijene karşı oluşan antikorların bazal membranla birleşmesi sonucu immün kompleks birikimi ile oluşmaktadır. Goodpasture sendromunda ise alveolar bazal membranı, glomerular bazal membranı ve akciğeri etkileyen anti-GBM antikorları oluşmaktadır (34).

2.8.1.6. Sinir sistemi

Bu gruba giren hastalıklar arasında myastenia graves ve akut ensefalomyelit bulunmaktadır. Myastenia graves hastalığında asetil kolin reseptörlerine karşı otoantikorlar oluşmaktadır, akut ensefalomyelit ise bazı viral infeksiyonlar sonrasında miyelin proteinine karşı hücresel tip immün yanıtın olduğu bir hastalıktır (34).

2.8.1.7. Karaciğer

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

(AMA) bulunmaktadır. Piruvat dehidrojenaz kompleksinin bir komponenti olan M2 antijeni mitokondriumun iç membranında lokalize olmuş bir yapıdır. M2 antijenine karşı oluşan antikorlar PBS için spesifik olarak kabul edilmektedir (34).

2.8.1.8. Göz

Herpes zoster, tüberküloz ve aspergilloz gibi infeksiyonların skleritis ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İmmün komplekslerin depolanmasının; kompleman aktivasyonuna, polimorfonükleer lökositlerin kemotaksisine ve olası otoimmün reaksiyonların başlamasına neden olduğu düşünülmektedir. Üveitis, immün kompleks hastalıklarında oluşan üveit ve gözde meydana gelen hasar sonucu sempatetik oftalmi göz yapısında oluşan otoimmün hastalıklar arasındadır (34).

2.8.1.9. Kan Hastalıkları

Otoimmün hemolitik anemi sıcak reaktif IgG otoantikor nedeniyle olabilmekte ve bu hastaların yaklaşık %50'sinde lenfoma, sistemik lupus eritematozus (SLE) ve romatoid artrit (RA) görülebilmektedir. Soğuk reaktif IgM antikorları ise soğuk hemaglutinin hastalığında görülmekte ve bu hastalık kronik hemolitik anemi ve Raynold fenomeni ile ilişkilendirilmektedir. İdiopatik trombositopenik purpura hastalığında ise tahrip olan trombositlere karşı anti trombosit antikorları oluşmaktadır (34).

2.8.1.10. Deri

Epiderm hücreleri arasında immünglobulin ve kompleman depolanması, IgG tipi otoantikorların oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca IgG titresi ile hastalık aktivitesi arasında bağlantı bulunmaktadır. Genellikle SLE, titoma ve myastenia graves hastalığıyla birlikte görülmektedir. Büllöz permfigoid hastalığında ise lamina lucida tabakasına karşı IgG tipinde otoantikorlar oluşmaktadır. Bu tabloda IgG titresi ile hastalık arasında bir bağlantı bulunmamaktadır (34).

2.8.2. Organa özgül olmayan (sistemik) otoimmün hastalıklar

Otoantikorların kendi antijenleriyle birleşmesi sonucu oluşan ve kanda dolaşan immün komplekslerin çeşitli organ ve dokularda (böbrek, kan damarları, bağ dokusu, deri, eklemler,vb.) birikimi sonucu ortaya çıkar. Sistemik otoimmün hastalıklar, kan

damarları ve bağ dokusu tutulumuna neden olduğu için kollajen vasküler hastalık veya bağ dokusu hastalığı olarak da adlandırılırlar. Bunlara örnek olarak sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, Sjögren sendromu, sistemik skleroz ve karışık bağ dokusu hastalığı verilebilir (7).

2.8.2.1. Sistemik lupus eritematozus

Sistemik lupus eritematozus (SLE) multifaktöriyel bir otoimmün hastalık olup hem çevresel hem genetik faktörlerden etkilenmektedir. SLE insidansı Amerika Birleşik Devletleri (ABD) verilerine göre 10⁵'inde 5.1, prevalansı 10⁵'inde 52.1'dir. Kadın : erkek oranı yaklaşık 9:1'dir. Ülkemizde ise Trakya bölgesinde yapılan bir çalışmada SLE insidansı 10⁵'inde 4.4, prevalansı ise 10⁵'inde 51.7 olarak belirlenmiştir. Lupusun doğal ve adaptif bağışıklık mekanizmalarında görülen bozukluklar nedeniyle geliştiği bilinmektedir. Apoptotik hücre temizlenmesi, sitokin kaskadı, B-hücre bağışıklığı ve T-hücre sinyalizasyonunda gelişen bozukluklar hastalığın patogenezinde rol oynayan temel mekanizmalar arasındadır (6).

SLE'de immün sistemde görev oynayan B hücreleri aktiftir ve immünglobülin (Ig) yapımları artmıştır. Aktif hastalarda , dolaşan T hücrelerinin sayısı azalmış, yardımcı T lenfosit işlevleri (fonksiyonları) artmıştır. Süpresör –sitotoksik T lenfositler azalmıştır ve işlevleri bozuktur. B lenfositlerin, otoantikor yapımını uyarıcı (stimüle edici) etkileri olan CD4-, CD8- T lenfositler artmıştır (36).

Otoreaktif B lenfositlerin varlığının kanıtı, viral enfeksiyonların seyrinde görülen özgül olmayan poliklonal B hücre aktivasyonu sonucu ürettikleri, IgM tipindeki doğal otoantikorlardır. Bunlar düşük titrede ve düşük bağlanma eğilimli (affiniteli) antikorlardır. Patojenik özellikleri yoktur. Otoreaktif B Lenfositlerin IgG tipi patojenik otoantikor yapımına geçebilmeleri için, otoreaktif T lenfositlerin yardımına gereksinim duyarlar. Ancak T hücre yardımı başlayınca, farklılaşabilir (diferansiye) ve çoğalabilirler (prolifere). Ardından antikor olgunlaşması gerçekleşir ve doku yıkımından sorumlu IgG tipinde, yüksek titrede ve yüksek bağlanma eğilimli otoantikorların yapımı gerçekleşir. Otoreaktif T lenfositler her bireyde bulunabilir. Böyle otoreaktif T lenfositlerin otoimmünite oluşturmaları, klonal anerji mekanizmaları ile önlenmiştir ve inaktive edilmişlerdir. Kendinden olan (self) peptide tepki göstermezler (tolerandırlar). Ancak, SLE' de inaktif olması gereken otoreaktif T hücre

klonları aktiftir. Bu durum, otoimmüneyi başlatan esas adım olarak kabul edilebilir (36).

SLE'de otoantikörlerin doku yıkımına yol açan bazı mekanizmalar olduğu düşünölmektedir (36).

İmmün kompleksler (İK) aracılığı ile oluşan doku yıkımı: SLE' de İK' ler iki yolla oluşabilir; ya dokuda yer alan antijenlere , dolaşımdaki antikörler bağlanarak, in situ İK oluşur veya dolaşımdaki antijen antikörle birleşerek , dolaşımda İK meydana gelir. İn situ İK oluştuğu yerde, dolaşan İK, damar duvarlarında birikir ve kompleman sistemini aktive ederler. Ardından, nötrofiller için çekim faktörü olan C5a oluşur. Olay yerine gelen nötrofiller, İK'leri fagosite etmeye çalışırlar. Bu sırada açığa çıkan intrasitoplazmik enzimleri, doku yıkımına sebep olur. Monositler ve diğer yangı (inflamasyon) hücreleri de olaya dahil olurlar. Trombosit agregasyonu ve pıhtılaşma (koagölasyon) sisteminin aktive olması , gelişen yıkımı daha da arttırır. SLE'li olgularda, hücre yüzeyindeki kompleman reseptörleri azalmıştır. İK' lerin , bu nedenle normalden daha yavaş temizlenmesi, hastalardaki İK aracılı yıkımın daha da artmasına neden olur (36).

Antikör nedeniyle gelişen hücre ölümü: hücre yüzeyine bağlanabilen antikörler, kompleman sistemini aktive etmeden de hücre ölümüne yol açabilir. Lökositler, dokulardaki antikörlerle kaplı hücreleri tanıyarak bu hücreleri ortadan kaldırabilir. Dolaşımdaki antikörle kaplı hücreler (eritrosit, lökosit ve trombositler) ise, ya retikülo-endotelial sistem (RES) tarafından ortadan kaldırılırlar, ya da komplemanın aktive olması sonucu parçalanırlar (36).

Tablo 3. SLE’li olgularda laboratuvar belirtilerinin sıklığı (36).

Laboratuvar belirtileri	Sıklık (%)
Pozitif ANA	97
Kompleman düşüklüğü	51
Lökopeni	46
Anti –ds-DNA	46
Anemi	42
Proteinüri	42
Anti-fosfolipid antikorlar	35
Gamapati	32

Sistemik Lupus Uluslar arası Klinikler İşbirliği [Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)] tarafından yayınlanan klinik ve immunolojik sınıflandırma kriterleri şunlardır:

Klinik kriterler: Kronik kutanöz lupus, akut kutanöz lupus, oral veya nazal ülserler, skarlaşmayan alopesi, iki veya daha fazla eklemi içeren sinovit, renal tutulum, serozit, santral sinir sistemi bulguları, lökopeni, trombositopeni, hemolitik anemi (6).

İmmünolojik kriterler: Referans sınır değerinde ANA, anti-Sm, anti-dsDNA, anti-fosfolipit antikor pozitifliği, düşük C3,C4 ve CH50 değerleri, direkt Coombs testi pozitifliği (hemolitik anemi varlığında önemsiz) (6).

SLE sınıflaması için en az dört kriter (en az bir immünolojik ve bir klinik kriter) veya biyopsi ile kanıtlanmış nefrit ve ANA veya anti-dsDNA pozitifliği gereklidir (6).

Tablo 4: SLE’de sık olarak görülen otoantikolar ve ilişkili klinik tablolar (36).

Otoantikolar	Sıklık	Klinik özellikler
Hücre içi		
anti-dsDNA	%50	Nefrit,serozit
anti-Ro(SSA)	%33	Fotosensitif deri döküntüleri, SKLE,neonatal lupus, nefrit,nötropeni, homozigot kompleman eksikliği, Sjögren sendromu
anti-La(SSB)	%33	Sjögren ve NNL. Nefritten koruyucu.
anti-U1 RNP	%33	Raynaud fenomeni, Miks BDH (anti-Sm yoksa)
anti-histon	%30-80	İlaca bağlı lupus
anti-ribozomal P		Depresyon,psikoz
Hücre membranı		
anti-kardiolipin	%33	Tekrarlayan düşükler,tekrarlayan arteryel-venöz trombozlar, fokal MSS tabloları, livedo retikularis, trombositopeni
anti-nöron		Difüz nörolojik tutulum
anti-lenfosit		Lenfopeni, MSS lupusu, hastalık aktivitesi
anti-eritrosit	<%10	Otoimmün hemolitik anemi
anti-trombosit	<%10	Otoimmün trombositopeni

2.8.2.2. Romatoid artrit

Romatoit artrit (RA) en sık görülen sistemik otoimmün hastalıktır. RA eklemlerde kronik inflamasyon ve buna bağlı artrit gelişimi ile karakterize bir hastalıktır. Tüm dünyada ortalama prevalansı %1-2’dir. Prevalans kadınlarda erkeklerden daha yüksektir. Romatoid artrit patogenezinde cinsiyet, genetik, mikrobiyal antijenlere bağlı T hücre aktivasyonu ve artmış sinoviyal immün yanıt başta olmak üzere pek çok faktör rol oynar. Özellikle mikrobiyal antijenlerle ortak epitop taşıyan bireylerde kronik

olarak sitriline olmuş peptidlere maruz kalma sonucunda anti-siklik sitrulinlenmiş peptid antikorlar (anti-CCP) sentezlenir. RA'da hem otoantikor sentezleyen B hücreleri hemde otoreaktif TH1 hücrelerinin aktivasyonu sonucunda otoimmün yanıt ortaya çıkarmaktadır. Sinoviyal sıvıdaki bu yanıt lenfosit ve makrofajların olay yerine gelmesine ve kıkırdak dokuda hasara yol açar. Bu hasarda rol oynayan önemli faktörlerden biri IgM-IgG immün kompleksleridir. IgG'nin Fc parçasına karşı sentezlenen IgM tipindeki anti-IgG antikorları en önemli rolü oynar. Bu antikorlar romatoid faktör (RF) olarak tanımlanmaktadır (6).

RA, primer sinovite yol açan bir hastalıktır. Anatomik olarak, normal sinovya iki kısımdan oluşur:

- Eklem aralığına bakan, 1-2 hücreden oluşan bazal membransız, ince intima tabakası.
- Az sayıda hücre ve daha çok sayıda damarsal yapı içeren subintima tabakası (36).

Bu iki tabaka ortak çalışır. Glikozaminoglikanların yapımı ve vasküler yapılara filtrasyonunu sağlama, temel görevleridir. Subintimal matrikste, daha çok kollajen, glikozaminoglikan ve fibronektin bulunur. İntimal tabakadaki sinovyal hücreler, makrofajlara özgü davranışlara sahiptirler ve T hücrelerinin mediatörleri olarak görev yaparlar. Normal sinovya romatoid sinovyaya döndüğünde, bu hücreler allojenik T hücre aktivasyonunda son derece etkili olurlar (36).

İleri yapısal çalışmalara göre sinovyal hücreler; fibroblast veya makrofaj yapısında olmak üzere iki kısma ayrılır. Makrofaj yapısında olan sinovyositler, Fc reseptörleri içerirler ve fagositoz yapma yeteneğindedirler. Bu hücreler ayrıca, yüzeylerinde HLA klas 2 moleküllerini de taşırlar. Köken olarak kemik iliği kaynaklıdır. Fibroblast yapısında olanlar mezenşimal kökenlidir ve diğer hücre tipindeki yapısal özellikleri göstermezler. RA sinovyumunda bu iki hücre tipi başlangıçta birlikte artış gösterir. Ancak olay kronikleştikçe, fibroblast tipi olan sinovyositlerin artışı gözlenir. Bu hücreler, pannüs (prolifere sinovyal oluşum) adı verilen hücre grubunu oluşturur. Romatoid sinovyumda histopatolojik olarak yangısal yapı incelendiğinde; mononükleer hücreler, makrofajlar, T lenfositler ve plazma hücreler dikkati çeker. Anjiogenezik aşamadan başlayarak gözlenir. Anjiogenezin uyarılmasında; makrofajlar, fibroblastlar

ve lenfositlerden salınan büyüme faktörlerinin rolü vardır. Kısa zamanda sinovya hücrelerinde artış ve bu artış sonucunda da villöz oluşumlar meydana gelir. Eklem anatomisinin bozulmasında ve hastalığın yol açtığı şekil bozukluklarının oluşmasında pannüslerin önemli rolü vardır. Pannüslerin etkili olduğu alan, kıkırdakla kemiğin birleştiği kısımdır. Büyüme etkili sitokinlerden TGF- β 'nın, pannüs oluşumunda rolü olduğu kabul edilmektedir. Romatoid sinovyumda egemen olan T hücre grubunu, daha çok CD4+ yardımcı T hücreleri oluşturur. Sinovyal dokuda polimorf nüveli lökositler az oranda saptanırken, sinovyal sıvının baskın hücrelerini meydana getirirler. Bunun nedeni, sinovyal yüzey hücrelerine yapışmaları için gerekli adezyon moleküllerinden integrinlerin, nötrofillerde olamamasıdır. Buna karşılık T hücreleri, romatoid sinovyumda, içerdikleri adezyon molekülleri nedeniyle kolayca yerleşebilirler. Polimorf nüveli lökositlerin, sinovyal sıvıda oluşturdukları enzimler, eklem kıkırdağının yıkımında rol oynayan ikinci mekanizma olarak kabul edilmektedir (36).

2.8.2.3. Sjögren sendromu

Gözyaşı ve tükürük bezlerinin immün reaksiyonlar sonucu hasar görmesi ile oluşan ağız, göz ve mukozaların kuruması şeklinde kendini gösteren sistemik inflamatuvar bir hastalıktır. RA, SLE ve skleroderma gibi hastalıklarla bir arada görülebilmektedir. Özellikle kadınlarda 40 yaşın üzerinde görülme sıklığı artış gösterir. Solunum yolunda oluşan kuruma sonucu ölümcül pnömoniler gelişebilmektedir. Üç gruba ayrılır: Primer Sjögren Sendromu, Sekonder Sjögren Sendromu ve RA ile beraber görülen 3. tip sjögren sendromu. Primer Sjögren Sendromu veya Sicca Sendromu adı verilen hastalıkta HLA-DW3 alleli ile ilişkilendirilmektedir. Sekonder sjögren sendromunda ise sicca sendromu, SLE, PBS, polimiyozit ile birlikte görülmektedir. Üçüncü grup ise RA ile birlikte görülür. Sjögren sendromunda %70'in üzerinde bir ANA pozitifliği ile beraber SS-A ve SS-B'ye karşı gelişen spesifik antikorların bulunması tanıda önemlidir. Bunun yanı sıra salgı kanallarını etrafında mononükleer ve CD4(+) lenfosit infiltrasyonu görülür (33, 34).

2.8.2.4. Skleroderma

Böbrek, deri, eklemlerdeki oluşumlar, özefagus, bağırsak kanalı, tiroid, akciğer ve iç organlarda bağ dokusunun anormal bir biçimde artması ile gelişen bir otoimmün hastalıktır. İmmünolojik faktörlerle beraber oluşan damar anomalilerinin hastalıkta

etkili olduğu düşünölmektedir. Yaygın skleroderma, iç organ tutulumu ile beraber görölürse ölümlle sonuçlanabilmektedir. Bazen de el ve yüzde oluşan skleroz yıllar sonra CREST sendromuna dönülebilmektedir. Sklerodermanın en iyi huylu formunun CREST sendromu olduğu bilinmektedir. İlerleyen sklerodermada böbrek tutulumu en sık görölen ölüm nedenidir. ANA pozitifliği %60-90 oranında görölebilmektedir. Bunun yanında RF pozitifliği de görölmektedir. Çözünebilir nükleer antijenlere karşı gelişen anti Scl-70 antikoru skleroderma için spesifik olmakla birlikte anti-sentromer antikoru ise CREST sendromu ile ilişkilendirilmektedir (33, 34).

2.9. Otoimmün hastalıkların epidemiyolojisi

Otoimmün hastalıkların genellikle nadir görölen hastalıklar arasında olduğu tahmin edilsede, mortalite ve morbidite üzerindeki etkilerine bakıldığında bu oranın oldukça yüksek olduğu görölmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan araştırmalar sonucunda otoimmün hastalıklar 65 yaşın altındaki kadınlar arasında önemli bir ölüm nedeni olarak gösterilmektedir (35).

Bu hastalık grubunun çoğunun kronikleşmesi, sağlık alanında, yaşam kalitesi üzerinde ve ekonomik anlamda ciddi boyutlarda kayıplara yol açmaktadır (38).

Otoimmün hastalıkların tamamının kadınlarda görölme sıklığı erkeklerde görölme sıklığından daha yüksek orandadır. Tiroid, skleroderma, SLE, sjögren sendromu gibi otoimmün hastalıkların kadınlarda görölme sıklığı %85'in üzerindeyken RA ve sistemik skleroz gibi otoimmün hastalıklarda ise bu oran %60-75 arasında değişmektedir. Tip 1 diyabet gibi bazı otoimmün hastalıkların kadın ve erkekler arasında, çocukluk döneminde başlama riskinin ise neredeyse birbirine eşit olduğu bildirilmektedir. Ayrıca juvenil RA gibi otoimmün hastalıkların kadınlarda daha sık rastladığı bildirilmiştir. Otoimmün hastalıklar üzerine yapılan son çalışmalarda ise yetişkin diyabet başlangıcında erkeklerin kadınlara oranla daha fazla risk taşıdığı görölmüştür (39, 40) .

Yapılan çeşitli araştırmalarla birlikte otoimmün hastalıkların yaşa bağlı görölme sıklığında önemli bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Ancak iki önemli çocukluk dönemi hastalığı olan juvenil artrit ve Tip 1 diyabetin hastalık başlangıcının yaklaşık 8-10 yaş civarında göröldüğü belirtilmektedir. Ayrıca sistemik skleroz ve graves gibi hastalıklar sıklıkla 30-50 yaş dönemleri arasında göröldüğü bildirilmektedir. Daha ileri

yaş gruplarında (40-70) görülen hastalıklar arasında ise tiroid, sjögren sendromu ve RA gibi otoimmün hastalıklar bulunmaktadır (38).

Otoimmün hastalıklardan olan SLE'nin erkeklere oranla kadınlarda 5-10 yıl daha erken görüldüğü belirtilmesine rağmen bu farklılığın sadece beyaz ırkta görülebileceği düşünülmektedir (41) .

Bunun tam tersi olarak hipertiroidizm hastalığının kadınlara oranla erkeklerde daha erken yaşlarda görüldüğü bildirilmiştir (42) .

Otoimmün hastalıklarda risk faktörleri ülkeler arasında hatta aynı bölgede yaşayan etnik gruplar arasında bile farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin Tip 1 diabet hastalığı Güney Avrupa ve Asya ülkelerine kıyasla Kuzey Avrupa ülkelerinde daha yaygın görülmektedir (43).

Yeterli bilgi ve kanıt elde edilmiş olmamasına rağmen otoimmün hastalıklardan biri olan sistemik skleroz da bu duruma bir örnek olarak gösterilebilmektedir (44).

ABD'de beyaz ırka oranla siyah ırk SLE için daha yüksek risk taşımaktadır. Ayrıca, Tip 1 diabet hastalığının insidansı ise beyaz ırka oranla siyah ırkta daha nadir görülmektedir. ABD'de yaşayan siyah ırk ve Asyalılar, sistemik skleroz hastalığı açısından daha düşük risk taşımaktadır (38).

2.10. Otoantikolar

En eski ve yaygın aranan otoantikör anti nükleer antikörlerdir (ANA) ve sistemik otoimmün hastalıkların tanısında önemlidir. Bunun yanı sıra hastalık tanı ve izleminde en sık kullanılan otoantikörler, çift sarmal DNA'ya karşı (anti-dsDNA), anti-Ro/SSA (SS; Sjögren sendromu), anti-La/SSB, anti-Sm (smooth muscle), anti-RNP (ribonükleoprotein), anti histon, anti sentromer, anti-Jo-1 (anti histidil tRNA), anti Scl-70 (sistemik skleroz-70kDa/anti topoizomeraz-1) olarak sayılabilir (Tablo 5) (45).

Tablo 5: Otoantikörlerin klinik yaygınlığı ve hastalıklarla olan ilişkileri (46).

Otoantikör	İlişkili hastalıklar	İlgili hastalıkta saptanma sıklığı(%)
ANA	Sistemik Lupus SLE etkin dönem	95-100
	SLE durgun dönem	80-100
	İlaçla uyarılmış SLE	100
	Mikst bağ dokusu hastalığı (MBDH)	100
	Romatoid artrit (RA)	20-40
	Progresif sistemik skleroz	85-95
	Polimiyozit , Dermatomyozit	30-50
	Sjögrem Sendromu	70-80
	Kronik Aktif hepatit	30-40
	Ülseratif kolit	25
	Diğer romatizmal hastalıklar	20-50
ds DNA	SLE	50-60
	RA, MBDH	5
SSA (Ro)	SLE	15-30
	Sjögrem Sendromu	60
	Yeni doğan lupus	100
SSB (La)	Sjögrem Sendromu	30
	SLE	30-50
Sm	SLE	25-30
RNP	MBDH	95-100
	Sistemik skleroz	20
	SLE	25-40
Scl-70	Skleroderma	20-30
Jo-1	Polimiyozit	25-45
Sentromer	CREST sendromu (skleroderma)	80
Histon	İlaçla uyarılmış SLE	90

Tablo 6: DFS70 Pozitifliğinin Klinik Yaygınlığı ve Hastalıklarla Olan İlişkileri (47).

Klinik tanı	DFS-70 pozitif örnek sayısı	Klinik tanı	DFS-70 pozitif örnek sayısı
Sistemik otoimmün romatizmal hastalıklar		Vasküler hastalıklar	
Sistemik lupus eritematozus	16 (%8.0)	Periferik vasküler hastalık	1 (%0.5)
Romatoid artrit	6 (%3.0)	Serebrovasküler hastalık	1 (%0.5)
Sjögren sendromu	1 (%0.5)	Hematolojik hastalıklar	
Sistemik skleroz	1 (%0.5)	Demir eksikliği anemisi	2 (%1.0)
Jüvenil romatoid artrit	2 (%1.0)	İdiopatik trombositopenik purpura	1 (%0.5)
Organa spesifik otoimmün hastalıklar		Solunum sistemi hastalıkları	
Multipl skleroz	4 (%2.0)	Astım	6 (%3.0)
Otoimmün tiroidit	2 (%1.0)	İnterstisyel pulmoner hastalık	1 (%0.5)
Otoimmün hepatit	1 (%0.5)	Allerjik rinit	1 (%0.5)
Ülseratif kolit	1 (%0.5)	Nörolojik hastalıklar	
Malign hastalıklar		Motor nöron hastalığı	1 (%0.5)
Karsinoma in situ	5 (%2.5)	Polinöropati	2 (%1.0)
Malign neoplazm	3 (%1.5)	Vertigo	2 (%1.0)
Sindirim sistemi malign neoplazmı	1 (%0.5)	Endokrin hastalıklar	
Diğer romatizmal hastalıklar		Toksik olmayan multinodüler guatr	1 (%0.5)
Fibromyalji	2 (%1.0)	Endokrin bozukluk	1 (%0.5)
Ankilozan spondilit	2 (%1.0)	Diğer	
Birikim hastalıkları		Eklem ağrısı	44 (%22.0)
Herodofamilyal amiloidozis	2 (%1.0)	Baş ağrısı	4 (%2.0)
Sarkoidoz	2 (%1.0)	Karın ağrısı	3 (%1.5)
Göz hastalıkları		Alerji	3 (%1.5)
İridosiklit	1 (%0.5)	Düşük	1 (%0.5)
Episklerit	1 (%0.5)	Öksürük	1 (%0.5)
Pitozis	1 (%0.5)	Rutin çocuk sağlığı muayenesi	4 (%2.0)
Üriner sistem hastalıkları		Sinovit	1 (%0.5)
Üriner sistem enfeksiyonu	3 (%1.5)	Tekrarlayan oral aftlar	1 (%0.5)
Sistit	1 (%0.5)	Transaminaz ve laktat dehidrogenaz yüksekliği	3 (%1.5)
Üriner taş	1 (%0.5)	Lökosit bozukluğu	3 (%1.5)
Akut böbrek yetmezliği	1 (%0.5)	Koagülasyon bozukluğu	1 (%0.5)
Nefrotik sendrom	2 (%1.0)	Deri döküntüsü	5 (%2.5)
Karaciğer hastalıkları		Karaciğer hastalığı	1 (%0.5)
Kronik hepatit	1 (%0.5)	Belirsiz	
Kronik hepatit C	2 (%1.0)	30 (%15.0)	
Toksik karaciğer hastalığı	1 (%0.5)		
Deri hastalıkları			
Ürtiker	7 (%3.5)		
Dermatit	1 (%0.5)		
Kserozis kutis	1 (%0.5)		
Raynaud sendromu	1 (%0.5)	TOPLAM	100

Bazı organa özgül ve sistemik otoimmün hastalıklarda rol oynayan antijenler Tablo 7 ve Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 7: Organa özgül otoimmün hastalıklar ve hastalık patogenezinde rol oynayan antijenler (6).

Organa özgül otoimmün hastalık	İlişkili antijenler
Tip 1 diabetes mellitus	Pankreas adacık hücresinde bulunan glutamat dekarboksilaz (GAD) ve tirozin fosfataz, insülin, preproinsülin
Hashimoto trioditi	Tiroperoksidaz (TPO) , tiroglobulin (Tg)
Graves hastalığı	Tiroid stimulan hormon (TSH) reseptör
Addison hastalığı	21- hidroksilaz
Goodpasture sendromu	Tip VI kollajen (glomeruler bazal membran)
Myastenia gravis	Asetil kolin reseptörü (AChR)
Multipl skleroz	Myelin proteinleri
Pernisiyöz anemi	İntrinsik faktör
Primer biliyer siroz	Piruvat dehidrojenaz, lamin B reseptör (LBR), nükleer por kompleks proteinleri (gp210)
Tip 1 otoimmün hepatit	F- actin
Tip 2 otoimmün hepatit	Sitokrom p450 (LKM-1: liver kidney microsomal-1), formimino transferaz siklodeaminaz (LC-1: liver cytosolic-1)
Tip 3 otoimmün hepatit	UGA- suppressor-serine-tRNA associated protein (SLA/LP: soluble liver antigen)
Crohn hastalığı	Pankreas asiner hücreleri, bazı bakteri peptitleri, maya hücre duvarında bulunan manan
Çölyak hastalığı	Doku transglutaminaz (dTG)
Nöromyelitis optika	Akuaporin -4
Pemfigus vulgaris	Desmoglein -3
Vitiligo	Melanosit spesifik tirozinaz, melanin konsantre edici hormon reseptörü (MCHR1),transkripsiyon faktör SOX10

Tablo 8: Sistemik otoimmün hastalıklar ve hastalık patogenezinde rol oynayan antijenler (6).

Sistemik otoimmün hastalık	İlişkili antijenler
Romatoid artrit (RA)	IgG molekülü Fc kısımları, sitrülünleşmiş siklik peptidler, U1-nRNP, histon, ssDNA
Sistemik lupus eritematozus (SLE)	dsDNA, histon, nükleozom, Sm, SS-A, SS-B, ribozomal P proteini
Sistemik skleroz (Skleroderma)	Topoizomeraz 1 (Scl-70), PM-Scl, fibrillarin, RNA polimeraz I,II,III, sentromer
Sjögren sendromu	SS-A, SS-B, ssDNA
Polimiyozit / Dermatomyozit	PM-Scl, Jo-1 (histidil tRNA sentaz), Mi-1, Mi-2 (DNA helikaz), SRP (signal recognition particle)
Miks bağ dokusu hastalığı	U1-nRNP, ssDNA

2.10.1. Romatolojik hastalıkların tanısında otoantikolarlar

Otoimmün yanıt ve hastalıkların en önemli tetikleyicisi enfeksiyona neden olan mikrobik antijenlerdir. Konakçı proteinleri ile mikrobik proteinlerin dizi benzerlikleri (moleküler benzerlik) otoimmün yanıtta ve hastalıkla neden olabilmektedir. Değişmiş konakçı proteinleri, protein mutasyonları, değişmiş protein oluşumları, proteinlerdeki posttranslasyonel modifikasyonlar, kovalent modifikasyonlar, proteinlerin enzimlerle işlenmesi, denatüre proteinler, apoptozis, proteasomlar, nukleosomlar otoimmün yanıtı tetikleyen diğer etkenlerdir. Otoimmün yanıtın bazı HLA alleli/allelleriyle birlikteliği otoimmüniteye yatkınlık açısından önemlidir. Ayrıca genetik açıdan, CTLA-4 (sitotoksik T lenfosit assosiyasyon antijen-4) geni, PTPN22 (protein tirozin fosfat nonreseptör tip 22), PDCD1, FCRL3, SUMO4, CD25, PAD14, SLC22A4, TNF- α ve FOXP3 gibi HLA dışındaki genlerle otoimmün hastalıkların birlikteliği rapor edilmiştir (48).

Otoimmün hastalıkların serolojik belirteci ise hücre içi ve dışı moleküllere karşı mevcut dolaşan otoantikolarlardır. Kendi moleküllerine karşı (öz antijenlere) reaksiyon veren antikorlar sağlıklı insanlarda da bulunabilir ve bunlar doğal antikorlar veya otoantikolar olarak tanımlanırlar (49).

2.10.1.1. Doğal antikorlar

Doğal antikorların büyük bölümü değişime uğramamış V(D)J genleriyle kodlanan IgM sınıfında, birbiriyle ilişkisiz antijenleri orta derecede affinite ile bağlayabilen polireaktif özelliktedirler. Doğal mono-reaktif antikorlar da mevcuttur. Doğal IgM antikorları hücrelerin, dokuların, bakteri ve virüslerin yüzeyindeki tekrarlayan antijenlere karşı yüksek bağlanma aviditesi gösterir. Bu antikorlar düşük titrelerde saptanabilirler, kompleman bağlamazlar ve hastalıklarla ilişkileri olduğu düşünülmektedir. Doğal antikorlar infeksiyonlara karşı ilk savunma hattıdır. Bakteriler, virüsler, mantarlar gibi dış kaynaklı antijenlere bağlanarak muhtemelen temizlik işlevi gördükleri gibi kendi antijenlerine karşı (örn. nükleik asitler, fosfolipidler, eritrositler, serum proteinleri, hücresel yapılar, insülin veya tiroglobulin gibi) oluşabilirler (50).

2.10.1.2. Patojenik otoantikorlar

Patojenik otoantikorlar, doğal antikordardan farklı olarak yüksek affiniteli ve somatik olarak mutasyona uğramış IgG sınıfındadırlar. Mutasyona uğramamış doğal otoantikorları kalıp olarak kullanan patojenik otoantikorlar somatik hipermutasyon ve sınıf değişimi sonucunda oluşabilirler. Patojenik otoantikorların üretimi öz antijenlere karşı toleransın bozulmasının önemli bir göstergesidir. İnsanlar üzerinde yapılan genetik çalışmalar, otoimmün hastalıkların, çevresel faktörlerin etkisiyle çok sayıdaki genetik değişimler sonucunda ortaya çıktığını göstermektedir (50) .

Fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu çok sayıda proteinin fonksiyon kaybı veya yetersizliği apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılmalarını olumsuz etkileyerek lupus benzeri hastalıklara yol açtığı gösterilmiştir (51,52).

2.11. Anti-nükleer antikorlar

Hücre içi antijenlere karşı anormal düzeyde otoantikorların mevcudiyeti sistemik bağ dokusu hastalıklarının önemli göstergelerindedir (53).

ANA'lar çoğunlukla sistemik otoimmün hastalıkların teshisinde kullanılır. ANA testlerinde hücre çekirdeğinin yanı sıra hücre sitoplazmasındaki bazı antijenlere karşı oluşan otoantikorları da saptamak mümkün olur. Hedef antijenler genelde; hücre yapısında bulunan çeşitli nükleoproteinler, enzimler, doğal ve denatüre olmuş DNA,

histonlar, RNA ve ribonükleer proteinler, çözülebilen hücresele reseptörler ve mitoz ile ilişkili proteinler olabilmektedir. Nükleer antijenik yapılara karşı oluşan otoantikolar genellikle immunglobulin G (IgG) sınıfı antikorlardır (54).

Hücrenin çekirdeğinde veya sitoplazmasında bulunan self antijenlere karşı oluşan otoantikolar, İndirekt İmmünfloresan (IFA) yöntemi ile tayin edilebilir. İndirekt İmmünfloresans testi ANA'ların rutin olarak tayininde ilk olarak tanımlandıkları 1954 yılından beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Testte hayvan (fare, sıçan, maymun gibi) karaciğer, böbrek, mide doku kesitleri substrat olarak kullanılmış olup günümüzde epitelyal kültür hücreleri (insan larenks karsinoma hücreleri, HEp-2 hücreleri, Amerikan doku koleksiyonu CCL-23) daha yaygın olarak kullanılmaktadır (53).

Substrat çok değişken olabilmekle birlikte, genelde insan epitelyum hücreleri-2000 (HEp-2) hücreleri kullanılmasının bir sebebi SLE ve Sjögren sendromunun tanısında yüksek duyarlılık elde edilmesidir (55).

Bu hücreler düz cam yüzeylerde gelişebilir ve fikse edildiklerinde antikorların hücrelerin içine girmeleri mümkün olur. Hücre siklusunun değişik aşamalarında eksprese olan antijenlere karşı antikorlar doku substratlarında saptanamazken kültür hücrelerinde tespit edilebilirler. HEp-2 hücrelerinin fiksasyon işlemleri bazı antikorların saptanmasını güçleştirebilir. SSA/Ro antijeni asetonla daha iyi fikse edilebilirken, etanol veya metanolla fiksasyonunda SSA iyi fikse edilemez ve ANA negatif bulunmasına rağmen EIA veya immünblot yöntemlerinde SSA pozitif bulunabilir (53).

ANA IFA yönteminde nükleus ve sitoplazmik otoantikolar, sayısı otuza yakın farklı boyanma modeli gösterir. ANA'lar genelde, hücre çekirdeğinde bulunan protein ve nükleik asitleri hedef almaktadır (56).

Cam yüzeylere yapılan hücre fiksasyonunu takiben inkübasyon sırasında otoantikoların hücre içine girmeleri mümkün olur. Cam yüzeye fiske edilmiş substrat üzerine dilüe edilmiş test serumu eklenir ve inkübasyona süresi boyunca, substrat üzerindeki antijenler ile serum içindeki otoantikoların bağlanması sağlanır. 'Fluorescein IsoThioCyanate (FITC)' ile konjuge ikinci bir antikor (IgG, IgA, IgM gibi) olan konjugat ile bu bağlanma floresan mikroskopta görünür hale getirilir ve değerlendirilir. İndirekt immün floresan boyanma modelleri, değişik antikorların mevcudiyetini

göstermektedir. Örneğin; Homojen boyanma tipi; histon, çift zincirli DNA (dsDNA) ve/veya nükleosomlara karşı otoantikorların varlığını gösterir. İndirekt immün floresan çalışmalarında belli boyanma şekilleri oluşturan bazı antikorlar, sistemik otoimmünopatilerin karakteristik özelliğidir. Birçok durumda bu otoantikorlar, onlarla ilişkili hastalıklar için ön bir klasifikasyon sağlarlar (49, 57).

ANA tarama testi EIA ile de çalışılabilir ancak testte kullanılan antijenlerin farklılıkları, standardizasyonun olmaması, düşük aviditeli antikorlar nedeniyle yanlış pozitiflikler testin değerlendirilmesini güçleştirir. ANA (IFA) yönteminde nükleus ve stoplazmik otoantikor pozitiflikleri sayısı otuza yakın farklı boyanma modeli gösterirler (2). Romatolojik hastalıklarda ANA pozitiflik oranları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9: Pozitif ANA sonucunun tanı koydurucu etkisi ve görülme sıklığı (6).

ANA tanıda çok yararlı	ANA pozitiflik (%)
Sistemik lupus eritematozus	90-95
Sistemik skleroz	85-95
Primer biliyer siroz	50-80
ANA tanıda belli ölçüde yararlı	
Polimiyozit / dermatomiyozit	30-70
Sjögren sendromu	50-70
ANA kritik tanı kriterleri arasında	
İlaca bağlı lupus	70-90
Miks bağ dokusu hastalığı	90-100
Otoimmün hepatit	40-80
ANA hastalık izlemi ve prognozda çok yararlı	
Juvenil kronik artrit	50-60
Raynaud fenomeni	20-40
ANA’ nın hastalık tanısı, izlemi veya prognozda rolü yok veya henüz kanıtlanmamış	
Romatoid artrit	15-30
Multipl skleroz	20-30
Otoimmün tiroid hastalıkları	10-20
Enfeksiyon hastalıkları	20-40
İdiyopatik trombositopenik purpura	10-30
Fibromiyalji	20-30
Kanser ve paraneoplastik sendromlar	20-50
Sağlıklı bireyler	
1/40	20-30
1/80	10
1/160	5
1/320	2

2.12. ANA saptanmasında IFA, immüno blot testleri ve standardizasyon

Otoimmün hastalıkların laboratuvar tanısında otoantikorlar yol gösterici olan en önemli belirteçlerdir. Bu amaçla rutin laboratuvarlarda yaygın olarak IFA ve ELISA yöntemleri kullanılır (6).

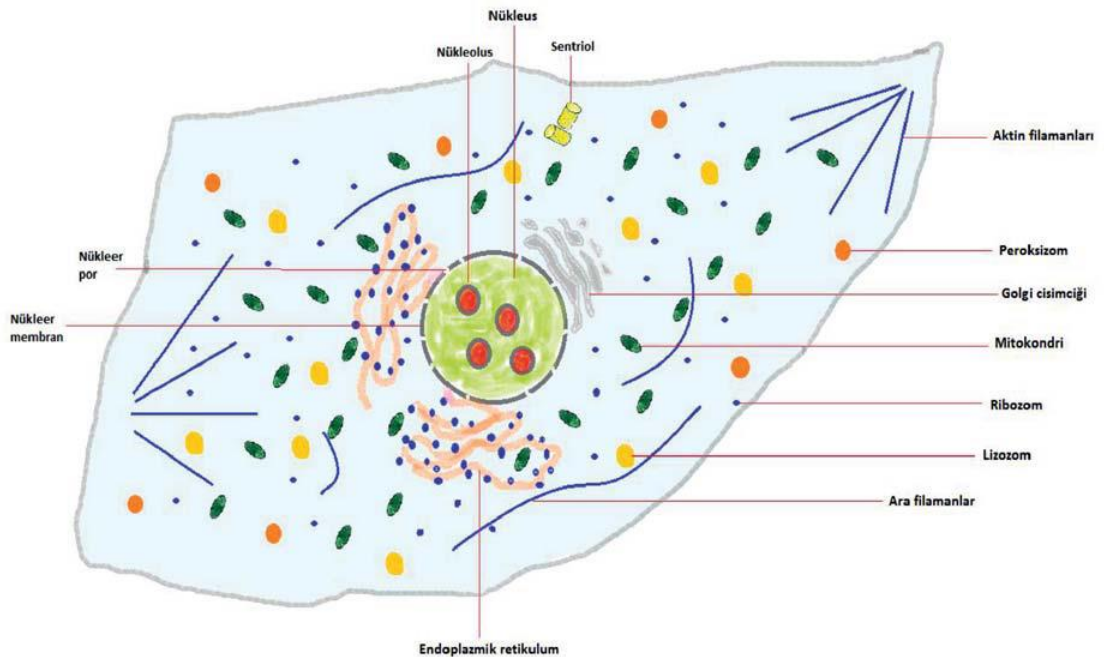
2.12.1. İndirekt floresan antikor yöntemi (IFA)

IFA yöntemi katı faz olarak hücre veya doku kesitlerinin kullanıldığı ve hasta serumunda özgül antikorların araştırıldığı in-vitro tanı yöntemidir. ANA saptanmasında en sık başvurulan yöntemdir. Yöntem hasta serumunda bulunan antikorun antijene bağlanması esasına dayanır. Bu yöntemde katı faz olarak slayt(lam) kullanılmakta olup, bu slaytlara çeşitli hücre veya dokular fikse edilmiştir. Ticari olarak hazırlanan bu slaytlar üzerine hasta serumu damlatılır ve üretici firmanın kendi önerileri doğrultusunda inkübe edilir. Tampon solüsyonla yıkamayı takiben FITC (fluorescein isothiocyanate) işaretli anti-insan antikoruna (konjugat) eklenir ve tekrar inkübasyon ve yıkama yapılır. Takiben slayt üzerine gliserol damlatılarak lamelle kapatılır ve floresan mikroskop altında değerlendirme yapılır. ANA IFA yönteminde kullanılan hücre ve dokular: ANA IFA yönteminde altın standart olarak önerilen HEp-2 hücreleri insan larinks epitelyal karsinom hücreleridir. HEp-2 hücreleri her seride benzer özellikte olduğundan ANA saptanmasında diğer dokulara göre daha standart bir substrat sağlamaktadır. HEp-2 hücre serilerinde SS-A antijeni genellikle düşük düzeyde eksprese olduğundan 'yalancı negatif' sonuçlarla karşılaşılabilir. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için HEp-2 hücrelerinin SS-A antijeni ile transfekte edildiği HEp-2000 hücre serisi geliştirilmiştir. HEp-2 hücrelerinin IFA yöntemiyle değerlendirilmesi hücrenin nükleer, sitoplazmik ve mitotik yapılarına karşı gelişebilen otoantikorların saptanmasına olanak sağlamaktadır. Bazı paternlerin ayrımı için ek dokulara da gereksinim olabilir. Örneğin maymun karaciğeri dokusu özellikle nükleer membran antikorları varlığını belirlemede, nükleer dot-sentromer paternlerini ayırt etmede fayda sağlamaktadır. Bu amaçla şüpheli durumlarda HEp-2 hücreleri ile birlikte karaciğer dokusunun sağlandığı kitler veya karaciğer dokusunun ayrı sağlandığı kitler kullanılabilir. HEp-2 hücre serilerinin ANA saptanmasında avantajları: HEp-2 hücre serilerinde çekirdeklerin büyük olması, hücre yapılarının kolay görülebilirliği, homojen ve tek tabaka hücre topluluğu sağlanması, hücre döngüsünün tüm evrelerinde ait antijenlerin ifadenmesi (100'den fazla otoantijeni yakalama olanağı), yeni

otoantikoların keşfedilmesine olanak sağlanması gibi avantajları vardır. HEp-2 hücre serilerinin ANA saptanmasında dezavantajları: HEp-2 hücre serisi kullanımına bağlı olarak anti-SSA, anti-tRNA sentetaz (Jo-1) ve anti ribozomal P (anti-Rib-P) antikolarının saptanmasında sorunlar yaşanabilir. Bu antijenler HEp-2 hücrelerinde çok düşük düzeyde ifadelendiğinden veya dokularda fiksasyon işlemleri sırasında denatüre olabildiğinden ‘yalancı negatiflik’ görülebilir. Bu nedenle en uygun olan HEp-2 hücre serileri aseton ile fiske edilmiş hücrelerdir; etanol veya metanol ile fiksasyon SS-A antijen kaybına neden olabilir. ANA HEp-2 hücrelerini kullanan laboratuvarlar anti-SSA varlığını mutlaka ek testlerle araştırmalıdır. HEp-2 hücrelerinde yaşanan bu sorunun kısmen üstesinden gelebilmek için SS-A/Ro60 antijenini yüksek düzeyde eksprese eden HEp-2000 hücre kullanılabilir (6).

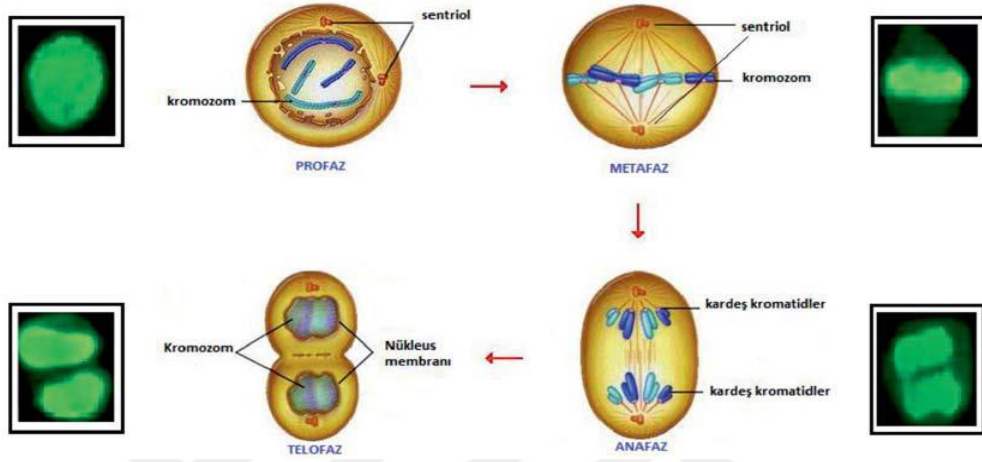
2.12.2. ANA IFA’ da mikroskopik değerlendirme

ANA IFA değerlendirmesinde kullanılan HEp-2 hücresi ve içinde bulunan ve farklı boyama paternlerine neden olabilen bazı yapılar Şekil 1’de şematize edilmiştir.



Şekil 1: HEp-2 hücresi ince yapısı (6).

ANA IFA testinin mikroskopik değerlendirmesi sırasında hasta serumunda hücre döngüsünün farklı evrelerinde açığa çıkan antijenlere karşı oluşan antikorları saptamak mümkündür. Detaylı ve doğru bir ANA IFA değerlendirmesi yapabilmek için hücre döngüsü evrelerinin bilinmesi gerekmektedir. Hücre döngüsü evreleri ve bu evrelerde görülebilen pozitif kromozom bantları Şekil 2’de gösterilmiştir (6).



Şekil 2: Mitoz bölünme evreleri ve bu evrelerde görülen pozitif kromozom bantları (6).

Hücre döngüsü evrelerinde gerçekleşen olaylar ;

İnterfaz : Bölünmeye hazırlık evresidir. ATP sentezi hızlanır, organel ve protein miktarı artar, DNA kendisini eşler.

Profaz : Kromatit iplikler kromozom halini alır, sentriyoller zıt kutuplara doğru gider, iğ iplikleri oluşmaya başlar.

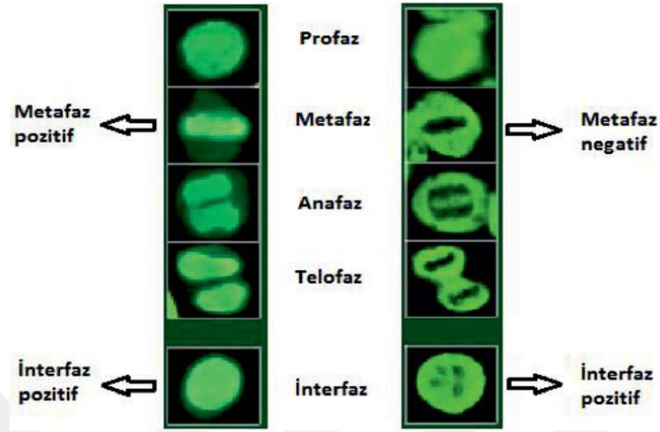
Metafaz: Kromozomlar hücrenin ekvator düzlemine dizilir.

Anafaz : Her kromozomdaki kardeş kromatitler zıt kutuplara doğru çekilir, iğ iplikleri ortada belirleşmiş.

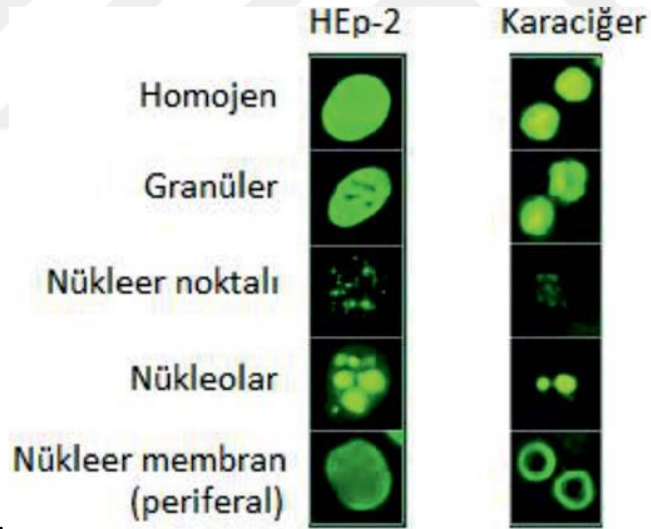
Telofaz: Çekirdek zarı oluşur, çekirdekçik ortaya çıkar, kromozomlar yeniden kromatin ipliğine dönüşür. İğ ipliği dönüşür. İğ iplikleri kaybolur, sitoplazma bölünmesi başlar.

ANA IFA incelemesinde özellikle interfaz ve metafaz aşamasındaki hücre boyanma paternleri dikkatle incelenmelidir (Şekil 3). İnterfaz aşaması hücre metabolizmasının en hızlı ve antijen ekspresyonunun en fazla olduğu evre olduğundan çok farklı antijenler

açığa çıkabilir. Metafaz aşamasında başta nükleusun homojen ve benekli paternleri olmak üzere pek çok paterni ayırt etmede dikkatle incelenmesi gereken bir diğer evredir. ANA IFA değerlendirmesinde özellikle interfaz ve metafaz aşamasındaki hücre boyanma paternleri dikkatle incelenmelidir (6).



Şekil 3: İnterfaz evresinde ve mitozun farklı evrelerinde görülen kromozom alanlarına örnekler (6)



Şekil 4: HEp-2 ve karaciğer hücrelerindeki nükleuslarda interfaz evresinde görülen boyanma türlerine örnekler (6).

Tablo 10: Sık saptanan ANA IFA paternleri ve ilgili antijenler (6).

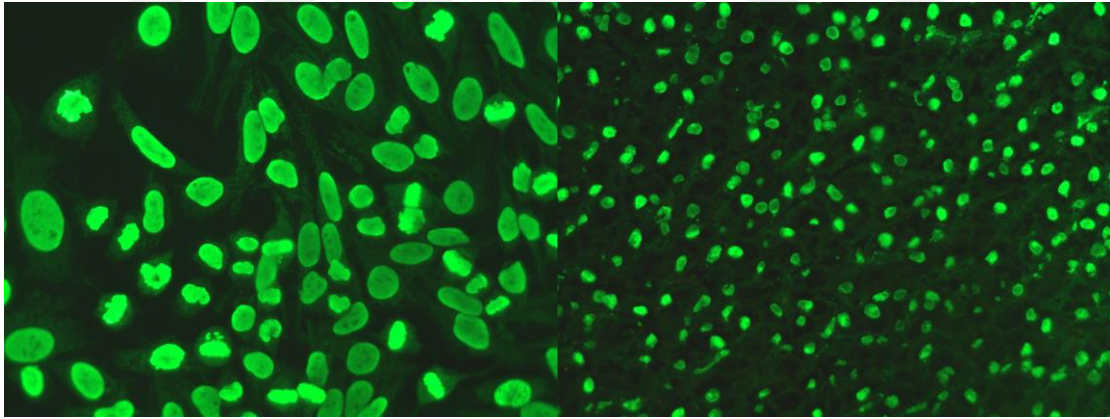
ANA paternleri	İlgili antijenler
<u>Nükleer paternler</u>	
Homojen	dsDNA, histon, kromatin/nükleozom
Kaba benekli	U1RNP, Sm(U2-nRNP), RNA polimeraz III
İnce benekli	SS-A, SS-B, Mi-2, Ku, RNA helikaz A, topoizomeraz I, TIF1, TIF1 β
Yoğun ince benekli (DFS)	DFS-70 /LEDGF-P75
Nükleolar	PM/Sc1-75, PM/Sc1-100, To/Th, Sc1-70, nükleofosmin, nükleolin, fibrillarin (U3-nRNP), RNA polimeraz I, NOR-90
Sentromer	Sentromer – A/B (C)
Çoklu nükleer noktalanma	Sp -100, PML proteinleri, MJ/ NXP-2
Az nükleer noktalı	P80- coilin, SMN
Nükleer membran/ periferal	Lamin A,B,C, gp210, nükleoporin p62, nükleer por kompleks antijenleri
Sentrozom /sentrion	Enolaz , ninein,perisentrin
Mitotik spindle (MSA)	NuMA/ sentrofilin
<u>Sitoplazmik paternler</u>	
Yoğun ince benekli	Ribozomal P proteinleri, PL-7, PL-12
Benekli	Jo-1/histidil-tRNA sentetaz, Signal recognition protein (SRP)
Retiküler (mitokondri benzeri)	Piruvat dehidrogenaz- E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2
Golgi kompleksi	Golgi proteinleri
Fibriller	Aktin, sitokeratin, vimentin, tropomiyozin, α -aktinin, vinkülin

Mikroskopik incelemede önce X10 veya X20 büyütme ile pozitiflik ve negatiflik yönünde değerlendirme yapılır. Daha sonra pozitif örnekler 40-60X büyütme ile floresan boyanma paterni açısından incelenir. ANA IFA slaytlarında paternler; nükleer, sitoplazmik ve mitotik paternler olarak ayrı ayrı incelenmeli ve rapor edilmelidir. Mikroskopik değerlendirme subjektif olduğundan, laboratuvarlar arası ve laboratuvarlar içi standardizasyonu sağlamak zordur. Ancak iyi tanımlanmış klinik örneklerle veya standart serumlarla yapılan değerlendirmeler yorumun daha objektif olmasını sağlayabilir. Özellikle floresan şiddeti yorumunda önemli olan bir etken de floresan mikroskopunun ışık şiddeti ve ömrüdür. Foton kaynağı olarak cıvalı lambaların kullanıldığı mikroskoplarda kullanım süresi arttıkça ışık şiddeti azalmakta ve daha

düşük titrelerin rapor edilmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle civalı lambaların 100-200 saat sonunda değiştirilmesi ve doğru olarak konumlanması önerilmektedir. LED ışık kaynaklı olan floresan mikroskoplar ise ısınma problemi ve ışık şiddetinin zamanla azalması sorunu bulunmadığından daha güvenilirdir. Ayrıca LED lambalarda lamba odak ayarları da bozulmamaktadır (6).

2.12.2.1. Homojen boyanma

Homojen nükleer boyanma modeli, histon, dsDNA ve/veya nükleosomlara (histon-DNA kompleksi) karşı otoantikorların varlığını gösterir. HEp-2 hücrelerinde bölünen hücrelerin kromatinleri yoğun, istirahat halindeki hücrelerin nükleusu uniform tarzda boyanır. İstirahat halindeki ve mitotik hücrelerin nükleus çevresi daha yoğun boyanmasına periferik (rim) boyanma modeli olarak adlandırılır, dsDNA'ya karşı antikorların varlığını gösterir ve SLE'de gözlenebilir. Bu tür boyanma gösteren örneklerin ileri dilüsyonunda sadece homojen boyanma izlenir. Homojen boyanma modeli SLE, ilaç ilişkili lupus (procainamide, hidralazine), romatoid artrit, juvenile kronik artrit ve sistemik skleroz gibi hastalıklarda tesbit edilebilir (53).



A. HEp-2 hücresi(x40)

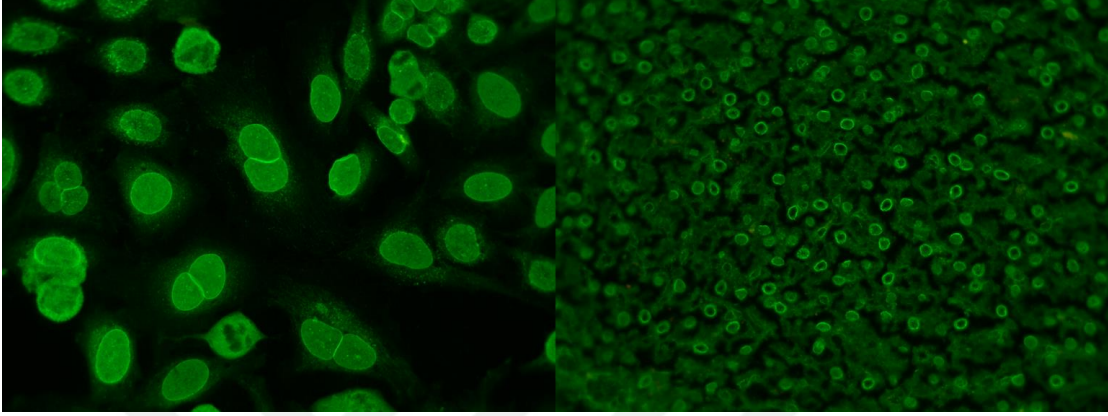
B. Maymun karaciğer hücresi(x40)

Resim 1: Homojen patern (Çalışmamızdan)

2.11.2.2. Nükleer membran boyanma

Nükleer membran tipi boyanmada otoantikorlar, nükleer membrandaki laminlere (A,B1,B2,C), gp210 gibi nükleer pore kompleks integral proteinlerine, laminle birlikte bulunan proteinlere (LAP 1A, LAP 2) karşıdır. Bu boyanma modeli HEp-2 hücrelerinin nükleusunda homojen halka benzeri veya noktalı tarzda membran boyanması şeklinde

olabilir, mitotik hücrelerin kromatini boyanmamıştır, istirahat halindeki hücrelerin nükleusu homojene benzer şekilde boyanır. Bu boyanma modeli primat karaciğer, böbrek gibi dokularda hücre nükleus periferinde daha kolay fark edilebilen bir boyanma gösterir. Kronik hepatit, vaskülitler, trombositopeni ve SLE gibi miks tip kronik otoimmün hastalıklarda tesbit edilirler (2, 53).



A. HEp-2 hücresi(x40)

B. Maymun karaciğer hücresi(x40)

Resim 2: Nükleer membran patern (Çalışmamızdan)

2.12.2.3. Granüler (Benekli) boyanma

Granüler tarzda boyanma histon haricindeki çok sayıdaki antijenlere karşı otoantikörlerin mevcudiyetini gösterir. Birbirinden farklı benekli boyanma modelleri farklı antijenlere bağlanmayla ortaya çıkar. Beneklerin şekli ve büyüklüğü büyükten çok küçüğe doğru sıralanırken şekilleri düzgün veya çok düzensiz olabilir (53).

2.12.2.4. Büyük benekli (nükleer matriks) boyanma

Bu boyanma modelinde, istirahat halindeki hücre nükleusları değişken büyük benekli tarzda boyanma gösterirken, mitotik hücrelerde kromozomlar boyanmamıştır ve otoantikörler başlıca heterojen nükleer ribonükleoproteinlere (hnRNP) karşı olabilir, SLE, RA ve MCTD gibi hastalıklarda (hnRNP-A1,A2,B2) ve sklerodermada (hnRNP-C1,C2 ve I) gözlenir (53).

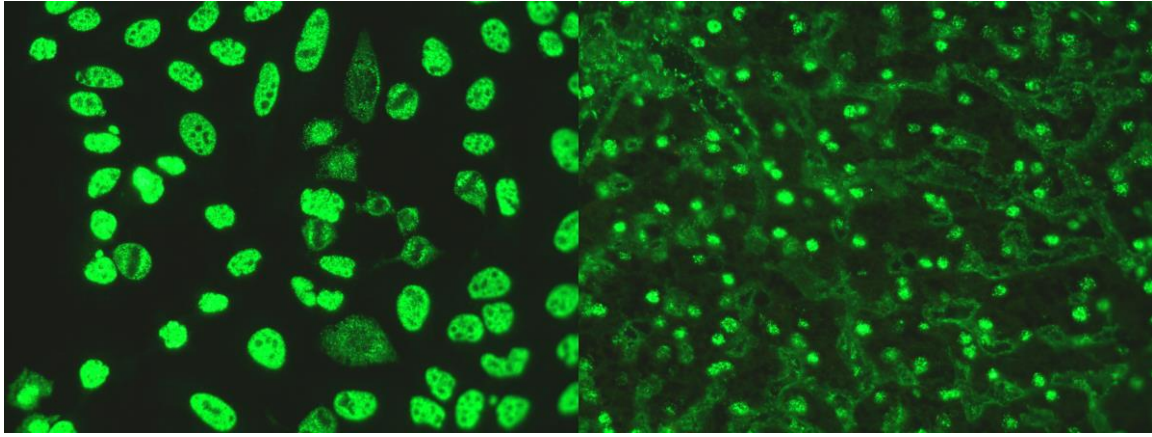
2.12.2.5. Kaba benekli boyanma

Sm ve U1-snRNP 'e karşı otoantikör varsa gözlenen bir boyanma modeli olup, istirahat halindeki hücrelerde yoğun ve orta büyüklükte benekli boyanma izlenirken, mitotik

hücrelerdeki kromozomlarda boyanma yoktur ve MCTD ve SLE’de tesbit edilebilirler. Antijenler küçük nükleer ribonükleoproteinleri (snRNP) içerir (53).

2.12.2.6. İnce Benekli boyanma

İstirahat halindeki hücrelerin nükleusunda bazen kumlu ve hemen hemen homojene benzeyen ince benekli tarzda floresans gözlenirken kromozom ve nükleoluslarda boyanma izlenmez. Bu boyanmada antikorlar SSA (Ro), SSB (La), RNA polimeraz II ve III, Ku, Ki ve Mi-2 ye karşı olabilir; SLE, Sjögren sendromu, skleroderma, myozit ve MCTD gibi hastalıklarda gözlenir (53).



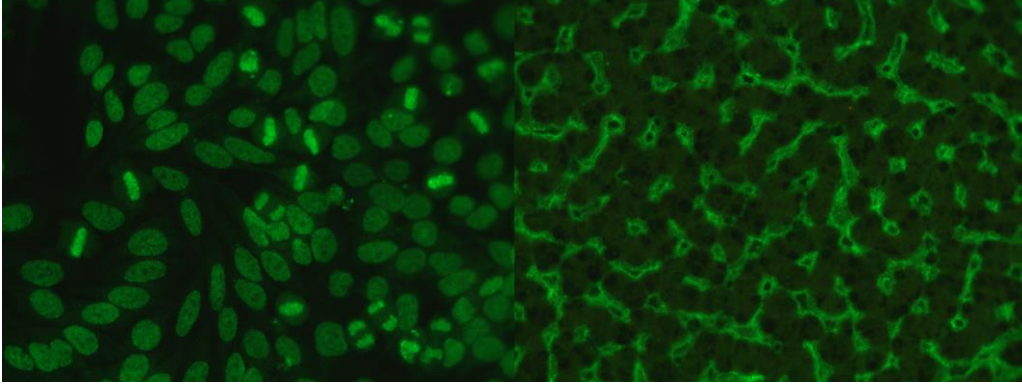
A. HEp-2 hücresi(x40)

B. Maymun karaciğer hücresi(x40)

Resim 3: Granüler (benekli) patern (Çalışmamızdan)

2.12.2.7. Granüler + granüler kromozom (Yoğun İnce Benekli-DFS-70)

Bu boyanma modelinde nükleoplazma yoğun ince benekli tarzda boyanırken benzer benekler mitotik hücrelerin kromozomlarında da gözlenir. Antikor, 75-kd’luk lens epitelyum kaynaklı büyüme faktörüne (LEDGF) karşı olup, sağlıklı kişiler, alopesi areatalı ve atopik dermatitli hastalarda görülebilmektedir (58,59,60,61).



A. HEp-2 hücresi(x40)

B. Maymun karaciğer hücresi(x40)

Resim 4: Granüler + granüler kromozom (Yoğun İnce Benekli-DFS-70) paterni (Çalışmamızdan)

Anti-DFS-70 otoantikorunun oluşturduğu boyanma modeli, ANA IFA tarama testi ile saptanabilmektedir. Boyanma şekli, mitotik hücrelerin kromozomunun ve interfazdaki nükleusun yoğun ince benekli boyanma göstermesi ile karakterizedir. Metafaz aşamasındaki ince benekli kromozom boyanması, granüler +granüler kromozom paternini belirgin bir şekilde homojen ve yoğun ince benekli boyanma tipinden ayırır (58).

Anti-DFS-70, LEDGF (Lens Epithelium-derived growth factor) ve transkripsiyon koaktivatör p75 olarak da adlandırılan, önemli biyolojik fonksiyonları olan, rutin ANA IFA taramasında sıkça saptanan ama aynı zamanda kesin olarak otoimmün hastalıklarla ilişkisi bilinmeyen bir otoantikor olarak tanımlanabilir (56).

DFS-70 pozitif hasta serumları ile yaptıkları blot çalışmalarında, DFS-70 antijeninin moleküler ağırlığının yaklaşık 70 -75 kDa olduğunu ileri sürülmektedir. İmmunblot sonuçlarında 75 kDa civarında band oluşumunu gözlemlenmiştir (66, 67).

LEDGF/DFS 70 proteininden; transkripsiyon aktivatörü, HIV-1 transporter ve strese karşı hücre direncini arttırıcı yani hücrenin hayatını kurtarıcı olarak da bahsedilmektedir (61).

Anti-DFS-70 otoantikorunun (LEDGF otoantikoru) hedef antijeni için farklı bir hipotez daha öne sürülmüştür. Yapılan bir araştırmada cevabı aranan soru; normal öz antijenlerin nasıl oluyorda immünojenik özellik kazanıp, kendilerine otoantikor cevabı oluşmasını sağladıkları ve bunu takiben otoimmün hastalıklar oluşmasına neden

olduklarıdır. Hipoteze göre, hücrelerin ölümü sırasında, hücrenin kendi otoantijenleri modifiye olarak, immünojenik özellik kazanmaktadır. Hücre ölümü sırasında (apoptoz, primer nekroz veya sekonder nekroz) hücre içi öz antijenler fragmanlara ayrılmakta ve bu fragmanlar normal fonksiyonlarını kaybederek, patojenik özellik kazanmaktadır. Hipoteze göre, memeli hücrelerinin büyümesini destekleyen ve hücrenin 'yaşamını devam ettirmesini' sağlayan bir otoantijen olan LEDGF/p75 de apoptoz sırasında kaspaz3 ve kaspaz7 enzimleri fragmanlarına ayrılmakta (p65 ve p58 fragmanları) ve normalde hücre ölümü sırasında oluşan strese karşı hücreleri korurken, oluşturduğu fragmanlarla tam ters etki yapmaktadır. Diğer bir deyişle, LEDGF/p75, apoptoz sırasında fragmanlarına ayrıldığında, oluşan fragmanlar, apoptozu arttırıcı özellik kazanmakta yada dentrik hücreleri tarafından lenfositlere sunulularak bu fragmanlara ve LEDGF/p75'e karşı otoantikör oluşumuna neden olmaktadır (68).

DFS-70/LEDGF/p75 antijeninin, prostat tümör dokularında fazla miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (66).

Atopik Dermatit (AD)'li hastalardaki Anti-DFS-70 oranını %30 olarak verilmiştir. AD'li hastalarda, LEDGF/DFS 70 antijeninin, nükleer bir öz antijen olduğunu ve keratohiyalin granüllerinde fonksiyonel bir rolü olduğu fikri de ortaya atılmıştır. Anti-DFS-70 otoantikörünün, AD hastalarının, yaklaşık %30'un da bulunması, bu otoantikörün, AD'li hastalarda baskın bir otoantikör olduğunu düşündürmüştür (61).

DFS-70 antikörünün erkeklere göre kadınlarda daha sık rastlandığı görülmüştür. Cinsiyet farklılığında, salgılanan hormonların bu duruma etkisinin olduğu düşünülmektedir. Antijenik yapının lokalizasyonundan daha önemli olan nokta ise bu antijene karşı oluşan otoantikörün klinik önem taşıyıp taşımadığıdır. Anti DFS-70 otoantikörünün doğal bir otoantikör olduğu ve sağlıklı bireylerde hiçbir antijen uyarımı olmaksızın bulunduğu da ileri sürülmüştür. Ayrıca DFS-70 antijeninin timusta, diğer dokulardan fazla eksprese edildiğini de belirtmişlerdir (69).

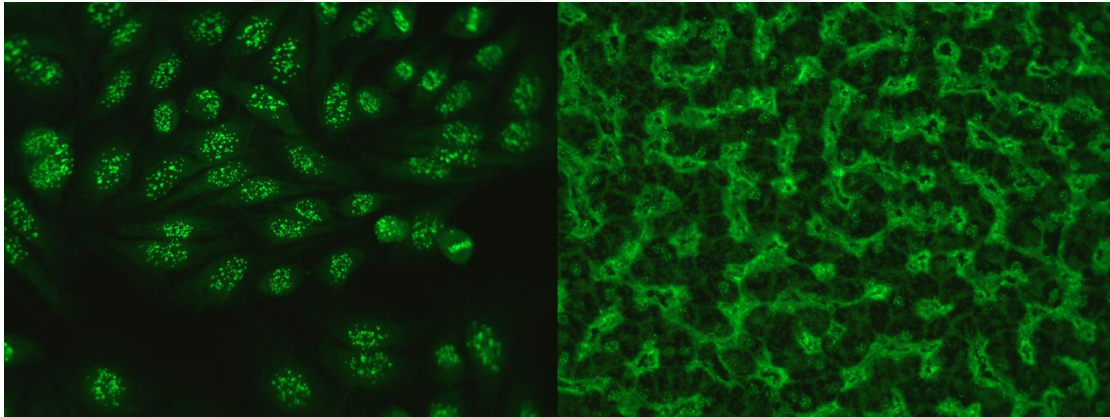
2.12.2.8. Çok biçimli benekli (polimorfik) (PCNA) boyanma

Bu boyanma şeklinde, Go veya G1 fazı negatif, homojen veya benekli tarzda, DNA sentezine bağlı olarak S fazındaki hücrelerin nükleoplazmalarında inceden kaba benekliye değişen şekillerde boyanma gözlenir. Hücrelerin %30-%60'ında nükleus

boyaması vardır. Anti-CENP-F antikoru bu boyanma modelinden profaz ve metafazdaki sentromer boyanmasıyla ayırt edilebilir. DNA replikasyon ve tamirinde görev alan siklin olarak da bilinen DNA polimeraz δ destek proteine karşıdır. SLE'de %3-6 oranında olmak üzere kronik B ve C hepatitli hastalarda tesbit edilebilirler (2,53).

2.12.2.9. Sentromer boyanma

Sentromer boyanma modelinde istirahat halindeki HEp-2 hücrelerinin nükleuslarında 40-60 arasında benek, mitotik hücrelerin kromatini belirgin benekli tarzda boyanır. Bu antikolar CENP- B, CENP- A, CENP- C ve daha nadir olarak CENP- D ye karşıdır. CENP-F antikoları bu boyanma şeklini göstermezler. Sentromer boyama şekli sınırlı kütanöz sistemik skleroz (CREST sendromu), primer biliyer siroz, Raynaud's fenomeninde saptanabilir (2,53).



A. HEp-2 hücresi(x40)

B. Maymun karaciğer hücresi(x40)

Resim 5: Sentromer paterni (Çalışmamızdan)

2.12.2.10. Nükleer az nokta (p80-coilin) boyanma

Bu boyanma modelinde istirahat halindeki HEp-2 hücrelerinin nükleoplazmalarında 80 kD'luk bir protein olup Cajal cisimciği (Coiled body) olarak bilinen yapılara karşı otoantikoları gösteren en fazla 6 adet nokta (ortalama 2-3 nokta) şeklinde boyanma gözlenir ve Sjögren sendromunda, diğer inflamatuvar hastalıklar, primer biliyer siroz, kronik aktif hepatit ve sağlıklı bireylerde görülebilir (2,53).

2.12.2.11. Nükleer nokta (Sp100) boyanma

Nükleer nokta boyanma modelinde istirahat halindeki HEp-2 hücrelerinin nükleoplazmalarında, boyutları değişken olabilen hücre başına ortalama 10 nokta (en fazla 20 nokta) şeklinde boyanma gösterirler, mitotik hücre kromatinleri boyanmaz. Otoantikorlar Sp100 nükleer antijenine, promyelocytic leukemia proteinine (PML) ve NDP53'e karşı olup, sıklıkla primer biliyer sirozlu hastalarda (%30), Sjögren sendromunda, SLE ve diğer kronik inflamatuvar bağ dokusu hastalıklarında tesbit edilebilirler (53).

2.12.2.12. Nükleolar boyanma

Bu boyanma modelinde mitoz aşamasındaki HEp-2 hücrelerinin nükleuslarında kromatinler boyanmamış, boyanmış veya az sayıda benekli tarzda boyanmış iken nükleoluslar boyanmıştır (53).

2.12.2.13. Nükleolar homojen boyanma

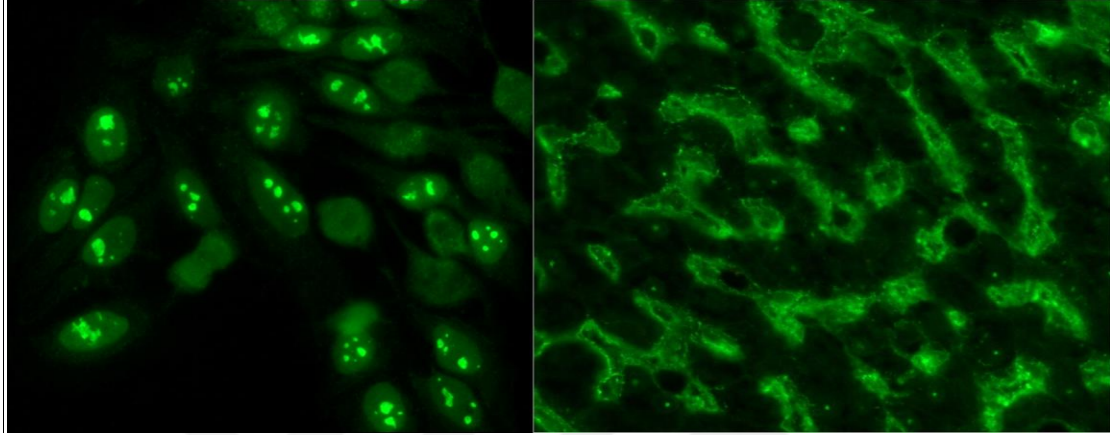
Bu boyanma modelinde nükleolusun homojen, nükleoplazmanın zayıf homojen veya benekli boyandığı durumlarda antikör PM-Scl kompleksine karşı olabilir ve başlıca myositis-skleroderma overlap sendromunda ve daha az sistemik skleroz ve myozitis de tesbit edilirler. Bu boyanma şekli anti-Th/To antikörleri olarak bilinir ve 40kDa'luk iki küçük ribonükleoproteine karşı oluştuğunda gözlenebilirler. Th/To antikörleri sistemik sklerosisde, SLE, polimiyozitis ve romatoid artritte saptanabilir (2,53).

2.12.2.14. Nükleolar küme (clumpy) boyanma

İstirahat halindeki hücrelerin nükleolusunda sıklıkla büyüklüğü ve şekli değişken küme (clumpy) tarzında boyanma, bölünen hücre kromatininde boyanabildiği durumlarda genellikle fibrillarine (U3snoRNP yi de ihtiva eden küçük nükleolar ribonükleoproteininin 34 kDa luk protein alt ünitesi (snoRNP) karşı antikörlerin bulunduğunu gösterir ve sistemik skleroz için yüksek spesifiktir (bu hastaların %5'inde) ve pulmoner hipertansiyonda görülür (2,53).

2.12.2.15. Nükleolar benekli boyanma

İstirahat halindeki hücrelerin nükleoluslarında benekli tarzda nükleolar boyanma, nükleoplazmada ince benekli boyanma, sistemik skleroz için yüksek spesifiklikte olmakla birlikte SLE, RA ve MCTD’de de gözlenen RNA polimeraz I (RNAP I) kompleksine karşı antikorları gösterebilir (2,53).



A. HEp-2 hücresi(x40)

B. Maymun karaciğer hücresi(x40)

Resim 6: Nükleolar paterni (Çalışmamızdan)

2.12.2.16. Sitoplazmik boyanma

ANA (IFA) testlerinde uzun süre göz ardı edilmiş veya negatif olarak değerlendirilmiştir. Ancak günümüzde “anti nükleer antikorları” hücre nükleus ve stoplazmasında bulunan antijenlere karşı oluşan “otoantikorlar” olarak tanımlamak daha doğru bir yaklaşımdır. Çünkü bütün otoantijenler hücrenin sadece bir bölümünde bulunmayabilirler, fonksiyonları ve değişik hücre bölümlerindeki derişimleri hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (53).

2.12.2.17. Sitoplazmik ince benekli boyanma

Nükleus çevresinden başlayarak hücre periferine doğru yayılır, antikorlar aminoaçil-tRNA sentetazlara (Jo-1, PL7, PL12) karşı olup idyopatik (otoimmün) myozitis (polimyoziit/dermatomyozit, overlap sendromunda myozitis, yumuşak bağ dokusu hastalıkları) için diyagnostik belirteçtir. Anti-Jo1 (histidil tRNA sentetaz) ve anti-EJ (glisil-tRNA sentetaz) antikorları klinik miyozit gelişmeden 5 ay önceden tesbit edilebilmektedirler (62,63).

2.12.2.18. Sitoplazmik büyük benekli boyanma

Stoplazmaya yayılmış olup lisosomlar ve endosom gibi organellere karşı otoantikörleri gösteririr.

2.12.2.19. Sitoplazmik kaba benekli ipliksi (mitokondri) boyanma

Boyanma, çoğunlukla M2'ye karşı gözlenir ve primer biliyer karaciğer sirozu (%95'inde antikör M2'ye karşı), diğer kronik karaciğer hastalıkları, SLE ve sistemik siklerozda görülebilirler (64).

2.12.2.20. Sitoplazmik homojen (ribozomal) boyanma

Boyanma modelinde çekirdek çevresinde kuvvetli homojenden ince benekliye diffüz boyanmanın yanı sıra ribozom sentezinin merkezi olan nükleolusta da boyanma gözlenir. Mitotik hücre kromatini negatiftir. Otoantikörler ribozomal P fosfoproteinlerden P0 (38 kDa), P1 (19 kDa) ve P2 (17 kDa) ye karşı ve diğer antijen hedefleri 28S tRNA, S10, Ja, L12, ve L5/5S'ye karşı oluşurlar. Bazen dsDNA antikörlerinin yokluğunda SLE'li hastaların %10-20'sinde tesbit edilebilirler (49,53).

2.12.2.21. Sitoplazmik sitoskeleton boyanma

Stoplazmada fibriller tarzda aktin, sitokeratin ve vimentin gibi bileşenlere karşı otoantikör pozitifliklerinde görülür. Aktine karşı otoantikörler (düz kas antikörleri) otoimmün hepatitlerde saptanır (49,53).

2.12.2.22. Sitoplazmik golgi boyanma

HEp-2 hücre stoplazmasında nükleusunun sadece bir tarafına yakın, büyüklükleri farklı olabilen benekli tarzda boyanmalar golgi kompleksi; golgin-67, golgin-95 (GM130), golgin 97, golgin-160, golgin-245(p230) ve macrogolgin/giantin'e karşı otoantikörlerin varlığını gösterir; SLE, Sjögren sendromu ve diğer kronik romatolojik hastalıklarda saptanabilir (49,53).

2.12.2.23. Sentiol boyanma

Bu modelde istirahat halindeki hücrelerin stoplazmalarında 1 veya 2 nokta, mitotik hücrelerin iğ mihver kutuplarında 2 nokta şeklinde boyanma, birçok sentrosomal antijene karşı; heat shock protein glycolytic spesifik enolas (48 kDa, gg isoform), PCM-1 (228 kDa), Pericentrin (220 kDa) karşı otoantikörleri gösterir. Bu nadir boyanma şekli Raynaud fenomeniyle birlikte skleroderma, CREST ve Sjögren sendromu ve diğer otoimmün hastalıklarda saptanabilir (53).

2.12.2.24. NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus, MSA-1 [Mitotic Spindle Apparatus] boyanma

Bu boyanma modelinde metafaz / anafaz iğ mihver kutupları ve fiberlerinde kuvvetli, istirahat halindeki hücrelerin nükleoplazmaları ince benekli tarzda boyanma, 240 kDa luk centrophilin antijenine karşı otoantikör mevcudiyetini gösterir. Bu nadir otoantikör otoimmün hastalıklardan SLE, CREST sendromu, Sjögren sendromu, MCTD, romatoid artrit ve primer biliyer sirozda tesbit edilebilir (53).

2.12.2.25. Midbody (MSA-2 antikörleri) boyanma

Bu boyanma modelinde, otoantijenler mitotik hücrelerin midbody kısmında bulunan proteinler olup çoğu halen tam olarak tanımlanamamıştır, bu otoantikör sistemik skleroz ve Raynaud fenomeninde görülebilmektedir (53).

2.12.2.26. CENP-F / p330d boyanma

Bu modelde otoantikör nükleer matriksin kinetokor proteinine karşı olup, hücre siklusuna bağlı olarak sadece bazı hücrelerde gözlenir. İstirahat halindeki hücrelerde değişik yoğunlukta ince benekli, metafazda kromatinler benekli, telefazda kromatinler boyanmaz ancak yoğun stoplazmik ve zayıf midbody boyanmaları gözlenir. Otoimmün romatolojik hastalıklar ve kanserli hastalarda gözlenebilir (53).

2.12.2.27. SCL-70 boyanma

HEp-2 hücrelerinin nükleusunda ince benekli ve nükleolar boyanma modeli gösterirler. Otoantikör topoizomeraz 1 (native formu 100 kDA, 70 kDA)'e karşıdır. Sistemik sklerozlu hastalarda görülür ve oldukça spesifiktir (53).

2.12.2.28. Anti-nükleozom (kromatin) antikorları

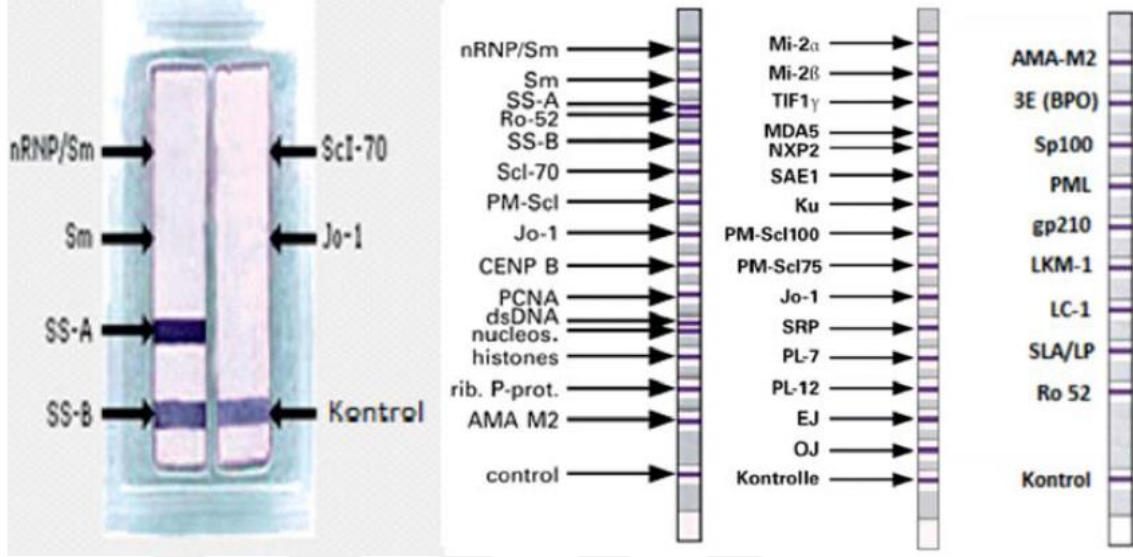
LE hücre formasyonuna neden olan otoantikörlerin başında yer alırlar. Anti-nükleozom antikörleri SLE'de hastalık aktivitesi ve böbrek tutumuyla korelasyon göstermektedir. SLE'de bu antikörün sensitivitesi %84, spesifikliğı %70'dir. Primer Sjögren sendromu ve primer antifosfolipid sendromu gibi diğere otoimmün hastalıklarda düşük oranda tesbit edilebilirler (10,65).

2.12.3. İmmünoblot Yöntemi

Günümüzde, immünoblot tekniğı antikör spesifitesini tanımlamak için zorunlu bir test haline gelmiştir. Temel olarak, antijen preparasyonları poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile ayrılmakta ve nitroselüloz membrana elektrotransfere gerçekleştirilmektedir. Sonraki aşamada dilüe edilmiş hasta serumu ile inkübasyon gerçekleştirilmekte ve antikör reaktivitesi radyoaktif işaretli veya enzim işaretli ikinci bir reaktif ile belirlenmektedir. Çözülmüş proteinlerin poliakrilamid jelden nitroselüloz membrana elektrotransfere proteinlerin kantitatif tayinini mümkün hale getirdiğı gibi transfer süreci içinde ayrılmış proteinlerin tamamen çözülmesini sağlamaktadır. Bir sonraki adımda katı yüzeye tutunmuş antijenler antikör veya diğere reaktiflerle kolaylıkla birleşebilmektedir (70).

İmmünoblot tekniğı, nükleer antijenlere karşı gelişen antikörlerin alt gruplarını birbirinden ayırarak belirleyebilme imkanı tanımaktadır. Bu alt gruplar, bazı otoimmün hastalıkların varlığına işaret etmektedir. Örneğın Sm antijenine karşı gelişen antikörler SLE varlığına işaret etmektedir. Anti Scl-70 veya fibrillarine karşı gelişen antikörler ise sklerodermayı düşündürmektedir. Hasta serumunda Anti SS-A ve Anti SS-B antikörleri genellikle sjögren sendromunda ve SLE'de görülse de bu hastalıklar için spesifik markerler olarak kabul edilmemektedir. Optimal koşullarda fibrillarine karşı gelişen antikörler kümeli nükleolar floresans paterni göstermektedir. Ancak deneyim sahibi biri, bu paterni doğru değerlendirebilmektedir. Bu açıdan immünoblot tekniğinin daha güvenilir sonuç vereceğı düşünölmektedir. İmmünoblot tekniğinin genellikle spesifik ve duyarlı olduğı düşünölmür. Diğere yöntemlerde, kullanılan kontrollerle hatasız bir sonuca ulaşıldığından emin olunması önemlidir. Bu açıdan immünoblot tekniğı bilinen antikör kontrolleri ile değerlendirme imkanı sağlamaktadır. ANA'ya sistemik romatolojik hastalıkların tanısında önemli bir unsur olarak ilginin büyümesi klinik laboratuvarlarda immünoblot tekniğinin yer almasını sağlamıştır. IFA gibi yaygın metodlar ANA

belirlenmesinde bazen yeterince duyarlı ve kesin olmamaktadır. İmmünoelot tekniği, otoantikorların moleküler düzeyde spesifitesini belirlemekte bir sonraki adım olarak gösterilmektedir (71).



Şekil 5: Sırasıyla ENA paneli, ANA paneli, miyozit paneli ve otoimmün karaciğer paneline örnek (6).

İmmünoelot yönteminin otoantikor saptanmasındaki avantajları: tüm ANA antijenlerinin bir arada bulunduğu western blot kitleri piyasada mevcut ise de ekstrakte edilebilen ve hastalıklar ile ilişkilendirilebilen antijenlerin saflaştırılarak ya da rekombinant yöntemler ile üretilerek nitroselüloz membranlara bağlanması ile oluşturulan immünoelot kitlerinin kullanılması daha çok tercih edilmektedir. İmmünoelot yönteminin otoantikor saptanmasındaki dezavantajları: Diğer yöntemler ile kıyaslandığında daha pahalı olması, kantitatif sonuçlar elde edilememesi, antijen hazırlama yöntemlerinden kaynaklanabilecek sorunlar bu yöntemin dezavantajları olarak sıralanabilir (6).

2.12.4. Enzim bağlı immunosorbent assay yöntemi (ELISA)

ELISA sistemleri 1960'larda radioimmünoassay yöntemlerine alternatif aranırken bulunmuştur. Enzim immünoassay (EIA) de kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması ve otomatize edilebilmesi yöntemin avantajlarından sayılabilir. Daha önemlisi laboratuvarlara çok fazla sayıda örnekle çalışma olanağı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır. EIA diye isimlendirilen yöntemler,

homojen ve heterojen olmak üzere iki çeşittir. Homojen tekniklerde, enzim bir haptene ile konjuge haldedir. Tekniğin esası, bu konjugatın antikor ile reaksiyona girmesi halinde enzim aktivitesinin bağlamasına dayanır. Ancak bu tekniğin düşük moleküler ağırlıklı maddeler kullanma zorunluluğunun bulunması, pahalı ve zahmetli olması gibi dezavantajları vardır. Bu nedenlerden dolayı fazla sık kullanılmazlar (72).

Mikrobiyolojide kullanılan enzim immünotestler heterojen yöntemlerdir. Heterojen EIA'de bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılırlar. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), heterojen EIA'e örnektir. ELISA'da bir enzimle konjuge edilmiş antikor (veya antijen), substratı ile reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturur. ELISA testleri antijeni veya antikoru (sınıfa özgül antikor da olabilir) işaretlemek için kullanılabilir (72, 73) .

ELISA kompleks bir teknik olmamasına rağmen bu teknikte birçok değişken kontrol edilmelidir. Katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan enzim ve substratların seçimi ve etkinliği, reaksiyonların sonlandırılma zamanı, kontrol edilmesi gereken değişkenlerdir. Katı faz olarak çoğunlukla mikrotitrasyon plakları şeklinde plastik kullanılmaktadır. Polistren mikrotitrasyon çukurcuklarından başka, plastik boncuklar, ferröz boncuklar ve nitrosellüloz membran da solid materyal olarak kullanılabilir (73,74).

ELISA'da kullanılan enzimler kinetikleri ve konjuge edilme dereceleri açısından iyi tanımlanmış enzimlerdir. Bunlar peroksidaz, alkalen fosfataz, beta-galaktozidaz gibi substratları renkli ürünlere çevirebilme yeteneğinde olan enzimlerdir. Bu renkli ürünler standart spektrofotometrede okutulabilir. Beta-galaktozidaz kullanılmışsa florimetrede okunmalıdır. Substratlar genellikle alkalen fosfataz için nitrofenil fosfat, peroksidaz için ortofenilendiamindir (72,75,76).

Yarışmacı olan (kompetitif) ve olmayan ELISA testleri vardır. Yarışmacı ELISA genellikle antijen varlığını göstermek için kullanılır. Aranılan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve test edilecek antijen (klinik örnek) katı fazdaki antikora aynı zamanda eklenir ve her iki antijenin de antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilir. İnkübasyondan sonra yıkanarak bağlanmamış antijenler uzaklaştırılır, ve enzim substratı konarak inkübe edilir. Bağlanmış enzim substratla reaksiyona girerek renk oluşturur, spektrofotometrede absorbans okunur. Substratın hidroliz miktarı, örnekteki antijen miktarı ile ters

orantılıdır. Yani sonuçta renk değişikliği olmazsa bu klinik örnekte antijen varlığını gösterir (75,78,79).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında yarışmacı olmayan ELISA daha sık kullanılmaktadır. Yarışmacı olmayan ELISA sandviç tekniği ile antijeni saptar. Antikor katı faza bağlanmıştır. Bunun üzerine antijen içeren vücut sıvısı konur. İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra enzimle işaretli antikor eklenir. İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra özgül kromojenik enzim substratı eklenir. Bağlı enzim substratla reaksiyona girerek renk değişikliğine neden olur. Bu renk değişikliği antijen varlığının kanıtıdır (75,77).

Yarışmacı olmayan ELISA antikor varlığını saptamak üzere de kullanılır. Bu yöntemde katı faza antijen bağlanmıştır. Test edilecek serum eklenir, serumda antijene özgül antikor varsa antijen antikor kompleksi oluşacaktır. Yıkamadan sonra enzimle işaretli antiglobulin konur. İnkübasyon ve yıkamadan sonra substrat eklenir. Özgül antikor varsa enzimle işaretli antiglobuline bağlanacak ve substrat hidrolize olacaktır. Her iki yöntemde de absorbans miktarı mevcut antijen veya antikorun miktarıyla doğru orantılıdır (75,77,80).

ELISA yöntemlerinde de bazı modifikasyonlar yapılabilir. En çarpıcı olan "capture" yakalama testleridir. Yakalama testleri de antikor ve antijen saptanmasında kullanılır. Antijen saptama için kullanılan yakalama testinde katı faza poliklonal veya monoklonal antikor bağlanır. Enzimle işaretli antikor da poli veya monoklonal olabilir. Monoklonal antikorların sadece bir epitopa bağlandığı düşünülürse poliklonal antikorlar antijenin farklı formlarını saptamada daha güvenilir antikorlardır (81,82).

ELISA plakları hazırlanırken, antijen aranacaksa antijene özgül antikor veya antikor aranacaksa antikora özgül antijen katı faza (plastik çukur veya boncuğa) bağlanmalıdır. Plakların kaplanma işlemi, 2 saat 37°C'de ya da bir gece oda ısısında veya +4°C'de bekletildikten sonra yıkama yapılarak gerçekleştirilir. İnkübasyonlar ise 1-2 saat 37°C'de yapılır (83).

Antijen ve antikor arama ayrı ayrı ele alınacak olursa, antijen arama için kullanılan yöntemler: direkt ELISA sandviç yöntemi, direkt ELISA tek basamaklı sandviç yöntemi, İndirekt ELISA, kompetitif ELISA yöntemi. Antikor arama amacıyla

kullanılan yöntemler: indirekt yöntem (katı faz sandviç yöntemi), sandviç inhibisyon yöntemi, kompetitif ELISA yöntemi olarak sınıflandırılmıştır (75,84,85).

ELISA, ANA IFA testleri ile karşılaştırıldığında iyi düzeyde duyarlılıkta ve yüksek oranda negatif prediktif değere sahiptir. Bu sebeple ELISA testleri ANA negatif örneklerin belirlenmesinde tercih edilir. ELISA testinin ANA belirlenmesinde pozitif prediktif değeri düşüktür. Bu nedenler ELISA ile pozitif saptanan tüm ANA sonuçları IFA testi ile doğrulanmalıdır. Anti-kardiyolipin antikoları (ACA), Anti- β 2-glikoprotein-1 antikoları, çözünebilir karaciğer antijeni/karaciğer pankreas antijeni (SLA/LP) antikoları, romatoid faktör (RF) ve anti-siklik sitrülünlenmiş peptid antikoları (anti-CCP) gibi bazı otoantikolar IFA yöntemi ile belirlenemeyip ELISA yöntemi ile saptanabilmektedir. Ayrıca IFA yönteminde SS-A, anti-tRNA sentetaz (Jo-1) ve anti-ribozomal-P antikolarının saptanmasında bir takım sorunlar yaşanabilmekte, bu durumlarda da ELISA yöntemi etkin olarak kullanılabilir. ELISA aracılığıyla bazı antikoların titre takibinin yapılması hastalık aktivitesinin gözlemlenebilmesi açısından önemlidir (6).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hasta bilgisi

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 221 nolu kararı ile etik kurul onayı alındı. Otoimmün hastalık şüphesi ile çeşitli kliniklerde yatarak yada ayaktan takip edilen 4440 hastanın serum örneğinin, ANA IFA değerlendirmesinde granüler+granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği saptanan 100 hasta serumu çalışma kapsamına alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalardan 84' ü kadın (%84) , 16'sı erkektir (%16) (Tablo 11) . Hastaların yaş ortalaması 35.44 ± 16.77 dir.

Çalışmaya alınan 100 örneğin 49'u (%49) Dahiliye Romatoloji Bölümü' den, 13' ü (%13) Yetişkin Hematoloji Bölümü' den, 11' i (%11) Yetişkin Nöroloji Bölümü' den, 6'sı (%6) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü' nden, 5'i (%5) Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Bölümü' nden, 4' ü (%4) Çocuk Romatoloji Bölümü' den, 4' ü (%4) Yetişkin Nefroloji Bölümü' nden, 2' si (%2) Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü' nden, 2' si (%2) Dermatoloji Bölümü' nden, 2' si (%2) Gastroenteroloji Bölümü' nden 1' i (%1) İç Hastalıkları Bölümü' nden, 1' i (%1) Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü'nden, gönderildi (Tablo12) .

Tablo 11: Anti DFS-70 antikoru pozitif bireylerin cinsiyet dağılımı.

Cinsiyet	Hasta sayısı	(%)
Kadın	84	84
Erkek	16	16
Toplam	100	100

Tablo 12: Hastaların bölümlere göre dağılımı.

Birim	Hasta sayısı	(%)
Dahiliye Romatoloji	49	49
Yetişkin Hematoloji	13	13
Yetişkin Nöroloji	11	11
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	6	6
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	5	5
Yetişkin Nefroloji	4	4
Çocuk Romatoloji	4	4
Kadın Hastalıkları ve Doğum	2	2
Gastroenteroloji	2	2
Dermatoloji	2	2
İç Hastalıkları	1	1
Enfeksiyon Hastalıkları	1	1
Toplam	100	100

3.2. Araştırma Yöntemi

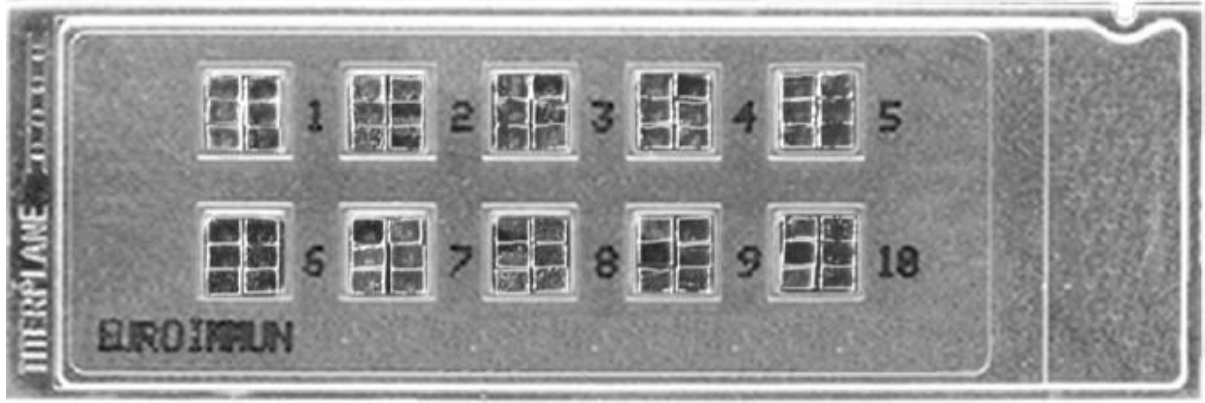
Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesinin çeşitli kliniklerinden laboratuvarımıza gönderilen, otoimmün hastalık şüphesi ile araştırılan hastaların serum örnekleri, IFA yöntemi (IFAT Mosaic: HEp-20-10/ Liver, Euroimmun, Almanya) ile ANA açısından değerlendirmeye alındı. Nisan 2016 - Eylül 2016 tarihleri arasında granüler + granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği saptanan 100 hasta serumunda immüno blot yöntemi ile (Euroline ANA Profile 3 plus DFS (IgG), Euroimmun, Almanya) 16 farklı antijene (nRNP/Sm, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl100, Jo-1, Sentromer B, PCNA, dsDNA, Nukleozomlar, Histonlar, Ribosomal-P-protein, AMA-M2, DFS-70) karşı oluşan antikorlar araştırıldı.

Çalışma kapsamına alınan örneklerin ait olduğu hastaların demografik bilgileri, hangi servisten geldiği ve ANA IFA test sonuçları kaydedildi.

3.2.1 ANA IFA Yöntemi

ANA IFA yöntemi, IFAT Mosaic: HEp-20-10/ Liver, (Euroimmun, Almanya) kiti kullanılarak, kit önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Test, özel olarak tasarlanmış kuyucuklar kullanılarak çalışıldı. Numuneler, işaretlenmiş antikorlar ve reaksiyonda etkili maddeler kuyucuklar üzerine eklendi. Slayt üzerindeki biyolojik dokular ,sıvılarla temas ettiğinde özgün reaksiyonlar eşzamanlı olarak başlar. Slaytlar 10 farklı numunenin aynı anda çalışılabileceği şekilde düzenlenmiştir.



Resim 7: IFAT Mosaic: HEp-20-10/ Liver, (Euroimmun, Almanya) Biyoçip eklenmiş slayt.

Test prosedürü;

1) Reaktiflerin hazırlanması; İlk açıldıktan sonra, ayıraçlar, aksi belirtilmediği sürece, +2°C ile +8°C arasında ve kontaminasyondan korunarak son kullanma tarihine kadar saklandı.

2) Slaytlar; kullanıma hazırды.

3) PBS-Tween; Bir paket tuz halindeki PBS, 1 litre distile suda çözüldü ve 2 ml Tween 20 ile karıştırıldı. Hazırlanan PBS-Tween, genellikle 1 hafta boyunca +2 °C ile +8 ° C de saklanabilir. Çözeltide bulanıklık görüldüğü durumlarda kullanılmadı. Yeni solüsyon hazırlandı.

4) Örneklerin hazırlanması; (İnsan serum veya plazması) İncelenmesi gereken hasta numuneleri +2 ° C ile +8 ° C de 14 güne kadar saklandı. Ancak dilüe edilmiş numuneler aynı gün içerisinde çalışıldı.

Kalitatif değerlendirme için örneklerin seyreltilmesi önerilir. Örneklerin sulandırımı, 1:100 oranında PBS-Tween ile yapıldı (Örneğin; 10.1 uL numuneye 1000 uL PBS-Tween eklenir). Bu sulandırım işlemi otoantikorların daha iyi bir şekilde elde edilmesine yardımcı olmaktadır.

5) Pipetleme; Slaytların her bir kuyucuğuna hava kabarcığı oluşmayacak şekilde 30'ar uL sulandırılmış örnek eklendi.

6) İnkübasyon; Herbir örneğin, slayt üzerindeki dokulara temas ettiğinden emin olunduktan sonra oda sıcaklığında (+18 ° C ile +25 ° C) 30 dakika inkübe edildi.

7) Yıkama; Slaytlar, PBS-Tween ile yıkandı ve hemen sonra en az 5 dakika süre ile bu çözelti içinde bekletildi.

8) Pipetleme; Her bir örneğin yer aldığı kuyucuklara 25' şer uL floresan ile işaretlenmiş anti-human globulin (konjugat) uygulandı.

9) İnkübasyon; Oda sıcaklığında (+18 ° C ile +25 ° C) 30 dakika inkübe edildi.

10) Yıkama; Slaytlar, PBS-Tween ile yıkandı ve hemen sonra en az 5 dakika süre ile bu çözelti içinde bekletildi.

Yıkanan slaytlar kurumaması için, fazla suyu alınarak gliserol damlatılmış lameller ile kapatılıp floresan mikroskobu (Euroimmun AG, Eurostar I, Seekamp 31, 23560 Lübeck, Almanya) altında değerlendirmeye alındı.

Mikroskopik incelemede slaytlar 40X büyütme ile pozitiflik ve negatiflik yönünden değerlendirildi. ANA IFA slaytlarında boyanma; nükleer, sitoplazmik ve mitotik paternler olarak ayrı ayrı incelenerek raporlandı. Prosedür kuralları doğrultusunda floresan boyanma paterni ve şiddeti raporlandı. Görüntünün floresan parlaklığına göre sonuçlar ' +, ++, +++, +++++ ' şeklinde değerlendirildi.

3.2.2. İmmüno blot Yöntemi

İmmüno blot yöntemi, Euroline ANA Profile 3 plus DFS (IgG), (Euroimmun, Almanya) kiti kullanılarak, kit önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Antijen emdirilmiş stripler aracılığıyla serum veya plazma örneklerinde otoantikörler tespit edildi.

Test prosedürü:

1) Reaktiflerin hazırlanması; tüm reaktifler kullanımdan 30 dakika önce, oda sıcaklığına (+18 ° C ila +25 ° C) getirildi. Açılmamış reaktifler son kullanma tarihine

kadar +2 °C ile +8° C arasında saklandı. Açıldıktan sonra aynı sıcaklıklarda 12 ay kadar saklanabilmektedir.

2) Stripler kullanıma hazırdır.

3) Konjuge enzim; konsantre haldedir. Kullanıma hazır konjuge enzimin hazırlanması için, steril bir pipet kullanılarak gerekli miktarda tampon çözeltisi ile 1:10 oranında seyreltildi. Her bir strip için 0.15 mL konjuge enzim ile 1.35 mL tampon çözeltisi kullanıldı. Hazırlanan reaktifler aynı gün içerisinde kullanıldı.

4) Tampon çözeltisi; kullanıma hazırdır.

5) Yıkama tamponu; konsantre haldedir. Kullanıma hazır yıkama tamponunun hazırlanması için, steril bir pipet kullanılarak gerekli miktarda distile su ile 1:10 oranında seyreltildi. Her bir strip için 1 mL yıkama tamponu ile 9 mL distile su kullanıldı. Hazırlanan reaktifler aynı gün içerisinde kullanılmalıdır.

6) Substrat çözeltisi; kullanıma hazırdır. Çözelti içeriği ışığa duyarlı olduğu için kullanımdan hemen sonra kapak kapatılmalıdır.

7) Örneklerin hazırlanması; (İnsan serum veya plazması)

İncelenmesi gereken hasta numuneleri +2 °C ile +8 °C' de 14 güne kadar saklanabilir. Ancak dilüe edilmiş numuneler aynı gün içerisinde çalışılmalıdır.

Örnekler, tampon çözeltisi ile 1:101 oranında dilüe edildi. 15 uL örnek için 1.5 mL tampon çözeltisi kullanıldı.

8) Cihazın inkübasyon tepsisinin bölmelerine her bir örnek için bir strip yerleştirildi. Test striplerinin üzerinde yer alan numaralar görünür olmalıdır. İnkübasyon tepsisinin bölmelerine tampon çözeltisi (1.5mL) ve hasta serumu(15 uL) eklendi. 5 dakika boyunca striplerin bulunduğu tepsi çalkalandı. Daha sonra bölmelerdeki sıvı aspire edildi.

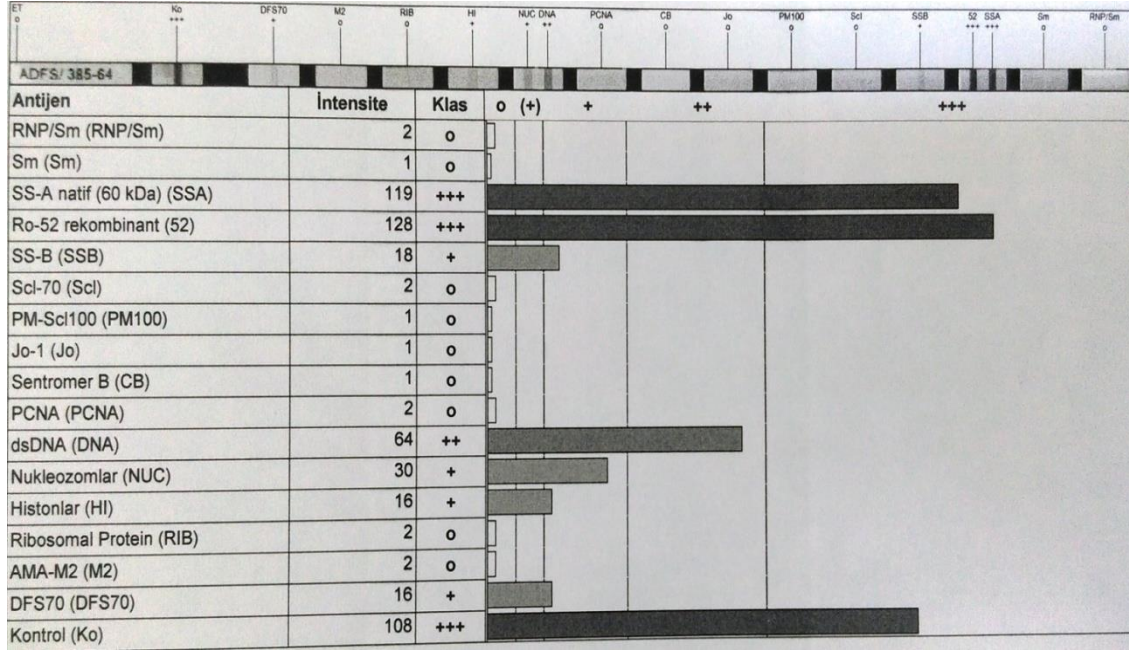
9) Oda sıcaklığında (+18 °C ila +25 °C) 30 dakika inkübe edildi.

10)Her bir bölme 1.5 mL yıkama tamponu eklenerek 3 kez yıkama yapıldı. Her yıkamada stripler, tampon içerisinde 5'er dakika inkübe edildi. Sıvı aspire edildi.

11) 1.5 mL substrat çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra bölmelerdeki sıvı aspire edildi.

12) Stripler distile su ile 3 kez yıkandı. Her yıkamada stripler , distile su içerisinde 1' er dakika inkübe edildi.Hava da kuruyana kadar çalkalayıcı da çalkalama işlemine devam edildi.

13) Stripler üzerinde oluşan bantlar değerlendirmeye alındı.



Resim 8: Euroline ANA Profile 3 plus DFS (IgG) Strip sonuç değerlendirmesi (Çalışmamızdan kontrol örneği).

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadan elde edilen verilerin analizinde SPSS 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences. IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 Armonk, NY: IBM Corp.) paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama, standart sapma ve yüzde dağılımları verildi.

4. BULGULAR

Nisan 2016- Eylül 2016 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen 4440 serum örneği IFA yöntemi ile ANA açısından değerlendirmeye alındı ve örneklerin 81' inde (% 1.82) tek olarak granüler +granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği , 19' unda (%0.42) ise farklı paternlerle beraber granüler +granüler kromozom ANA pozitifliği saptandı (Tablo 13).

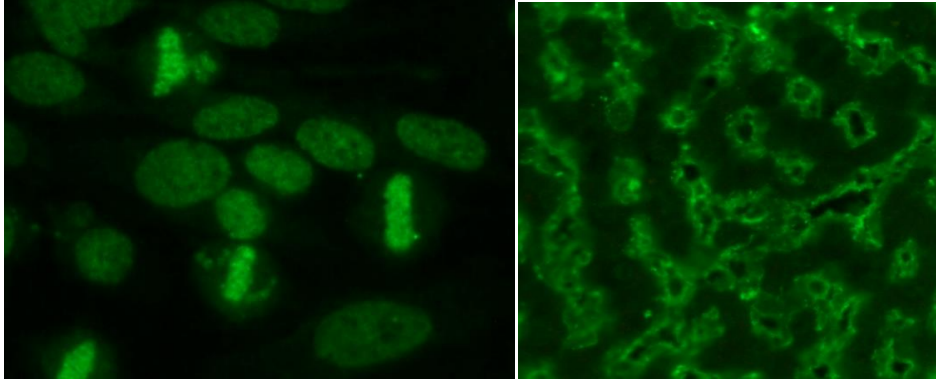
IFA yöntemi ile granüler + granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği saptanan örneklerdeki beraberinde saptanan diğer paternler Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 13: ANA IFA sonuçları.

ANA Paterni	Hasta sayısı	(%)
Granüler + granüler kromozom	81	1.82
Farklı bir paternle beraber granüler + granüler kromozom	19	0.42
Diğer paternler	4340	97.74
Toplam	4440	100

Tablo 14: Granüler + granüler kromozom tarzında ANA pozitifliği le birlikte saptanan diğer paternlerin dağılımı.

ANA Paterni	Hasta sayısı	(%)
Sitoplazmik patern	8	42.1
Granüler patern	7	36.9
Nükleolar patern	3	15.8
Sitoplazmik ve az nükleer noktalı patern	1	5.3
Toplam	19	100



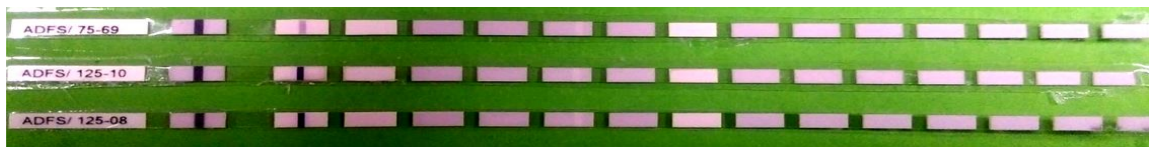
A. Hep-2 hücresi(x40)

B. Maymun karaciğer hücresi(x40)

Resim 9: IFA'da granüler + granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği (Çalışmamızdan)

İmmunblot ANA profil sonuçları

IFA'da granüler + granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği saptanan 100 örnek İmmünoblot yöntemi ile çalışmaya alınmış ve 70'inde (% 70) tek olarak anti-DFS-70 antikoru, 30'unda (% 30) ise anti-DFS-70 ile birlikte farklı antikor pozitiflikleri saptanmıştır. Anti DFS-70 ile birlikte farklı antikor varlığı belirlenen 30 hastadaki antikorlar şu şekildedir. 6'sında anti DFS-70 ve anti-Ro-52, 1'inde anti DFS-70 ile birlikte anti- Ro-52 ve anti- SS-A, 1'inde anti DFS-70 ve anti- nRNP/Sm, 6'sında anti-DFS-70 ve anti- dsDNA, 1' inde anti DFS 70 ile birlikte anti- Ro-52 ve anti- Jo-1, 1' inde anti DFS-70 ve anti- SS-A, 1' inde anti DFS-70 ve anti- Histon, 1' inde anti-DFS-70 ve anti- SS-B, 2'sinde anti- DFS-70 ve anti- PCNA , 1'inde anti DFS-70 ile birlikte anti- Ro-52 ve anti- PM-Sc1100, 2'sinde anti DFS-70 ile birlikte anti- PM-Sc1100, 1'inde anti DFS-70 ile birlikte anti- PM-Sc1100 ve anti-PCNA, 2'sinde anti DFS-70 ile birlikte anti-AMA-M2, 2'sinde anti DFS-70 ile birlikte anti- SS-A ve anti-SS-B, 1'inde anti DFS-70 ile birlikte anti- dsDNA ve anti- PCNA, 1'inde anti DFS-70 ile birlikte anti- AMA-M2 ve anti- Histon. Anti Sentromer pozitifliğine hiçbir hastada rastlanmamıştır.



Resim 70:İmmünoblot ile anti DFS-70 antikoru pozitifliği.

Tablo 15’de İmmünoblot yöntemi ile anti DFS-70 antikor pozitifliği durumu, Tablo 16’da ise İmmünoblot yöntemi ile anti DFS-70 antikoru beraberinde saptanan diğer antikorların varlığı gösterilmiştir.

Tablo 15: İmmünoblot yöntemi ile anti DFS-70 antikor pozitifliği.

Antikor pozitifliği	Hasta Sayısı	(%)
Anti DFS-70	70	70
Anti DFS-70 ile birlikte farklı antikor varlığı	30	30
Toplam	100	100

Tablo 16: İmmünoblot ile anti DFS-70 antikoru beraberinde saptanan diğer antikorlar.

Antikor	Hasta Sayısı	(%)
Anti- Ro-52	6	20
Anti-dsDNA	6	20
Anti- PCNA	2	6.67
Anti- PM-Scl100	2	6.67
Anti- AMA-M2	2	6.67
Anti-SS-A ve anti-SS-B	2	6.67
Anti-Ro-52 ve anti- SS-A	1	3.33
Anti- nRNP/Sm	1	3.33
Anti- Ro-52 ve anti- Jo-1	1	3.33
Anti- SS-A	1	3.33
Anti- Histon	1	3.33
Anti- SS-B	1	3.33
Anti- Ro-52 ve anti- PM-Scl100	1	3.33
Anti- PM-Scl100 ve anti-PCNA	1	3.33
Anti-dsDNA ve anti-PCNA	1	3.33
Anti-AMA-M2 ve anti-Histon	1	3.33
Toplam	30	100

Tablo 18’de hastaların ön tanıları (Tablo 17) esas alınarak demografik verileri, İmmunoblot sonuçları, ANA IFA sonuçları ve boyanma paternleri pozitiflik dereceleri ile birlikte gösterilmiştir.

Tablo 17: Hastaların ön tanı bilgileri

Ön Tanı	Hasta sayısı (n)	(%)
Eklem ağrısı	27	27
Artrit	19	19
Anemi	6	6
Baş ağrısı	6	6
Romatoid artrit	4	4
Sistemik lupus eritematozus	3	3
Fibromiyalji	2	2
Habituel abortus	2	2
Trombositopeni	2	2
Akut myeloid lösemi	1	1
Ankilozan spondilit	1	1
Behçet hastalığı	1	1
Boy kısalığı	1	1
Böbrek fonksiyon bozukluğu	1	1
Böbrek ve üreter taşı	1	1
Çarpıntı	1	1
Dermatit	1	1
Diskoid lupus eritematoz	1	1
Diyabetes mellitus	1	1
Esansiyel hipertansiyon	1	1
Gut	1	1
Hipotiroidizm	1	1
İdiopatik trombositopenik purpura	1	1
İdrarda anormal bulgular	1	1
Karaciğerin diğer hastalıkları	1	1
Kemik donörü	1	1
Koagülasyon bozukluk	1	1
Kronik ağrı	1	1
Multipl skleroz	1	1
Nefrotik sendrom	1	1
Osteoporoz	1	1
Otoimmün hepatit	1	1
Pıhtılaşma faktörleri kalıtsal eksikliği	1	1
Pnömoni	1	1
Polinöropatiler	1	1
Raynoud sendromu	1	1
Ürtiker	1	1
Vertebra füzyonu	1	1
Toplam	100	100

Tablo 18: Hastaların ön tanıları esas alınarak demografik verileri, İmmünblot ve ANA IFA sonuçları.

No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Anti-RNP /Sm	Anti-Sm	Anti-SSA	Anti-Ro52	Anti-SSB	Anti-Scl70	Anti-PMScI	Anti-Jo1	Anti-CenpB	Anti-PCNA	Anti-dsDNA	Anti-NUC	Anti-HI	Anti-RIB	Anti-AMA-M2	Anti-DFS-70	ANA IFA
59	60	K	Akut myeloid lösemi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
13	31	K	Anemi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
38	30	K	Anemi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
39	20	K	Anemi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
48	42	K	Anemi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
67	18	K	Anemi	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
85	25	K	Anemi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
10	41	E	Ankilozan spondilit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	Sınırdaki GGK
1	8	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
12	84	E	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
18	43	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
27	27	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
28	43	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+) GGK
32	21	E	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
40	23	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
50	15	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
53	10	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
57	11	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
65	36	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+) GGK
68	16	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
71	50	K	Artrit	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+) GGK, (+) GRANÜLER
72	45	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(++) GGK
82	52	E	Artrit	(-)	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK, (+) GRANÜLER
91	27	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK, (+) GRANÜLER

No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Anti-RNP /Sm	Anti-Sm	Anti-SSA	Anti-Ro52	Anti-SSB	Anti-Scl70	Anti-PMscl	Anti-Jo1	Anti-CenpB	Anti-PCNA	Anti-dsDNA	Anti-NUC	Anti-HI	Anti-RIB	Anti-AMA-M2	Anti-DFS-70	ANA IFA
93	45	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK, (++)GRANÜLER
95	18	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK,(+) GRANÜLER
99	16	K	Artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+) GGK
2	27	K	Baş ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
36	48	K	Baş ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
44	32	K	Baş ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	Sınırdaki GGK
78	54	K	Baş ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+) GGK
80	34	K	Baş ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK,(+) GRANÜLER
94	36	K	Baş ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK,(+) NÜKLEOLAR
47	29	E	Behçet hastalığı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
58	15	K	Boy kısalığı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
60	17	K	Böbrek fonksiyon bozukluğu	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK,(+) SİTOPLAZMİK
56	12	K	Böbrek ve üreter taşı	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++) GGK
55	43	E	Çarpıntı	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++) GGK
20	33	K	Dermatit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
76	30	K	Diskoid lupus eritematoz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
83	53	E	Diyabetes mellitus	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(++) GGK
3	68	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
7	29	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
8	37	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK,(+)Sİ TOPLAZMİK
9	39	K	Eklem ağrısı	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+) GGK
11	77	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	Sınırdaki GGK
15	42	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
17	10	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
22	19	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK

No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Anti-RNP /Sm	Anti-Sm	Anti-SSA	Anti-Ro52	Anti-SSB	Anti-Sc170	Anti-PMScI	Anti-Jo1	Anti-CenpB	Anti-PCNA	Anti-dsDNA	Anti-NUC	Anti-HI	Anti-RIB	Anti-AMA-M2	Anti-DFS-70	ANA IFA
24	36	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
33	24	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
34	38	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
41	41	E	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
45	38	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+) GGK
49	22	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
52	20	E	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
54	42	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)
63	45	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
73	53	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
74	69	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)
77	59	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
87	24	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
88	38	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
89	42	E	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
90	66	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
96	24	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
97	50	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+)GGK+(+)Sİ TOPLAZMİK
100	36	K	Eklem ağrısı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
30	48	K	Esansiyel hipertansiyon	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+) GGK
51	44	K	Fibromiyalji	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK ,(+) SİTOPLAZMİK (VİMENTİN)
35	31	K	Fibromiyalji	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++)GGK
29	70	E	Gut	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++)GGK
19	34	K	Habituel abortus	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)GGK,(+++) NÜKLEOLAR
46	31	K	Habituel abortus	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK

No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Anti-RNP /Sm	Anti-Sm	Anti-SSA	Anti-Ro52	Anti-SSB	Anti-Sc170	Anti-PMScI	Anti-Jo1	Anti-CenpB	Anti-PCNA	Anti-dsDNA	Anti-NUC	Anti-HI	Anti-RIB	Anti-AMA-M2	Anti-DFS-70	ANA IFA
4	48	K	Hipotiroidizm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
6	25	K	İdiopatik trombositopenik pupura	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
5	9	K	İdrarda anormal bulgular	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
81	43	K	Karaciğerin diğer hastalıkları	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)GGK, (+)SİTOPLAZMİK
61	27	K	Kemik donörü	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
21	31	K	Koagülasyon bozuklukları	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)GGK
70	7	K	Kronik ağrı	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	Sınırdaki GGK, (+) NÜKLEOLAR
43	28	K	Multipl skleroz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
62	4	K	Nefrotik sendrom	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
79	20	K	Osteoporoz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
98	43	K	Otoimmün hepatit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
23	41	K	Pıhtılaşma faktörleri kalıtsal eksikliği	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
64	36	E	Pnömoni	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
69	52	E	Polinöropatiler	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+++)	(+)GGK,(+)SİTOPLAZMİK,(+) FEW DOTS
14	23	K	Raynaud sendromu	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+)GGK
16	22	K	Romatoid artrit	(-)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
66	53	K	Romatoid artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+) GGK
84	40	K	Romatoid artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++) GGK, (+) GRANÜLER
86	65	K	Romatoid artrit	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK,(+) SİTOPLAZMİK
25	57	K	Sistemik lupus eritematozus	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+)GGK

No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Anti-RNP /Sm	Anti-Sm	Anti-SSA	Anti-Ro52	Anti-SSB	Anti-Sc170	Anti-PMScI	Anti-Jo1	Anti-CenpB	Anti-PCNA	Anti-dsDNA	Anti-NUC	Anti-HI	Anti-RIB	Anti-AMA-M2	Anti-DFS-70	ANA IFA
31	50	E	Sistemik lupus eritematozus	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK
92	15	K	Sistemik lupus eritematozus	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+++)	(+++) GGK, (+) SİTOPLAZMİK
37	51	K	Trombositopeni	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
75	51	K	Trombositopeni	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++) GGK
42	6	E	Ürtiker	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++) GGK
26	31	E	Vertebra füzyonu	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+) GGK, (+) SİTOPLAZMİK

5. TARTIŞMA

ANA varlığını araştırmada IFA yöntemi altın standart yöntemdir. İmmunoblot ile saflaştırılmış ve membran şeritlere aktarılmış özgül antijenlere karşı blotlama yöntemi ile antikor saptanmakta, tek reaksiyonda farklı antikorlar saptanabilmektedir. ELISA yöntemi ile antikor titrelerinin takibi gerçekleştirilmektedir. ANA saptamada ve takibinde bu yöntemlerin yerinde uygulanması önemlidir. Otoantikor pozitifliklerinin klinik verilerle birlikte değerlendirilmesi, klinik bulgusu olmayan ancak otoantikor pozitifliği saptanan olguların uzun süreli takibi önerilmektedir (3).

Şimdiye kadar anti DFS-70 antikorunu farklı hasta gruplarında çalışılmıştır. Anti DFS-70 antikorunun en yüksek prevalansının Atopik dermatit (AD)'li Japon hastalarda olduğu ortaya konmuştur ve oranı %30.0 olarak belirtilmiştir. İkinci en yüksek prevalansın ABD'li astım vakalarında; %16.0 bunun yanı sıra yine ABD'li İnterstitiel sistit hastalarında bu oranın %8.7 olduğunu ifade etmişlerdir . ABD'li sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda anti DFS-70 antikorunun oranını %0-2.5 arasında vermişlerdir. 650 sağlıklı kan donörü ile yapılan çalışmada ise anti DFS-70 antikorunun prevalansı %5.4 olarak saptanmıştır (58).

Atopik dermatitli hastalarda ki anti DFS-70 antikorunun oranının, astım ve interstitiel sistit hastalarından daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır . Sağlıklı bireylerde de, herhangi bir hastalık belirtisi olmaksızın ANA pozitifliği görülebildiği ve bu durumun ANA pozitifliğinin anlamı açısından soru işareti bıraktığı vurgulanabilir (86).

Ülkemizde Tutkak ve ark.'larının Ankara Üniversitesi'nde yaptıkları çalışmada, 4 aylık bir süre içinde 7855 serum örneği'nde ANA IFA sonucu değerlendirilmiştir. 7855 örneğin %15.7'si ANA pozitif, %84.3'ü ise ANA negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu grupta anti DFS-70 antikorunu 4. en sık rastlanılan boyanma paterni olup, %5.8 oranında saptanmıştır (87).

Çalışmamızda, çeşitli kliniklerden gönderilen 4440 serum örneği IFA yöntemi ile ANA açısından değerlendirmeye alındı ve örneklerin 81'inde (% 1.82) tek olarak granüler +granüler kromozom tarzında ANA pozitifliği, 19'unda (%0.42) ise farklı paternlerle beraber granüler +granüler kromozom tarzında ANA pozitifliği saptandı.

Watanabe ve ark.'larının 597 sağlıklı hastane personeli ile yaptıkları çalışmada 119 birey (% 20) ANA IFA testinde pozitif sonuç vermiştir. 119 ANA pozitif bireyden 69'u (tüm grubunun %12'si, ANA IFA pozitiflerin % 58.0'i) anti DFS-70 boyanma şekli göstermiştir (19). Watanabe ve ark.'ları aynı zamanda anti DFS-70 pozitifliği gösteren serum örnekleri ile yaptıkları immunblot çalışmasında yaklaşık 70 kDa civarında (anti DFS-70 antijeninin moleküler ağırlığının yaklaşık 70 kDa) band oluşumunu saptamışlardır (58).

Bizzaro ve ark.'larının 20 kan donöründe immünblot ile yaptıkları çalışmada hiçbir örnekte anti DFS-70 antikorunu saptamamışlardır (90).

Bizim çalışmamızda çeşitli kliniklerden gönderilen 4440 serum örneği IFA yöntemi ile ANA açısından değerlendirmeye alındığında 100'ü (%2.25) granüler+ granüler kromozom tarzında boyanma modeli gösterdi.

Okamoto ve ark.'ları, alopecia areata ve sağlıklı kontrol bireylerinde IFA ile yaptıkları taramada ise 105 sağlıklı bireyle çalışmışlardır. 105 sağlıklı bireyden 8'i (%7.6) anti-DFS 70 boyanma paterni göstermiştir (91).

Tutkak ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada anti DFS-70 antikorunun, kadın bireylerde, erkeklere oranla daha yüksek bulunmasının sebebini ise kadınların erkeklere göre daha duyarlı olmaları veya gebelik gibi antijenik uyarıya yol açan durumları daha fazla yaşamalarının neden olduğu belirtilmiştir (87).

Kang ve ark.'nın çalışmasında anti DFS-70 antikorunu pozitif olan hastaların 80'inin (%79.2) kadın, 21'inin (%20.8) ise erkek hastalardan oluşmakta olduğu görülmüştür (88).

Şener ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise, anti DFS-70 otoantikorunu pozitif olan hastaların %68.75'inin kadın, %31.25'inin erkek olduğu belirtilmiştir (89).

Çalışmamızda, anti DFS-70 antikorunu pozitifliği kadın bireylerde (%84) erkeklere (%16) oranla daha yüksek bulundu. Oranların kadın hastalarda oldukça yüksek olması bu hastaların otoimmün hastalık yönünden taranması gerektiğini düşündürmektedir.

Mariz ve ark.'nın (92) 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada, Anti DFS-70 antikorlarına sahip 39 sağlıklı bireyin uzun dönem sonuçları ve prognozları (ortalama dört yıllık klinik takip) incelendiğinde hiçbirinde sistemik otoimmün romatizmal hastalıkların gelişmediği görülmüş ve anti DFS-70 antikorlarının sistemik lupus eritematosus (SLE)

gibi sistemik otoimmün romatizmal hastalıkların tanısının dışlanmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (92).

Mutlu ve ark.'nın çalışmasında, DFS-70 paternine sahip 74 hastanın aldığı tanımlar incelenmiş, 68 hastanın (%91.9) hiçbir sistemik otoimmün hastalık tanısına sahip olmadıkları görülmüş, diğer 6 hastanın (%8.1) 3'ünün (%4.0) SLE, 2' sinin (%2.7) Sjögren sendromu ve 1'i (%1.4) de skleroderma tanısına sahip oldukları saptanmıştır (93).

Lee ve ark.'nın 2016 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada, IFA ile DFS-70 pozitif bulunan 181 hastanın 31'inin (%17.1) sistemik otoimmün romatizmal hastalık tanısı aldığı görülmüş, sistemik otoimmün romatizmal hastalık tanısı alan 19 hastanın (%10.5) SLE, 5 hastanın (%2.8) miks konnektif doku hastalığı, 5 hastanın (%2.8) Sjögren sendromu, 1 hastanın (%0.6) sistemik skleroz, 1 hastanın da (%0.6) polimiyozit/dermatomiyozit tanısı aldıkları görülmüştür (94).

Çalışmamızda ise granüler+ granüler kromozom paternine sahip 100 hastanın 26'sında (% 26) sistemik otoimmün romatizmal hastalık tanısı konulduğu görüldü. Bu hastaların 19'u (%19) artrit, 4'ü (% 4) romatoid artrit, 3'ü (% 3) SLE tanısı aldı.

Sistemik otoimmün hastalık grubuna dahil edilen RA, SLE, Sjögren Sendromu, Skleroderma, Dermatomiyoit/ Polidermamiyoitosis gibi BDH grubuna dahil edilen hastalıkların tanısı ve tedavisinin takibinde hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer antijenlere karşı gelişen antinükleer antikorlar büyük önem taşımaktadır. IFA, bu amaçla geliştirilen en eski ve yaygın yöntem olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra son yıllarda geliştirilen ELISA, immünoblot ve immünodiffüzyon gibi yöntemler de laboratuvarlarda tek başına veya IFA ile beraber kullanılmaktadır. Antinükleer antikorların yaşlılık, sitotoksik ilaç kullanımı ve kanser gibi durumlarda da görülmesi nedeniyle ANA pozitifliğinin anti-ENA adı verilen ANA alt gruplarının belirlenmesine de olanak sağlayan farklı yöntemlerle doğrulanmasının gerekliliğine dikkat çekilmektedir. Her yöntemin kendi içinde mevcut bazı avantajlar ve sınırlamalar göz önünde bulundurulduğunda, tek bir yöntemle tanıya gidilmesinin önemli bazı sorunlara yol açabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (71, 95).

Son yıllarda geliştirilen ELISA, immünoblot ve EIA gibi yöntemlerin uygulamasının daha pratik olması ve objektif bir değerlendirme sürecini sağlaması rutin laboratuvarlarda bu yöntemlerin yaygınlaşmasına olanak sağlamıştır. IFA ile karşılaştırıldığında, sonuçların laboratuvar içi veya laboratuvarlar arası tutarsızlığının önemli ölçüde giderildiği bildirilmiştir (71).

HEp-2 hücrelerinin fiksasyon işlemleri ve ayrıca bazı paternlerin birbirlerini maskeleymesi sonucu bir takım antikörlerin saptanması IFA yöntemi ile zor olabilmektedir. Bu gibi durumlarda ANA negatif bulunmasına rağmen ELISA veya immüno blot yöntemlerinde bazı paternler pozitif bulunabilir. Bizim çalışmamızda pozitiflik saptanan 100 örnek immüno blot yöntemi ile çalışmaya alınmış ve 70'inde (% 70) tek olarak anti-DFS-70 antikoru, 30'unda (% 30) ise anti-DFS-70 ile birlikte farklı antikör pozitiflikleri (6' sında anti-DFS-70 ve anti-Ro-52, 6'sında anti-DFS-70 ve anti-dsDNA, 2'sinde anti- DFS-70 ve anti- PCNA, 2'sinde anti- DFS-70 ile birlikte anti-PM-Scl100, 2'sinde anti- DFS-70 ile birlikte anti-AMA-M2, 2'sinde anti- DFS-70 ile birlikte anti- SS-A ve anti-SS-B, 1'inde anti-DFS-70 ile birlikte anti- Ro-52 ve anti- SS-A, 1'inde anti- DFS-70 ve anti- nRNP/Sm , 1'inde anti- DFS-70 ile birlikte anti- Ro-52 ve anti- Jo-1, 1'inde anti- DFS-70 ve anti- SS-A, 1'inde anti- DFS-70 ve anti- Histon, 1'inde anti-DFS-70 ve anti- SS-B, 1'inde anti- DFS-70 ile birlikte anti- Ro-52 ve anti-PM-Scl 100, 1'inde anti- DFS-70 ile birlikte anti- PM-Scl 100 ve anti-PCNA, 1'inde anti- DFS-70 ile birlikte anti- dsDNA ve anti- PCNA, 1'inde anti- DFS-70 ile birlikte anti- AMA-M2 ve anti- Histon) saptandı. Çalışmamızda, IFA ile granüler + granüler kromozom paterninde ANA pozitifliği saptanan örneklerin 8'inde (%42.1) sitoplazmik patern, 7'sinde (%36.9) granüler patern , 3'ünde (%15.8) nükleolar patern, 1'inde (% 5.3) sitoplazmik ile birlikte az nükleer noktalı patern beraber rastlandı.

IFA'da ANA değerlendirmelerinde homojen boyanma paterni, immüno blot'da anti-dsDNA, anti-ssDNA, anti-histon, anti-nükleozom antijenleriyle ilişkilidir. İnce benekli boyanma paterni; anti- SS-A ve anti-SS-B antijenleriyle, kaba benekli boyanma paterni; Sm antijeniyle, nükleolar boyanma modeli; PM-Scl 100 antijeniyle ilişkilidir (6).

Bizim çalışmamızda homojen boyanma modeline hiçbir hastada rastlanmadığı halde ilgili antijenlerin varlığına immüno blot sonuçlarında rastlandı. Granüler+ granüler kromozom modelinde boyanmış hastaların kromozomal boyanma durumunun homojen boyanma paterninde spesifik olan metafaz boyanma şeklini maskeleyebileceğini düşündürmektedir. Nükleolar boyanma paterniyle ilişkilendirilen PM-Scl 100 antijenine ise sadece granüler + granüler kromozom modelinde boyanmış hastalarda rastlandı. Bu sonuçlar, IFA'da paternlerin maskelenme durumunun olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda substrat olarak kullanılan maymun karaciğer hücreleri paternler arası maskelenme durumunu indirgemek amacıyla kullanılmaktadır ancak yüksek floresan ışımalarının görüldüğü durumlarda yanıltıcı olabilmektedir. Böyle durumlarda karşılaşıldığında ELISA yada İmmunblot yöntemi ile test doğrulanmalıdır.

Başka bir alternatif yol ise IFA'da tarama dilüsyonudur. Hasta serumları farklı oranlarda dilüe edilerek çalışmaya alınabilir. Erişkinlerde önerilen tarama dilüsyonu 1/160, çocuk hastalar için kesin olarak belirlenmiş bir tarama dilüsyonu olmamakla birlikte bu yaş grubu için de 1/160 dilüsyon önerilmektedir. ANA tarama dilüsyonuyla ilgili olarak uluslar arası literatürde 1/160 önerilmekle birlikte ülkemizde yaygın olan uygulama 1/100 dilüsyonla tarama yapılmasıdır. Tarama dilüsyonunun 1/160 olması 1/100 ile taramaya göre düşük pozitif ANA sonuçlarının azalmasını sağlar (6).

Dilüsyon farkından yararlanılarak sınır değerdeki pozitifliklerin yaratabileceği karmaşanın ortadan kaldırılabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca kullanılan HEp-2 hücre serisinin özelliklerine göre bazı paternlerin yakalanması dilüsyon katsayısına bağlı olarak değişebilmektedir. HEp-2 hücrelerinde 1/160 dilüsyonla yakalanamayan SS-A, SS-B paterninin 1/100 dilüsyonla yakalanması mümkündür (6).

Bizim çalışmamızda da İmmunblot sonucunda anti-SS-A ve anti-SS-B antijenlerine rastlandığı halde ANA IFA'da bu antijen pozitiflikleriyle ilişkilendirilen granüler boyanma paternine rastlanmadı. Bu durumda dilüsyon farkından yararlanılabilir.

Ayrıca izole anti DFS-70 antikor pozitifliği klinik açıdan genellikle sistemik romatizmal hastalık tanısından uzaklaştırmaktadır (5).

Atopik dermatit, alopesia areata, intersistiyel sistit, astım, pediatrik kronik yorgunluk sedromu gibi sistemik olmayan otoimmün hastalıklarda ya da çeşitli göz hastalıkları ve kanserlerde de görülebildiği bildirilmektedir (6).

İşte bu durum göz önüne alınarak anti DFS-70 antikoru saptanan hastaların ELISA yada immunblot yöntemi ile diğer antikorlar açısından araştırılması önemlidir. İmmunblot yöntemide bu noktada çok sayıda antikoru aynı zamanda saptaması nedeni ile oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

6.KAYNAKLAR

1. Scolfield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* 2004; 363:1544-46.
2. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for spesific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124: 71-81.
3. Tutkak H. Romatolojik hastalıkların tanısında otoantikolar. 2014, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara,s.38-44.
4. Marlet J, Ankri A, Charuel J-L, Ghillani- Dalbin P, Perret A, Martin-Toutain I, et al. Thrombophilia associated with anti-DFS-70 autoantibodies. *PLoS ONE* 2015;10: e0138671.doi:10.1371/journal.pone.0138671.
5. Fabris M, Zago S, Tosolini R, Melli P, Bizzaro N and Tonutti E . Anti-DFS-70 Antibodies: A useful biomarker in a pediatric case with suspected autoimmune disease . *Pediatrics* 2014;134:e1706; originally published online November 10, 2014; DOI: 10.1542/peds.2013-3914
6. Şener B ve ark. Otoantikoların Laboratuvar Tanısı Rehberi, KLİMUD kaynak no:9,Ankara, 2016:s.14-37.
7. Us D. Temel İmmünoloji ve Seroloji, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2016: s.5-80.
8. Düzgün N. Romatoloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik İmmünoloji ve Romatoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2011, s. 97-98.
9. Levinson W, Jawetz E. *Medical Microbiology and Immunology*, 2004, s.404.
10. Duzgun N, Sahin M, Genc Y, Tutkak H. Antinucleosome antibodies and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:421-8.
11. Terzioglu E. Self Tolerans ve Otoimmünite. In: Gümüşdis G, Doganavsargil E. Eds. *Klinik Romatoloji Kitabı*. _stanbul: Deniz Matbaası, 1999: 55-57.
12. Tokgöz G. (1997). *Klinik İmmünoloji*. Antıp A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, No:19. Bölüm 9-10.
13. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*, 2001; 344: 655- 664.
14. Abul K, Abbas AK ve Lichtman AH. Temel İmmünoloji. In: Camcıoglu Y ve Deniz G. Eds. _stanbul: _stanbul Medikal Yayıncılık, 2007: 1-5.
15. Delves RJ, Roitt IM. The İmmun Sistem. *N. Engl J Med*. 2000,343, 37-49.

16. Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B. (2000) Shaping of the otoreactive T-cell repertoire by splice variant of self proteins expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med* 6, 56-61.
17. Naik S. The immunological basis for autoimmunity. *J Indian Rheumatol Assoc.* 2004; 12, 22-28.
18. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*.1996; 272, 60-66.
19. Kurts C, Carbone FR, Barnden M, et al. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med.* 1999; 186, 217-253.
20. Nemazee D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rew Immunol.* 2000; 18, 19-51.
21. Fagarasan S, Honjo T. T-independent immun response: new aspects of B cell biology. *Science* 2000; 290, 89-92.
22. Çağlayan ES Anti nükleer antikorların farklı yöntemlerle bakılması ve alt gruplarının karşılaştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Yüksek lisans tezi. 2006.
23. Levinson W, Jawetz E. *Medical Microbiology and Immunology*,2004; s.487-488.
24. Herrmann M , Schölmerich J, Straub R. H. Stress and Rheumatic Diseases. *Rheumatic Diseases Clinic of North America* 2000;26(4): 737-63.
25. Stojanovich L. Stress and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 2009; 9(5): A271-6.
26. Dube S. A , Fairweather D , Pearson W. S. Felitti V. J, Anda R. F, Croft J. B. Cumulative childhood stress and autoimmune diseases in adults. *Psychosom Med* 2009; 71: 243-50.
27. Doğu F. Sistemik Otoimmün Hastalıklarda Otoantikor Testlerinin Tanısal Önemi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar Sempozyumu, Özet Kitabı. 2005; s:23.
28. Aydınтуğ O.T. Sistemik Otoimmün Hastalıklarda Otoantikor Testlerinin Tanısal Önemi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar Sempozyumu, Özet Kitabı. 2005; s. 83-84.

29. Chan E. K. L , Fritzier M. J, Wıık A , Andrade, Luis E.C , Reeves W. H , Tıncanı A, Meronı P. L. AutoAbSC.Org – Autoantibody tandardization Committee in 2006. Autoimmun Reviews, 6(8): 577-80.
30. Stinton L. M , Fritzier M. JA clinical approach to autoantibody testing in systemic autoimmune rheumatic disorders. Autoimmunity Reviews, . 2007; 7: 77-84.
31. Abbas AK, Lichtman AH, 2007, Basic Immunoloji 2ed. Elsevier Inc., New York. Temel İmmünoloji, İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları, çev. Yıldız Camcıoğlu, Günnur Deniz. İstanbul Medikal Yayıncılık, s161-176.
32. İyidir ÖT, Erten Ş. Clinical evaluation of autoantibodies in connective tissue disorders: medical education. J Med Sci. 2007; 27: 236-246.
33. Ruacan S. Otoimmünite. In: Ustaçelebi S. Eds. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Ankara: Günes Kitabevi, 1999; 245-249.
34. Theofilopolus AN, MD. Autoimmunity. Pp: 128-158. In: Stites DP, Stobo JD, Wells JW. Basis & Clinical İmmunology. Sixth Edition, Appleton & Lange. USA, 1987.
35. Volpe R. Immunological Aspects of Thyroid Disorders. Triangle 1984; 23, 95-103.
36. Doğanavşargil E, Gümüşdiş G. Klinik Romatoloji El Kitabı, Ege Üniversitesi İç Hastalıkları A.B.D. ,İzmir , 2003; 239-240.
37. Walsh SJ, Rau LM. Autoimmune disease: aleading cause of death among young and middle- aged women in the United States. Am J Public Health, 2000; 90: 1463-1466.
38. Cooper GS. The epidemiology of autoimmune diseases: Contributions of previous studies and opportunities for future research. In: Conrad K, Fritzier M, Sack U, Shienfeld Y Eds. From Proteomics to Molecular Epidemiology: Relevance of Autoantibodies. 6th Ed., Dresden: Dresden Symposium on Autoantibodies; 2002: 582-603.
39. Kyvik KO, Nystrom L, Gorus F, Songini M, Barak L, Burton P et al. Incidence of type 1 diabetes in young adult across Europe- an EU funded multicentre study (IDA). Diabetologia,2001; 44: A75.
40. Ostrauskas K, Zalinkevicius R, Norkus A. Incidence of Type 1 diabetes mellitus over eight consecutive year among 15-39 year aged Lithuanian population. Diabetologia, 2001; 44: A96.

41. Cooper GS, Parks CG, Treadwell EL. Differences by Race, Sex, and Age in the Clinical and Immunologic Features of Recently-Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus Patients in the Southeastern United States. *Lupus*, 2002; 11: 161-167.
42. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM. The incidence of thyroid disorders in the community: A twenty- year follow-up of the Whickham survey. *Clin Endocrin*, 1995; 43: 55-68.
43. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Care*, 2000; 23: 1516-1526.
44. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*, 2001; 22: 117-139.
45. Wiik AS. Anti-nuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. *Scand J Rheumatol*. 2005; 34: 260-8.
46. Otoantikörlerin Klinik Yaygınlığı ve Hastalıklarla Olan İlişkileri (Turk J Biochem, 2008; 33 (1) ; 19–24 .)
47. Kongur E, Kaklıkkaya N, Bayramoğlu G, Özkaya E, Önder Ş, Akyol R, Kasap B. Türk Yoğun İnce Benekli (DFS) Paterninde Antinükleer Antikor Varlığı Tespit Edilen Hastaların ICD Kodlarının Retrospektif Olarak Araştırılması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı , *Mikrobiyol Cem Derg* 2016; 46(2):82-87.
48. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity* 2008; 41(2):123-132.
49. Fritzler MJ. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmun Rev* 2008;7:616-620.
50. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(9):491-498.
51. Peng Y, Kowalewski R, Kim S, Elkon KB. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol Immunol* 2005;42:781-787.
52. Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun*. 2007;29(4):303-9.
53. Muro Y. Antinuclear antibodies. *Autoimmunity* 2005;38(1):3-9.
54. Aboysesef M. The value of the anti-nuclear antibodies (ANA). *Asjog*; 2004; 12. 68-71.

55. Hoffman I. E. A , Peene I , Veys E. M , Keyser F. D. Detection of Specific Antinuclear Reactivities in Patients with Negative Anti-nuclear Antibody Immunofluorescence Screening Tests. *Clinical Chemistry*, 2002;. 48(12): 2171-2176.
56. Ganapathy V, Casiano C. A. Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS-70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us? *Arthritis & Rheumatism*, 2004; 50(3): 684-688.
57. Burnester G , Pezzutto A. Renkli İmmünoloji Atlası. Nobel Tıp Kitabevleri, 2006; s.182-183.
58. Watanabe A , Koder M , Sugiura K , Usuda T, Tan E. M , Takasaki Y, Tomita Y, Muro Y. Anti-DFS-70 Antibodies in 597 Healty Hospital Workers. *Journal of Autoimmunity*, 2004; 26(4): 252-257.
59. Tutkak H, Kayasu D, Akbay S, et al. Anti-DFS-70/LEDGF antibodies; one of the high incidence antinuclear antibody pattern of HEp-2 cells in the indirect immunoflorescence assay. 2 nd Mediterranean Clinical Immunology Meeting; 2008 Oct 4-7; Antalya, Turkey, Abstract book, p 80-81.
60. Okamoto M, Ogawa Y, Watanabe A, et al. Autoantibodies to DFS-70/LEDGF are increased in alopecia areata patients. *J Autoimmun* 2004;23:257-266.
61. Sugiura K, Muro Y, Nishizawa Y, et al. LEDGF/DFS-70, a major autoantigen of atopic dermatitis, is a component of keratohyalin granules. *J Invest Dermatol* 2007;127:75-80
62. Bizzaro N. Autoantibodies as predictors of disease: the clinical and experimental evidence. *Autoimmun Rev* 2007;6:325-333
63. Sarkar K, Miller FW. Autoantibodies as predictive and diagnostic marker of idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2004;37:291-294.
64. Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25:215-222.
65. Puerta JGA, Burlingame RW, Cervera R. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies:Diagnostic and clinical value. *Autoimmun Rev* 2008;7:606-611.
66. Muro Y, Sugiura K , Morita Y, Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS-70/LEDGF autoantibody–positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus*, 2008; 17(3): 171-176.
67. Dellavance A, Viana V. S. T , Leon E. P , Bonfa E. S. D. O, Andrade, L. E. C , Leser, P. G. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the

- nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *The Journal of Rheumatology*. 2005; 32(11): 2144-9.
68. Ganapathy V, Daniels T, Casiano C. A. LEDGF/p75: a novel nuclear autoantigen at the crossroads of cell survival and apoptosis. *Autoimmunity Reviews*. 2003; 2: 290-297.
 69. Ochs RL, Muro Y, SI, Y., GE, H., Chan, EK., Tan, E.M. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000;105: 1211-20.
 70. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76, 4350-4354.
 71. Chan EKL, Pollard KM. Detection of autoantibodies to ribonucleoprotein particles by immunoblotting. In: Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (Eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Fifth Edition. ASM Press, Washington DC. 1997 ; p: 928-934.
 72. Babacan F. Enfeksiyon Hastalıklarının İmmünoserolojisi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M ed. *Enfeksiyon Hastalıkları*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 1996: 98- 9.
 73. Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS: Quantitation of antigen. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 3rd edition, Philadelphia: WB Saunders Company, 1997: 59-60.
 74. Hendry RM, Hermann JE. Immobilization of antibodies on nylon for use in enzyme-linked immunoassay. *J Immunol Methods* 1984; 67: 21.
 75. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Antibody Detection and Preparation. In: *Current Protocols in Immunology Vol 1.*, New York: John Wiley & Sons, 1994: 2.1.1-2.1.4.
 76. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: Current rapid techniques and emerging technologies in diagnosis. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 4th edition, Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992 :1086-87.
 77. Baron JE, Peterson LR, Finegold SM. Nontraditional Methods for Identification and detection of pathogens or their products. In: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 9th ed. Missouri: Mosby-Year Book, 1994: 125-7.

78. Hendry DI. Identification of viral isolates by enzyme immunoassay. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington: American Society for Microbiology, 1992; 2: 8.1.1-8.1.9.
79. Gülmezoğlu E, Ergüven S. İmmünoloji. Ankara: Hacettepe - Taş Kitapçılık, 1994: 287-9.
80. Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal affinity by noncompetitive immunoassay. *J Immunol Methods* 1987; 100: 173-9.
81. Feit C, Bartal AH, Tauber G, Dymbort G, Hirshaut Y. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies recognizing antigens expressed on viable cells. *J Immunol Methods* 1983; 58: 301-8.
82. Macy E, Kemeny M, Saxon A. Enhanced ELISA. How to measure less than 10 picograms of a specific protein (immunoglobulin) in less than 8 hours. *FASEB J* 1988; 2: 3003-09.
83. Jitsukawa T, Nakajima S, Sugawara I, Watanabe H. Increased coating efficiency of antigens and preservation of original antigenic structure after coating in ELISA. *J Immunol Methods* 1989; 4: 251-7
84. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, İkinci baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, 1995: 224-8
85. Schots A, Van der Leede BJ, De Jong E, Egberts E. A method for the determination of antibody affinity using a direct ELISA. *J Immunol Methods* 1988; 109: 225-33.
86. Muro Y, Ogawa Y, Sugiura K, Tomita Y. HLA-associated production of anti-DFS-70/LEDGF autoantibodies and systemic autoimmune disease. *Journal of Autoimmunity*, 2006; 26: 252- 257.
87. Tutkak H. Sistemik Otoimmün Romatolojik Hastalıklarda ve Sağlıklı Bireylerde Anti-DFS-70 Otoantikörleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.2010; s. 12-26.
88. Kang SY, Lee WI. Clinical significance of dense fine speckled pattern in anti-nuclear antibody test using indirect immunofluorescence method. *Korean J Lab Med* 2009; 29:145-51.
89. Şener AG, Afşar İ. Frequency of dense fine speckled pattern in immunofluorescence screening test. *Eur J Rheumatol* 2015; 2:103-5. <http://dx.doi.org/10.5152/eurjrheum.2015.0003>

90. Bizzaro N, Tonutti E, Visentini D, Alessio MG, Platzgummer S, Morozzi G, Antico A, Villalta D, Piller- Roner S, Vigevani E. Antibodies to the lens and cornea in anti-DFS-70 positive subjects. *Ann New York Acad sci.* 2007;1107: 174-83
91. Oatanabe A ,Kodera M , Sugiura K , Usuda T ,Tan E.M, Takasakd Y, Tomita Y , Muro Y. Anti-DFS-70 Antibodies in 597 Healty Hospital Workers. *Journal of Autoimmunity.* 2004; 26(4): 252-257
92. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibodypositive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011; 63:191-200. <http://dx.doi.org/10.1002/art.30084>
93. Mutlu E, Eyigör M, Mutlu D, Gültekin M. Confirmation of anti-DFS-70 antibodies is needed in routine clinical samples with DFS staining pattern. *Cent Eur J Immunol* 2016; 41:6-11.
94. Lee H, Kim Y, Han K, Oh EJ. Application of anti-DFS-70 antibody and specific autoantibody test algorithms to patients with the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells. *Scand J Rheumatol* 2016; 45:122-8.
95. Von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1995; 24, 323-358.

7. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Gaziantep’ de doğdu. 2008 -2014 yılları arasında Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde okudu. 2014 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladı.

