

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**OTOİMMÜN HASTALIKLARDA KARBONİK ANHİDRAZ I VE**  
**KARBONİK ANHİDRAZ II OTOANTİKORLARININ**  
**BELİRLENMESİNDE KARBONİK ANHİDRAZ MİKTARI ETKİSİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ayşegül UZUN**

**TRABZON-2007**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı öncelikle, danışman hocam sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA olmak üzere bilgilerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç. Dr. S. Caner KARAHAN, Yrd. Doç. Dr. Birgül KURAL ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, çalışmalarımdayken benden yardımını esirgemeyen Arş.Gör. Ahmet MENTEŞE, İbrahim TURAN, Dr. Utku UÇAR ve Arş.Gör. Müge KOPUZ'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsüne ve Biyokimya anabilim dalındaki bütün çalışma arkadaşlarıma, ayrıca beni bugünlere getiren aileme ve hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Temmuz, 2007**

**Ayşegül UZUN**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karbonik Anhidraz	3
2.1.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	3
2.1.2 Karbonik Anhidraz I (CA-I)	4
2.1.3 Karbonik AnhidrazI I (CA-II)	5
2.1.4 Karbonik Anhidraz aktivitesi Tayin Metodları	6
2.2. Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar	7
2.2.1. Otoimmünite	7
2.2.2. Otoimmün Hastalıklarda İmmünopatolojik Mekanizmalar	8
2.2.3. Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler	8
2.2.4. Otoimmün Hastalıklar	10
2.3. CA I ve CA II'nin Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi	11

3. MATERYAL ve METOD	12
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	12
	iv
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	13
3.3. Numunelerin Toplanması	15
3.4. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	15
3.5. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	16
3.6. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	17
4. BULGULAR	18
4.1. ELISA Sonuçları	18
4.1.1. CA I Otoantikörleri için ELISA Sonuçları	18
4.1.2. CA II Otoantikörleri için ELISA Sonuçları	19
4.2. İstatistiksel Bulgular	20
5. TARTIŞMA	21
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	23
7.ÖZET	24
8.SUMMARY	25
9.KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİŞ	30

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri, sulfonamidlere olan ilgileri ve hücre içi yerleşimleri	4
<b>Tablo 2.</b> Memeli karbonik anhidraz II izoenzimlerinin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi	6
<b>Tablo 3.</b> Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	13
<b>Tablo 4.</b> Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri	14
<b>Tablo 5.</b> Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	15
<b>Tablo 6.</b> CA I ve CA II otoantikörleri için ELİSA sonuçlarının istatistiksel analiz sonuçları	22

## ŞEKİLLER DİZİNİ

		<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1.</b>	CA I otoantikörleri için ELISA sonuçları	20
<b>Şekil 2.</b>	CA II otoantikörleri için ELISA sonuçları	21

## KISALTMALAR

CA	:Karbonik anhidraz
CARP	:Carbonic anhydrase related protein
ELISA	:Enzyme-linked immunesorbent assay
Ia	:I region associated
HLA	:Human leucocyte antigen
MHC	:Major histocompatibility complex
PBC	:Primer biliary cirrhosis
Ig G	:Immunoglobulin G
RA	:Romatoid artrit
AIH	:Autoimmun hepatitis
DNA	: Deoksiribonükleik asit
SLE	: Systemic lupus erythematosus
AIC	:Autoimmun cholangitis
NK	:Natural killer
SS	:Sjögren's Syndrome

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Karbonik Anhidraz (CA, E.C 4.2.1.1., Karbonat Hidroliyz), bakterilerden en gelişmiş hayvanlara kadar dağılım gösteren bir enzimdir. Bu enzimler aktif bölgelerinde  $Zn^{+2}$  iyonu ihtiva eden metaloproteinler olup, monomer yapıdadır. Temel olarak karbondioksitin hidrasyonunu katalizlerler. CA enzimleri organizmada metabolik yollarla oluşan  $CO_2$ 'in taşınması, elektrolit sekresyonu, asit-baz dengesinin düzenlenmesi ve biyosentetik  $HCO_3^-$  oluşturulması gibi olaylarda rol oynar (1). Bugüne kadar omurgalıların farklı organ ve dokularında, farklı hücre içi yerleşimleri olan 16 CA izoenzimi belirlenmiştir (2).

Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmasına bağlı olarak gelişen otoimmün hastalıklarda vücudun kendi proteinlerine karşı otoantikör oluşturduğu bilinmektedir (3). İlk kez 1991 yılında, Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus eritematos ve Sjögren's sendromlu hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin varlığı gösterilmiştir (4). Bu tarihten sonra çeşitli otoimmün hastalıklarda CA II otoantikörleri Western Blot ve ELISA yöntemleri ile belirlenmiştir (5-7). CA II safra kanalları, pankreatik kanallar, renal tübüler ve tükürük bezi kanallarının epitel hücrelerinde bol miktarda sentezlenir. Bu yüzden CA II' nin çeşitli ekzokrin bezlerin epitel hücrelerinden salgılanan yaygın bir hedef antijen olarak, otoimmün ekzokrinopati ve otoimmün epitelitis olarak isimlendirilen hastalık komplekslerinin patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (8). Ayrıca, CA II otoantikörleri sistemik lupus eritematos, sistemik skleroz, dermatomiyosit, polimiyosit, endometriosis, otoimmün hepatitli ve kronik viral hepatitli hastalarda da belirlenmiştir. Bu hastalıklarda CA II otoantikörlerinin hastalıkların patolojisindeki rolü anlaşılamamıştır (9, 10).

Endometriosis, otoimmün tiroid, romatoid artrit, sistemik skleroz, idiopatik kronik pankreatit, Sjögren's sendromu gibi otoimmün hastalıklar batı ülkelerindeki populasyonun yaklaşık % 5'ini etkilemektedir. Son yıllarda, bu otoimmün hastalıkların bazılarının belirlenmesinde ve benzer semptomlu hastalıklardan ayırt edilmesinde CA II antikörlerinin serum belirteci olarak kullanılıp kullanılmayacağı tartışılmaktadır (11). Daha önce, laboratuvarımızda CA II antikörlerinin ELISA yöntemi ile belirlendiği iki yüksek lisans tezi hazırlanmıştır. Dolayısıyla, ELISA'da çok önemli olan pratik deneyim kazanılmıştır. Daha önceden yapılan diğer araştırmalarda ve de laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmalarda hemolizden kaynaklanabilecek CA aktivitesinin ELISA ölçümlerine olabilecek muhtemel etkisi ortaya konulmamıştır. Bu araştırmada amacımız, önceden % 50 pozitif antiCA II



ELISA değerleri tesbit edilmiş olan (12) romatoid artritli hastaların serumlarında toplam CA aktivitesi ile anti CA II ELISA değerleri arasındaki ilişkiyi (korelasyon) kantitatif olarak ortaya koymaktır. Ayrıca, romatoid artritli hastalarda daha önceden araştırılmamış olan anti CA I ölçümlerini yapıp, bu değerlerin de toplam CA aktivitesi ile korelasyon gösterip göstermediği incelenecektir. Çünkü, bazı otoimmün hastalıklarda anti CA I'in de ortaya çıktığı bildirilmektedir (5, 13, 14).

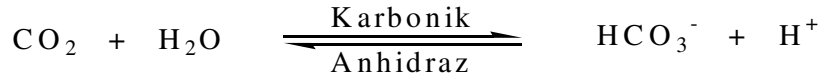
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karbonik Anhidraz

#### 2.1.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1) prokaryot ve ökaryotlarda bulunan, dağılımı geniş ve birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanan çinko ( $Zn^{2+}$ ) içeren metaloenzimlerdir. Omurgalılar, bakteriler, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında bulunan  $\alpha$ -CA'lar, daha çok bakteriler, algler ve tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında bulunan  $\beta$ -CA'lar, Archea ve bazı bakterilerde bulunan  $\gamma$ -CA'lar ve deniz diatomlarda bulunan  $\delta$ -CA'lar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Memelilerde doku dağılımı ve subselüler lokalizasyonu oldukça farklı olan onaltı ayrı  $\alpha$ -CA izoenzimi ve CA benzeri protein (CARP) bulunmaktadır (Tablo 1) (2).

CA, ilk defa, memelilerin eritrositlerinden 1933 yılında saflaştırılmıştır (15). Karbonik anhidraz karbondioksit ( $CO_2$ )' in hidrasyonu ve  $HCO_3^-$ 'in dehidrasyonundan sorumlu olan bir enzimdir (16) .



Bu reaksiyon ve ürünleri ile metabolizmada, asit-baz dengesinin sağlanması,  $CO_2$ 'nin taşınması, elektrolit sekresyonu, üregenez, lipogenez ve glukoneogenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve daha birçok fizyolojik ve patolojik proseslerde görev almaktadır (16).

Karbonik anhidraz yukarıdaki reaksiyonun dışında karboksilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehitlerin ve piruvatın hidrolizini de katalizler. Ancak, bunların fizyolojik önemi bugüne kadar gösterilememiştir (17).

**Tablo 1.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri, sulfonamidlere olan ilgileri ve hücre içi yerleşimleri (2)

<b>izoenzim</b>	<b>Katalitik aktivite (hidrataz)</b>	<b>Sülfonamide İlgisi</b>	<b>Hücre İçi Yerleşim</b>
CA I	Düşük	Orta	Sitozol
CA II	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CA VA	Düşük/Orta dereceli*	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta dereceli*	Yüksek	Tükürük ve sütte
CA VII	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CARP VIII	Yok	**	Sitozol
CA IX	Yüksek	Yüksek	Plazma membranı
CARP X	Yok	**	Salgılanır
CARP XI	Yok	**	Salgılanır
CA XII	Düşük	Çok yüksek	Plazma membranı
CA XIII	Orta dereceli	Orta –Yüksek	Sitozol
CA XIV	Orta dereceli	Yüksek	Plazma membranı
CA XV	Düşük	Bilinmiyor	Membrana bağlı

\*pH 7.4’de düşük, pH : 8.2 ve üzerinde orta dereceli

\*\*Doğal CARP ( CA related protein) izozimleri Zn içermemektedir. Bu nedenle sulfonamidlere olan afiniteleri ölçülmemiştir.

### 2.1.2. Karbonik Anhidraz I (CA I)

CA I, eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan bir protein olup konsantrasyonu 12 mg CA I/(gram hemoglobin)’dir. İnsan eritrositlerinde CA II’den yaklaşık 6 kat daha bol bulunan, fakat, aktivitesi CA II’nin %15’i kadar olan bir izoenzimdir( $K_{cat}=2.10^5s^{-1}$ ). Sağlam yetişkin eritrositlerinde CA I total CA aktivitesinin yaklaşık % 50 ‘sini oluşturmaktadır. CA I  $Cl^-$  tarafından inhibisyonda CA II’den daha fazla ve sülfonilamid inhibitörlerinden de CA II’ye göre daha az etkilenir. CA I, kalın barsağın epitelyumunda, kornea epitelyumunda, lenste, ter bezlerinde ve adipoz dokuda bulunur. CA I insan fetal eritrositlerinde bulunmaz. Kırmızı kan hücrelerinde

hemoglobinden sonra en bol bulunan protein olmasına rağmen hiçbir hematolojik anomaliler onun eksikliği sonucu ortaya çıkmaz. CA I izoenziminin fizyolojik önemi belli değildir. Diğer CA izoenzimlerinin ve başka mekanizmaların CA I eksikliğini telafi edebildiği tahmin edilmektedir(18).

### 2.1.3. Karbonik Anhidraz II (CA II)

CA II, hemen hemen her doku veya organdaki bazı hücre tiplerinin sitozolünde bulunan, maksimum CO<sub>2</sub> hidrasyonu turnover sayısına sahip olan ( $1.10^6 \text{ s}^{-1}$ ) ve en geniş dağılımlı, yüksek aktiviteli bir izoenzimdir (19).

CA II kemikte osteoklastlarda, beyinde, oligodendrositler ve beyin epitelyumunda, gözde lensler ve retina müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrekte, salgı bezlerindeki asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterusun endometriumunda, endotel hücrelerde, spermatozoada, eritrositlerde, trombositlerde bulunur (16). Bu hücre tiplerinde CA II'nin fiziksel rolü dönüşümlüdür. Bazı hücrelerde CA II asit-baz homeostazı için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon üretimi için H<sup>+</sup> salgılayan renal tubuler, gastrik parietal hücreler tarafından H<sup>+</sup> salgısına katkıda bulunur (16). CA II pankreas sıvısı için HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> katkısı yapan pankreatik kanal hücrelerine HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> temin eder. Dönüşümsüz körlüğe sebep olan glokom'da CA II enziminin önemli rolü vardır. Glokom anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkmaktadır. Dünyada on milyonu aşkın kişinin yüksek göz içi basıncına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (20). Aköz humorun salgılanmasında da CA II enziminin uyarıcı etkisi vardır. CA II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tübüllerde CO<sub>2</sub> değişimine katkıda bulunur (21). Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi Tablo 2'de gösterilmiştir (22).

**Tablo 2.** Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi (22).

Doku dağılımı	İşlevsel rolleri
❖ Yemek borusu (özefagus) ve larinks epiteli	❖ Mideden yemek borusu ve daha yukarı bölgelere mide içeriğinin geri akımını engeller
❖ Kemik osteoklast hücreleri	❖ Kemik resorpsiyonu
❖ Göz	❖ Aköz hümörün üretimi
❖ Testis	❖ Sperm hareketliliği
❖ Böbrek	❖ İdrar asidifikasyonu
❖ Beyin	❖ BOS salgısı
❖ Akciğer	❖ Gaz değişimi
❖ Eritrositler	❖ Gaz değişimi
❖ Gastrointestinal epiteli	❖ H <sup>+</sup> salgısı, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> salgısı

#### 2.1.4. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları

Karbonik anhidraz aktivitesi, enzimin CO<sub>2</sub> hidratasyonu, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenebilir. Katalizlediği reaksiyona bakıldığında, ortama göre CO<sub>2</sub> gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H<sup>+</sup> konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalan CO<sub>2</sub> gazı, kantitatif olarak monomerik yolla tespit edilebilir. Fakat monomerik metodun, reaksiyon pH'sının değişken olması, CO<sub>2</sub>'nin suda sınırlı çözülmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır (23). İkinci olarak, H<sup>+</sup> konsantrasyonu, pH'nın düşmesi veya yükselmesi gibi geçen süre potansiyometrik yolla veya indikatörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa zaman alması gibi avantajının yanı sıra reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması, CO<sub>2</sub>'nin suda sınırlı çözülmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır (24, 25). Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0.02-0.05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda, spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metodlar aktivite tayininde kullanılmaktadır.

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde, CO<sub>2</sub> hidratasyonunda pH'nın 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre, bromtimol mavisi indikatörü kullanılarak

bulunmakta ve enzim birimi, enzimsiz CO<sub>2</sub> hidratasyonu süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın t<sub>c</sub>'ye bölünmesi ile belirlenir (26).

Karbonik anhidrazın ester hidrolizleyici özelliğinden faydalanılarak da aktivitesi belirlenebilir. Kullanılan esterin birim zamanda hidrolizlenen miktarı spektrofotometrik olarak takip edilir ve enzimin aktivitesi bulunur. Bu amaçla en çok kullanılan ester *p*-nitrofenil asetatıdır. *p*-nitrofenil asetatın hidrolizi ile oluşan *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat iyonunun 348 nm'de verdiği absorbansın ölçümüyle aktivite tayin edilir (27, 28).

## 2.2. OTOİMMÜNİTE VE OTOİMMÜN HASTALIKLAR

### 2.2.1.Otoimmünite

İmmün sistemin başlıca görevi bünyenin kendisine yabancı antijenleri tanıma ve onlara karşı immün cevap oluşturmaktır. B ve T tipi lenfositler ile makrofajlar immün cevap oluşumundan ve denetiminden sorumludur (3). Canlılar normalde kendi doku antijenlerine karşı immün cevap vermemektedir. Ancak, bazı patolojik durumlara bağlı olarak hücre reseptörlerinin bozulması ile veya immün cevap ürünlerinden bazılarının değişik aktivite göstermesi ile, organizmada değişen doku antijenlerine karşı immün cevap oluşmaktadır. Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya otoimmünite, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara da otoimmün hastalıklar denilmektedir. Oluş mekanizması kesin olarak bilinmeyen bu tür hastalıkların tanısında organizmanın kendi dokularına karşı oluşan hücresel tip immün cevap ve oto-antikorların belirlenmesinden yararlanılmaktadır.

### 2.2.2.Otoimmün Hastalıklarda İmmünopatolojik Mekanizmalar

1- İmmün sistem araçlarıyla doğrudan temas halinde olmayan hücre içi maddeler organizma tarafından "kendisine ait" olarak tanınmamış olabilir. Bunlar dolaşıma karıştıkları takdirde bir immün cevaba yol açabilirler. Sempatik oftalmide etkili olan bir mekanizmadır; normal olarak gözün içerisinde bulunan ve dolaşıma karışmayan bir antijenin dolaşıma katılması bağışıklık cevabına neden olmaktadır.

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

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

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

### 2.2.3. Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler

#### Genetik Faktörler

Otoimmün hastalıkların patogeneğinde genetik, immünolojik ve viral faktörler rol oynamaktadır. Ia (I region associated) antijenleri makrofaj ve lenfositlerde bulunan ve MHC genleri tarafından kontrol edilen bir antijendir. Otoimmünitenin patogeneğinde HLA antijenlerini yöneten gen lokuslarının rolü olduğu belirlenmiştir.

#### İmmünolojik Faktörler

Otoantijenler baskılandığı veya fonksiyonları bozulduğu zaman otoimmün hastalık oluşmamaktadır. Yapısal olarak anomali kazanan otoantijenler veya ilaç gibi yabancı bir madde ile birleşerek çapraz reaksiyon verebilen otoantijenler, hücre membranında molekül yapısı değişen otoantijenler, Epstein - Barr virusu, bakteri lipopolisakkaridleri gibi poliklonal aktivatörlerin T veya B lenfositleri doğrudan uyarımıyla otoimmün hastalık oluşmaktadır

#### Hümmoral İmmün Cevap

Eritrositlere karşı oluşan antikorların, eritrositlerle birleşmesi ve komplemanın da aktivasyonu sonucu, sitolitik etki ile doku hasarı olmaktadır ve bu tür hastalıklara otoimmün hemolitik anemi denilmektedir. Eritrositlere karşı oluşan antikorlar eritrositlerle birleştiğinde,

bu eritrositlerin dalak ve karaciğer fagositer hücreleri tarafından tutulma ve tahrip edilmeleri hızla artmaktadır. Eritroblastozis fetaliste de mekanizma aynıdır. Tiroid hücre membran antijenlerine (tirotropin) karşı oluşan plasentadan geçebilen LATS antikörlerinin Fab kısımları, tiroid hücrelerini sürekli uyarak neonatal hipertiroidizme neden olmaktadır. Spermli aglutine eden antikörler, spermli servikal mukus içine girmesini engelleyerek steriliteye yol açmaktadır.

### **İmmün Kompleksler**

Doku antijenlerine karşı oluşan antikörler ile anti-nükleer antikörlerin kanda dolaşan antijen-antikör kompleksi oluşturarak bunların böbrek glomerül kapillerlerinde birikmeleriyle glomerülo nefrit; damar endotellerinde birikmeleri sonucu da vaskülitler meydana gelir. Sistemik lupus eritromatozda DNA-antijen-antikör, romatoid artritte romatoid faktör-IgG kompleksleri hastalığın oluşumundan sorumlu tutulmaktadır. Viral infeksiyonlarda immün kompleks oluşumuna daha sık rastlanılmaktadır.

### **Hücreyel İmmün Cevap**

Hücreyel otoimmün cevapta lenfokinler, hücre içi paraziti olabilen bakteri ve virüs enfeksiyonlarından sonra gelişen geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonları ve lenfosit-hedef hücre ilişkileri rol oynamaktadır. Freund adjuvantı karıştırılarak verilen beyin dokusu ile deney hayvanında ansefalomyelit oluşturulmakta ve bu hasta hayvanın lenfositleri normal hayvanlara nakledildiğinde aynı lezyonlar geliştirilebilmektedir. Lezyonların oluşumunda hücreyel cevabın ve NK hücrelerinin rolü olduğu sanılmaktadır. Kuduz aşısından sonra görülebilen ansafalit olgularında da aynı mekanizma düşünülmektedir

### **Viral Faktörler**

Bazı virüslerle duyarlı hayvan ve insanlarda kalıcı kronik tipte viral infeksiyonlar gelişmektedir. Yavaş virüslerin otoimmün hastalıklarla ve immün komplekslerin oluşumuyla ilişkisi kesin bilinmektedir. Fare lenfositik koriyomenenjit virüsü, kalıcı kronik viral infeksiyon ve immün komplekslerin oluşumuna neden olmaktadır. Aynı mekanizma ile hepatit B virusu poliartrit nodoza, Epstein-Bar virusu infeksiyöz mononükleoz ve Burkitt lenfoması oluşturmaktadır. İnfeksiyöz mononükleozlu hastaların B lenfositlerinin yüzeyinde bulunan Epstein-Bar virusunun viral antijen reseptörlerine (CD21) karşı duyarlılaşmış atipik T lenfositleri bulunmaktadır.



Kuru ve Creutzfeldt-Jacop hastalığında immün kompleksler oluşmaktadır. Antijen-antikor kompleksleri glomerul membranında ve kan damar duvarlarında birikmektedir.

#### **2.2.4. Otoimmün Hastalıklar**

Otoimmün hastalıkları klinik yönden hastalığın bulunduğu organlar bakımından 2 gruba ayırabiliriz. Bunlardan bazılarında hastalık bir organda görülmektedir. Tiroid hastalıkları (Hashimoto Hst, graves hst), pernisiyöz anemi, adison, juvenil diabet gibi... Bu otoimmün hastalıklara organa özgül otoimmün hastalıklar denir. Birden fazla organ tutulumu varsa organa özgül olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklar denir. Bunlara örnek, romatoid artrit, skleroderma, SLE verilebilir.

#### **Romatoid Artrit**

Periferik eklemlerde nonspesifik ve genellikle simetrik inflamasyon şeklinde kendini gösteren; eklemlerde ve eklem çevresindeki oluşumlarda ilerleyici harabiyetle sonuçlanma ihtimali yüksek olan, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Toplumda prevalansı %1-3 ve kadın/erkek oranı 3/1dir. Kadınlarda 3 kat fazla görülmesi ve sıklıkla menarştan sonra menapozdan önce görülmesi, hamilelik esnasında artması bize hormonal faktörlerin önemli olduğunu göstermektedir. Bunun yanında, genetik faktörler de önemlidir. HLA-DR4 geni taşıyanların % 70'inde RA bulunmuştur. İnfeksiyöz ajanlar da etiyolojide rol oynamaktadır. Buna rağmen, RA'lilerin sinovyal sıvısında herhangi bir infeksiyöz ajan partikülü tesbit edilememiştir. Fakat, proteus vulgarisin yüzey antijeni ile HLA-DR4 arasında çarpaz reaksiyon geliştiği bilinmektedir.

Hastaların eklem sıvısındaki B lenfositleri tarafından salgılanan anormal Ig G ve bunlara karşı oluşan romatoid faktörler ki bunlar Ig G ye karşı oluşmuş Ig M dir, birleşerek immün kompleksler oluşturmaktadır. Bu immün kompleksler klasik ve alternatif yoldan komplemanı aktive ederek inflamasyonu başlatmaktadır. Eklem sıvısında oluşan immün kompleksler bir miktar kanda da oluştuğu için vaskülitlere ve SLE benzeri semptomlara neden olmaktadır. SLE den farklı olarak immün kompleksler çok nadiren nefrite yol açar (29).

### 2.3. CA I ve II'nin Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi

Sjögren's sendromu, idiopatik kronik pankreatit, primer safra sirozu (PBC), primer sklerosik, renal tübüler asidozu içeren kuru gland sendromu veya otoimmün ekzokrinopati adı verilen hastalık grubunda farklı organların duktal epitel hücrelerinde eksprese edilen yaygın bir antijene karşı otoimmün bir cevabın varolabileceği ileri sürülmüştür (30, 31). Bu organlardan elde edilen ekstraktların çeşitli hayvan türlerine farklı adjuvantlarla immünizasyonu bazı immün hastalıklar oluşturulmuştur. Ancak bu ekstraktlardaki uyarıcı antijenin yapısı tanımlanamamıştır (32, 33).

İlk kez 1991 yılında, Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus eritematos ve Sjögren's sendromlu hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin varlığı gösterilmiştir (4). Nishimori ve arkadaşları SS 'lu hastalarda pankreas, tükürük bezi, böbrek ve özefagus gibi ekzokrin organların ekstraktlarında, CA II'ye bağlanan monoklonal bir antikörün varlığını göstermişlerdir (34). Yine aynı araştırmacılar 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada insan CA II'yi PL/J ırkı farelere immünize ederek otoimmün sialoadenitis oluşturmayı başarmışlardır (35). Daha sonraki yıllarda Ueno ve arkadaşları CA II immünizasyonu ile immün aracılıklı kolangitis oluşturmuşlardır (36).

Bu çalışmaları takiben, polimiyozit, sistemik sikleroz, endometriosis, otoimmün kolonjitis (AIC), kronik viral hepatit, diabet gibi çeşitli hastalıklarda CA otoantikörleri belirlenmiş ve hastaların serumlarından saflaştırılmıştır (3-5, 37, 38). Bazı hastalıklar için bu antikörlerin güvenilebilir bir teşhis göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür (39). Özellikle AIC ile antimitokondrial antijeni negatif PBC hastaların ayırımında kullanılabileceği ifade edilmiştir (40).

CA II otoantikörlerinin yukarıda bahsedilen hastalıkların patolojisindeki rolü anlaşılammıştır. Bazı araştırmacılara göre, hastalığın patolojik seyrine bağlı olarak oluşan doku harabiyetinin bir sonucu olarak CA II'ye karşı bir antikör oluşturulmaktadır. Faklı olarak bazı araştırmacılar ise, oluşan antikörlerin CA II'ye karşı oluşmadığını, ancak, moleküler taklitten(molecular mimicry) dolayı farklı bir antijene karşı üretilmiş antikörün CA ile ile çapraz reaksiyon verdiğini ve bu antijenin membrana bağlı diğer CA izoenzimleri (CA IV, IX, XII) olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Anti CA II'ye nispeten çok daha az sayıda olmakla beraber, otoimmün pankreatit, kronik pankreatit ve Sjögren's sendromu gibi hastaların serumlarında CA I antikörlerinin da varlığı bildirilmiştir (5, 13, 14). CA I otoantikörlerinin da yukarıda ifade edilen hastalıkların patolojisindeki rolü CA II'de olduğu gibi anlaşılammıştır.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeleri üreticileri ile Tablo 3'te listelenmiştir.

**Tablo 3.** Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

<b>Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler</b>	<b>Marka / Model</b>
Derin dondurucu	Vestel, Arçelik, Bosch
Saf su cihazı	Aquatron 4AD
ELISA yıkayıcısı	Diagnostics Pasteur LP 35
ELISA okuyucusu	Spektraflour plus, TECAN
ELISA pleyti	Coostar, yüksek bağlama kapasiteli
Etüv	Gallenkamp
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Hassas analitik terazi	Oertling NA 164
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet, 0.5-10 µL	Biohit, Proline
Otomatik pipet, 10-100 µL	Socorex
Otomatik pipet, 50-200 µL	Biohit, Proline
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Transferpette
Otomatik pipet, 1-5 mL	Exelpette
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Santrifüj	Heraeus, Labofuge 200
Soğutucu	Philco FRT 152 D
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU530, UV /VIS
Vorteks karıştırıcı	Nüve, NM 110

### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Tablo 4'te bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri verilmiştir.

**Tablo 4.** Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri

<b>Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>Satın Alındığı Firma, Kodu ve Saflığı</b>
Disodyummonohidrojenfosfatheptahidrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Merck, A547474
Asetazolamid	Sigma, A6011
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, % 30, d=1.11 (1.08597)
Süt tozu	Pınar
Sodyum bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, > % 99.5 (6329)
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma, lot 2029A
4-nitrofenilasetat	Sigma, lot 023K2604
Tris(hidroksimetilaminometan)	Merck, K3528987
Tween-20	Sigma, %10, P8942
Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human Ig G antikoru	Sigma, A-8792, Lot 103K4848
Sitrik asit (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O)	Sigma, C-1909, Lot 47H0808
<i>o</i> -fenilen diamin tabletleri	Sigma, P-1063, Lot 092K8205
Sülfürik asit (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carlo-Erba ,%96, (d=1.84 g/ml) no: 306657
Sodyum dihidrojen fosfat -dihidrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.)	Merck, (6345)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, > % 99 (6462)
Hidroklorik asit (HCl)	Carlo Erba, % 37, d=1.186 (7647-01-0)
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, 646 A-153371
Potasyum klorür (KCl)	Merck, %99-100.5 (711 TA299855)
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, % 99.5-100.5 (1.06400.1000)
Disodyumhidrojenfosfat-heptahidrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Merck, A547474
İnsan karbonik anhidraz I	Sigma, 125 K 6005
İnsan karbonik Anhidraz II	Sigma, 084 K 6004

Kullanılan çözeltiler ve bazılarının hazırlanışlarıyla yararlanıldığı yerler liste halinde Tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Kullanıldığı Yer ve Hazırlanışı
1 M NaOH	10 g NaOH saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
1 M HCl	Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı
Kaplama Tamponu (PH=9.6)	A çözeltisi: 0,2 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2,12 g / 100 mL), B çözeltisi: 0,2 M NaHCO <sub>3</sub> (1,68 g/100 mL) 8 mL A çözeltisi ve 17 mL B çözeltisi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. pH 9,6'ya ayarlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.
Birinci Yıkama Tamponu (PBS çözeltisi)	0,14 M (0,8 g ) NaCl, 2,7 mM (0,02 g ) KCl, 1,5 mM (0,02 g) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve 8,1 mM (0,2169 g) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O tartılıp bir miktar distile suda pH= 7,4'e NaOH ile ayarlandı. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
İkinci Yıkama Tamponu (Tween-20 – PBS çözeltisi)	0,14 M (0,8 g ) NaCl, 2,7 mM (0,02 g ) KCl, 1,5 mM (0,02 g) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve 8,1 mM (0,2169 g) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O tartılıp bir miktar distile suda pH=7,4'e NaOH ile ayarlandı. 50 µL tween-20 eklendi. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
Bloklama Tamponu	%3 süt tozu ihtiva eden birinci yıkama tamponu PBS çözeltisi. 3 g süt tozu 100 mL PBS'de çözülerek hazırlandı.
2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çözeltisi	ELISA'da reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.
Sitrat-fosfat tamponu (pH=4.8)	0,1 M (2,101 g) Sitrik asit (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O), 0,2 M (3,12 g) Sodyum dihidrojen fosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.) alındı. Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. pH 4,8'e ayarlandı. Substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı.
Substrat çözeltisi	10 mg orto-phenylene-diamine pH=4,8 olan sitrat-fosfat tamponunun 25 mL'sinde çözüldü. Kullanılmadan hemen önce çözeltiliye 10 µL, %30'luk hidrojen peroksit ilave edildi.
Antikor (konjugat) çözeltisi	5 µL Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikoru alındı ve seyreltme tamponu ile 10 mL'ye tamamlandı.
Seyreltme tamponu	%1süt tozu ihtiva eden birinci yıkama tamponu (PBS) çözeltisi. 1 g süt tozu 100 mL PBS'de çözülerek hazırlandı.
0.05M Tris-SO <sub>4</sub> Tamponu (pH=7.00)	6.057g tris yaklaşık 900 mL deiyonize suda çözülerek 1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile pH=7.00' a ayarlandı. Karbonik anhidraz aktivitesi tayininde kullanıldı.
3 mM p-nitrofenil asetat çözeltisi	27.2 mg p-nitrofenil asetat 1mL asetonda çözüldükten sonra karışmakta olan 49 mL deiyonize suya eklendi. Karbonik anhidraz aktivitesi tayininde substrat olarak kullanıldı ve çalışma günü taze olarak hazırlandı.
0.1M asetazolamid çözeltisi	1.11 g asetazolamid 13 mL 1 N NaOH'te çözüldü ve 0.05 M Tris-sülfat (pH=7.00) tamponu ile hacim 50 mL'ye tamamlandı. Serum karbonik anhidraz aktivitesini inhibe etmek için kullanıldı.
Eşdeğer tampon çözeltisi	13 mL 1 N NaOH alınarak, 0.05 M Tris- SO <sub>4</sub> (pH=7.00) tamponu ile hacim 50mL'ye tamamlandı. Yukarıdaki asetazolamidin çözüldüğü çözeltilinin aynısı olan bu çözelti inhibitör çözeltilisindeki NaOH'ten meydana gelebilecek pH yükselmesinin aktiviteye olumsuz etkisini bertaraf etmek amacıyla karbonik anhidraz aktivitesi tayininde kullanıldı..

### 3.3. Numunelerin Toplanması

Çalışmamızda kullanılan serumlar KTÜ Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon polikliniğine başvuran ve romatoid artrit tanısı konulan hastalardan (n=32, 25 kadın / 7 erkek) ve kontrol grubu da gönüllü hastane çalışanlarından (n=24, 9 kadın / 15 erkek) alınan kanlardan elde edildi. Alınan kanlar pıhtılaşmaları için 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar çalışma gerçekleştirilene kadar -20 °C' de saklandı.

### 3.4. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Çalışma gruplarındaki bireylerin CA I ve CA II otoantikör seviyelerini belirlemek için Hosoda ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELISA yöntemi küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı (41). Her bir numune için ölçümler iki kez tekrarlandı.

#### Deneyin Yapılışı

1. pH'sı 9,6 olan kaplama tamponunda seyreltilen ve konsantrasyonu 10 µg/mL olarak hazırlanan CAI veya CA II'den 50 µL ile ELISA pleytindeki her bir mikrotiter kuyucuk kaplandı ve 18 saat +4 °C'da inkübasyona bırakıldı (Kaplama yapılırken her serum örneği için 4 kuyucuk ayrılır ve bu kuyucukların ikisi CA I veya CA II ile kaplanır, ikisi kaplanmaz. Kaplı olan kuyucukların absorbans değerlerinden kaplanmamış olan kuyucukların absorbans değerleri çıkartılarak sonuçlar değerlendirilir).

2. Pleyt PBS tamponu (birinci yıkama çözeltisi) ile 5'er dakika arayla ve bu aralarda pleytler çalkalayıcıda bekletilerek üç kez yıkandı. Yıkama işlemi için, önce, ELISA yıkayıcısında bir kez yıkanan pleyte sekizli pipetle 200 µL yıkama tamponu pipetlendi ve çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandıktan sonra yeniden ELISA yıkayıcısında yıkanması sağlandı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

3. Yıkama işleminin tamamlanmasıyla pleytte her bir kuyucuğa 200 µL bloklama tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında iki saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

4. İki saat inkübasyon sonunda bloklamanın sona erdiği pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile aynen ikinci basamakta anlatıldığı gibi üç kez yıkandı.

5. %1 sütünzu içeren PBS ile hazırlanan seyreltme tamponunda 1/200 oranında seyreltilen hasta ve kontrol serumlarından 100 µL CA I veya CA II kaplanmamış iki kuyucuğa ve CA I veya CA II kaplanmış iki kuyucuğa ayrı ayrı pipetlendi ve iki saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

6. İnkübasyonun ardından pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile ikinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı.

7. %1 sütünzu ihtiva eden seyreltme tamponuyla 1/200 oranında seyreltilmiş antikor (horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikor)çözeltisinden kuyucuklara 100 µL ilave edildi ve oda sıcaklığında bir saat çalkalayıcıda bekletildi.

8. Tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile pleyt ikinci basamakta izah edildiği gibi tekrar üç kez yıkandı.

9. 100 µL substrat çözeltisi ilave edilen pleyt 25 dakika süreyle karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildi.

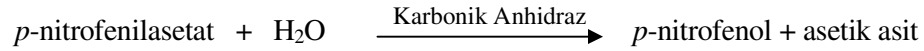
10. 100 µL 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bütün kuyucuklara pipetlenerek reaksiyonun durdurulması sağlandı ve ELISA okuyucusunda 485 nm’de absorbanlar okundu.

CA kaplanmış kuyucuklardan okunan absorbanların ortalamasından CA kaplanmamış kuyucukların ortalaması çıkarılarak sonuçlar elde edildi. Bu şekilde, serumlardaki antiCA miktarları 485 nm’deki absorban artışı olarak belirlenmiş oldu.

### 3.5 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

Serum CA aktivitesi tayini Armstrong ve akadaşları tarafından geliştirilen esteraz aktivitesi metodu ile yapıldı (27). Metodun prensibi; karbonik anhidrazın *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenol ve asetata hidrolizlemesi esasına dayanır. Oluşan *p*-nitrofenolün absorbanı 348 nm’de spektrofotometrik olarak takip edilerek CA aktivitesi tayin edilir. Fenol grupları asidik olduklarından reaksiyon ortamının pH’sına göre değişen oranda fenolat ve H<sup>+</sup> iyonlarına ayrılmaktadır. Fakat, *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat 348 nm’de aynı absorbanı

gösterdiklerinden aktivite tayinini etkilememektedirler (27, 42). Reaksiyon denklemi şu şekildedir:



Serum numunelerinde CA aktivitesi tayin işlemleri için; önce, her bir serumda toplam esteraz aktivitesi tayin edildi. Bu amaçla, deney tüplerine 1.3 mL Tris-SO<sub>4</sub> tamponu, 0.1 mL serum ve 0.1 mL eşdeğer tampon çözeltisi konularak oda sıcaklığında iyice karıştırıldı. Daha sonra üzerine 1,5 mL *p*-nitrofenilasetat çözeltisi ilave edildi ve karışım spektrofotometre küvetine alınarak hemen 348 nm’de absorbansı okundu. Bu andan itibaren üç dakikalık inkübasyon süresinden sonra tekrar absorbans okundu. Başlangıçta ve inkübasyon dönemi sonunda okunan absorbanslar arası fark esteraz aktivitesi olarak alındı. Bu deney ile serumda total CA ve ester hidrolizleyici diğer enzimlerin toplam aktiviteleri ölçülmüş oldu.

İkinci aşamada 0.1 M asetazolamid çözeltisi kullanılarak serumlardaki CA tamamen inhibe edildi. Bu amaçla deney tüplerine 1.3 mL Tris-sülfat tamponu, 0.1 mL serum ve 0.1 mL inhibitör çözeltisi ilave edildi. Bu karışım enzim-inhibitör etkileşiminin tam olarak sağlanabilmesi için on dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra üzerine 1.5 mL substrat çözeltisi eklenerek hemen 348 nm’de absorbans okundu. Bu andan itibaren üç dakikalık inkübasyon süresini takiben tekrar absorbans okundu ve absorbans farkı bulundu. Birinci aşamada bulunan total esteraz aktivitesi değerinden(ölçülen absorbans değerinden) bu aşamada bulunan değer çıkarılarak total esteraz aktivitesi içindeki CA aktivitesi payı absorbans olarak bulunmuş oldu. Esteraz aktivitesi olarak bulunan bu absorbans değerleri enzim ünitesine çevrilmeden, doğrudan, korelasyon testinde kullanıldı.

### 3.6. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Hasta ve kontrol grupları için elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlenmiştir. Normal dağılıma uyanlarda Student t testi, normal dağılıma uymayanlarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak alınmıştır.

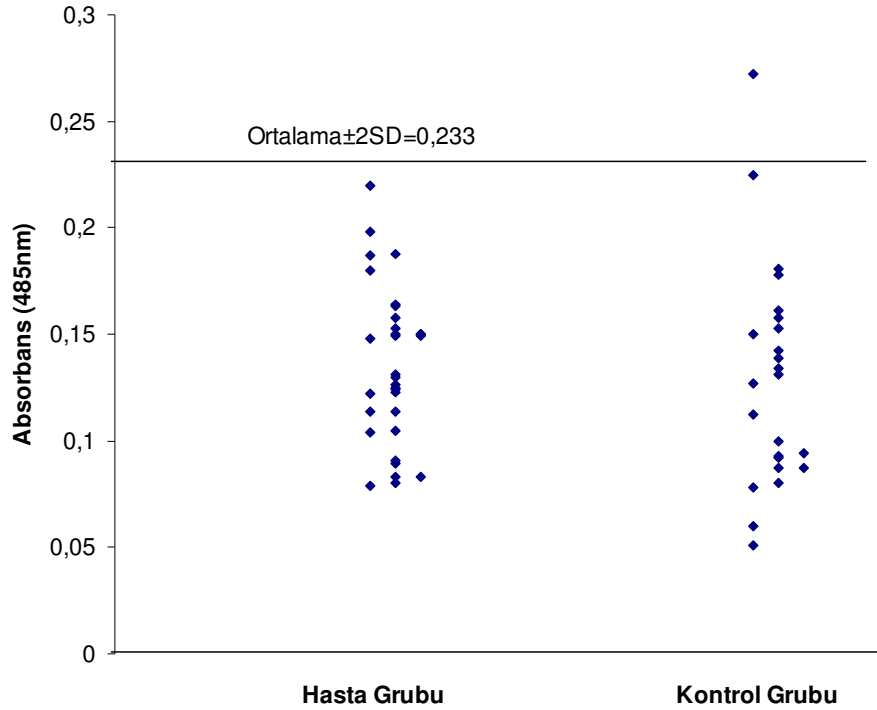


## 4. BULGULAR

### 4.1. ELISA Sonuçları

#### 4.1.1 CA I Otoantikörleri İçin ELISA Sonuçları

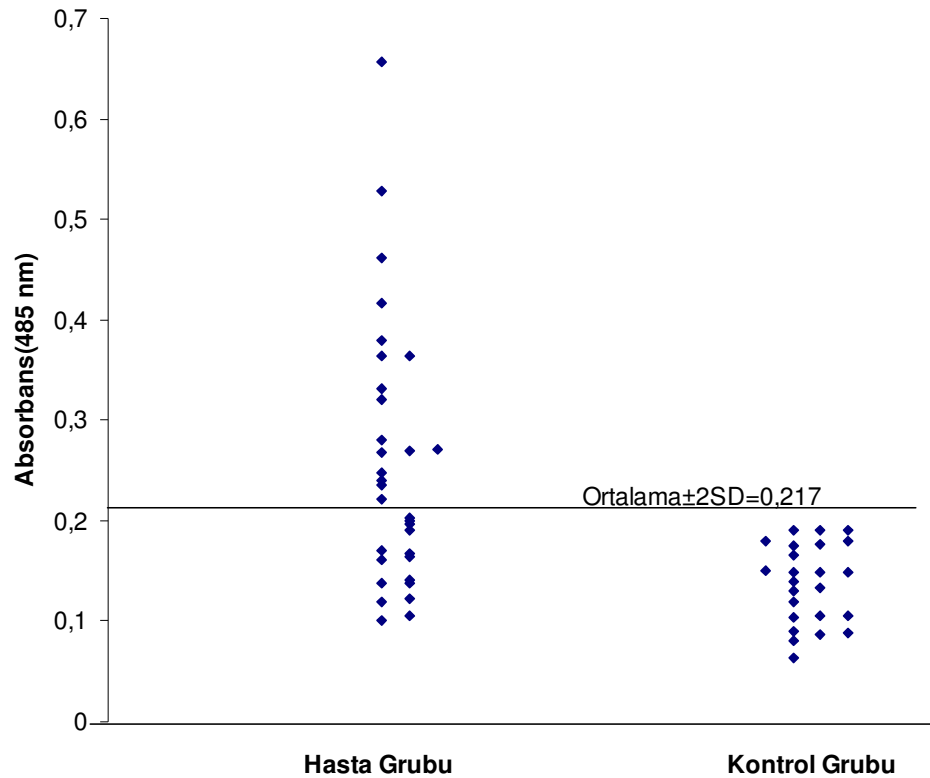
32 romatoid artritli hasta ve 24 sağlıklı bireylere ait serumlarda ELISA metodu ile CA I otoantikör düzeylerine bakıldı. Ortalama absorbans değeri 0.233'ten büyük olan bireyler pozitif olarak kabul edildi (cut off değeri). Bu değer kontrol grubuna ait ortalama absorbans değerine (0.129) 2SD (Standart sapma) değeri (0.052) eklenerek bulundu. Serumlarında CA I otoantikörü içeren romatoid artritli ve sağlıklı bireylere ait absorbans değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Romatoid artritli 32 hastanın serumlarında pozitif sonuç bulunmazken kontrol grubunda 1 pozitif sonuç elde edilmiştir (% 4,2).



Şekil 1. CA I antikörleri için ELISA sonuçları

#### 4.1.2. CA II Otoantikörleri İçin ELISA Sonuçları

32 romatoid artritli hasta ve 24 sağlıklı bireylere ait serumlarda ELISA metodu ile CA II otoantikör düzeylerine bakıldı. Ortalama absorbans değeri 0.217'den büyük olan bireyler pozitif olarak kabul edildi. Bu değer kontrol grubuna ait absorbans ortalaması olan 0.137 değerine 2SD (0.040) eklenerek bulundu. Serumlarında CA II otoantikörü içeren romatoid artritli ve sağlıklı bireylere ait absorbans değerleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Romatoid artritli hasta grubuna ait bireylerin serumlarının 17 tanesinde pozitif sonuç bulundu (% 53). Kontrol grubuna ait bireylerin serumlarında ise pozitif sonuç bulunamamıştır.



Şekil 2. CA II antikörleri için ELISA sonuçları

## 4.2. İstatistiksel Bulgular

Hasta grubundaki CA II otoantikör düzeyi  $0,255 \pm 0,128$  (ortalama $\pm$ SD), kontrol grubunda ise  $0,137 \pm 0,040$  bulundu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ).

Hasta grubundaki CA I otoantikör düzeyi ise  $0,135 \pm 0,036$ , kontrol grubunda da  $0,129 \pm 0,052$  bulunmuş olup, aralarında istatistiksel yönden anlamlı bir fark görülmedi ( $p = 0,965$ ).

**Tablo 6.** CA I ve CA II antikörleri için ELISA değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

	Hasta(n=32)	Kontrol(n=24)
CA I Otoantikörü	$0,135 \pm 0,036$	$0,129 \pm 0,052$
CA II Otoantikörü	$0,255 \pm 0,128^*$	$0,137 \pm 0,040$

\* Mann Whitney U testine göre,  $p < 0,001$

CA I ve CA II otoantikör düzeyleri ile esteraz aktivitesi arasında bir ilişkinin olup olmadığının anlaşılması için Pearson korelasyon testi uygulandı. Burada, CA'nın aktivitesi enzim ünitesi olarak değil de, absorbans olarak alınmış ve bu değerler, ayrıca, tablo halinde verilmemiştir. Hasta grubunda CA I otoantikör düzeyi ile esteraz aktivitesi arasında pozitif yönde oldukça düşük bir korelasyon, ( $r = 0,016$ ) olup, istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 0,927$ ). Kontrol grubunda CA I otoantikör düzeyi ile esteraz aktivitesi arasında negatif yönde düşük bir korelasyon, ( $r = -0,157$ ) olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p = 0,435$ ). Hasta grubunda CA II otoantikör değerleri ile esteraz aktiviteleri arasında negatif yönde düşük ve anlamsız bir korelasyon, ( $r = -0,269$ ,  $p = 0,107$ ) elde edildi. Kontrol grubunda ise, CA II otoantikör düzeyi ile esteraz aktivitesi arasında negatif yönde düşük ( $r = -0,026$ ), istatistiksel olarak da anlamlı olmayan ( $p = 0,898$ ) bir korelasyon bulundu.

## 5.TARTIŞMA

Bazı otoimmün hastalıklarda karbonik anhidraz II izoenzimi antikorlarının varlığının Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus erithematos ve Sjögren sendrom'lu hastaların serumlarında gösterilmesinden sonra, çeşitli otoimmün hastalıklarda CA II otoantikoru Western Blot ve ELISA yöntemleri ile belirlenmiştir (5-7). CA II safra kanalları, pankreatik kanallar, renal tubüler ve tükürük bezi kanallarının epitel hücrelerinde bol miktarda sentezlenir. Bu yüzden CA I'nin çeşitli ekzokrin bezlerin epitel hücrelerinden salgılanan yaygın bir hedef antijen olarak, otoimmün ekzokrinopati ve otoimmün epitelitis olarak isimlendirilen hastalık komplekslerinin patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (8).

Endometriosis, otoimmün tiroid, romatoid artrit, sistemik skleroz, idiopatik kronik pankreatit, Sjögren's sendromu gibi otoimmün hastalıklar batı ülkelerindeki populasyonun yaklaşık % 5'ini etkilemektedir. Son yıllarda, bu otoimmün hastalıkların bazılarının belirlenmesinde veya benzer görünümlü bazı hastalıkların ayırılmasında serum belirteci olarak CA II otoantikoru kullanılması tartışılmaktadır(10, 11, 43). Daha önce, anabilim dalımız laboratuvarlarında ELISA yöntemi ile CA II antikorlarının ölçüldüğü iki çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, hem laboratuvarlarımızda ileride yapılacak araştırmalarda yardımcı olmak, hem de, literatürdeki boşluğu gidermek için hemolizden kaynaklanabilecek CA aktivitesinin ölçümlere etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, 32 romatoid artritli hastaların serumlarında, 24 adet kontrolle birlikte, toplam CA aktiviteleri ve CA I ve II antikorları ölçülerek, aralarındaki ilişki kantitatif olarak incelenmiştir.

Çalışmamızda ve sonuçların değerlendirilmesinde ne hasta grubunda, ne de kontrol grubunda kadın-erkek kategorizasyonuna gidilmemiştir. Bu husus bulunabilen hasta ve kontrol grubunun dağılımından (hasta için n=32, 25 kadın / 7 erkek ve kontrol grubu için n=24, 9 kadın / 15 erkek) kaynaklanmıştır.

Yaptığımız ELISA testleri sonucunda ( Tablo 6, Şekil 1 ve 2) anti CA I için hiç pozitif bir değer bulunmazken, anti CA II için de % 53 oranında pozitif değerler elde edilmiştir. Romatoid artrit hastalarında daha önceden yapılmış bir CA I antikorları

çalışmasına rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu değerleri mukayese imkanımız bulunmamaktadır. Ancak, başka hastalık gruplarında yapılmış olan ELISA ölçümlerinde, anti CA I seviyeleri anti CA II'den daha büyük ve daha fazla pozitif değerlerde bulunmuştur(5, 13, 14). Bizim ölçümlerimizde durum bunun tam tersidir (Tablo 6). Ayrıca, kontrol grubundan anlamlı bir farklılığı da bulunmamaktadır. Sonuç olarak, romatoid artritte anti CA I seviyelerinin değişmediği ifade edilebilir. A. Menteşe yaptığı tez çalışmasında 20 kişilik aynı hastalık grubunda CA II antikoru için yaklaşık %50'lik bir pozitiflik bulmuştur ve bizim sonuçlarımızla da uygunluk göstermektedir.

Bu çalışmayla, öncelikli olarak, seruma eritrositlerin hemolizi sonucu geçebilecek olan karbonik anhidraz enzimlerinin anti CA'ların ELISA ölçümlerini etkileyip etkilemeyeceğini ortaya koymak istedik. Bu amaçla hasta ve kontrol grubu serumlarında ölçülen toplam CA aktiviteleri ile anti CA değerleri arasında korelasyon testi uyguladık. Sonuçta, hasta grubunda, CA I otoantikör düzeyi ile esteraz aktivitesi arasında pozitif yönde oldukça düşük ( $r= 0,016$ ) ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p= 0,927$ ) bir korelasyon, kontrol grubunda, CA I otoantikör düzeyi ile esteraz aktivitesi arasında negatif yönde düşük ( $r=-0,157$ ) ve istatistiksel olarak önemsiz ( $p= 0,435$ ) bir korelasyon ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde, hasta grubunda CA II otoantikör düzeyi ile esteraz aktivitesi arasında negatif yönde düşük ( $r=-0,269$ ) ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan ( $p= 0,107$ ) bir korelasyon, kontrol grubunda da CA II otoantikör düzeyi ile esteraz aktivitesi arasında negatif yönde düşük ( $r=-0,026$ ) ve istatistiksel olarak önemsiz ( $p= 0,898$ ) bir korelasyon gözlenmiştir. Bu durumda, ELISA ile anti CA ölçümlerinde, serumda eritrositlerden normal şartlarda gelmesi muhtemel CA'ların etkili olmadığı ve gözle kolay farkedilir bir aşırı hemoliz olmadığı sürece serum CA aktivitesinin dikkate alınmasına gerek olmadığı sonucuna varılmıştır.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. 32 romatoid artritli hastada CA II otoantikör düzeyi  $0,255 \pm 0,128$  (ortalama $\pm$ SD), kontrol grubunda ise  $0,137 \pm 0,040$  bulundu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ).
2. Aynı grupta CA I otoantikör düzeyi ise  $0,135 \pm 0,036$ , kontrol grubunda da  $0,129 \pm 0,052$  bulunmuş olup, aralarında istatistiksel yönden anlamlı bir fark görülmedi ( $p = 0,965$ ).
3. Yukarıdaki ELISA ölçümlerinde anti CA II için %53, anti CA I için % 0 pozitiflik belirlendi.
4. CA I ve CAII otoantikör düzeyleri ile serum esteraz aktiviteleri arasında bir korelasyon belirlenemedi.
5. Yukarıdaki veri ve istatistiksel analizleri sonucunda ELISA yöntemi ile CA antikörlerinin belirlenmesinin hemolizsiz normal serumlarda CA aktivitesinden etkilenmediği kanısına varıldı.
6. Hemoliz derecesini, hemoglobün seviyesiyle belirleyerek, ne kadarının ELISA yöntemi ile CA antikörlerinin ölçümünü inhibe edebileceğinin ortaya koyulması faydalı olacaktır
7. Anti CA I'in daha geniş bir hasta grubunda çalışılarak, daha güvenilir bir referans tabanı oluşturulması gelecekte yapılacak mukayeseler açısından uygun olacaktır.

## 7. ÖZET

Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immun cevap oluşturmaya bağılı olarak gelişen otoimmun hastalıklarda vücudun kendi proteinlerine karşı otoantikor oluşturduğu bilinmektedir. İlk kez 1991 yılında, Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus erithematos ve Sjögren sendromlu hastaların serumlarında CA II otoantikorlarının varlığı gösterilmiştir. CA II, eritrositlerden başka insanda en yaygın CA izoenzimidir ve safra kanalları, pankreatik kanallar, renal tubüler ve tükürük bezi kanallarının epitel hücrelerinde bol miktarda sentezlendiğinden CA II yaygın bir hedef antijen olarak düşünülmektedir. Bu yüzden, anti CA ölçümü bazı otoimmün hastalıkların belirlenmesinde önem kazanmıştır.

Bu çalışmada, romatoid artritli bir hasta grubunda serumdaki karbonik anhidraz enziminin CA I ve CA II antikorlarının ELISA ile ölçümü üzerindeki etkisi incelenmiştir. 32 kişiden ibaret (25 kadın / 7 erkek) hasta ve 24 kişiden oluşan (9 kadın / 15 erkek) kontrol gruplarındaki şahısların serumlarında ELISA yöntemiyle CA I ve CA II antikorlarının ve esteraz aktivitesi ölçümü ile de toplam CA'ın miktarları belirlenmiştir.

Deneysel ve istatistiksel analizler sonucunda CA II otoantikor düzeyi  $0,255 \pm 0,128$  (ortalama $\pm$ SD), kontrol grubunda ise  $0,137 \pm 0,040$  bulundu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ). CA I otoantikor düzeyi ise  $0,135 \pm 0,036$ , kontrol grubunda da  $0,129 \pm 0,052$  bulunmuş olup, aralarında istatistiksel yönden anlamlı bir fark görülmedi ( $p = 0,965$ ). ELISA değerlerinde CA II için %53'lük bir pozitiflik bulunurken, anti CA I için pozitif bir değer yoktu. CA I ve CA II otoantikor düzeyleri ile serum CA aktiviteleri arasında bir ilişkinin olmadığı korelasyon testi sonucu görüldü.

Sonuç olarak, ELISA yöntemi ile CA antikorlarının belirlenmesinin, hemolizsiz normal serumlarda, CA aktivitesinden etkilenmediği kanısına varıldı.

## 8. SUMMARY

Autoimmune diseases arise from the immune responses of the body to its own antigens. In 1991, the presence of anti-CA II antibody has been first reported by Inagaki and et al. in the serums of patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. CA II, other than erythrocytes, is the most widely seen CA isoenzyme. Since it is abundantly expressed in the epithelium of biliary, pancreatic, renal and salivary gland ducts, CA II is suggested to be a widespread target antigen. For that reason, it has become important to determine the CA antibody levels for some autoimmune diseases.

Here, for a group of rheumatoid arthritis, the effect of serum CA enzyme activity on determination of CA I and CA II levels by ELISA has been investigated. In the sera of 32 patients(25 female/7 male) with rheumatoid arthritis and 24 healthy persons(9 female/15 male) CA I and CA II antibody by ELISA method and total CA by esterase activity have been determined.

According to the experimental and statistical analysis, the following results were obtained: 1- the levels of CA II antibody were  $0,255 \pm 0,128$  (mean $\pm$ SD) for the patients,  $0,137 \pm 0,040$  (mean $\pm$ SD) for the healthy group with a statistically significant difference ( $p < 0,001$ ), whereas, CA I antibody were  $0,135 \pm 0,036$  (mean $\pm$ SD) for the patients,  $0,129 \pm 0,052$  (mean $\pm$ SD) for the healthy group without a statistically significant difference ( $p = 0,965$ ), 2- in the ELISA of CA II antibody 53% positivity were obtained whereas no positive value of CA I antibody was found and 3- no relationships between the CA I and CA II antibody levels and serum CA activities were seen after a correlation test.

It was concluded that the measurement of CA antibodies by ELISA had not been affected by CA activity in the normal non-hemolyzed sera.



## 9. KAYNAKLAR

1. Maren, T.H.: Carbonic Anhydrase, Physiology and Inhibition, *Physiol*, 47: 595, 1967.
2. Supuran, C.T., Scozzafava A.: Carbonic Anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15:4336-4350, 2007.
3. Ian, R., Mackay, M.D., Fred, S., Rosen, M.D.: Autoimmun diseases. *N Engl J Med*, 345 (5), 2001.
4. Inagaki, Y., Jinno-Yoshida Y., Ueki H.: A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome, *J Dermatol Sci*, 2:147-54,1991.
5. Kino-Ohsaki, J., Nishimori, I., Momarita, M.:Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and sjögren syndrome. *Gastroenrology*,110:1579-86, 1996.
6. Ito, T., Nakano, I., Koyanagi, S., Miyahara, T., Migita, Y., Ogoshi, K., et al.: Autoimmun pancreatitis as a new clinical entity. Tree cases of autoimmun pancreatitis with effective steroid therapy. *Dig Dis Sci*, 42:1458-68, 1997.
7. Gordon, S.C., Quattrociocchi-Longe, T.M., Khan, B.A., Kodaali, V.P., Chen, J., Silverman, A.M., et al. Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. *Gastroenterology* , 108:1802-9, 1995.
8. Nishimori, I., Akisawa, N., Miyaji, E., Kohsaki, T., Iwasaki, S., Onishi, S.: Serum antibody to carbonic anhydrase II in patients with chronic viral hepatitis: a review of its prevalence in liver diseases, *Hepatology Research*, Vol.30, 210-213, 2004.
9. Invernizzi, P., Battezzati, P. M., Crosignani, A., Zermiani, P., Bignotto, M., Del papa, N., Zuin, M., Podda, M.: Antibody to carbonic anhydrase II is present in primary biliary cirrhosis (PBS) irrespective of antimitochondrial antibody status. *Clin Exp Immunol*, 114:448-454, 1998.
10. Akisawa, N., Nishimori, I., Miyaji, E., Iwasaki, S., Maeda, T., Shimizu, H., Sato, N., Onishi, S.: The ability of anti-carbonic anhydrase II antibody to distinguish autoimmune cholangitis from primary biliary cirrhosis in japanese patients. *J Gastroenterol*, 34:366-371, 1999.

11. [Aparisi, L., Farre, A., Gomez-Cambronero, L., Martinez, J., De Las Heras, G., Corts, J., and et al.](#): Antibodies to carbonic anhydrase and IgG4 levels in idiopathic chronic pancreatitis: relevance for diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Gut*, 54(5):703-9, 2005.
12. Mentşe, A.. Otoimmun hastalıklarda CA II otoantikörlerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Trabzon, 2005.
13. Bartolome, M.J., de las Heras, G, and Lopez-Hoyos, M.: Low-avidity antibodies to carbonic anhydrase-I and -II in autoimmune chronic pancreatitis. *Scientific World Journal*, 112:1560-8, 2002.
14. [Frulloni, L., Bovo, P., Brunelli, S., Vaona, B., Di Francesco, V., Nishimori, I. and Cavallini, G.](#): Elevated serum levels of antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas*, 20(4):382-8, 2000.
15. Lindskog, S.: Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase, *Pharmacol.Ther.*, Vol: 74, No:1:1-20, 1997.
16. Sly, S.W., Hu, Y.P.: Human Carbonic Anhydrase and Carbonic Anhydrase Deficiencies, *Annual Reviews*, 64: 375-401, 1995.
17. Pocker, Y.: Molecular Control of Carbonic Anhydrase Activity: Ionic Effectors, Differential Modifiers and Novel Inhibitors. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botre, F., Storey, B. T., Gros, G., (Eds.) Wienheim, VCH Publishers, pp 75-85, 1991.
18. Careter, M.J.: Carbonic Anhydrase: Isoenzymes Properties, Distribution and Functional Significance, *Biological Review*, 42:462-475, 1972.
19. Robyt, J.F., White, B.J.: *Biochemical Techniques Theory and Practise*, Press Inc., s.95, 1990.
20. Maren, T.H., Jankowska, I., Sanyal, G., Edelhauser, H.F.: The Transcorneal Permeability of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Effect on Aqueous Humor Secretion, *Exp.Eye.Res*, 33: 457, 1983.
21. Epstein, D.L., Grant, W.M.: Carbonic Anhydrase Inhibitors Side Effects; Serum Chemical Analysis, *Arc.Ophthalmol*, 85:1387, 1977.
22. Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T.C.: Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects, Vol.119, No. 3: 199-229, 2004.
23. Wilbur, K.M., Anderson, N.G.: Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase, *Journal of Biological Chemistry*, 76: 146, 1948.
24. Maren, C.H.: Simplified Micromethod for the Determination Carbonic Anhydrase and its Inhibitors, *Journal of Pharmacology Expedition Therapeutic* 130:26, 1960.

25. Conroy,C.W., Maren T.H.: The Determination of Osteopetrotic Phenotypes by Selective Inactivation of Red Cell Carbonic Anhydrase Isoenzymes, *Clinica Chimica Acto.*, 15:3347, 1985.
26. Mathews, C.K., Holde, K.E.V.: *Biochemistry*, The Benjamin Publishing Company Inc., Oxford, 1990, 308-317.
27. Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T.: Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *J Biol Chem.* 12 (18):4221-29, 1967.
28. Koester, M.K., Pullan,L.M., Noltmann, E.A.: The p-nitrophenyl Phosphatase Activity of Muscle Carbonic Anhydrase. *Arch Biochem Biophys.* 211 (2):632-42, 1981.
29. <http://www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=10&Article=256> (04.06.2005). Ortatatlı, M.: GATA Infeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı.
30. Epstein, O., Chapman, R. W. G., Lake-Bakaar, G., Foo, A. Y., Rosalki, S. B., and Sherlock, S.: The pancreas in primary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 83:1177.
31. Strarand, V., and Talal, N.: Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bull. Rheum, Dis.* 30:1046, 1980.
32. Whaley, K., and MacSween, R. N. M.: Experimental induction of immune sialoadenitis in guinea pigs using different adjuvants. *Clin. Exp. Immunol*, 17: 681, 1974.
33. White, S. C., and Casarett, G. W.: Induction of experimental autoallergic sialoadenitis. *J. Immunol*, 112: 178, 1974.
34. Nishimori, I., Okazaki, K., Morita, M., Tamura, S., and Yamamoto, Y.: Identification of autoantibodies to a pancreatic antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *J. Clin. Immunol*, 13: 265, 1993.
35. Nishimori, I., Bratonova, T., Toshkov, I., Caffrey, T., Mogaki, M., Shibata, Y., and A.Hollingsworth, M.: Induction of Experimental Autoimmune Sialoadenitis by Immunization of PL/J Mice With Carbonic Anhydrase II, *The journal of immunology*, 154:4865-4873, 1995.
36. Ueno, Y., Ishii M., Takahashi, T., Toyota, T., and Larusso, N.F.: Different Susceptibility of Mice to Immune-mediated Cholangitis Induced by Immunization with Carbonic Anhydrase II, *Lab Invest*, 78:629-637, 1995.
37. Frederick, L., Kiechle, M. D., Therese, M., Quattrociochi-Longe, M. S., David A. Brinton, M. D.: Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am J Clin Pathol*, 101: 611-615, 1994.
38. Kiechle, F.L., Quattrociochi-Longe, T.M., Brinton, D.A.: Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am J Clin Pathol*;101:611-5, 1994.

39. Kiechle, F. L., Quattrocioni-Longe, T.M., Brinton, D.A., Gordon, S.C., Sykes, E., Elkhalfa, M.Y.: Autoantibodies to specific enzymes, a review [review], *Ann clin Lab Sci*, 26:195-207, 1996.
40. Kita, H.: Are antibodies to carbonic anhydrase disease specific marker?(Editorial). *Hepatology Research* 30, 238-239, 2004.
41. Hosoda, H., Okawa-Takatsuji, M., Tanaka, A., Uwatoko, S., Aotsuka, S., Hasimoto, N., et al.: Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions. *Clin Chim Acta*, 342: 71-81, 2004.
42. Armstrong, J. Mc, Myers D. V., Verpoorte J. A., Edsall J. T.: Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J Biol Chem*. 214: 5137-49, 1996.
43. Onji, M.: In what types of diseases does anti-carbonic anhydrase II antibody-positivity have clinical significance. *J Gastroenterol*, 34(3):431-2, 1999.