



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRABZON İLİ ERİŞKİN YAŞ GRUPLARINDA
ANTİ NÜKLEER ANTİKOR
SEROPREVALANSININ BELİRLENMESİ**

Dr. Altan AKINEDEN

UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA

TRABZON-2012



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TRABZON İLİ ERİŞKİN YAŞ GRUPLARINDA
ANTİ NÜKLEER ANTİKOR
SEROPREVALANSININ BELİRLENMESİ**

Dr. Altan AKINEDEN

UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA

TRABZON-2012

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam sũresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, bũlũm başkanımız Prof. Dr. Faruk AYDIN'a, bũlũm hocalarım Prof. Dr. Murat ERTÜRK'e, Doç. Dr. İlknur TOSUN, Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. C. Kurtuluş BURUK'a emekleri ve özverileri için teŐekkũr ederim.

Tez çalışmamdaki yardım ve katkılarından dolayı KTÜ Tıp Fakũltesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gamze AN ve Arş. Gör. Bekir BULUT'a teŐekkũr ederim.

Tez çalışmamı 2010.114.0001.13 nolu proje ile destekleyen KT Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teŐekkũr ederim.

Anabilim dalımızda yũksek lisans, doktora, uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarımıza Tıbbi Mikrobiyoloji Rutin Laboratuvarı çalışanlarına ve yardımlarından dolayı Halime AKTAŐ'a teŐekkũr ederim.

Tez çalışmalarım boyunca tũm bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan canım ağabeyim Dr. Ömer AKINEDEN'e teŐekkũr ederim.

Desteğini, sevgisini sũrekli hissettiğim, hayatımın vazgeçilmez parçaları olan değerli annem Gũlay AKINEDEN, bitanecik eşim Asuman'a, yaşam kaynağım canım kızım Ceren'e ve sevgili ağabeyim Mustafa AKINEDEN'e teŐekkũrlerimi ve saygılarımı sunarım.

Onurlu, dũrũst ve mertçe nasıl yaşanabileceğini öğrendiğim ve bu dũnyada kendisine doyamadığım canım ağabeyim Selçuk AKINEDEN'i rahmetle anıyorum ve üzerimdeki emeklerinden dolayı minnetlerimi sunuyorum.

Dr. Altan AKINEDEN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	VI
KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	VII
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1 Otoimmünite	6
4.1.1 Otoimmün hastalıklar ve epidemiyolojisi	6
4.1.2 Otoimmün hastalıkların oluş mekanizmaları	7
4.1.2.1 T hücre toleransı	8
4.1.2.1.1 Self antijenlere tolerans ve anerji	9
4.1.2.1.2 T hücre olgunlaşma faktörleri	10
4.1.2.1.3 Sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen (CTLA-4)	10
4.1.2.2 B hücre toleransı	11
4.1.2.2.1 B hücrenin merkezi toleransı	12
4.1.2.2.2 B hücrenin periferik toleransı	12
4.1.2.3. Genetik yatkınlık	13
4.1.2.4 Diğer faktörler	14

4.2 Anti nükleer antikor	16
4.2.1 Anti nükleer antikorların en önemli alt tipleri	17
4.2.1.1 DNA ve histon proteinlerine karşı gelişen ANA'lar	17
4.2.1.2 Diğer nükleer antijenlere karşı oluşan ANA'lar	18
4.3 Anti nükleer antikorların laboratuvar tanısı	19
4.3.1 Anti nükleer antikorun immünfloresan (IF) yöntem ile tespiti	19
4.3.1.1 İmmünfloresan boyanma paternleri	20
4.3.1.2 Kullanılan substratlar	22
4.3.1.3 Anti nükleer antikor titresini	22
4.3.2 Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ANA tanısı	23
4.4 Ekstrakte edilebilir nükleer antijenlere karşı gelişen antikorların tespit yöntemleri	23
4.4.1 Western (immüno) blot testi	23
5. GEREÇ VE YÖNTEM	25
5.1 Gereç	25
5.1.1 Örneklem büyüklüğünün hesaplanması	25
5.1.2 Örneklem seçimi	25
5.1.3 Verilerin toplanması	25
5.1.4 Kan örneği alınması	26
5.2 Yöntem	26
5.2.1 ANA varlığının tespiti	26
5.2.2 Anti-ENA antikorları varlığının tespiti	28
5.2.3 İstatistiksel yöntem	30

6. BULGULAR	31
6.1 ANA seropozitiflikleri ve dağılımları.....	31
6.2 Anti-ENA antikorları ve görülen bantların dağılımları	40
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
8. KAYNAKLAR	48

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Otoimmün hastalıkların sınıflandırılması	7
Tablo 2. HLA gen allelleri ve ilişkili olduğu otoimmün hastalıklar	14
Tablo 3. Anti nükleer antikorlar ve görüldüğü hastalıklar	18
Tablo 4. Anti nükleer antikorlar ve kollejen doku hastalıkları arasındaki ilişki	19
Tablo 5. IF yöntemiyle anti nükleer antikor boyanma paternleri ve ilişkili olduğu hastalıklar	21
Tablo 6. ANA boyanma paternleri ve Hep-2 hücreleri üzerindeki boyanma bölgeleri .	22
Tablo 7. ANA IF test kit içeriği	27
Tablo 8. ENA profile Plus1 (IgG) kit içeriği ve içerdiği antijen veya miktarı	29
Tablo 9. Toplanan serum örneklerinin yerleşim yerleri ve cinsiyete göre dağılımları ..	31
Tablo 10. ANA pozitif örneklerin IF boyanma paternlerine göre dağılımları	34
Tablo 11. ANA pozitifliğinin yerleşim yerlerine göre dağılımı.	35
Tablo 12. ANA pozitif örneklerin merkez ve ilçeler arasındaki dağılımı.....	35
Tablo 13. ANA pozitifliklerinin cinsiyetlere göre dağılımı.	36
Tablo 14. ANA pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımları	37
Tablo 15. ANA pozitifliğinin sigara kullanımına göre dağılımı	37
Tablo 16. Gelir durumu ve ANA pozitifliği dağılımı	38
Tablo 17. Medeni duruma göre ANA pozitifliği dağılımları	38
Tablo 18. Eğitim durumuna göre ANA pozitiflik dağılımları	39
Tablo 19. Beden kitle indeksine göre ANA pozitifliğinin dağılımları.....	39

Tablo 20. Anti-ENA antikörlerinin ANA pozitiflik derecelerine göre dağılımları 41

Tablo 21. ENA antijenleri ve prevalansı..... 42

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. T hücresi merkezi ve periferik tolerans mekanizmaları	9
Şekil 2. CTLA-4 molekülü ve etkileri	11
Şekil 3. B hücre merkezi toleransı	12
Şekil 4. B hücre periferik toleransı	13
Şekil 5. Enfeksiyon ajanlarının otoimmünite ile ilişkisi	15

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Western (immüno) blot test stripleri	24
Resim 2. Benekli boyanma paterni.....	32
Resim 3. Sitoplazmik boyanma paterni.....	32
Resim 4. Nükleoler boyanma paterni	33

KISALTMALAR SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ANA	Anti nükleer antikor
SLE	Sistemik lupus eritematozus
HLA	Human lenfosit antijen
MHC	Major doku uygunluk kompleksi
ASH	Antijen sunan hücreler
IL-2	İnterlökin 2
Th-1	T helper 1
CTLA-4	Sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen
AIRE	Otoimmün düzenleyici gen
Treg	Regülatör T hücreleri
CREST	Kalsinozis-Raynaud fenomeni özefagial dismotilite telenjektazi
PM-DM	Polimiyozit dermatomiyozit
ss-DNA	Tek zincirli deoksiribonükleik asit
ds-DNA	Çift zincirli deoksiribonükleik asit
ENA	Ekstrakte edilebilir nükleer antijenler
RNP	Ribonükleoprotein
Sm	Smith
IF	İndirek immünfloresan
ELISA	Enzim linked immunosorbent assay
BKİ	Beden kitle indeksi
MCTD	Karışık bağ dokusu hastalığı

1. ÖZET

Trabzon İli Erişkin Yaş Gruplarında Anti Nükleer Antikor Seroprevalansının Belirlenmesi

Anti nükleer antikor (ANA) deoksiribonükleik asit (DNA), histon komplekslerine ya da nükleer ve sitoplazmik ribonükleer proteinlere karşı gelişen otoantikörlara verilen genel isimdir. Serumda ANA varlığının belirlenmesi birçok sistemik otoimmün hastalığın tanısının konulmasında, hastalıkların evrelendirilmesinde ve prognozunun belirlenmesinde en önemli laboratuvar bulgusudur. Görölme sıklığı değişken olmakla birlikte, farklı toplumlarda ANA seroprevalansı %5–15 arasında bildirilmiştir. Toplumdaki ANA seroprevalansının araştırılması o toplumda bulunan otoimmün hastalıkların belirlenmesinin yanı sıra, hastalık öncesi subklinik durumların ortaya çıkarılmasında, erken tedavi ve izlemde, ayrıca bu hastalıklar için risk faktörlerinin belirlenmesinde önemlidir.

Çalışmamızda Trabzon’da yaşayan erişkin yaş grubunda ANA seroprevalansının belirlenmesi ve bu otoantikörların varlığı ile bireylerin sosyodemografik özellikleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Trabzon ili ve dokuz ilçesinde yaşayan, 20 yaş ve üzeri bireylerden elde edilen toplam 884 serum örneği dahil edilmiştir. Örneklerde ANA belirlenmesi amacıyla Antibodies against cell nuclei (IgG) (Euroimmun, Lübeck, Almanya) kitleri kullanılmıştır. İndirekt immünflouresan (IF) yöntemi ile 1:80 ve üzerindeki dilüsyonlardaki ANA pozitiflikleri ve boyanma paternleri belirlenmiştir. Benekli boyanma paterni gösteren 53 örnekte ekstrakte edilebilir nükleer antijen (anti-ENA) antikörları varlığı Anti-ENA profile Plus1 (IgG) (Euroimmun, Lübeck, Almanya) kitleri kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen veriler ki kare testi ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya alınan 884 bireyin 132’sinde (%14.93) 1:80 ve üzerindeki dilüsyonlarda ANA pozitifliği belirlenmiştir. En sık görülen boyanma paterni 53 örnekte (%6.00) belirlenen benekli boyanma paternidir. ANA pozitifliği ile yerleşim yeri, cinsiyet, sigara kullanımı, gelir düzeyi, medeni durum, eğitim düzeyi beden kitle indeksi ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (sırasıyla $p=0,987$, $p=0,312$, $p=0,054$, $p=0,887$, $p=0,826$, $p=0,787$, $p=1,000$, $p=980$).

Bu bulgular Trabzon ilinde ANA seroprevalansının oldukça yüksek düzeylerde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle özellikle klinik bulguları olan bireylerde ANA tarama testlerinin yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler; Anti nükleer antikor, Trabzon, seroprevalans.

2. SUMMARY

Determination of antinuclear antibody seroprevalence in adult age groups of Trabzon province

Anti-nuclear antibody (ANA) is the common name of autoantibodies directed against deoxyribonucleic acid (DNA), histone complexes or nuclear and cytoplasmic ribonuclear proteins. Determination of the ANA in blood serum is the most significant laboratory findings in diagnostic, staging and prognosis of several systemic autoimmune diseases. Whereat the frequency is varying, ANA seroprevalence has been reported between 5 to 15 % in different populations around the world. Analysis of ANA seroprevalence in a population may not only help to determine autoimmune diseases emerging in the population but also paves the way for premorbid subclinical situations, early clinical treatment and observation possibilities, besides it is important to specify risk factors for this kind of diseases.

The aim of the study was to determinate the ANA seroprevalence within the adults living in Trabzon and to relate the presence of the autoantibodies and sociodemographic features of the individuals possessing them.

This study included 884 sera samples drawn by individuals 20 years old or older who live in Trabzon province and nine different districts of the province. In order to determine ANA in samples, antibodies against cell nuclei (IgG) (Euroimmun, Lübeck, Germany) kits were used. By means of Indirect Immunofluorescence (IF) method, ANA positivity and fluorescence patterns in dilutions 1/80 and higher were detected. In 53 samples showing speckled pattern, antibodies of extractable nuclear antigen (anti-ENA) were detected by using Anti-ENA profile Plus1 (IgG) (Euroimmun, Lübeck, Germany) kits. Obtained data were compared by chi square test.

In this study, 132 (%14,93) out of 884 participated individuals were ANA positive, detected in 1:80 and higher dilutions. Most frequently fluorescence pattern was the speckled pattern which has been detected in 53 samples (%6,00). No statistically significant relation between ANA positivity and residential area, gender, smoking, level of income, marital status, education level, body-mass index and age was

determined ($p=0,987$, $p=0.312$, $p=0,054$, $p=0,766$, $p=0,887$, $p=0,826$, $p=0,787$, $p=1,000$, $p=980$, respectively).

These findings showed that the level of ANA seroprevalence in Trabzon province is quite high. Therefore to conclude that, ANA screening tests should be performed on especially individuals with clinical outcomes.

Keywords: Antinuclear antibody, Trabzon, seroprevalance.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Otoimmün hastalıklar; B ve T hücrelerinin seleksiyonunda, regülasyonunda veya apoptozis aşamalarının herhangi birinde oluşan bozukluk sonucunda bireyin kendi öz antijenlerine karşı oluşturduğu immünolojik cevaptır. Otoimmünitinin en önemli laboratuvar bulgusu serumda otoantikörlerin tespit edilmesidir (1).

Anti nükleer antikör (ANA) deoksiribonükleik asit (DNA) histon kompleksine, nükleer ya da sitoplazmik ribonükleer proteinlere (RNP) karşı gelişmiş otoantikörlere verilen genel isimdir. Serumda ANA varlığının belirlenmesi sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), sjögren sendromu, skleroderma, sistemik skleroz, kalsinozis-Raynaud fenomeni-özefagial dismotilite-telenjektazi (CREST) sendromu, polimiyozit-dermatomiyozit (PM-DM) ve karışık bağ doku hastalığı (MCTD) gibi birçok sistemik otoimmün hastalığın tanısının konulmasında, hastalıkların evrelendirilmesinde ve prognozunun belirlenmesinde önemlidir (2-4).

Anti nükleer antikör seroprevalansı ülkeler ve aynı ülke içindeki bölgeler arasında farklılıklar gösterebilmektedir. Toplumdaki ANA seroprevalansının araştırılması o toplumda bulunan otoimmün hastalıkların belirlenmesinin yanı sıra, hastalık öncesi subklinik durumların ortaya çıkarılmasında, erken tedavi ve izlemede, ayrıca bu hastalıklar için risk faktörlerinin belirlenmesinde önemlidir. Görülme sıklığı değişken olmakla beraber farklı toplumlarda ANA seroprevalansı %5-15 arasında bildirilmiştir (2).

Ülkemizde ANA seroprevalansın belirlenmesine yönelik olarak yapılmış çalışmalar oldukça az sayıdadır. ANA pozitifliği ile bireylerin sosyodemografik özellikleri arasında bir ilişki olup olmadığı konusunda da yeterli veri bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Trabzon'da yaşayan erişkin yaş grubunda ANA seroprevalansının belirlenmesi ve bu otoantikörlerin varlığı ile bireylerin yaş, cinsiyet, yerleşim yeri, sigara kullanımı, guatr hastalığı varlığı, gelir düzeyi, medeni durum, eğitim düzeyi beden kitle indeksi gibi özellikleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Otoimmünite

Vücudumuzdaki immüneye ait hücrelerin kendi öz antijenlerine yönelik verdiği immün yanıtların tümüne birden otoimmünite denir. Oluşan bütün otoimmün yanıtlar her zaman klinik semptomlarla seyreden otoimmün hastalıklara dönüşmeyebilir. Örneğin; özellikle yaşlı insanlarda hiç bir otoimmün hastalık belirtisi olmadan anti nükleer antikorlar (ANA) tespit edilebilmektedir. Eğer oluşan otoimmünite klinik olarak gözlenen semptomlarla seyreden hastalık haline dönüşmüş ise otoimmün hastalık meydana gelmiş demektir (5). Otoimmün hastalıkların oluşması için oluşan otoantikorların çeşitli semptomlarla seyreden ve klinik olarak gözlenebilen tablolara yol açması gerekmektedir (6).

4.1.1 Otoimmün hastalıklar ve epidemiyolojisi

Otoimmün hastalıkların sınıflandırmasında çeşitli sistemler kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan sınıflandırma biçimlerinden birisi sistemik tutulumlu otoimmün hastalıklar ve organ tutulumlu otoimmün hastalıklar biçiminde olanıdır (1, 7). Bu hastalıklar Tablo 1’de özetlenmiştir (2).

Otoimmün hastalıklar; B ve T hücrelerinin seleksiyonunda, regülasyonunda veya apoptozis aşamalarının herhangi birinde oluşan bozukluk veya bozukluklar sonucunda kendi öz antijenlerine karşı oluşturduğu immünolojik cevabın değişikliğe uğramasıyla oluşan klinik durumları ifade etmektedir (1, 7). Otoimmün hastalıklar, otoimmün tiroidit ve romatoid artrit haricinde, oldukça nadir görülen hastalıklardır. Amerika ve Avrupalı ülkelerde halkın yüzde 5’ine yakın bir bölümünde otoimmün hastalıkların görülebildiği belirtilmiştir (1, 8, 9). Ayrıca Amerika’da her 5 yılda tahmini olarak 1,186,015 yeni otoimmün hastalık görüleceği öngörülmektedir (8).

Tablo 1. Otoimmün hastalıkların sınıflandırılması (2)

ORGAN SPESİFİK HASTALIKLAR	SİSTEMİK HASTALIKLAR
Graves hastalığı	Sistemik lupus eritematozus
Hasimoto tiroiditi	Romatoid artrit
Otoimmün poliglandüler sendrom	Sistemik nekrotizan vaskülit
Tip 1 diabetes mellitus	Wegener granülomatozusu
Otoimmün adisson hastalığı	Antifosfolipid antikor sendromu
Pemfigus vulgaris	Sjögren sendromu
Dermatitis herpetiformis	
Otoimmün alopesi	
Vitiligo	
Multipl skleroz	

4.1.2 Otoimmün hastalıkların oluş mekanizmaları

Otoimmün hastalıkların oluşmasına nelerin sebep olduğu ve hangi mekanizmaların rol aldığı tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir, ancak tüm bu oluş mekanizmalarını açıklamak için bir dizi tartışma konusu güncel olarak devam etmektedir (6).

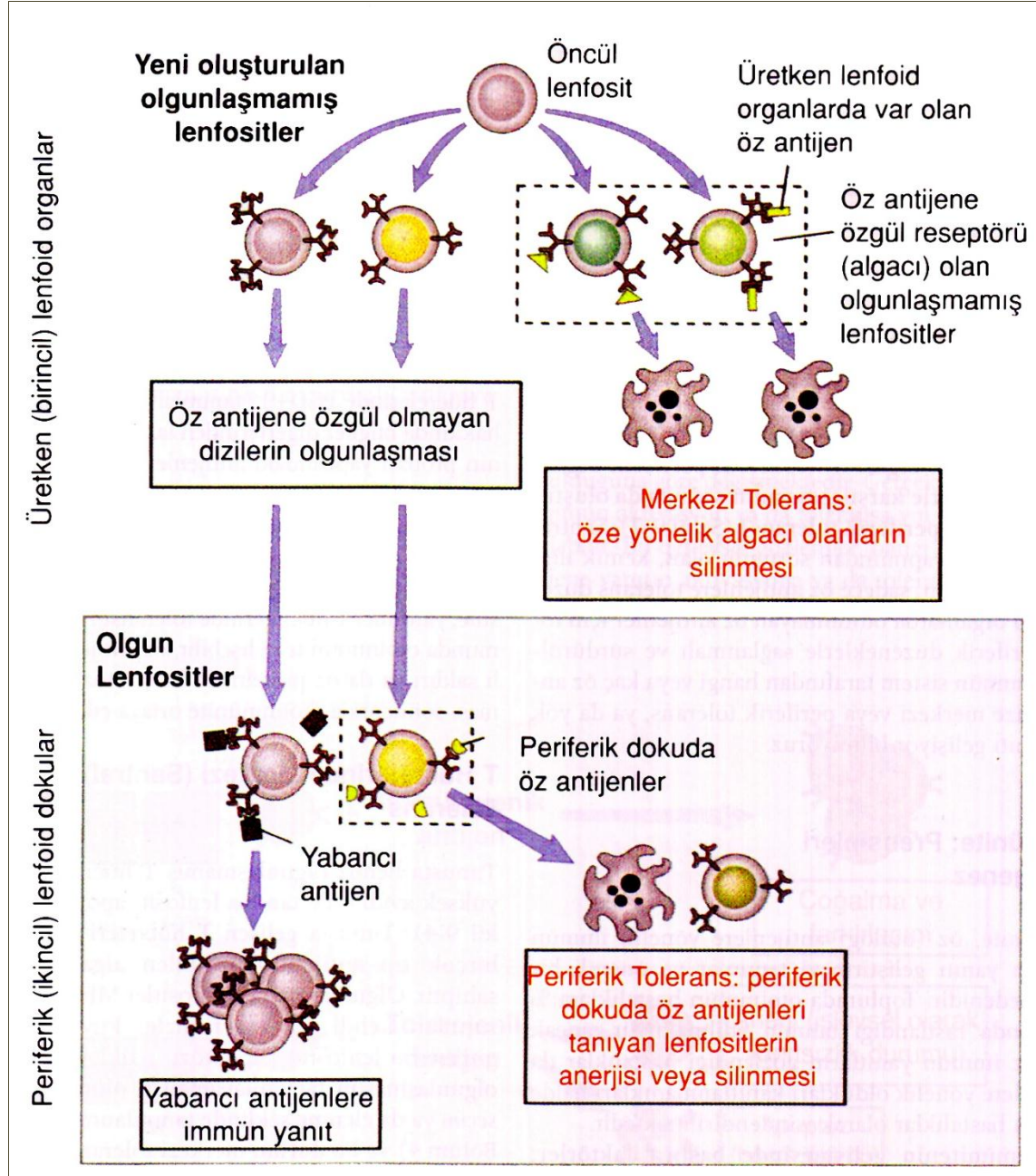
Otoimmün hastalığın oluşmasında ilk basamaklardan birisi vücudun kendi öz antijenlerine karşı gösterdiği immün toleransın kaybolmasıdır. İmmün toleransın kaybolmasına ve otoimmünitenin oluşmasına sebep olan en önemli etkenler, geçirilmiş enfeksiyonlar gibi çevresel etmenler ve immün toleransı olumsuz yönde etkileyen kalıtsal durumlar olarak sıralanabilir (1).

Otoimmün hastalıklarda ortaya çıkan immünolojik aksaklıkların hangi yolları kullanarak otoimmün hastalıklara yol açtığı konusunda giderek artan bilgilere rağmen henüz hiçbir otoimmün hastalığın nedeni tam olarak açıklanamamıştır. Bunun nedeni otoimmün hastalıkların heterojen olması ve birçok etmene bağlı olarak gelişmesidir (10).

4.1.2.1 T hücre toleransı

T hücre toleransı temel olarak organizmanın kendi öz antijenlerine yönelik oto-reaktif ve olgunlaşmamış T hücre kopyalarının kemik iliğinden timusa göçüp, burada büyük çoğunlukla elimine edilmeleri ile meydana gelir (1, 7). Timusta henüz olgunlaşmamış T hücreleri eğer vücudun öz antijenlerini yüksek avidite ile tanırsa bu T hücresi apoptozise uğrar. Bu işlemde major doku uygunluk kompleksi (MHC) ile sunulan vücudun öz antijenlerine kuvvetli yanıtlar veren T hücreleri bilinmeyen bir mekanizmayla apoptozis sinyalini oluşturur ve elimine edilir. Buna negatif seleksiyon denmektedir. T hücrelerini apoptozise yönlendiren sinyallerin neler olduğu tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (10).

Normal immün sistem fonksiyonlarının devamı için düşük düzeyde oto-reaktif T hücrelerinin varlığı gerekli ve fizyolojiktir (1, 7). T hücre tolerans mekanizmaları Şekil 1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1. T hücresi merkezi ve periferik tolerans mekanizmaları (10)

4.1.2.1.1 Öz antijenlere tolerans ve anerji

İmmün reaksiyonların oluşması için eş uyarıcı (ko-stimülantör) moleküllerinin varlığı çok önemli bir yere sahiptir. Eş uyarıcı moleküllerinin yokluğunda immün reaksiyonlar oluşmaz. Antijen sunan hücreler (ASH) vücudun kendi öz antijenlerini T hücrelerine sunarlar. ASH üzerinde B7 gibi eş uyarıcı moleküllerinin olmadığı durumlarda T hücrelerinde anerji meydana gelir ve immünolojik tolerans oluşur (3). İmmün reaksiyonların oluşmasında en önemli basamaklardan biri de antijenle T

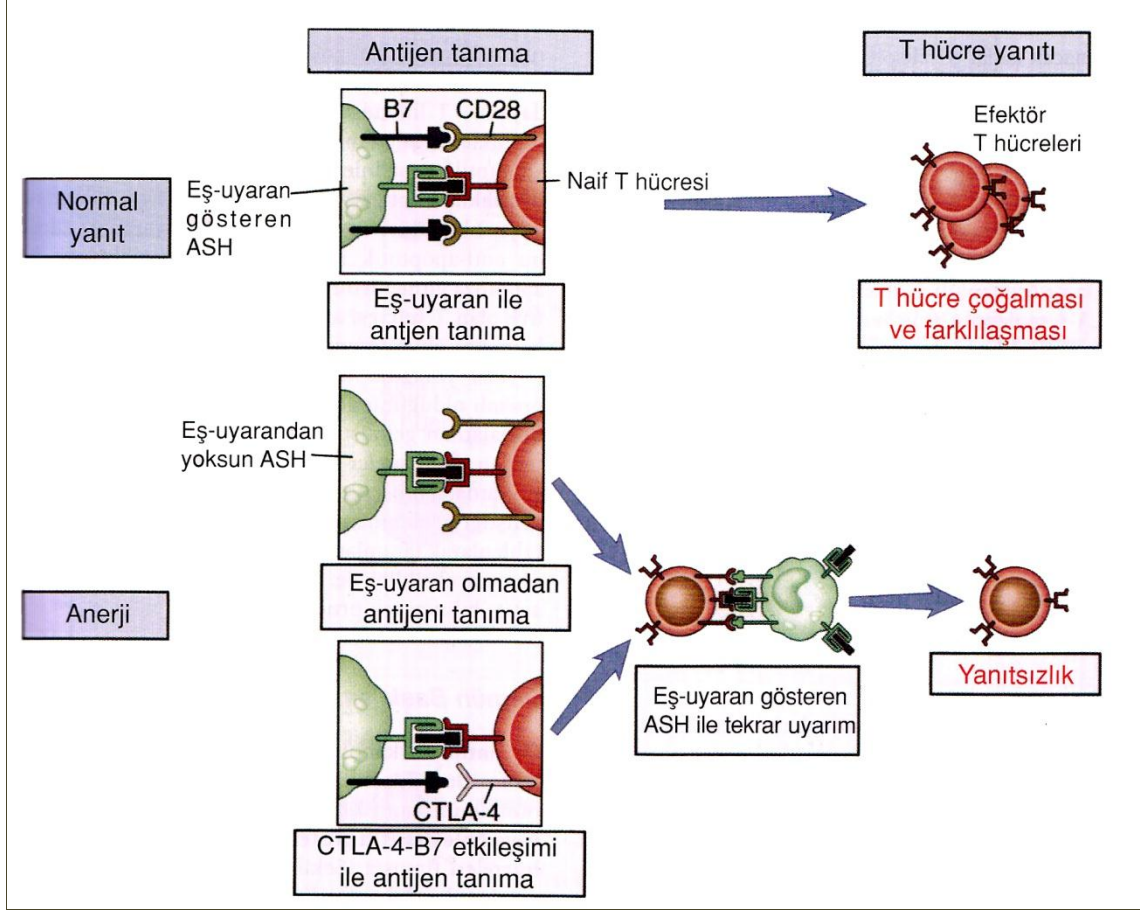
hücrelerinin temasının olmasıdır, bu temas olmadığı müddetçe immün reaksiyonlar yine oluşamaz. İmmün reaksiyonun oluşabilmesinde diğer bir faktör antijenin miktarıdır. Az miktarda antijenin olduğu durumlarda immün reaksiyonlar oluşmayabilir (11).

4.1.2.1.2 T hücre olgunlaşma faktörleri

T hücrelerinin olgunlaşması veya yıkılması için gerekli olan faktörlerin eksikliği durumlarında otoimmünite oluşabilir. T hücreleri normalde eş uyaran ve interlökin 2 (IL-2) varlığında yardımcı T hücrelerine (Th-1) dönüşüp hücrel immün yanıtı başlatmaktadır. Bu gibi faktörlerin yokluğu veya bozukluğunda otoimmün yanıtlar meydana gelmektedir. Sonuç olarak otoimmün hastalıklara zemin oluşmaktadır (11).

4.1.2.1.3 Sitotoksik T lenfosit ile İlişkili antijen (CTLA-4)

CTLA-4 immün düzenleyici bir moleküldür. T hücresi tarafından eksprese edilir. CTLA-4 molekülleri eş uyaran molekülleri olan ve ASH tarafından eksprese edilen B7-1 ve B7-2 reseptörlerine yüksek derecede afinite gösterirler. Bu reseptörlere bağlanan CTLA-4 molekülleri immün reaksiyonların başlamasını ve dolayısıyla oluşmasını baskırlar. Bu şekilde baskılanan T hücrelerine anerjik T hücreleri denir (1). CTLA-4 molekülleri ile oluşan T hücre anerjisi Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. CTLA-4 molekülü ve etkileri (10)

4.1.2.2 B hücre toleransı

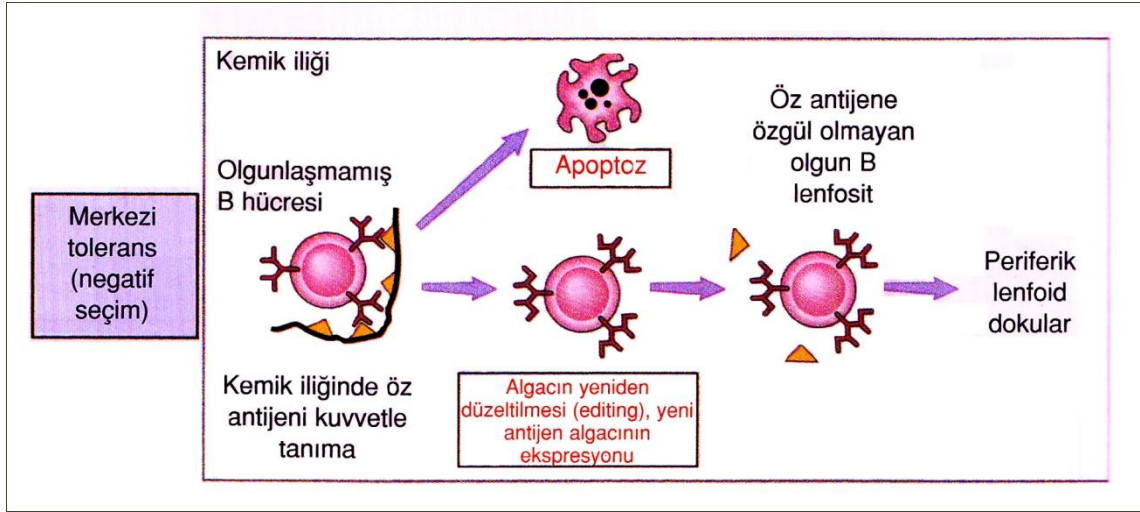
Serum içerisinde tespit edilen antikorlar bir çok otoimmün hastalık için karakteristiktir. Bazı antikorlar otoimmün hastalıkların klinik oluşumlarında önemli bir role sahiptir. Oto-reaktif B hücrelerinin eliminasyonu için birçok mekanizma bulunmaktadır. Oto-reaktif B hücreleri kemik iliğinde, dalakta ve lenf bezlerinde elimine edilirler.

T hücre yardımı olmadan vücudun kendi öz antijenlerinin B hücreleri yüzey immünglobülinlerine bağlanması durumunda, T hücre yardımından yoksun B hücreleri anerjik hale gelebilmektedir (12-15).

4.1.2.2.1 B hücrelerinin merkezi toleransı

Olgunlaşmamış B hücreleri kemik iliğinde vücudun kendi öz antijenleriyle kuvvetli bir şekilde immün reaksiyona girerse ya apoptozise uğrar ya da antijen

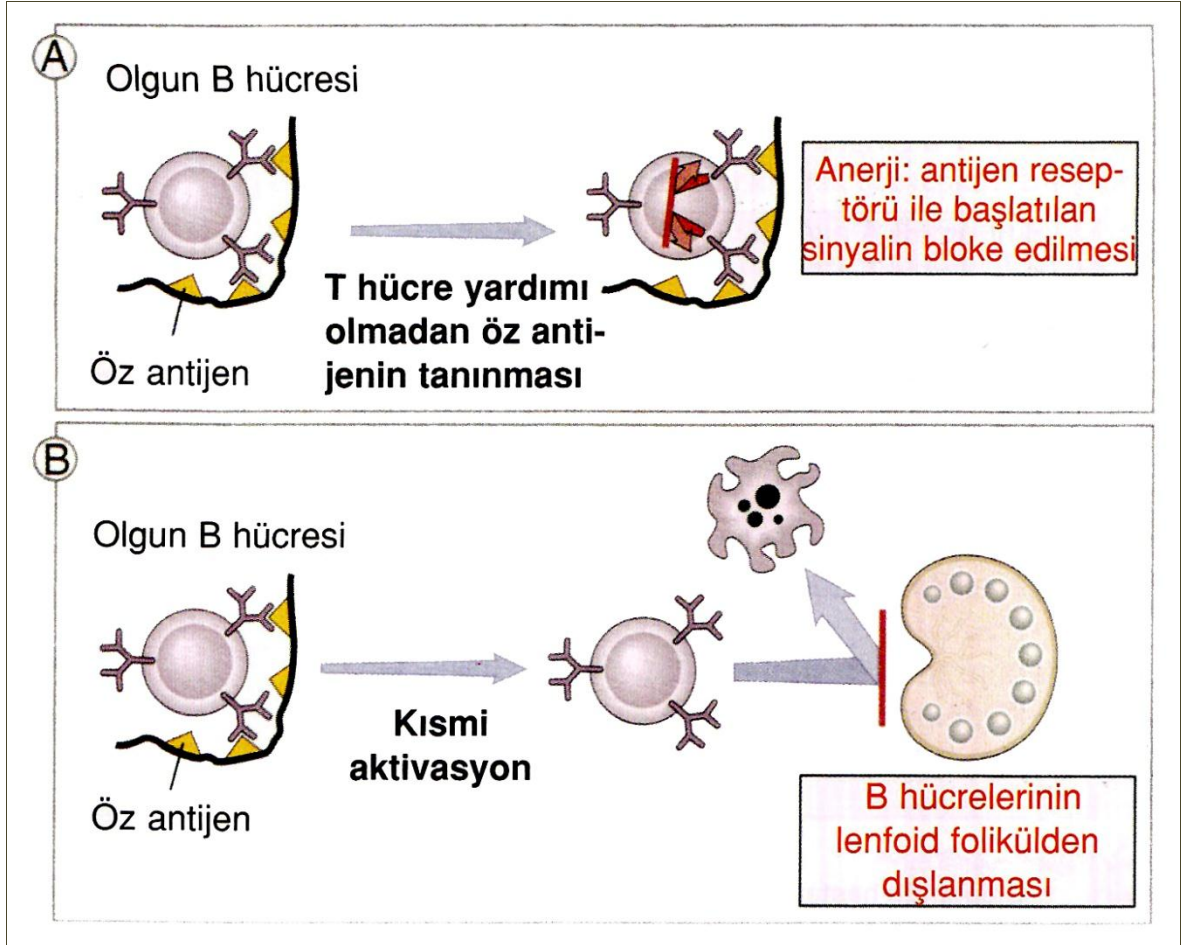
bağlayan reseptörlerinde yeni bir düzenlemeye gidilerek merkezi tolerans sağlanmış olur (12-14). Şekil 3’de B hücre merkezi toleransı gösterilmiştir.



Şekil 3. B hücre merkezi toleransı (10)

4.1.2.2.2 B hücresinin periferik toleransı

Kemik iliğinden periferik dokulara geçen olgunlaşmış B hücreleri eğer yüksek miktarlarda vücudun kendi öz antijenleriyle karşılaşılırsa, bu antijenlere karşı anerjik yani yanıtızsız hale dönüşürler. Burada herhangi bir immün yanıtın oluşması için T hücresinin yardımı gereklidir. Eğer T hücre yardımı yoksa B hücreleri yine anerjik hale gelecektir. Bu tür B hücreleri lenfoid dokulardan dışlanırlar ve herhangi bir uyarana alamadığından eliminasyona uğrarlar (12-15). Şekil 4’de B hücresi periferik tolerans mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 4. B hücresi periferik tolerans mekanizması (10)

4.1.2.3. Genetik Yatkınlık

Epidemiyolojik çalışmalar, genetik faktörlerin otoimmün hastalıkların oluşum basamaklarında çok büyük bir rol oynadığını göstermiştir. Ailesel bir otoimmün hastalığın tek yumurta ikizlerinde görülme oranının çift yumurta ikizlerine oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (1, 16-18).

Bazı otoimmün hastalıkların nedeni sadece tek bir genin mutasyonu sonucunda olabilmektedir, örneğin otoimmün regülatör (AIRE) genindeki otozomal resesif bir mutasyonun oluşması sonucunda poliendokrin otoimmün sendrom tip-1 (mukokutanöz kandidiazis, hipoparatiroidizm, addison hastalığı) ortaya çıkabilmektedir (19-21). Başka genlerde oluşabilecek mutasyonlar da otoimmün hastalıkların oluşmasına sebep olabilir. Ancak bu durum gen mutasyonlarını taşıyan her kişinin hasta olacağı anlamına gelmemektedir. Otoimmün hastalıkların büyük bir kesiminin oluşması için birden fazla gen mutasyonunun varlığına gereksinim vardır. Özellikle HLA sisteminde oluşacak

mutasyonların varlığında otoimmün hastalıkların ortaya çıkma ihtimali diğer sistemlerde oluşan gen mutasyonlarına oranla daha fazladır. Bu duruma ankilozan spondilitde HLA-B27, pernisiyöz anemide HLA-Dw5, diabetes mellitus tip-1’de HLA-DQ1*0301 ve HLA-DQ1*0302 gen alleli pozitiflikleri örnek olarak gösterilebilir (17, 22, 23). Otoimmün hastalıkların oluşması sadece HLA sistemdeki genetik bozukluklara bağlı da değildir. Bunun yanısıra Sitokinler, eş uyaranlar vb. molekülleri kodlayan genlerdeki mutasyonların varlığı da otoimmün hastalıkların oluşmasına sebep olabilir (1). Tablo 2’de HLA gen allelleri ve ilişkili olduğu otoimmün hastalıklar özetlenmiştir.

Tablo 2. HLA gen allelleri ve ilişkili olduğu otoimmün hastalıklar

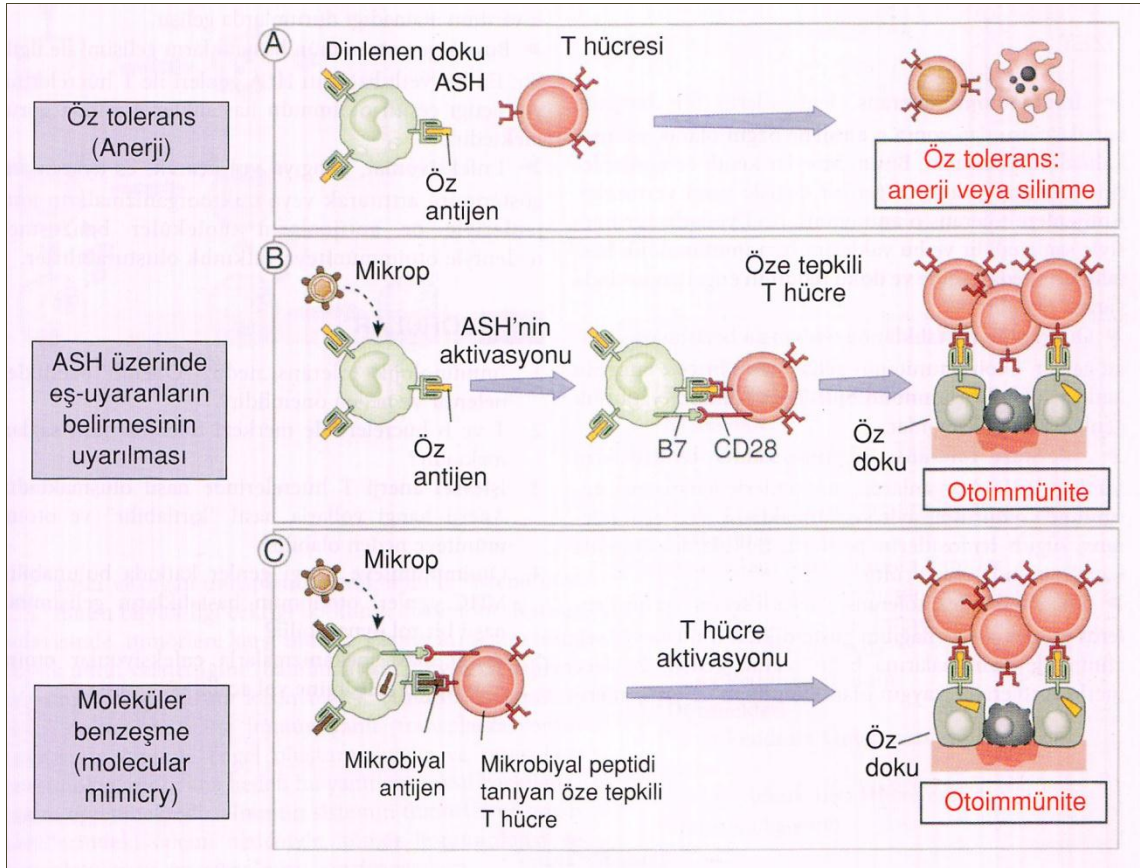
OTOİMMÜN HASTALIK	HLA GEN ALLELİ
Romatoit Artrit	DR4
Juvenil İdiopatik Artirit	DR5
Sistemik Lupus eritamatozus	DR3, DR4
Ankilozan Spondilit	B27
Reiter Hastalığı	B27
Behçet Hastalığı	B51
Psöriyatik Artrit	B27
Diabetes Mellitus Tip 1	DR3, DR4
Çölyak Hastalığı	DR3
Myastenia Gravis	DR3

4.1.2.4 Diğer faktörler

Belirli bazı çevresel faktörlerin otoimmün hastalıkların oluşmasında önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Örneğin bir popülasyonda görülen diabetes mellitus tip 1 ve multiple skleroz insidansının, popülasyon üyelerinin başka bir yere göç etmeleri durumunda yükseliş gösterdiği belirlenmiştir (24, 25).

Enfeksiyonlar otoimmün hastalıklara yol açabilen diğer bir grup etkidir. Bunun gerçekleşmesi için antijen spesifik veya non-spesifik mekanizmalar önemli rol oynarlar. Bu duruma organizmanın kendi öz antijenleriyle moleküler benzerlik (molecular mimicry) gösteren enfeksiyon ajanlarının antijenleri sebep olurlar. Enfeksiyon ajanlarının antijenlerine karşı gelişen immün yanıtın, oluşacak olan çarpaz reaksiyonlar

ile öz antijenlere karşı da oluşmasıyla otoimmünite meydana gelir (1). Buna en iyi örnek olarak romatojenik streptokok suşlarının M5 peptidi ile kardiak miyozin hücreleri antijenleri arasındaki çapraz reaksiyonlar verilebilir (26-28). Şekil 5’de enfeksiyonlar ve oluşan immüitenin moleküler benzerlikle otoimmüniteye dönüşmesi şematize edilmiştir.



Şekil 5. Enfeksiyon ajanlarının otoimmünite ile ilişkisi (10)

Kullandığımız birçok ilaç da otoimmün hastalık oluşumuna sebep olabilmektedir. Bunlardan en önemlileri penisilinler, sefolosporinler, prokainamid ve interferon-alfadır (29).

Otoimmün hastalıkların oluşumuna sebep olan bazı gıda maddeleri uzun yıllardır gündemdedir ve bunlara en iyi örnek olarak gliadin verilebilir. Gliadin buğdayda bulunan gluten isimli proteinin bir parçasıdır. Glutene karşı oluşan hipersensitivite reaksiyonu sonucunda barsak villuslarına karşı otoimmün reaksiyonlar gelişebilmekte ve otoimmün hastalıklar oluşabilmektedir (30).

Stresin otoimmün hastalık oluşmasında önemli birçok farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. Akut stres durumunda daha çok immünsüpresif etki ön plandayken, kronik stres durumunda verilen immün cevaplar daha da güçlenmektedir (31).

4.2 Anti nükleer antikor

Anti nükleer antikor (ANA) DNA histon kompleksine, nükleer ya da sitoplazmik ribonükleer proteinlere (RNP) karşı gelişmiş otoantikorlara verilen genel bir isimdir (11). Otoimmün hastalıkların tanısında ve takibinde önemli bir parametredir (8, 11). Farklı toplumlarda görülme sıklığı değişken olmakla birlikte %5-15 arasında değiştiği ve bu oranın yaşla birlikte arttığı düşünülmektedir. Birçok çalışmada kadınlarda erkeklere göre görülme sıklığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (8).

ANA'lar sistemik otoimmün hastalıklarla beraber bazı organ spesifik otoimmün hastalıklarda ve çeşitli sistemik hastalıklarda tespit edilebilirler. Çeşitli infeksiyonlarda, malign hastalıklarda ve çeşitli ilaçların yan etkisi olarak ANA pozitiflikleri oluşabilir (11).

Sitoplazma içerisinde bulunan ribozom ve mitokondri gibi hücre çekirdeği yapısı dışındaki yapılara karşı da ANA gelişebilmektedir. ANA'lar elli yılı aşkın süredir otoimmün hastalık tanısında kullanılmaktadır. ANA'ların yüksek titrelerde tespit edilmesi daha çok bağ dokusu hastalıkları olarak bilinen sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), sjögren sendromu, skleroderma, sistemik skleroz, kalsinozis-Raynaud fenomeni-özefagial dismotilite-telenjektazi sendromu (CREST), polimiyozit-dermatomiyozit (PM-DM), karışık bağ dokusu hastalığı (MCTD) gibi hastalıkların varlığını düşündürmektedir. Bu anlatılanlara rağmen sadece ANA pozitifliğinin klinik bulgular olmadan tanısal değeri düşüktür. Bu nedenlerden dolayı ANA'ların tespiti otoimmün hastalık şüphesi klinik bulgularla destelenen olgularda, hastalığın tanısında en önemli laboratuvar belirteçleri arasında sayılmaktadır (4). ANA'lar IgG, IgM, IgE, IgA ve IgD tipinde olabilir ancak en çok IgG tipi ANA'lar oluşmaktadır (32).

4.2.1 Anti nükleer antikörlerin en önemli alt tipleri

ANA'lar bazı otoimmün hastalıklarla yakın ilişki halindedir. Tablo 3'de ANA'ların karakteristikleri ve görülme sıklıkları verilmiştir. ANA'ların hedef antijenik yapıları tam olarak belirlenmiştir buna rağmen, bu antikörlerin hastalık oluşum patogenezindeki rolleri yeteri kadar açıklanabilmiş değildir (33).

ANA'lar hedef komponentleri farklılığına göre ikiye ayrılırlar:

1. DNA ve histon proteinlerine karşı gelişen ANA'lar
2. Diğer nükleer antijenlere karşı oluşan ANA'lar

4.2.1.1 DNA ve histon proteinlerine karşı gelişen ANA'lar

- a) Anti-dsDNA, anti-ssDNA antikörleri
- b) Anti-histon antikörler

Bu antikörler, SLE hastalığının tanısında önemli parametrelerdir. Tek ve çift sarmal içeren DNA'lara (ss-DNA= tek zincirli DNA ve ds-DNA= çift zincirli DNA) karşı oluşan antikörler genellikle ilaçlarla oluşmuş, lupus benzeri tablolara yol açan anti-histon antikörlerine verilen isimlerdir (33).

Histonlar hücre nükleusunda bulunan ve miktarı en fazla olan proteini ifade etmektedir. Histon proteinleri DNA ile kromatin denen kompleksleri oluştururlar. Kromatinler ise nükleozom denen alt birimlerin bütünüdür. Histon proteinleri; H-1, H-2A, H-2B H-3 ve H-4 şeklinde isimlendirilirler. Bunlardan H-2A, H-2B H-3 ve H-4 bir histon molekülünü oluştururken H-1 ise 60 bazlık DNA molekülleriyle nükleozoma yapışma görevini üstlenen moleküllerdir.

Anti-histon antikörler SLE hastalığında oldukça spesifik antikörlerdir ve bu özelliklerinden dolayı SLE tanısında önemli bir yer tutmuştur. Anti-ssDNA ve anti-histon antikörler genellikle anti-dsDNA antikör pozitif serumlarda tespit edilirler. Anti-histon antikörler direk olarak DNA'nın nükleozom içerisine paketlenmesinde rol alan hücre çekirdeği proteinlerinden olan histonlara yönelik oluşurlar. Anti-histon antikörlerin ayrıca ilaca bağlı oluşan lupusta oldukça sık olduğu bilinmektedir (33).

4.2.1.2 Diğer nükleer antijenlere karşı oluşan ANA'lar

Bu grup antikorlar aynı zamanda ekstrakte edilebilir nükleer antijenler (ENA) olarak da bilinen nükleer yapılara karşı oluşan antikorlardır. Bu zamana kadar bu grup içerisinde tespit edilen antikorlardan en iyi bilinenleri; anti-Sm (smith), anti-U1-RNP (ribonükleoprotein), anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Scl-70, anti-Jo-1 ve M1'dir (34). İlk anti-ENA antikoru 1996 yılında bulunan anti-Sm antikorudur. Yapılan araştırmalarla bu antikoru SLE hastalığının tanısında oldukça spesifik bir belirteç olduğu tespit edilmiştir (33). En sık görülen ANA'lar ve sıklıkla görüldüğü otoimmün hastalıklar Tablo 3 ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Anti nükleer antikorlar ve görüldüğü hastalıklar

OTOANTİKOR	FONKSİYONU	EN SIK GÖRÜLDÜĞÜ OTOİMMÜN HASTALIK
Anti-dsDNA	Genetik kodlama	SLE
Anti-histon (H1, H2A, H2B . H3, H4)	DNA paketlenmesi	SLE
Anti-Sm	RNA'ların splicing olması	SLE
Anti-Ku	T-hücre reseptörleri regülasyonu	SLE
Anti-topoizomeraz I (Scl-70)	DNA- süpersarmal yapının gevşemesi	Skleroderma
Anti-SS-B/La	RNA-polimeraz-I enzim regülasyonu	Sjögren sendromu, SLE
Anti-SS-A/Ro	Fonksiyonu bilinmiyor Y1-Y5 RNA'lar ile kompleksler oluşturma	Sjögren sendromu, SLE*
Anti-U1-RNP	RNA'ların splicing olması	MCTD*
Anti-sentromer	Hücre bölünmesi	Progresif sistemik sklerozis

* MCTD= Karışık bağ dokusu hastalığı

* SLE= Sistemik lupus eritamatozus

Tablo 4. Bazı anti nükleer antikorlar ve kollejen doku hastalıkları arasındaki ilişki

ANA ÇEŞİTLERİ	GÖRÜLME SIKLIĞI
Anti-dsDNA	SLE'de %30-70
Anti-Sm	SLE'de %15-30
Anti-histon H2A,H2B	SLE'de %50-70 ilaçla oluşmuş SLE'de > %95
Anti- SS-A/Ro	SLE'de %24-26 Sjögren sendromunda %88-96 PM-DM'de % 18, PSS'de % 5, RA'de %5
Anti- SS-B/La	SLE'de % 9-34 Sjögren sendromunda %71-87
Anti-U1-RNP	SLE'de %30-40 Neredeyse bütün MCTD'li hastalarda tespit edilir
Anti-Scl-70	Diffüz sistemik skleroderma
Anti-Jo-1	Polimiyozit-dermatomiyozit

4.3 Anti nükleer antikorların laboratuvar tanısı

ANA'ların tespitinde altın standart yöntem indirek immünfloresan (IF) yöntem olarak kabul edilmektedir. Geçen zaman içerisinde yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip metodlar geliştirilmiştir. Bunun haricinde enzim linked immünosorbent assay (ELISA) immünblot gibi yöntemler de yaygın olarak kullanılmaktadır (35).

4.3.1 Anti nükleer antikorların immünfloresan (IF) yöntem ile tespiti

İmmünfloresan yöntemi ile ANA tespiti ilk olarak 1957 yılında George Friou tarafından geliştirilmiş ve günümüzde kullanılan en yaygın test yöntemidir. Bu test yöntemi oldukça ucuzdur ve diğer metodlara göre yapılması daha kolaydır. Bu nedenle rutin tanı testleri içinde kendisine yer bulmuştur (36). ANA bir reaktif ile bağlanarak değişik otoimmün hastalıklarla bağlantılı olabilen otoantikorlara ait floresan ışınlarla karakterize mikroskobik motifler oluşturur. Direk ve indirek olmak üzere iki farklı IF test yöntemi vardır. Direk IF test yönteminde; floresan ile bağlanmış antikor test edilecek örnek içindeki antijen ile bağlanarak kompleks oluşturur ve floresan ışık yayar. Yöntem bu ışığın floresan mikroskopta incelenmesi esasına dayanır. İndirek yöntemde ise aynı şekilde antijenler ile antikor kompleksi oluşur ancak burada antijen-antikor

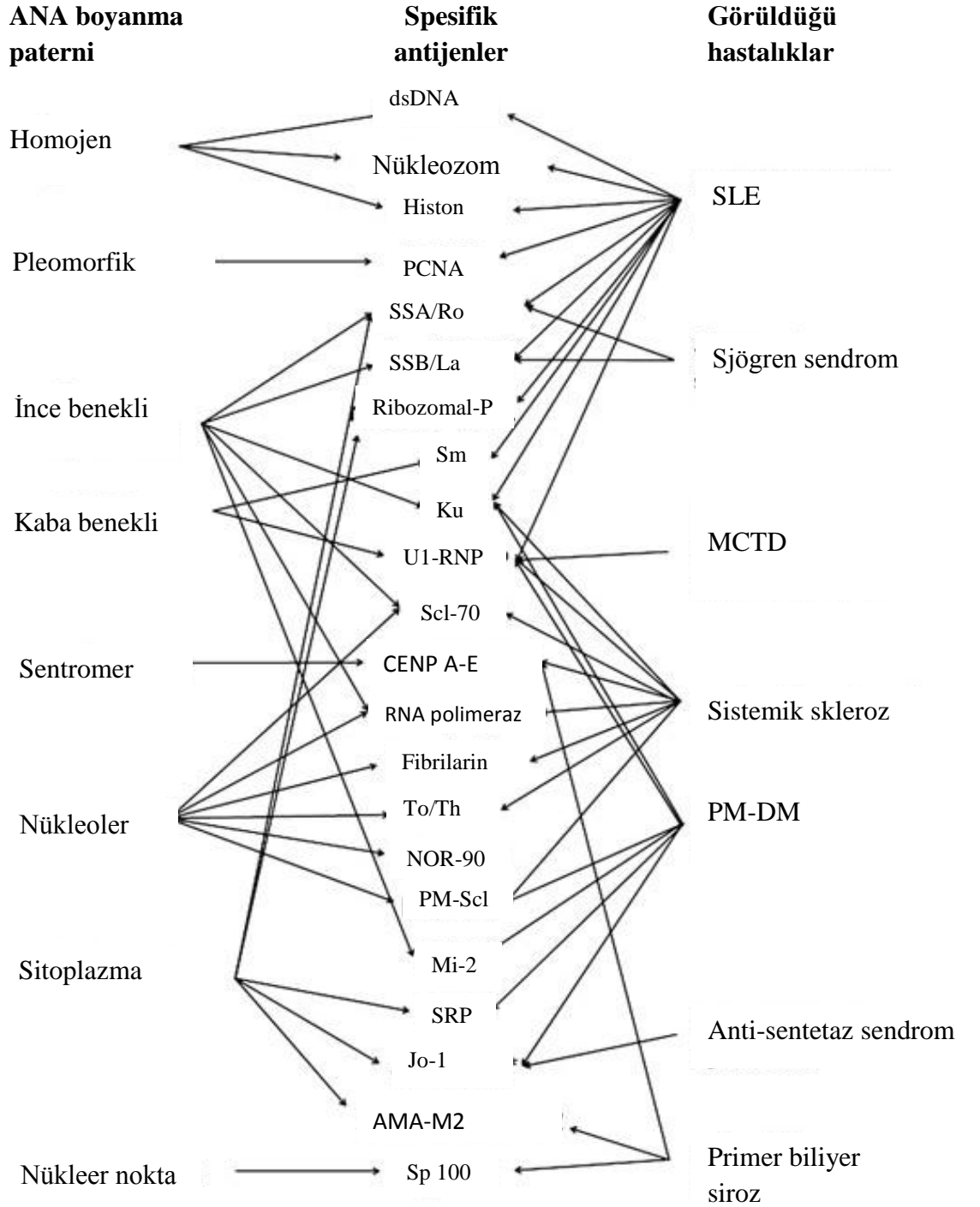
kompleksi floresan ile bağlanmış anti-antikör ile muamele edilir, oluşan floresan ışımalar yine floresan mikroskopta incelenir (37).

Anti nükleer antikör belirlenmesinde IF testinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi için üç parametrenin değerlendirilmesi gereklidir (38).

1. İmmünfloresan boyanma paterni
2. Kullanılan substrat
3. ANA titresi

4.3.1.1 İmmünfloresan boyanma paternleri

Farklı ANA IF boyanma paternleri vardır; genel olarak sitoplazmik boyanma paterni (benekli, mitokondriyal, ribozomal, golgi aygıtı vb.) ve nükleer boyanma paterni (homojen, periferal membran, benekli, nükleoler, sentromer, mid body, sentriol) diye gruplandırılabilir (34, 38). ANA boyanma paternleri ve en sık ilişkili olduğu hastalıklar Tablo 5’de gösterilmiştir.



Tablo 5. IFA yöntemiyle ANA boyanma paternleri ve en sık ilişkili olduğu hastalıklar (38)

4.3.1.2 Kullanılan Substratlar

ANA ile bağlanma özelliği olan birçok substratla denemeler yapılmıştır; sıçan karaciğer doku kesitleri, sıçan böbrekleri ve fare midesi kullanılmıştır. 1975 yılında ilk kez Hep-2 hücreleri; skuamöz laringeal karsinoma hücrelerinden kültüre edilmiştir ve daha sonra hemen hemen bütün dünyada laboratuvarlarda substrat olarak kullanıma girmiştir. Hep-2 hücreleri IF ANA testlerinin hassasiyetlerini daha da artırmıştır. İnsan Hep-2 hücrelerinin kullanıldığı testlerle oldukça iyi sonuçlar alınmıştır. Bazı SLE hastalarında hayvan substratları kullanıldığında negatif sonuçlar alınırken Hep-2 hücreleri kullanılıp tekrarlandığında testlerin pozitif döndüğü görülmüştür (39-42). ANA boyanma paternlerinin Hep-2 hücreleri kullanıldığında floresan ışığa yayan bölgeleri ve ilişkili olduğu antijenler Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. ANA boyanma paternleri ve Hep-2 hücreleri üzerindeki boyanma bölgeleri (38)

ANA BOYANMA PATERNİ	HEP-2 HÜCRELERİ FLORESAN BOYANA ALAN BÖLGELER	İLİŞKİLİ OLDUĞU ANTİJENLER
Homojen	Metafaz pozitif, nükleer homojen veya nükleer ince benekli floresan boyanma	dsDNA, histon proteinleri, nükleozomlar
İnce granüler	Metafaz negatif, nükleer ince benekli floresan boyanma	SSA/Ro, SSB/La, Ku, Mi-2
Kaba granüler	Nükleolus negatif, nükleer floresan boyanma	U1-RNP, Sm
Nükleolar	Nükleoluslar floresan boyanma	Sc1-70, RNA polimeraz I-III, U3-RNP, fibrilların
Sentromer	İnterfazda kromozomlar nokta şeklinde floresan boyanma	CENP A-E
Nükleer nokta	Metafaz negatif, nükleer alanda çoğunlukla 13 ile 25 arası nokta tarzı floresan boyanma	Sp 100
Pleomorfik	İnterfazda, heterojen nükleer floresan boyanma	PCNA
Sitoplazmik	Sitoplazmik alanın floresan boyanması	AMA-M2, Rib-P, Jo-1, Actin

4.3.1.3 Anti nükleer antikor titresi

ANA titresinin yüksekliği doğrudan IF-ANA testinin sonucunun doğruluğunun göstergesi sayılabilir; titre ne kadar yüksekse otoimmün hastalık oluşma riski o kadar yüksektir. Düşük titrelerdeki ANA pozitiflikleri her zaman otoimmün hastalığı işaret etmeyebilir. Bir çok laboratuvar 1:160 ve üzeri değerleri kronik konnektif doku hastalıkları lehine değerlendirmektedir (43, 44).

4.3.2 Enzim Linked Immünosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ANA tanısı

ELISA metodu temelinde bir enzimatik renk reaksiyonu bazında geliştirilmiş bir testtir (45).

Antijen spesifik olan bu metod uygulanması kolay, ucuz bir yöntemdir. Bu nedenlerden dolayı ELISA yöntemi dünyada ANA tespitinde bazı laboratuvarlarda tercih edilmektedir. Sadece rutin tarama testi şeklinde olmayıp aynı zamanda spesifik ANA'ların tespitinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (34). ELISA testinin güvenilirliği birçok araştırma ile test edilmiştir, farklı sonuçların yanında yanlış pozitif sonuçlar da elde edilmiştir (46).

4.4 Ekstrakte edilebilir nükleer antijenlere (ENA) karşı gelişen antikorların tespit yöntemleri

Anti-ENA antikorlarını tespit edebilmek için değişik metodlar geliştirilmiştir. Hemaglutinasyon metodu çok yaygın olarak kullanılmış ancak yerini daha hassas ve modern metodlara bırakmıştır. Bu yeni metodlar arasında western (immüno) blot, dot blot, line blot, multiplex immüno assay ve antijen-mikroarray sayılabilmektedir (47, 48).

4.4.1 Western (immüno) blot testi

Western blot testinde araştırılacak proteinler poliakrilamid jel elektroferez işlemine tabi tutulur ve molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılır. Ayrıştırılan proteinler nitroselüloz kağıt membranlara emdirilerek stripler elde edilir. Hasta serumuyla muamele edilen stripler belirli bir prosedürü takiben belirli bantlar oluşturup

oluşturmamasına göre değerlendirme yapılır (49). Resim 1’de western (immüno) blot test stripleri görülmektedir

Lot	Membran
D100601AC 62-46	ENA-1/ 62-46
D100601AC 91-78	ENA-1/ 91-78
D100601AC 91-77	ENA-1/ 91-77
D100601AC 91-76	ENA-1/ 91-76
D100601AC 91-75	ENA-1/ 91-75
D100601AC 91-74	ENA-1/ 91-74
D100601AC 91-73	ENA-1/ 91-73
D100601AC 91-71	ENA-1/ 91-71
D100601AC 91-70	ENA-1/ 91-70
D100601AC 91-69	ENA-1/ 91-69
D100601AC 91-68	ENA-1/ 91-68
D100601AC 91-67	ENA-1/ 91-67

Resim 1. Western (immüno) blot test stripleri

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 GEREÇ

Trabzon ili erişkin yaş grubundaki ANA seroprevalansını araştırmak amacıyla, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Dahiliye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı tarafından yapılan "Trabzon İli 20 Yaş Üzeri Erişkinlerde Guatr Prevalansı ve İlişkili Risk Faktörleri" isimli çalışmada, KTÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı tarafından yapılan "Trabzon İli 20-49 Yaş ve Üzeri Erişkinlerde Herpes Simpleks Tip-2 Seroprevalansı" ve "Trabzon İlinde 40 Yaş ve Üzeri Erişkinlerin Tetanoz Antitoksin Düzeyleri ve Etkileyen Faktörler" isimli çalışmalar için toplanan ve alikotlanarak -20 °C'de saklanan serumlar çalışmaya alındı.

5.1.1 Örneklem büyüklüğünün hesaplaması

Çalışmada Trabzon ilinden toplanan serumlarda ANA serolojisi IF yöntemi ile araştırıldı. Örneklem büyüklüğü beklenen en yüksek prevalans %99 güvenle %15 olacağı ön görüşü eşliğinde, %3 sapmayla $n = Z^2 \cdot 1 - \alpha / 2 \cdot X [p(1-p)/d^2]$ formülü kullanılarak 884 kişi olarak hesaplandı.

5.1.2 Örneklem seçimi

Çalışmada çok aşamalı örnekleme yöntemi kullanıldı. Birinci aşamada Trabzon iline bağlı 17 ilçeden ilin coğrafi özellikleri göz önüne alınarak kurayla 9 tanesi seçildi. İkinci aşamada her yerleşim bölgesinde sağlık ocağı bölgelerinden yararlanılarak 20 yaş ve üzeri erişkinler, yaş gruplarına, cinsiyete (Tablo 13-14) ve diğer sosyodemografik özelliklerine göre tabakalandırıldı.

5.1.3 Verilerin toplanması

Çalışmaya alınan tüm kişilere ait bilgileri elde edebilmek için araştırmacı tarafından geliştirilen bir anket formu kullanıldı. Yaş, cinsiyet, medeni durum, eğitim durumu, meslek, aylık gelir düzeyi ve tetanoza karşı aşılama durumlarının sorgulandığı anket formu, konu hakkında eğitim verilmiş olan Tıp Fakültesi Dönem 2 ve Dönem 5 öğrencileri tarafından yüzyüze görüşme tekniğiyle dolduruldu.

5.1.4 Kan örneği alınması

Anketi yapılan kişiler, ertesi gün sağlık ocağına davet edilerek brakial venden 7-8 ml kadar venöz kan antikoagülsüz vakumlu tüplere, özel iğneler kullanılarak, hava ile temas etmeyecek şekilde alındı. Alınan bu kanlardan 3000 rpm'de 8 dk'lık santrifüjü takiben serum örnekleri elde edildi; örnekler Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'na ulaştırıldı. Laboratuvarda, serumlar 1 mL'lik santrifüj tüplerine bölünerek serolojik analizleri yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

5.2 YÖNTEM

5.2.1 ANA varlığının tespiti

ANA varlığı ve boyanma paterni IF yöntemiyle Antibodies against cell nuclei (IgG) (EUROIMMUN, Lübeck, Almanya) kitleri kullanılarak belirlendi. Kitler üretici firmanın talimatlarına uygun olarak kullanılıncaya kadar +2 ile +8 °C'de muhafaza edildi. ANA IF test kit içeriği Tablo 7'da gösterilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce kullanılan tüm malzemeler oda sıcaklığına getirildi. Serum dilüsyonları 1:80 olacak şekilde dilüe edildi. Çalışmaya 884 serum örneği dahil edildi. Testler üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Floresans mikroskop kullanılmak şartıyla birbirinden bağımsız iki farklı kişi tarafından slaytlar floresan boyanma şiddetine göre +1, +2, +3, +4 olarak derecelere ayrıldı ve boyanma paternleri belirlendi.

Tablo 7. ANA IF test kit içeriği

ANA IF test kit içeriği	Hazırlanması
Her alanda 2 BIOCHIP slayt	Her bir slayt Hep-20-10 hücreleri/maymun karaciğeri kaplıdır, kullanıma hazır
1,5 mL floresan (FITC*) işaretli anti-human IgG	Kullanıma hazır
0,1 mL pozitif kontrol	Kullanıma hazır
2 paket fosfat tamponu (PBS)	Her paket 1Lt distile su çözülerek hazırlanır (PBS)
2 adet 2 mL Tween 20	Bir litre distile su içerisine çözülerk hazırlanan PBS içine 2mL tween 20 katılmasıyla hazırlanır (PBS-Tween)
3 mL kapatma medyum	Kullanıma hazır
Kapatma lamelleri	Kullanıma hazır
İnkübasyon tepsi	Kullanıma hazır

*FITC floresein izotiyosiyonat

Testin yapılışı

- Serum örnekleri 1/80 olacak şekilde 12,5 µL serum 987,5 µL fosfat tampon (PBS)-Tween solüsyonu içinde seyreltilerek hazırlandı.
- Hazırlanan dilüsyonlar inkübasyon tepsi üzerine ilgili alanlara 25 µL olacak şekilde aktarıldı ve üzerleri slaytlar ile kapatıldı, oda sıcaklığında 30 dak inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası slaytlar kaldırıldı ve üzerlerine PBS-Tween çözeltisi döküldü, ardından slaytlar PBS-Tween çözeltisi ile dolu yıkama küvetinde en az 5 dak olacak şekilde bekletildi.
- İnkübasyon tepsi üzerine ilgili alanlara 20 µL floresan işaretli anti-human IgG konjugat aktarıldı. Bunun üzerine yıkama süresi dolan slaytlar arka yüzleri kurulandıktan sonra hemen kapatıldı. Oda ısısında 30 dak inkübe edildi.

- e. İnkübasyon sonrası slaytlar kaldırıldı. Üzerlerine PBS-Tween solüsyonu döküldü. Ardından slaytlar PBS-Tween solüsyonu ile dolu yıkama küvetinde en az 5 dak olacak şekilde bekletildi.
- f. İnkübasyon tepsi üzerine lameller konuldu ve ilgili yerlere kapatma medyumu her bir alana 10 µL olacak şekilde aktarıldı, bunun üzerine yıkama süresi dolan slaytlar arka yüzleri kurulandıktan sonra hemen kapatıldı.
- g. Slaytlar floresan mikroskopta incelenmeye alındı.
- h. Hazırlanan tüm slaytlar farklı iki kişi tarafından değerlendirildi.
- i. Sonuçlar +1, +2, +3, +4 olarak değerlendirildi.

+1; 1/80 dilüsyon

+2; 1/160 dilüsyon

+3; 1/320 dilüsyon

+4; 1/640 dilüsyon olarak değerlendirildi.

5.2.2 Anti-ENA varlığının tespiti

ANA antikoları IF yöntemiyle pozitif bulunan ve benekli şekilde boyanan serum örnekleri anti-ENA antikolarının varlığı açısından araştırıldı. Çalışmada Anti-ENA profile Plus1 (IgG) (EUROIMMUN, Lübeck, Almanya) test kiti kullanıldı. Çalışmada yapılan bütün işlemler firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. ENA profile Plus1 (IgG) test içeriği Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. ENA profile Plus1 (IgG) test içeriği ve içerdiği antijen veya içerik miktarı

Anti-ENA profile plus 1 (IgG) test içeriği	İçerdiği antijen veya içerik miktarı
Antijen kaplı stripler	nRNP/Sm, Sm, SS-A/Ro, Ro-52, SS-B/La, Scl-70, Jo-1
Pozitif kontrol (IgG, insan) 100X konsantre	1 x 0,02 mL
Enzim konjugat (anti-human IgG, keçi), 10X konsantre	1 x 3 mL
Numune tamponu kullanıma hazır	1 x 100 mL
Yıkama tamponu 10X konsantre	1 x 50 mL
Substrat çözeltisi (NBT/BCIP*) kullanıma hazır	1 x 30 mL
İnkübasyon tepsisi	
Test talimatı	

* NBT/BCIP= Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro -3-indolyolphosphate

Testin yapılışı:

- Serum örnekleri ve pozitif kontrol 1:101 oranında numune tamponuyla seyreltildi.
- Antijen kaplı stripler kilitli ambalajından çıkarılıp inkübasyon tepsisi kanalları içine yerleştirildi ve üzerlerine 1500 µL numune tamponu eklenerek çalkalayıcı üzerinde 5 dak oda ısısında inkübe edildi. Sürenin dolmasıyla kanallardaki sıvı stripler içinde kalacak şekilde ortamdan uzaklaştırıldı.
- Her kanaldaki strip üzerine 1500 µL seyreltilmiş serum örneği ve pozitif kontrol eklenerek çalkalayıcı üzerinde 30 dak oda ısısında inkübe edildi. Sürenin dolmasıyla kanallardaki sıvı, stripler içinde kalacak şekilde ortamdan uzaklaştırıldı.
- 1/10 oranında yıkama tamponu ile distile su temiz bir kap içinde karıştırılarak yıkama çözeltisi elde edildi.
- Hazırlanan yıkama çözeltisinden her kanala 1500 µL aktarıldı. Çalkalayıcı üzerinde 5 dak oda ısısında bekletildi. Ardından sıvı ortamdan uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.

- f. Enzim konjugat ile numune tamponu 1/10 oranında seyreltildi. Hazırlanan dilüsyonlardan her kanaldaki strip üzerine 1500 µL seyreltilmiş enzim konjugat eklenerek çalkalayıcı üzerinde 30 dak oda ısısında inkübe edildi. Sürenin dolmasıyla kanallardaki sıvı stripler içinde kalacak şekilde ortamdan uzaklaştırıldı.
- g. Hazırlanan yıkama çözeltisinden her kanala 1500 µL aktarıldı. Çalkalayıcı üzerinde 5 dak oda ısısında bekletildi. Ardından sıvı ortamdan uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- h. Kullanıma hazır şekilde bulunan substrat çözeltisinden her kanala 1500 µL aktarıldı. Çalkalayıcı üzerinde 10 dak oda ısısında bekletildi. Sürenin dolmasıyla kanallardaki sıvı stripler içinde kalacak şekilde ortamdan uzaklaştırıldı.
- i. Distile su ile her kanala 1500 µL aktarıldı. Çalkalayıcı üzerinde 1 dak oda ısısında bekletildi, ardından sıvı ortamdan uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- j. Sonuçlar EUROLinescan programı kullanılarak değerlendirildi.

5.2.3 İstatistiksel yöntem

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 13.0 programı kullanıldı. ANA pozitifliğine etki eden faktörleri belirlemek amacıyla sonuçlar yaş, cinsiyet, yerleşim yeri, sigara kullanımı, guatr olma, medeni durum, eğitim düzeyi ve gelir düzeyi durumuna göre analiz edildi. Değerlendirmede ki-kare testi (Pearson ki-kare testi) kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alındı.

6. BULGULAR

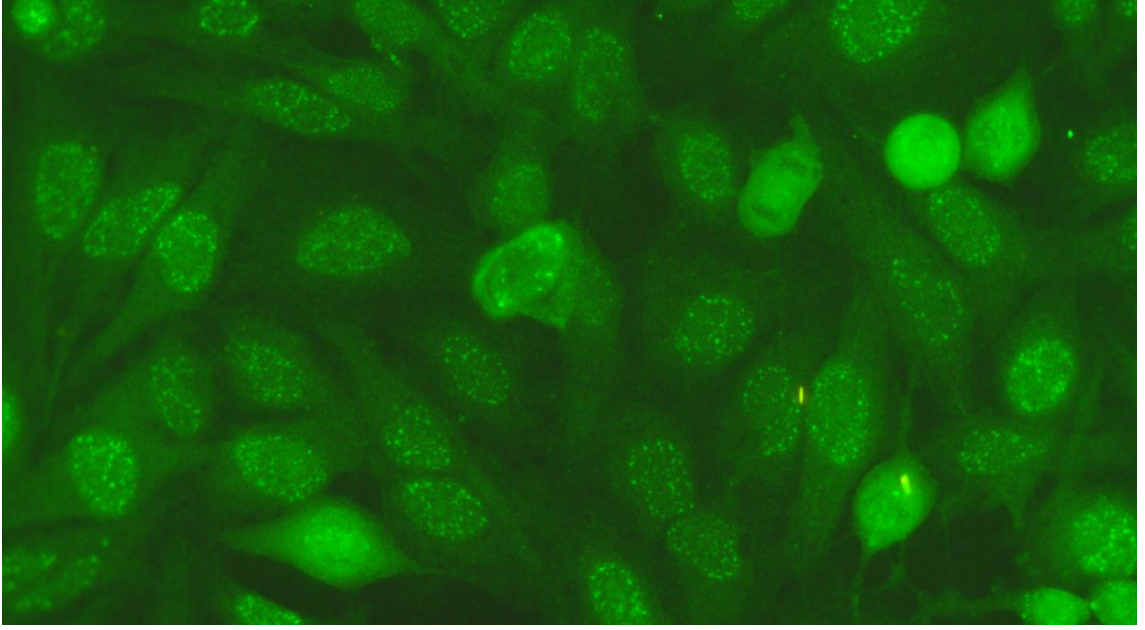
Trabzon ili erişkin yaş gruplarında ANA ve anti-CCP seropozitifliğinin araştırılması amacıyla Trabzon merkez ve 9 ilçesinden toplam 884 kişiden elde edilen serum örnekleri çalışmaya alındı. Toplanan serum örneklerinin cinsiyet ve yerleşim yerlerine göre dağılımı Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Toplanan serum örneklerinin yerleşim yerleri ve cinsiyete göre dağılımları

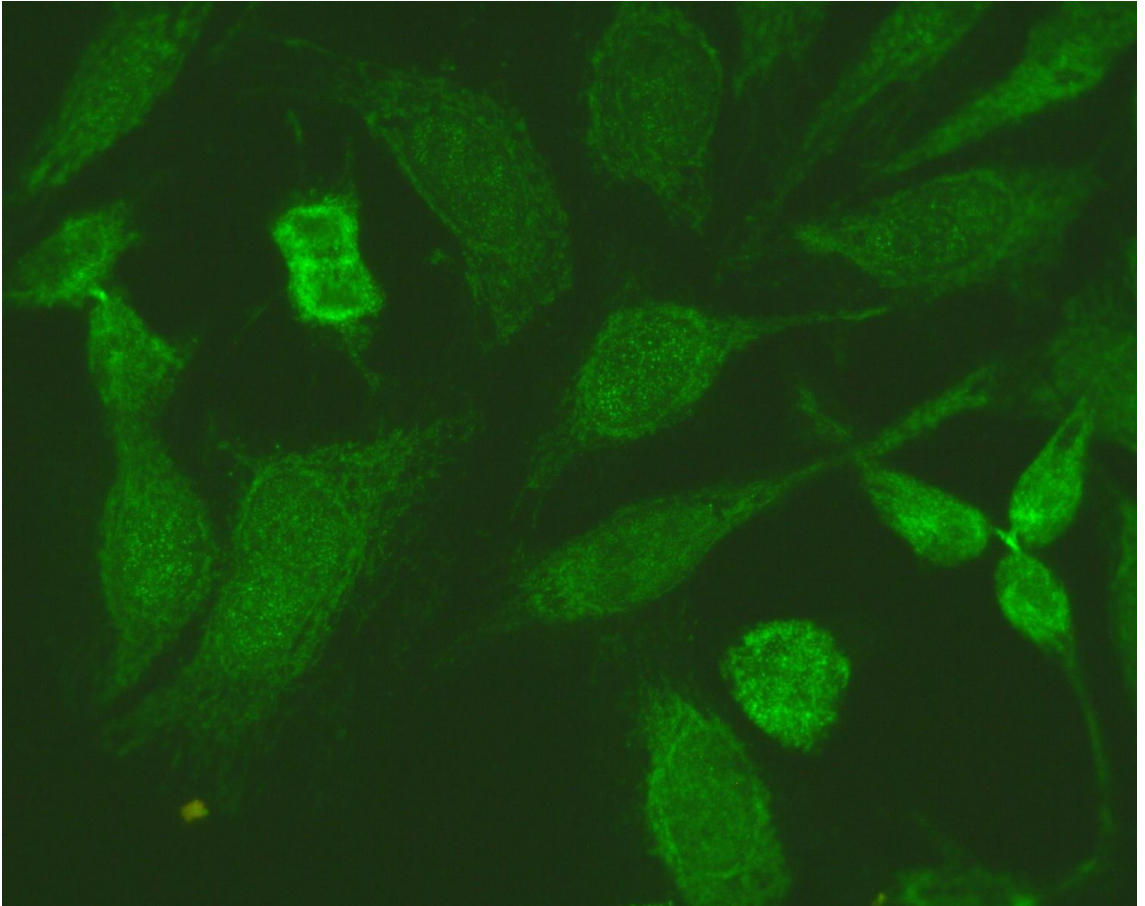
YERLEŞİM YERİ	KADIN	ERKEK	TOPLAM	YÜZDE (%)
Merkez	275	266	541	61,2
Akçaabat	50	45	95	10,7
Araklı	26	23	49	5,5
Çaykara	3	3	6	0,7
Düzköy	6	6	12	1,4
Maçka	10	12	22	2,5
Of	25	23	48	5,4
Sürmene	19	18	37	4,2
Vakfikebir	24	20	44	5,0
Yomra	15	15	30	3,4
Toplam	453	431	884	100

6.1 ANA seropozitiflikleri ve dağılımları

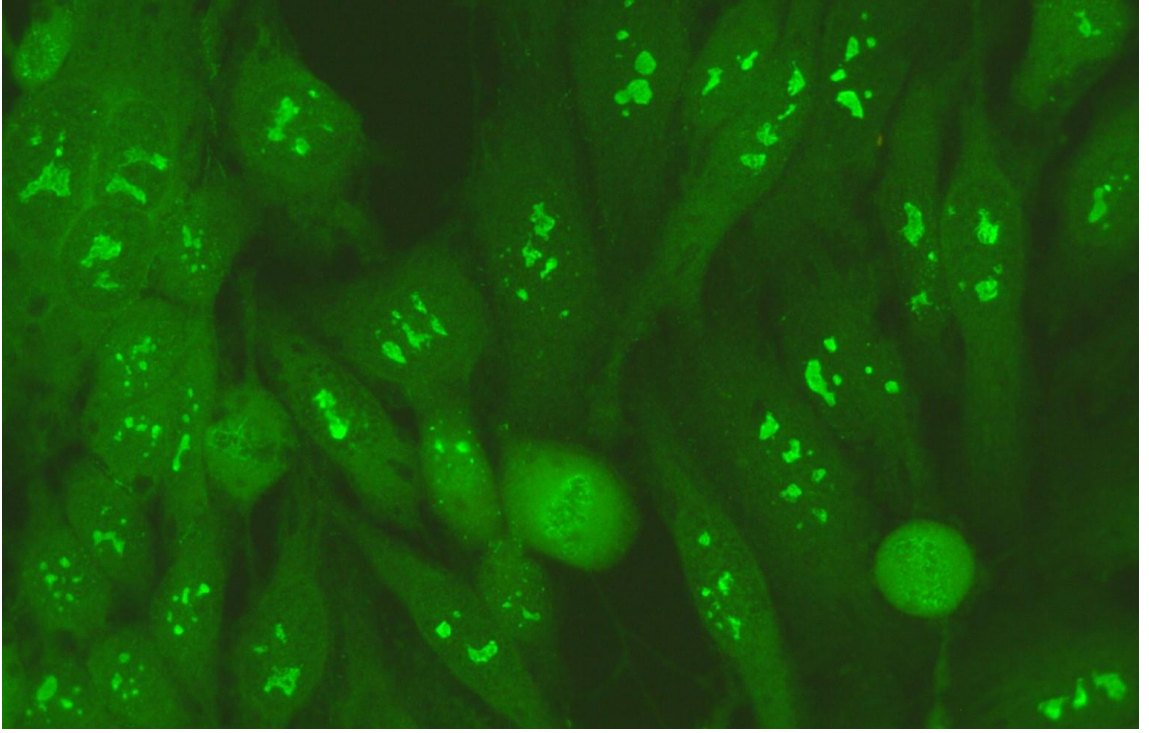
Çalışmaya alınan 884 serum örneğinin 132’sinde (%14,93) ANA testi 1:80 ya da daha üzeri dilüsyonlarda pozitif olarak tespit edildi. En sık görülen boyanma paterni benekli patern (53 örnek, %5,99) olarak belirlendi. Benekli patern Resim 2’de gösterilmiştir. İkinci en sık görülen boyanma paterni sitoplazmik patern (36 örnek, %4,07) olarak belirlendi. Sitoplazmik patern Resim 3’de gösterilmiştir. Üçüncü sıklıkta nükleoler patern (26 örnek, %2,94) olarak belirlendi. Nükleoler patern Resim 4’de gösterilmiştir. ANA pozitiflikleri ve boyanma paternleri Tablo 10’da gösterilmiştir.



Resim 2. Benekli boyanma paterni



Resim 3. Sitoplazmik boyanma paterni



Resim 4. Nükleoler boyanma paterni

Tablo 10. ANA pozitifliklerinin IF boyanma paternlerine göre dağılımları

IF BOYANMA PATERNİ	ANA POZİTİFLİK DERECESESİ				SAYI (n=884)	YÜZD E (%)
	1:80	1:160	1:320	1:640		
Benekli	3				3	0,33
Benekli+ mid body	2				2	0,22
Benekli+ nükleoler	1				1	0,11
Kaba benekli	1	2			3	0,33
Kaba benekli, ince benekli	2				2	0,22
İnce benekli	22	5	2		29	3,28
Homojen+benekli		4		1	5	0,56
Homojen+ ince benekli	2	5	1		8	0,90
Homojen	3	1		1	5	0,56
Mid-body	3	2			5	0,56
Nükleer noktalı	1	2			3	0,33
Nükleoler	18	6	2		26	2,94
Sentriol	1				1	0,11
Sentromer				2	2	0,22
Spindle fibres	1				1	0,11
Sitoplazma filamentöz	11	5	2		18	2,03
Sitoplazma benekli	13	5			18	2,03
Toplam	84	37	7	4	132	%14,93
	%9,50	%4,18	%0,56	%0,45		

Çalışmada Trabzon il merkezindeki 541 örnekten 81'i (%14,9), ilçelerden alınan 343 örnekten 51'i (%14,86) ANA pozitif bulundu. En yüksek pozitiflik oranı Araklı ilçesinde görüldü. Araklı'dan alınan 49 örnekten 11'i (%22,4) ANA pozitifliği. İl merkezi ve ilçelerdeki ANA pozitifliklerinin dağılımları Tablo 11 ve Tablo 12'de gösterilmiştir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p=0,987).

Tablo 11. ANA pozitifliklerinin yerleşim yerlerine göre dağılımı.

YERLEŞİM YERİNE GÖRE	KİŞİ SAYISI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
Merkez	541	81	14,97
Akçaabat	95	16	16,84
Araklı	49	11	22,44
Çaykara	6	1	16,66
Düzköy	12	0	0
Maçka	22	3	13,63
Of	48	4	8,33
Sürmene	37	5	13,51
Vakfikebir	44	8	18,18
Yomra	30	3	10,00
Toplam	884	132	14,93

Tablo 12. ANA pozitifliğinin merkez ve ilçeler arasındaki dağılımı.

	KİŞİ SAYI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
Merkez	541	81	14,97
İlçeler	343	51	14,86
Toplam	884	132	14,93

ANA pozitifliklerinin cinsiyetlere göre dağılımları değerlendirildi; 453 kadının serum örneğinin 73'ü (%16,1) ANA pozitif olarak tespit edildi, 431 erkeğin serum örneğinin 59'u (%13,6) ANA pozitif olarak saptandı. ANA pozitiflik sayı ve oranlarının cinsiyetlere göre dağılımları Tablo 13'de belirtilmiştir.

ANA pozitifliklerinin cinsiyetlere göre dağılımları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,312$).

Tablo 13. ANA pozitifliklerinin cinsiyetlere göre dağılımı.

CİNSİYET	KİŞİ SAYISI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
Kadın	453	73	16,11
Erkek	431	59	13,68
Toplam	884	132	14,93

ANA pozitifliklerinde yaşa göre dağılımlara bakıldığında 30-39 yaş grubunda 262 örneğin 37'sinde (%14,12), 50-59 yaş grubunda 122 örneğin 19'unda (%15,5) ve 60-69 yaş grubunda 69 örneğin 11'inde (%15,9) ANA pozitifliği tespit edildi. 30-39, 50-59 ve 60-69 yaş gruplarında daha yüksek oranlar tespit edilirken 70 yaş ve üzerindeki 55 örneğin sadece 7'si (%12,72) ANA pozitif olarak saptandı. Tüm yaş gruplarında en az oranda pozitiflik 70 yaş ve üzerindeki grupta tespit edildi. ANA pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 14'de gösterilmiştir.

ANA pozitifliğinin yaşa göre dağılımlarına bakıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0,980$).

Tablo 14. ANA pozitif örneklerin yaş gruplarına göre dağılımları

YAŞ GRUBU	KİŞİ SAYISI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
20-29	262	37	14,12
30-39	203	33	16,25
40-49	173	25	14,45
50-59	122	19	15,57
60-69	69	11	15,94
70+	55	7	12,72
Toplam	884	132	14,93

ANA pozitifliğinin sigara kullanımı ile bağlantısına bakıldığında sigara kullanan 308 kişinin serum örneklerinden 35'i (%11,36) ANA pozitif olarak tespit edildi. Sigara kullanmayan 484 kişinin serum örneklerinden 82'si (%16,84) ANA pozitif olarak tespit edildi. Sigara kullanmış bırakmış olan 92 kişinin serum örneklerinden 15'i (%16,3) ANA pozitif olarak tespit edildi. Sigara kullanımı ile ANA pozitifliği dağılımları Tablo 15'de gösterilmiştir.

ANA pozitifliğinin sigara kullanımına göre dağılımlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,054$).

Tablo 15. ANA pozitifliğinin sigara kullanımına göre dağılımı

SİGARA KULLANIMI	KİŞİ SAYISI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
Kullanıyor	308	35	11,36
Kullanmıyor	484	82	16,94
Kullanmış bırakmış	92	15	16,30
Toplam	884	132	14,93

Gelir durumuna göre ANA pozitifliğinin dağılımına bakıldığında 1000 Türk lirası (TL) ve altında gelire sahip 656 kişinin serum örneğinin 97'sinde (%14,78) ANA pozitif tespit edildi. Gelir durumu 1000 Türk lirası üzerindeki 228 kişinin serum örneğinin 35'inde (%15,35) ANA pozitif tespit edildi. Gelir durumu ve ANA pozitifliği dağılımı Tablo 16'de gösterilmiştir.

Gelir düzeyine göre karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0,887$).

Tablo 16. Gelir durumu ve ANA pozitifliği dağılımı

GELİR DÜZEYİ	KİŞİ SAYISI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
1000 TL ve altı	656	97	14,78
>1000 TL	228	35	15,35
Toplam	884	132	14,93

Medeni durum ile ANA pozitifliğinin dağılımlarına bakıldığında evli olan 650 kişinin serum örneğinden 98'inde (%15,07) ANA pozitif olarak tespit edildi. Bekar olan 182 kişinin serum örneğinden 29'unda (%15,93) ANA pozitif tespit edildi. Medeni duruma göre ANA pozitiflik dağılımları Tablo 17'da gösterildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0,826$).

Tablo 17. Medeni duruma göre ANA pozitifliği dağılımları

MEDENİ DURUMU	KİŞİ SAYISI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
Evli	650	98	15,07
Bekar	182	29	15,93
Diğer	52	5	9,61
Toplam	884	132	14,93

Eğitim durumu ile ANA pozitifliği dağılımlarına bakıldığında örgün eğitim alamayan 89 kişinin serum örneğinden 14'ünde (%15,73) ANA pozitif tespit edildi. İlk öğretim mezunu 406 kişinin serum örneğinden 54'ünde (%13,30) ANA pozitif tespit edildi. Lise ve üstü eğitim düzeyine sahip 386 kişinin serum örneğinden 64'ünde

(%16,58) ANA pozitifliği tespit edildi. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0,787$). Eğitim durumuna göre ANA pozitiflik dağılımları Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18. Eğitim durumuna göre ANA pozitiflik dağılımları

EĞİTİM DURUMU	KİŞİ SAYI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
Örgün eğitim almayanlar	89	14	15,73
İlköğretim mezunu	406	54	13,30
Lise ve üstü mezunu	386	64	16,58
Toplam	881	132	14,93

Beden kitle indeksi (BKİ) kişinin kilosunun boy uzunluğunun karesine bölme işlemi yapılmasıyla elde edildi. BKİ 25 ve üzeri olanlar ile 25’in altı olanlarda ANA pozitifliğine göre dağılımlar incelendiğinde; BKİ 25 ve üzeri hesaplanan 23 kişiden 3’ünde (%13,04) ANA pozitif tespit edildi. BKİ 25’in altında hesaplanan 861 kişiden 129’unda (%14,98) ANA pozitif olarak tespit edildi. Dağılımlar Tablo 19’da gösterilmiştir. İstatistik olarak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=1,000$).

Tablo 19. Beden kitle indeksine göre ANA pozitifliğinin dağılımları

BEDEN KİTLE İNDEKSİ (BKİ)	KİŞİ SAYI	ANA POZİTİFLİĞİ (n)	YÜZDE (%)
25 ve üzeri	23	3	13,04
<25	861	129	14,98
Toplam	884	132	14,93

6.2 Anti-ENA antikoru ve görülen bantların dağılımları

ANA pozitif olarak saptanan ve benekli boyanma özelliği gösteren 53 serum rneği anti-ENA antikoru belirlenmek amacıyla çalışmaya alındı. Bu amaçla immünblot testleri uygulanarak anti-ENA antikoru belirlendi. Anti-ENA antikoru ANA pozitiflik derecelerine göre dağılımları Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Anti-ENA antikorlarının ANA pozitiflik derecelerine göre dağılımları

ANA POZİTİFLİĞİ	nRNP/Sm				Sm				SS-A/Ro				SS-B/La				Scl-70				Jo-1				Ro52				Toplam	
	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+		
Benekli													1				1									2				4
Benekli +mid body													1				1				1					1				4
Benekli +nükleoler									1																	1				2
Homojen+ benekli		1								1											1							1	4	
Homojen +ince benekli	1	2				4	1			2	1			1	1		1	1			1				1	3			20	
İnce benekli	2	1	2		6	1	1		8	3	1		5	1		6	1			3	1				7	3	1		53	
Kaba benekli +ince benekli									1											1					1				3	
Kaba benekli						1				1			1												1	1			5	
Toplam	3	4	2		6	6	2		10	7	2		8	2	1		9	2			6	2			14	7	1	1	95	
Yüzde		9,47				14,73			20				11,57				11,57				8,42				24,21				100	

Serum örneklerinden 3'ünde herhangi bir anti-ENA antikoru tespit edilemedi, diğer 50 örnekte anti-ENA antikolarına ait bantlar elde edildi. 1:160 dilüsyonda homojen granüler boyanma paterni gösteren bir örnekte sadece anti-Jo-1 bantında pozitiflik saptandı. Diğer tüm örneklerde beklendiği gibi nRNP/Sm, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B antijenlerine ait antikor bantları tespit edildi. Scl-70 bantının tespit edildiği tüm örneklerde SS-A, SS-B, nRNP/Sm bantlarından en az biri tespit edildi.

Çalışılan serum örneklerinde toplam 95 anti-ENA antikolarına ait bant tespit edildi. Bunlardan 23'ü Ro52 antijenine ait banta karşı oluştu. Bunları sırayla SS-A'ya karşı oluşan 19 bant, Sm'ye karşı oluşan 14 bant takip etti.

Tüm örnekler arasındaki seroprevalanslarına bakıldığında, Ro52'ye ait prevalans %2,60 olarak tespit edildi. ENA antijenlerine karşı oluşan bant sayıları Tablo 21'de gösterildi.

Tablo 21. ENA antijenleri ve prevalansı

ENA ANTİJENLERİ	OLUŞAN BANT SAYISI (n=95)	PREVALANS (%) (n=884)
nRNP/Sm	9	1,01
Sm	14	1,58
SS-A/Ro	19	2,14
SS-B/La	11	1,24
Scl-70	11	1,24
Jo-1	8	0,90
Ro52	23	2,60

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücre içi self antijenlere karşı gelişen otoantikörler kollajen doku hastalıklarıyla yakından ilişkilidir. Otoimmünite ve sonucunda gelişen otoantikörler SLE, sistemik skleroz, sjögren sendromu gibi sistemik hastalıkların yanında PM-DM gibi birçok organ tutulumlu hastalıklarla beraber bulunurlar (50). ANA'lar birçok otoimmün ve enfeksiyon hastalıklarında tespit edilebilmektedir. ANA tespiti bu hastalıklar için çok özgül bir parametre olmamasına rağmen, SLE gibi bazı hastalarda %98've varan bir oranda bulunabilmektedir. ANA'lar tanısal olmasa bile tarama amaçlı olarak araştırılması yararlıdır (51). ANA tespiti için en yaygın ve altın standart test IF testidir. Bu amaçla substrat olarak Hep-2 hücreleri en fazla kullanılan substrattır (52). ANA'ların tespiti otoimmün hastalıkların tanısında önemli bir basamağı oluştururken, bu hastalıkların tedavi planlamalarında ve takiplerinde önemli yere sahiptir (50).

Normalde sağlıklı insanlarda, kronik hepatit, neoplastik hastalıklar, tüberküloz, malarya ve çeşitli bakteriyel enfeksiyonlarda otoantikörler düşük titrelerde tespit edilebilmektedir (50). Normal insanlarda ve asemptomatik hastalarda tespit edilen düşük titredeki otoantikörlerin ileride oluşacak olan hastalıkların habercisi olabileceğine yönelik inanış giderek artmaktadır (53).

Biz bu çalışmada Trabzon ili erişkin yaş gruplarından toplanan 884 kişiye ait serum örneklerini çalışmaya alınmıştır. Toplanan serum örneklerinde ANA seropozitifliğinin prevalansını yaş, cinsiyet, yerleşim yeri, sigara kullanımı, guatr olma, medeni durum, eğitim düzeyi ve obezite durumlarına göre araştırıldı.

Bu çalışmada ANA seropozitifliğini belirlemek amacıyla IF yöntemi kullanılarak çalışmaya alınan 884 serum örneğinden 132'sinde (%14,93) ANA pozitif bulundu.

ANA prevalansını belirlemek için yapılan çeşitli çalışmalarda değişik oranlarda prevalans değerleri elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda ANA prevalans değerleri 1/5 ile 1/80 dilüsyonlarda %4 ile %22,6 arasında değişim göstermektedir. (54-61).

Hayashi ve ark. (62) Japonya'da Hyogo bölgesinde 5 yıllık süre içinde 2181 kişi üzerinde yaptıkları çalışmada; 1:40 dilüsyonda ANA prevalansını %26 olarak, 1:160 dilüsyonda ise %9,5 olarak tespit etmişlerdir.

Marin ve ark. (63) Meksika'da 104 kan donörü, 100 sağlık çalışanı ve 100 romatolojik hastalığı olan toplam 304 kişi üzerinde yaptıkları çalışmada; 1:80 dilüsyonda ANA prevalansını %13,4 olarak, 1:160 dilüsyonda ise %3,2 olarak tespit etmişlerdir.

Baig ve Shere (54) Suudi Arabistan'da sağlıklı donörlerden ve herhangi bir otoimmün hastalığı olmayan hastaların serum örneklerinden yaptıkları çalışmada; 1:5 dilüsyonda ANA prevalansını %4,2 tespit etmişlerdir. Kullandıkları substrat belirtilmemiştir.

Vlam ve ark. (53) Belçika'da sağlıklı kan donörlerinin serum örneklerinde yaptıkları çalışmada 1:80 dilüsyonda ANA prevalansını %13 olarak tespit etmişlerdir. Buna benzer bir çalışmada Vazquez-Del Mercado ve ark. (64) Meksika popülasyonunda ANA prevalansını %4,7 olarak bildirmişlerdir.

Satoh ve ark. (61) Amerika Birleşik Devletleri'nde 12 yaş ve üzeri 4754 kişiden elde edilen serum örneklerinde yaptıkları çalışmada 1:80 dilüsyonda ANA prevalansını %13,8 olarak tespit etmişlerdir.

ANA seropozitifliğinin farklı çalışmalarda bu kadar farklı oranlarda bulunması, serum örneği alınan kişilerin yaşadığı yerlerin coğrafi farklılıklarına, genetik özelliklerine, beslenme alışkanlıklarına, kullanılan testlerin uygulanma biçimlerine ve laboratuvarın performanslarına göre değişiklik gösterebilmektedir.

Çalışmamızda il merkezinde yaşayan bireylerden elde edilen 541 örnekten 81'i (%14,9) ilçelerde yaşayanlardan alınan 343 örnekten 51'i (%14,8) ANA pozitif bulundu. Bu konuda daha kapsamlı çalışmaların kırsal ve kentsel yerleşim yerlerine göre farklılıkları daha iyi yansıtacağını düşünmekteyiz.

ANA pozitifliklerinin cinsiyetlere göre dağılımlarının değerlendirilmesinde 453 kadının serum örneğinin 73'ü (%16,1), 431 erkeğin serum örneğinin 59'u (%13,6) ANA pozitif bulundu. Bu çalışmada ANA seropozitifliği kadınlarda erkeklere oranla biraz

daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel olarak bu yükseklik anlamlı bulunmamıştır ($p=0,312$).

Satoh ve ark. (61) yaptıkları çalışmada ANA prevalansını kadınlarda erkeklere oranla daha yüksek (kadınlarda %17,8 erkeklerde %9,6) bulmuşlardır.

Hayashi ve ark. (62) yaptıkları çalışmada kadınlardaki ANA prevalansını erkeklere oranla önemli ölçüde yüksek bulmuşlardır. 1:40 dilüsyonda ANA prevalansını erkeklerde %15, kadınlarda %31,7 olarak tespit etmişlerdir. 1:160 dilüsyonda ANA prevalansını ise erkeklerde %4,3, kadınlarda %12,4 olarak tespit etmişlerdir.

Baig and Shere (54) Suudi Arabistan'da yaptıkları çalışmada ANA pozitifliğini kadınlarda erkeklere oranla 4 kat daha fazla tespit etmişlerdir.

Al-Jabri ve ark. (59) Umman'da yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi ANA pozitifliğini kadınlarda erkeklere göre çok az yükseklikte tespit etmişlerdir.

Otoimmün hastalıkların neden kadınlarda daha yüksek olduğu tam olarak anlaşılammıştır. Bu yöndeki en önemli görüşler kadınlardaki hormonal farklılıklar üzerine yoğunlaşmıştır (65, 66). 20 yaş altında görülen ANA prevalansının cinsiyet ayrımından bağımsız olduğuna dair görüşler mevcuttur. Bu görüşler bize ANA'ların kadınlarda daha fazla tespit edilmesinin yaşamlarının ilerleyen yıllarında oluşacak otoimmün hastalıklar için zemin hazırlayan faktörlerden birisi olduğu bildirilmektedir (67).

Bu çalışmada ANA pozitifliklerinde yaşa göre dağılımlara bakıldığında 20-29 yaş grubunda 262 örneğin 37'sinde (%14,12), 50-59 yaş grubunda 122 örneğin 19'unda (%15,5) ve 60-69 yaş grubunda 69 örneğin 11'inde (%15,9) ANA pozitifliği tespit edilmiştir. 20-29, 50-59 ve 60-69 yaş gruplarında giderek artan oranlar tespit edilirken 70 yaş ve üzerindeki 55 örnekten sadece 7'si (%12,72) ANA pozitif saptanmıştır. 70 yaş ve üzeri bireylerde immün sistem baskılanmakta ve, bu nedenle antikor üretiminde bir azalma olabilmektedir.

Satoh ve ark.'nın (61) yaptıkları çalışmada ANA prevalansının 50-59 ve 70 yaş üzerinde anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir.

Hayashi ve ark. (62) yaptığı çalışmada ise 20-30 yaş aralığında ANA prevalansı yüksek oranda tespit edilirken, 81-93 yaş aralığında ise ANA prevalansında belirgin düşüş tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ANA pozitifliğinin sigara kullanımı ile bağlantısına bakıldığında sigara kullanan 308 kişinin serum örneklerinden 35'i (%11,36) ANA pozitif olarak tespit edildi. Sigara kullanmayan 484 kişinin serum örneklerinden 82'si (%16,84) ANA pozitif olarak bulundu. Sigara kullanmış bırakmış 92 kişinin serum örneklerinden 15'i (%16,3) ANA pozitif olarak bulundu. Sigara kullanmaya devam eden gruptaki ANA seropozitifliğinin düşük görülmesi, sigaranın immün sistem üzerindeki olumsuz etkilerinin sonucu olabileceğini aklımıza getirmektedir.

Satoh ve ark. (61) yaptıkları çalışmada sigara kullanımının ve süresinin ANA prevalansı ile herhangi bir ilişkisini tespit edememişlerdir.

Bu çalışmada gelir durumu ile ANA pozitifliği arasında istatistiksel bir ilişki bulunamamıştır. Geliri daha fazla olan grupta daha fazla ANA pozitiflik oranı tespit edilse de bu fazlalığın dikkate alınamayacak düzeyde olduğunu düşünmekteyiz. Gelir durumuyla ANA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

Eğitim durumu ve medeni durum değerlendirmeye alındığında yine her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır.

Beden kitle indeksine (BKİ) göre bir değerlendirme yapıldığında; BKİ 25 ve üzeri hesaplanan 23 kişiden 3'ünde (%13,04) ANA pozitif tespit edildi. BKİ 25'in altında hesaplanan 861 kişiden 129'unda (%14,98) ANA pozitif olarak tespit edildi. BKİ 25'in altında hesaplanan kişilerin serum örneklerinde daha fazla oranda ANA pozitifliği tespit edilmiştir. Beklenmeyen bu duruma sebep olarak adipoz dokunun proinflatuar sitokin ve östrojen salgılanması gösterilebilir (68). Obezitenin bazen immün sistemini baskıladığı ve ANA'nın bu nedenle düşük tespit edildiği de düşünülebilir (69).

Satoh ve ark. (61) yaptığı çalışmaya göre BKİ 25-30 arasındaki kişilerde ANA pozitifliğini %12,8, BKİ 30 ve üzeri kişilerde ANA pozitifliğini %12,6, BKİ 25'in altındaki kişilerde ise %16,5 olarak bildirmişlerdir.

ANA pozitif olarak saptanan ve benekli boyanma özelliği gösteren 53 serum örneği anti-ENA antikorlarını belirlemek amacıyla çalışmaya alındı. Bu amaçla immünblot testleri uygulanarak anti-ENA antikorları belirlendi. Çalışmaya alınan serum örneklerinden üç tanesinde herhangi bir anti-ENA antikorunu tespit edilemedi, diğer elli örnekte anti-ENA antikorlarına ait spesifik bantlar elde edildi. Homojen ve benekli boyanma paterni gösteren bir örnekte sadece anti-Jo-1 bantında pozitiflik saptandı, diğer tüm örneklerde beklendiği gibi nRNP/Sm, Sm, SS-A/Ro, Ro-52, SS-B/La antijenlerine ait antikor bantları tespit edildi. Bu çalışmada en fazla Ro52 antijen bantı tespit edilmiştir. Bu antijenlere karşı oluşan antikorlar çeşitli otoimmün hastalıklarda tespit edilmektedirler. Bunlardan en önemlileri SLE, sjögren sendromu, ilaca bağlı lupus, PM-DM sayılabilir. Burada tespit edilen anti-ENA antikorlarına ait bantlar tespit edilen kişilerde otoimmün hastalık oluşması yönünden erken uyarı belirteci yönünden yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak tespit edilen bütün antikorlar her zaman hastalık oluşturmayacağı akıldan çıkarılmamalıdır.

Satoh ve ark. (61) yaptıkları çalışmaya göre ABD toplumunda en yaygın bulunan ENA antikorunu Ro52 antijenine yönelik oluşan antikorlar olarak bildirilmektedir.

Marin ve ark. (69) yaptığı çalışmaya göre; ANA pozitif olarak bulunan örneklerin %50,3'ü benekli patern boyanmıştı.

Sonuç olarak bölgemizde ANA seropozitifliği oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özellikle klinik bulguları olan hastalarda ANA tarama testlerinin yapılması, ANA testinde benekli patern görülen örneklerin anti-ENA antikorları yönünden test edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Davidson A, Diamond B (2001). Autoimmune Diseases. *New England Journal of Medicine* 345(5):340-350.
2. Harrison TR, Fauci AS, Langford CA (2006). *Harrison's rheumatology*. McGraw-Hill Professional çev. ed. Soy M. (2007) nobel tıp kitabevi 59-66.
3. Silverstein A, Rose N (2000). There is only one immune system. The view from immunopathology. *Semin Immunol* 12: 173 and 257-178 and 344.
4. Li QZ, Karp DR, Quan J, Branch VK, Zhou J, Chong YLBF, Wakeland EK and Olsen. NJ (2011) Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Research & Therapy*, 13:R38.
5. Braun-Falco O, Plewig G, Wolf H.H, Burgdorf WHC, Landthaler M (2005). *Dermatologie und Venerologie*. 5. Auflage. Springer, Heidelberg. 1493-1498.
6. Vollmar A, Dingermann T (2005). *Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart. ISBN3-8047-2189-3.
7. Rose N (1997). Autoimmune Diseases: tracing the shared threads. *Hosp Pract* 32: 147.
8. Jacobson D, Gange S, Rose N, Graham N (1997). Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 84: 223-243.
9. Sinha A, Lopez M, McDevitt H (1990). Autoimmune diseases: The failure of self tolerance. *Science* 248: 1380-1388.
10. Abdul K Abbas, Andrew H Lichtman (çev. ed.; Y. Camcıoğlu, G. Deniz). *Temel İmmünoloji*, İstanbul Medikal Yayıncılık 2007.
11. Hörster I, Hirose R, Arbeit J, Clausen BE, Hanahan D (1995). Limited capacity for tolerization of CD4+ T-cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity* 2: 573-585.
12. Goodnow C, Crosbie J, Adelstein S (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334 (676): 682.
13. Kamradt T, Mitchison N (2001). Tolerance and Autoimmunity. *New England Journal of Medicine* 344 (9): 655-66.

14. Nemazee D, Burki K (1989). clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337: 562-566.
15. Rathmell J, Townsend S, Xu J, Flavell R, Goodnow C (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas(CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 87: 319-329.
16. Kelly W, Harris EJ, Ruddy S, Sledge C (1997). Genetic analysis of rheumatic diseases. *Textbook of Rheumatology* 5th ed. Vol.1. Philadelphia: WB Saunders: 209-227.
17. Kukreja A, Maclaren N (1999). Autoimmunity and Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinol Metab* 84: 4371-4378.
18. Ortonne J (1999). Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *Br Journal Dermatol* 140: Suppl 54: 1-7.
19. Kumar P, Laloraya M, She J (2002). Population genetics and functions of the autoimmune regulator (AIRE). *Endocrinol Metab Clin North Am* 31: 321-338.
20. Pearce S, Cheetham T, Imrie H (1998). A common and recurrent 13-bd deletion in the autoimmune regulator gene in British kindreds with autoimmune polyendopathy type 1. *Am J Hum Genet* 63: 1675-1684.
21. Scott H, Heino M, Peterson P (1998). Common mutations in autoimmune polyendocrinopathycandiasis-ectodermal dystrophy patients of different origins. *Mol Endocrinol* 12: 1112-1119.
22. Tiwari JL, Terasaki PI (1985). HLA and disease associations. Springer-Verlag, New York. 18-27.
23. Albert LJ, Inman RD (1999). Molecular mimicry and autoimmunity, *N Engl J Med*. Dec 30; 341 (27): 2068-74.
24. Dahlquist G (1998). The aetiology of type I diabetes: an epidemiological perspective. *Acta Paediatr Suppl* 425: 5-10.
25. Noseworthy J, Luccinetti C, Rodriguez M, Weinshenker B (2000). Multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 343: 938-952.
26. Galvin J, Hemric M, Ward K, Cunningham M (2000). Cytotoxic Ab from rheumatic carditis recognizes heart valves and laminin. *J Clin Invest* 106: 217-224.

27. Guilherme L, Cunha Neto E, Coelho V (1995). Human heart-infiltrating T cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation* 92: 415-420.
28. Malkiel S, Liao L, Cunningham M, Diamond B (2000). T cell dependent antibody response to the dominant epitope of streptococcal polysaccharide, N-acetylglucosamin, is cross-reactive with cardiac myosin. *Infect Immun* 68: 5803-5808.
29. Rocco A, Gargano S, Provenzano A (2001). Incidence of autoimmune thyroiditis in interferon alpha treated and untreated patients with chronic hepatitis C virus infection. *Neuroendocrinol Lett* 22: 39-44.
30. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3: 797-801.
31. Cutolo M, Villaggio B, Foppiana L, Briata M, Sulli A, Pizzorni C (2000). The hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 917: 835-843.
32. Fernandez MF, Mattioli M (1976). Antinuclear antibodies: immunologic and clinical significance. *Seminars in arthritis and Rheum* 6 (2), 83-124.
33. Tan EM, Kunze HG (1966). Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 96: 464.
34. Yashwant K, Alka B, Ranjana Walker M (2009). Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol*. 4: 1.
35. Rondeel JM (2002). Immunofluorescence versus elisa for the detection of antinuclear antigens. *Exp Rev Mol Diagn* 2: 226-232.
36. Friou CJ (1957). Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 36: 890-897.
37. Bigazzi P, Rose N. *Methods in immundiagnosis*, Center of immunology State University of New York at Buffalo, John Wiley and Sons. 107-108.
38. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, Kromminga A, Von Landenberg P, Messer G, Witte T (2009) Contemporary Challenges in Autoimmunity: *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1173: 166–173.

39. Lightfoote MM, Chirmule N, Homburger HA, Kavanaugh A, Nakamura RM, Papisch W, Tetin SY (2006). Quality Assurance of Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens: (1) Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and (2) Microtiter Enzyme Immunoassay Methods; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Volume 26: Number 13.
40. Cook L (1998). New methods for detection of anti-nuclear antibodies. *Clin Immunopathol* 88: 211-220.
41. Saitta MR, Keene JD (1992). Molecular biology of nuclear antigens. *Rheum Dis Clin North Am* 18: 283-310.
42. Evans J (1998). Antinuclear antibody testing in systemic autoimmune disease. *Clin Chest Med* 19: 613-625.
43. Ghosh P, Dwivedi S, Naik S, Agarwal V, Verma A, Aggarwal A, Misra R (2007). Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence: Optimum screening dilution for diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Indian J Med Res* 126: 34-38.
44. Kiuttu J, Hartikainen A, Makitalo R (1994). Occurrence of antinuclear antibodies in an unselected pregnancy population. *Gynecol Obstet Invest* 37: 160-163.
45. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA & Kuby (2003). *J. Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. In: *Immunology* 5th ed WH Freeman, New York. 148-150
46. Charles PJ, Van Venrooij WJ, Maini RN (1992). and the Consensus Finding Group for Autoantibodies. The consensus workshops for the detection of auto antibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases 1989–1992. *Clin Exp Rheum* 10: 507-511.
47. Siracusano A, Agelli M, Ioppolo S (1985). Detection of antiextractable nuclear antigens in connective tissue diseases: comparison between passive haemagglutination, counter immunoelectrophoresis and double immunodiffusion *Ric. Clin Lab* 15: 3338.
48. Zampieri S, Ghirardello A, Doria A, Tonello M, Bendo R, Rossini K, Gamberi PF (2000). The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J Immunol Meth* 239: 1–11.
49. Us AD (2006). Serolojik Tanı Yöntemleri. Hacettepe üniversitesi yayınları sayfa 43.

50. Von Mühlen CA, Tan EM (1995). Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 24 (5): 323-58.
51. Sawalha AH, Harley JB (2004). Antinuclear autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 16: 534-540.
52. James K, Meek G (1992). Evaluation of commercial enzyme immunoassays compared to immunofluorescence and double diffusion for autoantibodies associated with autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 97: 559-565.
53. De Vlam K, De Keyser F, Verbruggen G (1993). Detection and identification of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Clin Exp Rheumatol* 11 (4): 393-7.
54. Baig MM, Shere SJ (1989). Prevalence of autoantibodies in Saudi population. *J Med* 20 (3,4): 286-90.
55. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP (1987). High prevalence of anti cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 69 (3): 557-65.
56. Goemaere S, Ackerman C, Ghoethals K (1990). Onset of symptoms of rheumatoid arthritis and relation to age, sex and menopausal transition. *J Rheumatol* 17 (12): 1620-2.
57. Azizah MR, Shahnaz M, Zulkifli MN (1955). Anti-nuclear, antimitochondrial, anti-smooth muscle and anti-parietal cell antibodies in the healthy Malaysian population. *Malays J Pathol* 17 (2): 83-6.
58. Fernandez S (2003). Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 58 (6): 315-319.
59. Al Jabri AA, Al Belushi MS, Nsanze H. Frequency and levels of otoantibodies in healthy adult Omains, *Annals of Saudi Medicine* 234.
60. Smikle MF, James OB (1994). Seroprevalence of autoantibodies in selected and unselected populations in Jamaica. *West Indian Med J* 43: 59-62.
61. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, Jusko TA, Walker NJ, Germolec DR, Whitt IZ, Crockett PW, Pauley BA, Chan JY, Ross SJ, Birnbaum LS, Zeldin DC, Miller FW (2012). Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum.* 64 (7): 2319-27.

62. Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S, Kawano S, Kumagai S (2008). Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Mod Rheumatol* 18 (2): 153-60. Epub 2008 Feb 19.
63. Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME (2009). Prevalence of antinuclear antibodies in 3 groups of healthy individuals: blood donors, hospital personnel, and relatives of patients with autoimmune diseases. *J Clin Rheumatol* Oct;15(7):325.
64. Vazquez Del Mercado M, Gonzalez Bernaldez M, Garcia De LaTorre I (1995). Prevalence of antinuclear antibodies in a Huichol population of Mexico. *Lupus* 4 (2): 164-5.
65. Grimaldi CM (2006). Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol* 18: 456–61.
66. Oliver JE, Silman AJ (2009). Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther* 11:252.
67. Craig WY, Ledue TB, Johnson AM, Ritchie RF. The distribution of antinuclear antibody titers in “normal” children and adults. *J Rheumatol* 1999;26:914–9.
68. Cleary MP, Grossmann ME (2009). Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* 150: 2537–42.
69. Gonzalez DA, De Leon AC, Rodriguez Perez MC, Coello SD, Gonzalez Hernandez A, Fuentes RC (2008). Inverse association between obesity and antinuclear antibodies in women. *J Rheumatol* 35: 2449–51.