



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ANTİ-DFS70 ANTİKORLARININ
OTOİMMÜN VE ALLERJİK HASTALIKLARDAKİ
ROLÜ NEDİR VE OTOİMMÜN HASTALIKLARDA
KORUYUCU ROLÜ VAR MIDIR?**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ümran YILDIRIM

Antalya, 2018



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ANTİ-DFS70 ANTİKORLARININ
OTOİMMÜN VE ALLERJİK HASTALIKLARDAKİ
ROLÜ NEDİR VE OTOİMMÜN HASTALIKLARDA
KORUYUCU ROLÜ VAR MIDIR?**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ümran YILDIRIM

Tez Danışmanı: Prof.Dr. M. Ender TERZİOĞLU

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2018

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2018-3149)

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatını bulduğum başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Sayın Prof.Dr. M. Ender TERZİOĞLU olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerine,

Bugüne kadarki tüm başarılarımın arkasında olan, iyi ve kötü günümde yanımda olan ve benimle gurur duyan öncelikle annem olmak üzere, babam, abim ve tüm dostlarıma

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Otoimmün ve Allerjik Hastalıklar ve Otoantikörler	3
2.1.1. Sistemik Lupus Eritematozus	3
2.1.2. Romatoid Artrit	4
2.1.3. Astım	5
2.1.4. Allerjik Rinit	6
2.1.5. Ürtiker	7
2.2. Anti Nükleer Antikörler (ANA), Tanısı ve Hastalık İzlemindeki Önemi	7
2.2.1. ANA Saptanmasında İndirekt İmmünfloresan (IIF) Yöntemi	9
2.2.2. ANA Saptanmasında Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi	9
2.2.3. ENA Saptanmasında İmmünblot Yöntemi	10
2.3. ANA IIF Testi Boyanma Paternleri	10
2.3.1. Nükleer Paternler	11
2.3.2. Nükleolar Paternler	13
2.3.3. Sitoplazmik Paternler	14
2.4. Anti-DFS70 Antikoru	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. İndirekt İmmünfloresan (IIF) Antikör Yöntemi	18
3.2. İmmünblot Yöntemi	20
3.3. Anti-DFS/70 ELISA Yöntemi	20
4. BULGULAR	22
5. TARTIŞMA	32

6. SONUÇLAR	36
7. ÖZET	38
8. ABSTRACT	40
9. KAYNAKLAR	42
10. EKLER	47
Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı	47
Ek 2. Aydınlatılmış Onam Formu	48



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACR	American College of Rheumatology
ANA	Anti Nükleer Antikorlar
Anti-CCP	Anti Cyclic Citrullinated Peptid (Anti-Siklik Sitrülinlenmiş Peptid Antikorlar)
Anti-DFS70	Anti Dense Fine Speckled 70 (Anti Yoğun İnce Benekli 70)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENA	Ekstrakte Edilebilen Nükleer Antijenler
FITC	Floresein İşaretli Anti Human IgG
GM-CSF	Granulosit Makrofaj Koloni Stimülan Faktör
HEp-2	Human Epithelial Cell Line 2000
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Sistemi Bozucu Virüs)
HLA	Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
hnRNP	Heterojen Nükleer Ribonükleoproteinler
IgG	Immünglobulin G
IIF	İndirekt İmmünfloresan
IL-1β	İnterlökin 1 Beta
LE	Lupus Eritematozus
LEDGF	Lens Epitelyum Kaynaklı Büyüme Faktörü
MCDT	Mixed Connective Tissue Disease (Karışık Bağ Dokusu Hastalıkları)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Büyük Doku Uygunluk Kompleksi)
NK T Cell	Doğal Öldürücü T Hücreleri
PBS	Fosfat Tuz Tamponu

RA	Romatoid Artrit
RF	Romatoid Faktör
SARD	Systemic Autoimmun Rhomatological Disases (Sistemik Otoimmün Romatizmal Hastalıklar)
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinic (Sistemik Lupus Uluslararası Klinikler İşbirliği)
TH1	Helper T Cell (Yardımcı T Hücresi 1)
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Nükleer homojen patern	11
2.2. Nükleer membran patern	11
2.3. Büyük, kaba ve ince benekli patern	12
2.4. Yoğun ince benekli patern	13
2.5. Nükleolar homojen, küme ve benekli patern	14
2.6. Sitoplazmik homojen, mitokondriyal ve golgi patern	15
2.7. Karakteristik boyanma paternleri ve Anti-DFS70 antikorları için önerilen test algoritması	17

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sistemik lupus eritematozus SLICC kriterleri	4
2.2. Romatolojik hastalıklar ve sağlıklı toplumda ANA pozitiflik oranı	8
2.3. DFS70'in anahtar hücresel fonksiyonları	16
4.1. Gruplara göre dağılımlar	22
4.2. Gruplara göre yaşların tanımlayıcı istatistikleri	22
4.3. Gruplara göre cinsiyet dağılımları	23
4.4. Sistemik lupus eritematozus ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	23
4.5. Romatoid artrit ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	24
4.6. Allerjik astım ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	24
4.7. Allerjik rinit ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	25
4.8. Ürtiker ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	25
4.9. Allerjik solunum yolu hastalıkları (Rinit+Astım) ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	26
4.10. Allerjik hastalıklar (Rinit+Astım+Ürtiker) ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	26
4.11. Allerjik rinit ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	27

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.12. Allerjik astım ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	27
4.13. Ürtiker ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	28
4.14. Romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	28
4.15. Allerjik hastalıklar (Rinit+Astım+Ürtiker) ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi	29
4.16. Gruplara göre DFS70 ELISA ile DFS70 immünblot arasındaki ilişkilerin incelenmesi	30
4.17. Gruplara göre DFS70 pozitifliği ile ANA pozitifliği arasındaki ilişkilerin incelenmesi	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anti Nükleer Antikorlar (ANA), hücrelerin nükleus veya sitoplazmasındaki, protein veya nükleik asit yapısındaki otoantijenlere karşı oluşan, Immünglobulin G (IgG) yapısındaki otoantikorları tanımlar (1). Nükleer antijenlere karşı gelişmiş bu yüksek titreli otoantikorlar, sistemik otoimmün romatizmal hastalıkların (SARD: Systemic Autoimmun Rhomatological Disases) serolojik bir özelliğidir (2).

ANA tanımlamada en yaygın kullanılan test, HEp-2 hücrelerinin kullanıldığı, İndirekt İmmünfloresan (IIF) yöntemidir ve American College of Rheumatology (ACR) tarafından gold standart yöntem olarak önerilmiştir (3).

Son zamanlarda, bir ANA paterni olan anti yoğun ince benekli 70 (Anti-DFS70: Anti dense fine speckled 70) antikorlar, tamamen sağlıklı bireyler ve SARD dışında değişken klinik patolojileri olan hastalarda tanımlanmıştır (4).

Anti-DFS70 antikoru ve klinikle olan ilişkisi immünolojik paradoks olmayı sürdürmektedir. Bu antikor ilk tanımlandığından bu yana, çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklarda (5), kanserlerde (6) ve sağlıklı kişilerde (7) raporlanmıştır. Diğer antinükleer antikorların aksine, özellikle de yüksek titreli Anti-DFS70 antikor, yaygın değildir (8). Romatizmal hastalığa spesifik otoantikor pozitifliği olmayan, Anti-DFS70 pozitif 40 kişilik hasta grubunun uzun dönem verilerinde, hastaların hiçbirinde SARD gelişmediği görülmüştür (9). Bu gözlemlere dayanarak, izole Anti-DFS70 antikorunun varlığı, Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) gibi, sistemik otoimmün romatizmal hastalıkları dışlamak için biyomarker olarak kullanılabilir (5, 9, 10).

Anti-DFS70 antikoru IIF, immünblot, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi çeşitli tekniklerle belirlenebilir. Yeni yapılan bir çalışmada DFS70 antikorunun, ANA pozitif sağlıklı kişilerde %33.1, ANA pozitif SARD'da %0.0 olarak bulunmuştur ($p<0.0001$). Bu sonuç IIF yönteminin diagnostik gücünü ve etkinliğini göstermiştir (5).

Bizim çalışmamızda, yukarıdaki bilgiler ışığında, tedavi alan ve almayan, astım, allerjik rinit, ürtiker, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus tanılı hastalar ve sağlıklı gönüllüler grubunda IIF ve ELISA ile DFS70 antikoru çalışılacak, bu hastalıklarla ilişkisi, hastalıklarının klinik olarak aktif olup olmadığı, biyokimyasal ve otoimmün parametreleri de dikkate alınarak değerlendirilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otoimmün ve Allerjik Hastalıklar ve Otoantikörler

İmmün sistem normal koşullarda, immünolojik tolerans gereği, organizmanın öz antijenlerine karşı yanıt oluşturmaz. Bu durumun bozulması otoantikör oluşumuna neden olarak otoimmün hastalık gelişimine yol açar (11). Otoimmünite birçok molekül ve hücreyel yolakla en sık da enfeksiyona neden olan mikrobik antijenlerle tetiklenir.

Bazı otoimmün hastalıklarda, otoantikörler, hastalık başlangıcından önce presente olabilir, hastalığa özgül olarak gelişebilir, tanı ve tedavi yaklaşımı için belirteç olarak kullanılabilir (12). Örneğin SLE’de ANA, Anti-dsDNA pozitifliği, Sjögren Sendromunda Anti-Ro, Anti-La pozitifliği gibi.

Miyastenia Gravis, Pemfigus gibi organ spesifik otoimmün hastalıklarda, otoantikörler direkt olarak hedef hücreye bağlanır ve hasar oluşturur. Sistemik otoimmün hastalıklarda ise otoantikörler, fosfolipidler gibi serbest moleküller veya hücre yüzey ve nükleus antijenleri ile reaksiyona girer ve patojenik antijen-antikör kompleksini oluştururlar (12). Sonrasında salınan inflamatuvar sitokinlerle otoimmun hasar gelişir.

2.1.1. Sistemik Lupus Eritematozus

SLE birçok sistemi tutabilen, kronik, otoimmün bir hastalıktır. Prevelansı etnik farklılıklar göstermekle birlikte, 100.000’de 39-51 civarındadır. Kadınlarda 8-10 kat sık görülen bu hastalığın insidansı 40’lı yaşlarda artar. Etyolojisi hala bilinmeyen SLE’nin, genetik, hormonal, immünolojik ve çevresel faktörlerle geliştiği düşünülmektedir.

SLE patogenezinin sorumlu otoantikörler, direkt olarak hücre yüzeyi, nükleus veya sitoplazmadaki antijenlere, IgG ve koagülasyon faktörlerine karşı oluşabilir. ANA hastaların %95’inden fazlasında gelişen en karakteristik antikördür (13). Anti-dsDNA ve Anti Sm antikörler, SLE hastalarına özgün gelişen ve bu nedenle sınıflandırma kriterlerinde sayılan antikörlerdir (14).

Hastalar, hafif eklem ve cilt tutulumundan, hayatı tehdit eden renal, hematolojik veya santral sinir sistemi tutulumuna varan çok değişken kliniklerle presente olabilir. En sık görülen bulgu artrit ve malar döküntüdür.

Tanı için 2012 yılında Sistemik Lupus Uluslararası Klinikler İşbirliği [Systemic Lupus International Collaborating Clinic (SLICC)] tarafından yayımlanmış sınıflandırma kriterleri kullanılır (Bkz Tablo 2.1) (15). SLE sınıflaması için en az bir hematolojik ve en az bir immünolojik olmak üzere dört kriter yeterlidir. Ayrıca biyopsi ile kanıtlanmış lupus nefriti yanında ANA veya Anti-dsDNA pozitifliği de SLE için yeterli bulunmuştur.

Tablo 2.1. Sistemik lupus eritematozus SLICC kriterleri (15)

Klinik	İmmünolojik
Akut kütanöz lupus Kronik kütanöz lupus Oral veya nazal ülserler Alopesi Sinovit/Artrit Serozit Renal tutulum Nörolojik tutulum Hemolitik anemi Lökopeni-lenfopeni Trombositopeni	ANA pozitifliği Anti-dsDNA pozitifliği Anti-Sm Anti-fosfolipid antikor pozitifliği Düşük kompleman düzeyi Direkt Coombs testi pozitifliği

2.1.2. Romatoid Artrit

Romatoid Artrit (RA), primer olarak sinoviyal dokuyu etkileyerek eklem hasarı ve kemik destrüksiyonu ile giden, ağır sakatlık ve mortaliteye neden olan, kronik otoimmün bir hastalıktır (16). Dünya genelinde prevalansı yaklaşık %1 civarında olan RA, kadınlarda 2-3 kat daha sık görülmektedir.

Kalıtımsal analiz içeren çoğu çalışmada, RA gelişen hastaların %60'ında genetik faktörlerin sorumlu olduğu gösterilmiştir (17). En önemlileri; İnsan Lökosit Antijeni (HLA: Human Leukocyte Antigen), Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (MHC: Major Histocompatibility Complex) genleridir ancak hastalık duyarlılığı ve şiddeti ile ilişkilendirilmiş birçok başka gen tanımlanmıştır.

Doğal immün sistemin aktivasyonu muhtemelen hastalığın en erken aşamasını oluşturmaktadır. RA'da hem otoantikor sentezleyen B hücreleri, hem de otoreaktif Yardımcı T Hücre 1 (TH1: Helper T Cell) hücrelerinin aktivasyonu sonucunda otoimmün yanıt ortaya çıkar (11). Olguların çoğunun serumunda Romatoid Faktör (RF) olarak bilinen bir otoantikor pozitif bulunur. RF; IgG molekülünün Fc kısmına bağlanabilen, IgM, IgA veya IgG yapısında olabilen bir otoantikordur (18). RA hastalarında RF dışında başka otoantikorların da görülebildiği iyi bilinen bir durumdur. Anti-siklik sitrülünlenmiş peptid antikorlar [Anti Cyclic Citrullinated Peptid (Anti-CCP)] olarak bilinen ve sitrülünize olmuş peptidlere karşı gelişen otoantikorların, RF'den daha erken dönemde pozitif olabileceği ve RA için daha spesifik olduğu gösterilmiştir (18, 19).

RA birçok eklemden başlıca ağrı, şişlik ve sertlikle birlikte sinsi başlangıç gösterir. Genellikle el ve ayakların küçük eklemlerini simetrik tutma eğilimindedir. Başlıca metakarpofalangiyal ve proksimal interfalangiyal eklemler tutulur. Eklem dışı bulgular olan anemi, halsizlik, romatoid nodüller, nöropati, episklerit, Sjögren Sendromu, vaskülit, splenomegali hastalık seyrinde gelişebilir.

2.1.3. Astım

Astım, hava yolu inflamasyonu ile karakterize, zaman içinde sıklığı ve ağırlığı değişen hırıltı, nefes darlığı, göğüste sıkışma-baskı hissi ve öksürük yakınmaları ile tanımlanmış değişken ekspiratuar hava akımı kısıtlılığı bulunan heterojen bir hastalıktır (20). Astımın dünyada yaklaşık 300 milyon kişiyi etkilediği düşünülmektedir.

Astımın ortaya çıkması ve gelişmesinde kişisel ve çevresel etkenler ön plana çıkmaktadır. Bunlardan en belirginleri; atopi, bronş hiperreaktivitesi, obezite, allerjenler, sigara, enfeksiyonlar ve mesleki duyarlılaştırıcılardır.

Astım patogeneğinde en önemli mekanizma havayolu inflamasyonudur. İnflamatuar sürecin başlaması ile bronş duvarında hiperreaktivite, bronkokonstriksiyon, mukozal ödem ve mukus hipersekresyonu meydana gelmektedir (20). İnflamasyon sürecine; mast hücreleri, eozinofiller, dendritik hücreler, makrofaj, doğal öldürücü T hücreleri (NK T cell), TH2 hücreleri ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücreler ile beraber epitel, düz kas, endotel hücreleri,

fibroblastlar, gibi havayolu yapısal hücreleri katılmaktadır (21). Anahtar mediatörlerse; kemokinler, sisteinil lökotrienler; IL-1 β (Interlökin 1 beta), TNF- α (Tümör Nekroz Faktör Alfa), GM-CSF (Granulosit Makrofaj Koloni Stimulan Faktör), IL4, IL5 ve IL13'ü içeren sitokinler; histamin, nitrik oksit ve prostaglandin D2'dir (22).

Allerjik tip astım hastalığının en yaygın şeklidir. Allerjik olmayan formla kıyaslandığında, hafif bir forma eşlik eden rinit, konjonktivit veya atopik dermatit ve yükselmiş IgE seviyeleri, önemli ölçüde daha sık gözlenir (23).

ANA varlığı daha çok atopik astım ve aspirin ilişkili astım gelişiminde gözlenmiştir. Bir çalışmada atopik astımlı hastaların %39'unda, 1/40 ve üzerinde ANA pozitifliği saptanmıştır (24).

2.1.4. Allerjik Rinit

Allerjik rinit, nazal mukozada IgE aracılı Tip 1 hipersensitivite reaksiyonu sonucu gelişen inflamatuvar ve semptomatik bir hastalıktır. Bu reaksiyona polenler, küfler, ev tozu akarları, hayvanlar veya haşereler gibi birçok allerjenin inhalasyonu neden olabilmektedir (25). Hastada sulu burun akıntısı, hapşıрма, burun kaşıntısı ve burun tıkanıklığı görülür.

Organizma allerjene maruz kaldığında, antijen sunucu hücrelerce bu allerjenler T lenfositlere sunulur ve IL3, IL4, IL5 gibi sitokinler salınır. Böylece dolaşımdaki B lenfositler aktive olur, plazma hücresine dönüşür ve allerjene spesifik IgE antikorlarını üretir. Antijene özgü IgE antikorları dokulardaki mast hücreleri ile dolaşımdaki bazofillerin hücre duvarındaki reseptörlere bağlanır ve organizma bu allerjene duyarlı hale gelmiş olur. Allerjen yeniden vücuda girdiğinde kendine özgü IgE antikorları ile yüklü mast hücresine bağlanır, mast hücresi degranüle olur ve histamin, tripaz ve heparin, prostoglandin ve lökotrienler (LCT4, LTD4 ve LTE4) gibi mediyatörler açığa çıkar (26). Bu mediyatörler damar geçirgenliğini arttırarak nazal mukozada ödeme, submukozal bezleri uyarak mukus salgısının artmasına, arteriyovenöz anastomozları genişleterek konjesyona, duyarlı sinir uçlarını uyarak kaşıntı ve hapşırığa neden olur.

2.1.5. Ürtiker

Ürtiker genel popülasyonda yaklaşık %20 sıklığında görülen yaygın bir rahatsızlıktır (27). Tipik ürtikeryal lezyon yoğun kaşıntının eşlik ettiği eritematöz plaklıdır. Bazen deride daha derin şişlik olan anjioödem ile birlikte görülür.

Altı haftadan kısa olgular akut ürtiker, daha uzun süren olgular ise kronik ürtiker adını alır. Yeni başlangıçlı ürtiker hastalarında ilaç, besin alımı, böcek sokması veya enfeksiyon gibi olası bir tetikleyici tanımlanmışken, kronik ürtikerli hastaların %80 ila 90'ında, hastalık sürecine katkıda bulunan hiçbir allerjik neden bulunamaz. Bu grup idiopatik ürtiker olarak tanımlanır.

Ürtikeryal plak oluşumunda temel mekanizma mast hücrelerinden salınan IL3-6, IL13, TNF- α , GM-CSF, heparin, prostaglandinler ve histamin gibi proinflatuar mediyatörlerce, ilgili bölgede vazodilatasyon, artmış kapiller permeabilite ve damar dışına anormal plazma salınımıdır (28).

Kronik ürtikerin bir otoimmün bozukluğu temsil edebileceği kavramı, bu hastalarda tiroid disfonksiyonu ve tiroid otoantikörlerinin daha yaygın olduğunun kabul edilmesinden doğmuştur (29). Kronik ürtikerli hastalarda, tiroid hastalıkları, çölyak hastalığı, Sjögren sendromu, SLE, RA ve tip 1 diabetes mellitus gibi otoimmün bozukluklar yaygındır. Bu hastaların kanlarında IgE ve yüksek afiniteli IgE reseptörüne karşı gelişmiş IgG tipindeki otoantikörlerin mast hücreleri ve bazofillerin aktivasyonuna sebep olduğu varsayılmaktadır (30). Antinükleer antikörlerde genel popülasyona göre daha yaygındır (29).

2.2. Anti Nükleer Antikörler (ANA), Tanısı ve Hastalık İzlemindeki Önemi

ANA, hücrelerin nükleuslarında bulunan antijenlere karşı oluşan, genellikle IgG yapısında bir grup antikoru tanımlar. İlk olarak 1948'de SLE hastalarında lupus eritematozus (LE) hücreleri kullanılarak tanımlanan ANA, 1958'de, Friou tarafından IIF yöntemi ile tespit edilmiştir (31). ANA'nın hedef molekülü başta hücre nükleusu olmak üzere, nükleolar, sitoplazmik ve hücre yüzey proteinleridir ve DNA, RNA, nükleik asid-protein komplekslerine bağlanabilir. Bu antijenlerden nRNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70 ve Jo-1'e karşı oluşan antikörlerin varlığı bazı otoimmün hastalıklarla yakından ilişkili bulunmuştur (32). Bu

antijenler timus, dalak ve hücre kültürlerinden serum fizyolojik ile ekstrakte edilebildikleri için, Ekstrakte Edilebilen Nükleer Antijenler (ENA) olarak tanımlanmıştır.

Nükleer antijenlere karşı gelişmiş bu yüksek titreli otoantikorlar, sistemik otoimmün romatizmal hastalıkların serolojik bir özelliğidir (2). Özellikle SLE, Sjögren Sendromu, inflamatuvar miyopatiler başta olmak üzere tarama testi olarak kullanılmaktadır. Bazı kanserler, atopik hastalıklar, ilaçlara bağlı olarak, kronik enfeksiyonlar ve sağlıklı toplumda da, genellikle düşük titrede de olsa ANA saptanabilmektedir (33). Görüldüğü üzere çok sayıda sağlıklı kişi, SARD ve diğer hastalıklarda ANA pozitifliği sıkça karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle güncel kılavuzlar SARD tanısı için ANA sınır değeri olarak $\geq 1/160$ titreyi öngörmektedir (11). Tablo 2.2’de ANA pozitifliğinin hastalık ve sağlıklı toplumda görülme oranı özetlenmiştir (34).

Tablo 2.2. Romatolojik hastalıklar ve sağlıklı toplumda ANA pozitiflik oranı (34)

Hastalık	ANA pozitiflik oranı (%)
Tanı için ANA testinin çok yararlı olduğu hastalıklar	
SLE	95-100
Sistemik Skleroz	60-80
Tanı için ANA testinin bazen yararlı olduğu durumlar	
Sjögren Sendromu	40-70
İdiyopatik İnflamatuvar miyozit	30-80
Hastalığın takibi ve prognozunda ANA testinin yararlı olduğu durumlar	
Üveitle birlikte olan juvenil kronik oligoartiküler artrit	20-50
Raynaud fenomeni	20-60
Pozitif ANA test sonucunun tanı kriterlerinden biri olduğu hastalıklar	
SLE	~100
İlaça bağlı SLE	~100
Otoimmün karaciğer hastalığı	~100
Miks bağ dokusu hastalığı (MCTD)	~100
Tanı için ANA testinin yararlı olmadığı hastalıklar	
RA	30-50
Multiple Skleroz	25
İdiyopatik Trombositopenik Purpura	10-30
Tiroid Hastalıkları	30-50
Diskoid Lupus	5-25
Enfeksiyon Hastalıkları	Değişken
Maligniteler	Değişken
Fibromiyalji	15-25
Sağlıklı insanlar	
ANA titresi: 1/40	20-30
1/80	10-12
1/160	5
1/360	3

2.2.1. ANA Saptanmasında İndirekt İmmünfloresan (IIF) Yöntemi

Yaklaşık 50 yıldır ANA saptamadaki major yöntem IIF yöntemi olmuştur. Bu yöntem LE hücre yönteminde sonra geliştirilmiş ve amacı ANA testinin hassasiyet ve tekrarlanabilirliğini arttırmak ve daha fazla ANA saptamak olmuştur (35).

ANA IIF yönteminde altın standart olarak önerilen HEp-2 (Human Epithelial Cell Line 2000) hücreleri insan larinks epitelyal karsinom hücreleridir. Bu hücreler çok sayıda, doğal protein ve nükleik asit yapısında otoantijen içerdikleri için, ANA saptama için ideal substratlardır (3). Ayrıca hücrelerin büyük nükleusları bulunmakta ve hücre siklusu boyunca farklı şekillerde sergilenen antijenlerin daha kolay belirlenmesini sağlamaktadır.

Hastadan alınan serum örneği HEp-2 hücreleriyle inkübe edilir, preparat yıkanır ve sonra floresan işaretli anti-insan globulin içeren ayıraçla inkübasyon işlemi tekrarlanır. Preparat floresan mikroskopunda incelendiğinde, floresan boyanın yoğunluğuna paralel bir ışına izlenir. Işımanın yoğunluğu fazla olduğunda ANA boyama paterni belirlemek zorlaşabilir. Bu nedenle, yoğun ışımının görüldüğü preparatlara dilüsyon yapılarak, aynı ölçüde serumda bulunan otoantikör miktarı titre edilebilmektedir (35,36).

ANA IIF incelemesinde özellikle interfaz ve metafaz aşamasındaki hücre boyanma paternleri dikkatle izlenmelidir. İnterfaz aşaması, hücre metabolizması ve antijen ekspresyonunun en fazla olduğu, metafaz aşaması da nükleusun homojen ve benekli paternlerinin çok iyi görülebildiği aşamalardır (11).

2.2.2. ANA Saptanmasında Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yöntemi

ELISA, özellikle otoimmün hastalıkların tanısında, serumdaki antikorların varlığını ve miktarını saptamada oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir.

Öncelikle özgül antijenin sabitlendiği bir yüzeydeki kuyucuklara hasta serumu inkübe edilir. Bağlanan antikorları saptamak için enzimle işaretli anti-IgG reaktifi ortama eklenir ve inkübasyon tekrarlanır. Yıkama işlemi yapılarak bağlanmayan yapılar uzaklaştırılır. En son eklenen enzimle reaksiyon verecek kromojen bir substrat eklenir ve oluşan renk yoğunluğu standart bir serum örneği

ile karşılaştırmalı şekilde spektrofotometrik olarak ölçülür. Böylece hem kalitatif hem de kantitatif sonuçlar elde edilir.

ELISA yönteminin duyarlılığı yüksek ancak özgüllüğü düşüktür (37), bu nedenle ANA taramasında IIF ilk tercih olmalıdır. ANA negatif olgularda ELISA ile ölçüm tekrarlanabilir. Kısa zamanda daha çok hasta serumu tayin edilebildiği için ucuz ve kullanışlı bir yöntem olarak kabul edilmiştir.

Günümüzde ELISA, lupusta dsDNA, bazı vaskülitlerde ANCA titre takibinde sıkça kullanılmaktadır. ENA tayininde IIF den daha yararlı olduğu düşünülmektedir.

2.2.3. ENA Saptanmasında İmmünoblot Yöntemi

Antijen antikor birleşmesi ve oluşan reaksiyonun nitroselüloz membran üzerinde tespiti prensibine dayanır. Bu yöntem serum veya plazma örneklerinde farklı antijenlere karışı oluşan antikorların in vitro olarak, kalitatif ya da semikantitatif tayininde kullanılır.

Testin ilk basamağında hasta örnekleri immünoblot şeritleri ile inkübe edilir. Pozitif örneklerde antikorlar özgül antijenlere bağlanır. Bağlanan antikorları saptamak için bir renk reaksiyonunu katalizleyen enzimle işaretlenmiş anti-insan antikorları ve kullanılan enzime uygun bir substrat eklenir. Bu reaksiyonlar sonucu şerit üzerinde oluşan bantlar gözle veya cihaz ile değerlendirilir (11).

İmmünoblot yöntemi hastalıkla ilişkili otoantikorların tespitinde, kolay uygulanması, kalitatif ya da semikantitatif sonuçlar elde edilebilmesi bakımından oldukça yararlıdır.

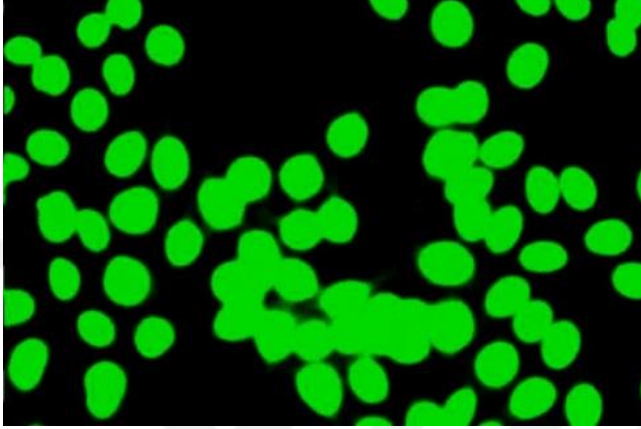
2.3. ANA IIF Testi Boyanma Paternleri

ANA IIF yönteminde, HEp-2 hücrelerinin farklı hücre döngülerinde oluşan antijenlere karşı farklı boyanma paterni gösteren çok sayıda antikor olarak gözlenir. Farklı boyanan ANA paternleri farklı hastalıkların tanısı ile kuvvetle ilişkilendirilmiştir.

Başlıca 4 ana tipte ANA boyanma paterni tanımlanmıştır; homojen, benekli, nukleolar, periferik (35).

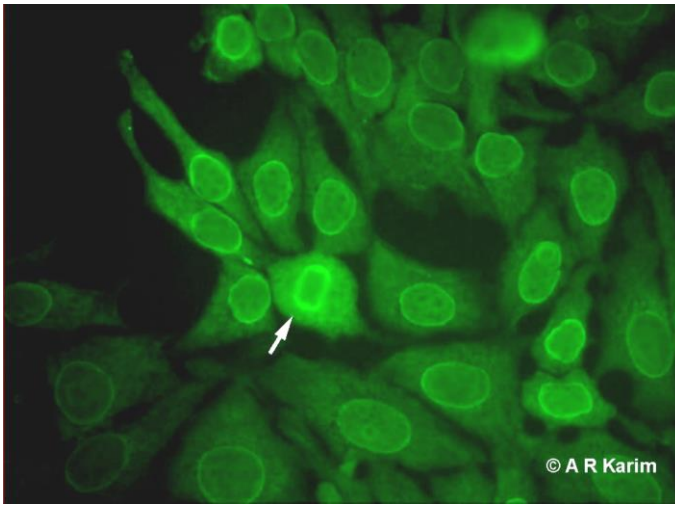
2.3.1. Nükleer Paternler

Nükleer homojen: Anti-dsDNA, Anti histon, Anti nukleozom antikorlarının varlığını gösterir (38). Homojen boyanma modeli SLE, ilaç ilişkili lupus (procainamide, hydralazine), romatoid artrit, juvenil kronik artrit ve sistemik skleroz gibi hastalıklarda tesbit edilebilir.



Şekil 2.1. Nükleer homojen patern (39)

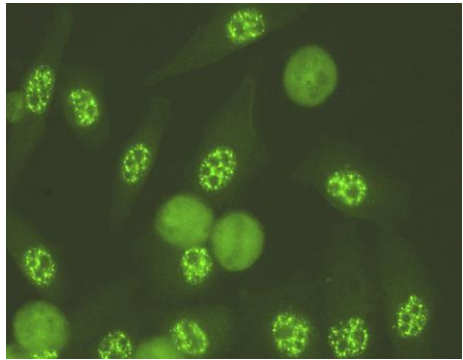
Nükleer membran: Bu boyanma tipindeki antikorlar lamin gibi nükleer membranın integral proteinlerine, gp120 gibi nükleer por kompleks integral proteinlerine karşı oluşmuştur. Kronik hepatit, vaskülitler, trombositopeni, primer biliyer siroz ve SLE gibi kronik otoimmün hastalıklarda tespit edilirler (34).



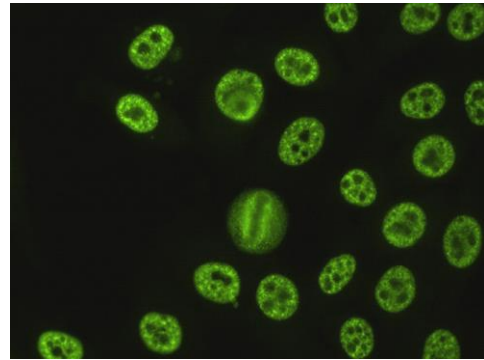
Şekil 2.2. Nükleer membran patern (40)

Benekli: Bu boyanma paterni histon dışındaki birçok antijene karşı oluşan otoantikorları gösterir. Dört farklı alt tipi vardır (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4):

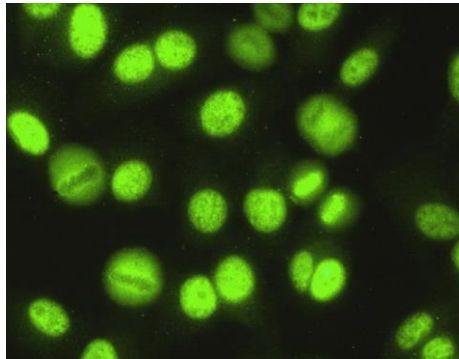
- **Büyük benekli (nükleer matriks):** Bu paternde istirahatteki hücre nükleusları büyük benekli tarzda boyanma gösterir. Otoantikorlar başlıca heterojen nükleer ribonükleoproteinlere (hnRNP) karşı olabilir (41). SLE, RA ve MCTD gibi hastalıklarda (hnRNP-A1, A2, B2) ve sklerodermada (hnRNP-C1, C2 ve I) gözlenir.
- **Kaba benekli:** Sm ve U1-snRNP'e karşı otoantikor varsa gözlenen bir boyanma modeli olup, istirahat halindeki hücrelerde yoğun ve orta büyüklükte benekli boyanma izlenir, nükleoluslar boyanmamıştır (38). MCTD ve SLE'de gözlenir.
- **İnce benekli:** İstirahatteki hücrelerin nükleusunda bazen kumlu ve hemen hemen homojene benzeyen ince benekli tarzda boyanma gözlenirken kromozom ve nükleoluslarda boyanma izlenmez. SSA (Ro), SSB (La), RNA polimeraz II ve III, Ku, Ki ve Mi-2'ye karşı otoantikorlar ince benekli boyanır (38,42); SLE, Sjogren sendromu, skleroderma, myozit ve MCTD gibi hastalıklarda gözlenir.



Büyük benekli



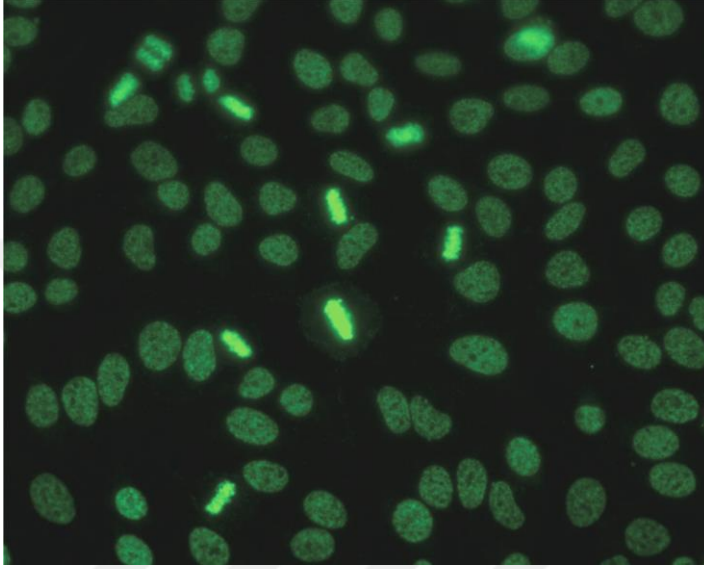
Kaba benekli



İnce benekli

Şekil 2.3. Büyük, kaba ve ince benekli patern (43)

- **Yoğun ince benekli:** Bu paternde nükleoplazma yoğun ince benekli tarzda boyanırken benzer benekler mitotik hücrelerin kromozomlarında da gözlenir (44). Anti-DFS70 antikoru, 75-kd'luk lens epitelyum kaynaklı büyüme faktörüne (LEDGF) karşı olup, sağlıklı kişiler, alopesi areatalı ve atopik dermatitli hastalarda görülebilmektedir (Şekil 2.4).



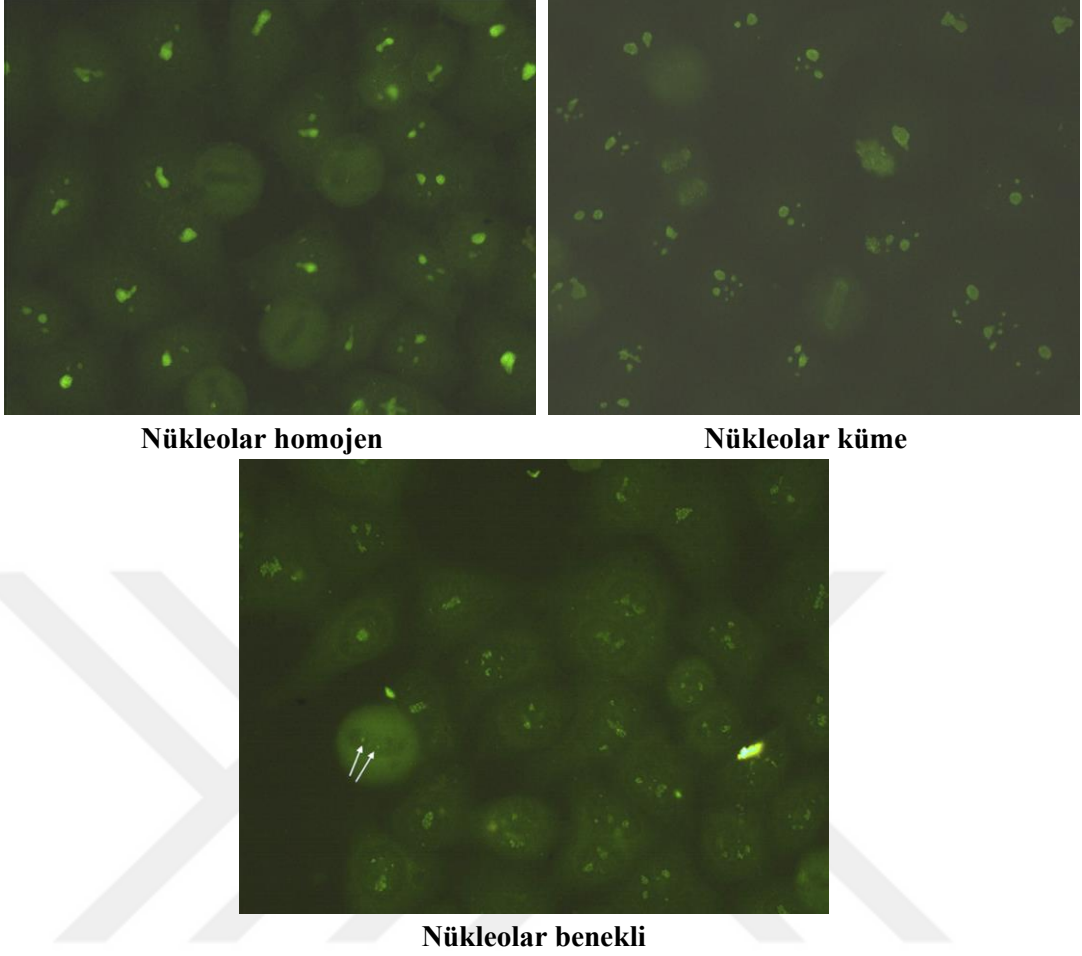
Şekil 2.4. Yoğun ince benekli patern (45)

2.3.2. Nükleolar Paternler

Nükleolar homojen: Bu modelde nükleolus homojen, nükleoplazma zayıf homojen veya benekli boyanır. Fosfoprotein B23 ve nükleoline, PM-Scl kompleksine karşı gelişen otoantikor varlığında görülebilir (46). Bu boyanma şekli sistemik sklerosis, SLE, polimiyositis ve romatoid artritte saptanabilir (Şekil 2.5).

Nükleolar küme: İstirahatteki hücrelerin nükleolusunda, büyüklüğü ve şekli değişken küme (clumpy) tarzında boyanmadır. Genellikle snRNP'ye karşı antikorların bulunduğunu gösterir. Sistemik skleroz ve pulmoner hipertansiyonda görülür (Şekil 2.5).

Nükleolar benekli: Sistemik skleroz için yüksek spesifiktir olmakla birlikte SLE, RA ve MCTD'de de gözlenen RNA polimeraz I kompleksine karşı antikorları gösterir (Şekil 2.5).



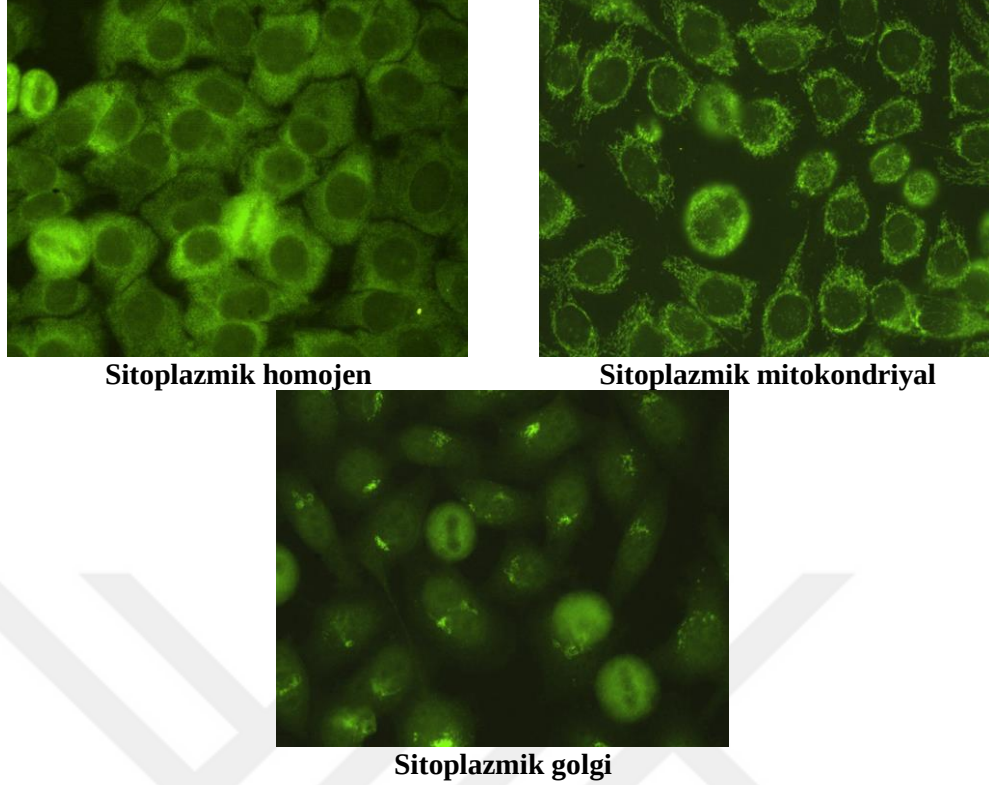
Şekil 2.5. Nükleolar homojen, küme ve benekli patern (43)

2.3.3. Sitoplazmik Paternler

Sitoplazmik homojen: Bu boyanma nükleus çevresinden hücre periferine doğru yayılır. Antikorlar aminoasil-tRNA sentetazlara (Jo-1, PL7, PL12) karşı olup idyopatik (otoimmün) myozitis (polimyozyt/dermatomyozit, overlap sendromunda myozitis, yumuşak bağ dokusu hastalıkları) için diagnostik belirteçtir (Şekil 2.6) (47).

Sitoplazmik kaba benekli ipliksi (mitokondri): Çoğunlukla M2'ye karşı gözlenir ve primer biliyer karaciğer sirozu diğer kronik karaciğer hastalıkları, SLE ve sistemik sklerozda görülebirlirler (Şekil 2.6) (48).

Sitoplazmik Golgi: Sitoplazmanın perinükleer bölgesinde düzensiz granüler boyanma gözlenir. SLE, Sjögren sendromunda saptanabilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Sitoplazmik homojen, mitokondriyal ve golgi patern (43)

2.4. Anti-DFS70 Antikoru

Anti-DFS70 antikoru başlangıçta, hedef otoantijenin moleküler kitlesi ve IIF paternine göre adlandırılmıştır. Tipik DFS70 IIF paterni benzersiz bir benekli paterndir, interfazdaki nükleus ve metafazdaki kromatin boyunca dağılmıştır ve çekirdekteki beneklerin yoğunluğuna, büyüklük ve parlaklığına göre görünümü değişir (49). Antikor günümüzde birincil hedefi olan lens epiteli büyüme faktörü (LEDGF), DNA bağlayıcı transkripsiyon koaktivatör p75 olarak da adlandırılmaktadır.

DFS70/LEDGF prostat tümör dokusunda ve diğer kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Viral integras ile bir etkileşim sayesinde, insan bağışıklık sistemi bozucu virüsün (HIV) çoğalması için bir kofaktör olarak görev alır ve bunun gibi bir dizi fizyolojik işleve sahiptir (50).

DFS70/LEDGFp75 ve kısa ek varyantı olan LEDGF/p52, 15 ekzon ve 14 introndan oluşan aynı genden derive olmuştur. DFS70 ve p52 bir amino (N)-terminal bölge paylaşır ancak p52’de DFS70’de olmayan C-terminal bölge vardır. Bu varyantlar farklı nükleer bölgeleri lokalize eder ve ektopik olarak aşırı

eksprese edildiğinde karışık roller oynarlar, DFS70 bir stres sağkalım proteini, p52 ise bir pro-apoptotik protein olarak davranır (51).

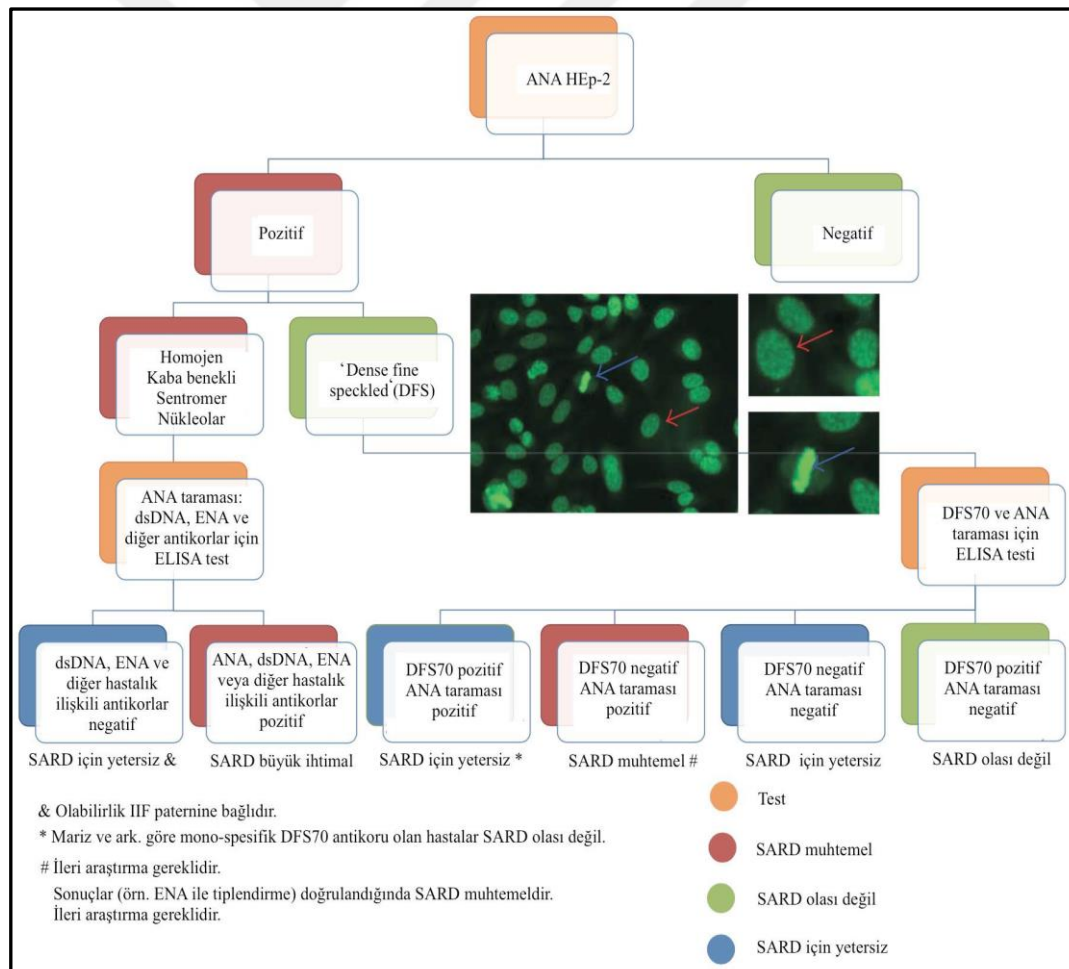
DFS70, alkol, ultraviyole B (UVB) ışını, sitotoksik ilaçlar ve bazı virüsler gibi çevresel stres faktörleri karşısında hücre sağkalımının desteklenmesinde önemli bir rol oynar (52). Sonuç olarak, bu gibi stres faktörleri, DFS70 aktivasyonuna yol açan artmış hücresel oksidatif strese yol açar. DFS70'in stres sağkalım fonksiyonları, stres koruyucu, antioksidan ve inflamatuvar genleri transkripsiyonel olarak aktive etme yeteneğine bağlıdır (52). DFS70, bu genlerin aktivasyonuna, çeşitli kromatin ilişkili proteinler ile kompleksler oluşturarak katkıda bulunur. Genin N ve C terminal kısımları, transkripsiyon ve stres sağkalım fonksiyonlarına katılır (53). DFS70'in, lizozom gibi hayati hücresel organellerin yapısal bütünlüğünü korumaya yönelik etkisi, strese yanıt olarak hücresel yaşamı ve ölüm kararlarını düzenlemede bu proteinin kritik rolüne işaret eder (41). Tablo 2.3'de DFS70'in ana hücresel işlevleri özetlenmiştir (53).

Tablo 2.3. DFS70'in anahtar hücresel fonksiyonları (53)

Fonksiyon	Mekanizma
Apoptoz sinyali	Apoptoz sırasında kaspazlarla fragmanlarına ayrılır, bu bölünme sağkalım faaliyetini ortadan kaldırır ve hücre geçişi apoptozdan sekonder nekroza doğru devam eder
Hücresel stres sağkalımı	Memeli hücrelerini çeşitli çevresel streslere karşı korur (örn. UVB, oksidatif stres, termal stres, alkol, bazı ilaçlar)
Kemorezistans	Kemoresistant kanser hücrelerinde artmıştır; ilaç kaynaklı kaspazdan bağımsız hücre ölümünde lizozomal stabiliteyi artırır
DNA onarımı	Homolog rekombinasyon tamir kompleksi bileşeni
HIV-1 integrasyonu	HIV-1 integrasyonunu kolaylaştırmak için transkripsiyonel olarak aktif bölgelere HIV integrasyonu sağlar
İnflamasyon	IL6 / STAT3 yolunun aktivasyonunda rol alır
Malign transformasyon	Kanser hücrelerinde ve bazı solid tümörlerde fazlaca üretilir; hücre hayatta kalma sinyalizasyonunu, proliferasyonu, göçü, klonojenisiteyi, anjiyogenezi ve tümör büyümesini teşvik eder

Oldukça geniş spektrumlu hücre içi antijenlere karşı gelişen ANA, SARD'ın bir belirteçidir. Ancak tümü SARD ilişkili değildir ve bu nedenle bazı ANA test sonuçları klinik uygulama ve yorumlamayı zorlaştırır.

Bir çalışmada, başka hastalığa spesifik antikor pozitifliğinin eşlik etmediği 40 Anti-DFS70 pozitif bireyin, 4 yıllık takip sonunda, hiçbirinde SARD gelişmediği görülmüştür (5). Başka bir çalışmada, ANA pozitif sağlıklı bireylerin %30'unda Anti-DFS70 pozitif saptanırken, ANA pozitif SARD bireylerde bu oranın %0 olduğu görülmüştür (49,50).



Şekil 2.7. Karakteristik boyanma paternleri ve Anti-DFS70 antikorları için önerilen test algoritması (49)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı (Ek-1). Hastalara araştırmanın amacı hakkında sözlü ve yazılı bilgilendirme yapılarak ‘Aydınlatılmış Onam Formu’nu imzalayan gönüllü hastalar çalışmaya alındı (Ek-2).

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Romatoloji Bilim Dalı ve Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı’na başvuran, 18-65 yaş arası, astım, allerjik rinit, ürtiker, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus tanılı 30’ar hasta ve kontrol grubu olarak 30 sağlıklı gönüllü alındı. Rutin kan tetkiki yapılan hastalardan fazladan 1 adet serum tüpüne kan alındı.

Kronik enfeksiyon hastalığı, malign hastalık, doğuştan veya kazanılmış immün yetmezliği olan hastalar, viral veya bakteriyel enfeksiyon geçirmiş olan hastalar ve gebe hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Hastanın anamnezinde yaş, cinsiyet, hastalık yaşı, kullanmakta olduğu tedaviler sorgulandı.

3.1. İndirekt İmmünfloresan (IIF) Antikor Yöntemi

ANA IIF yöntemi, Mosaic HEp-20-10 / Liver (monkey) (Euroimmun, Almanya) kiti kullanılarak, öneriler doğrultusunda gerçekleştirildi. Hasta serumları -20°C’den çıkarılıp oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi ve birkaç saniye vortekslendi. Kullanılacak kitler +4°C’den çıkarılıp oda sıcaklığına getirildi. Her bir kitte 10 farklı hastanın serumunun çalışılacağı 10’luk slaytlar kullanıma hazır. PBS (Fosfat Tuz Tamponu) (pH 7.2), 1L distile su ile karıştırılıp bu karışıma 1 tüp tween 20 solüsyonu eklenerek homojen bir şekilde karışması sağlandı. Bu karışım yıkama solüsyonu ve serum dilüenti olarak kullanıldı. 180 adet serum örneği mikrosantrifüj tüplerinden alikot tüplerine alındı ve her biri numaralandırıldı. EUROIMMUN IF Sprinter (Almanya) cihazına sırasıyla yerleştirildi. İlk iki bölmede olmak üzere bir adet pozitif kontrol, bir adet negatif kontrol tüpleri yerleştirildi. Cihaz 1/100 başlangıç dilüsyonuna ayarlı idi. Cihaz 10 µl serum ile 990 µl hazırlanan PBS-tween 20 solüsyonunu karıştırarak her bir

serumun dilüsyonunu hazırladı. Hazırlanan bu dilüsyondan 30 µl alarak lam slaytların ilgili kuyucuğuna pipetleyerek 30 dk'lık oda sıcaklığında inkübasyona aldı. Pipetaj sonrasında hasta kuyucuklarındaki sıvının bir diğeri ile temas halinde olmadığına ve hava kabarcıkları içermediğine emin olundu. Ardından 5 dk PBS-tween 20 solüsyonu ile yıkamaya alındı. Yıkama sonrası 25 µl floresein-işaretli anti human IgG (FITC) içeren konjugat (kullanımdan önce iyice karıştırılmış olmalı) her bir kuyucuğa pipetlendi. Özellikle bu aşamada karanlıkta 30dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından tekrar PBS-tween 20 solüsyonu ile 5 dk yıkama yapıldı. Yıkama sonrası slaytlar cihazdan alınıp kurutma kağıdı üzerinde arka tarafları kurulandı. Her bir kuyucuk üzerine 10 µl olacak şekilde gliserol eklenip, slayta uygun bir lamelle kapatıldı. Slaytlar floresan mikroskopta değerlendirmeye almaya hazırıldı.

Yöntemin Çalışma Prensipleri: İnsan laringeal karsinom hücrelerinden oluşan HEP-2 hücreleri ile maymun karaciğeri dokusu içeren ticari slaytlar substrat olarak kullanıldı. Üzerine hasta serumu eklenince, bu dokudaki antijenlere karşı antikor varsa bağlanması sağlanır. Yıkama ile bağlanmayan kısım uzaklaştırılır. Ardından floresein işaretli anti-insan globülini eklenerek, bağlanan ilk antikora bağlanması sağlanır. Tekrar yıkama işlemi ile bağlanmayan tüm maddeler uzaklaştırıldıktan sonra floresan mikroskopta incelemeye alınır. Eklenen ikinci antikor, hasta serumunda bulunan antikorun tespitini sağlamak için işaretlidir. Yöntem hasta serumundaki antikoru direkt göstermediği, arada ikinci bir antikor olduğu için indirekt bir yöntemdir.

Mikroskopik İnceleme: Hazırlanan slaytlarda, 40x büyütmede öncelikle pozitif ve negatif kontrol incelenmiş, uygun boyanma varlığında test geçerli sayılmıştır. Ardından öncelikle HEP-20-10 çekirdek ve sitoplazmaları incelenmiş ve negatif olanlar not edilmiştir. Boyanma saptanan örnekler ise boyanma şiddeti ve paterni not alınarak, karaciğer görüntüsü ile konfirme edilmiştir. Tarama dilüsyonu olarak 1/100 kullanılmıştır. Boyanma şiddeti ise (+) 1/100, (++) 1/320, (+++) 1/1000, (+++++) 1/3200 dilüsyona karşılık gelecek şekilde belirtilmiştir.

3.2. İmmünoelot Yöntemi

EUROLINE ANA Profile 3 Plus DFS/70 (IgG), (EUROIMMUN, Almanya) kiti kullanımdan en az 30 dk önce +4°C den çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Tüm basamaklar kit önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Enzim konjugatı 10x konsantre şekildeydi ve 1:10 olacak şekilde seyreltmek için 0,15 ml enzim konjugat, 1,35 ml tampon çözelti ile karıştırıldı. Enzim konjugatı dilüe edildikten sonra aynı gün içinde kullanıldı. Tampon çözelti kullanıma hazırды. Yıkama çözeltisi 10x konsantre şekildeydi. 1:10 dilüsyon elde etmek için her bir strip için 1 ml yıkama solüsyonuna 9 ml distile su eklendi. Bu haliyle aynı gün içinde kullanıldı. Substrat solüsyonu kullanıma hazırды. Üzerine 16 adet bilinen antijen emdirilmiş, kullanıma hazır test stripleri sırasıyla küvete yerleştirildi. Her birinin üzerine hastaya ait numara yazıldı.

EUROBlotOne cihazı her bir strip üzerine 1,5 ml tampon çözelti ekleyip 5 dk boyunca çalkalamaya aldı. Ardından sıvıyı aspire etti. Hastalara ait serumları 15 µl seruma 1,5 ml tampon çözelti ekleyerek 1:101 oranında dilüe edip bu karışımdan 1,5 ml her bir strip üzerine ekleyip oda sıcaklığında çalkalayıcı eşliğinde 30 dk inkübasyona aldı. Sürenin sonunda bu sıvıyı aspire edip 3 kez 1,5 ml'lik dilüe yıkama solüsyonu ile çalkalayıcı eşliğinde yıkama yapıp kalan sıvıyı aspire etti. Yıkama sonrası 1,5 ml alkali fosfataz bağı bağı anti human-IgG içeren dilüe edilmiş konjugatı koydu. 30 dk boyunca oda sıcaklığında karıştırıcı eşliğinde inkübasyona aldı. Süre bitiminde sıvıyı aspire etti ve bir önceki gibi yıkamaya aldı. Ardından 1,5 ml substrat ekleyerek 10 dk karıştırıcı eşliğinde inkübasyona aldı. Kontrol bantlarının oluşumu kontrol edildi. Kalan sıvıyı aspire edip 3 kez 1'er dakikalık distile su ile yıkama yaptı. Ardından kurutma aşaması sonrası stripler değerlendirmeye alındı.

3.3. Anti-DFS/70 ELISA Yöntemi

Tüm işlem basamakları zemininde DFS70 antijeni bulunan 96 kuyucuklu EUROIMMUN Anti-DFS/70 ELISA (Almanya) kit önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Kitin içeriğindeki kontrol-kalibratörler, enzim konjugat, tampon solüsyon, kromojen/substrat solüsyon ve stop solüsyonu kullanıma hazırды.

Kullanmadan en az 30 dk önce +4°C'den çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Yıkama solüsyonu 10x konsantre haldeydi. Dilüe etmeden önce iyice karıştırıldı. 1:10 olacak şekilde distile su ile karıştırıldı. Hasta serumları 1:201 olacak şekilde 5 µl seruma 1.0 ml tampon solüsyon eklenerek dilüe edildi ve vortekslendi. Ardından 100 µl kalibratör, pozitif ve negatif kontrol ve sırasıyla hasta serumları mikropate kuyucuklarına pipetlendi ve 30 dk oda sıcaklığında (+18/+25°C) inkübe edildi. Ardından Mindray mw-12a (Çin) cihazında 450 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez 1'er dk'lık yıkama yapıp fazla sıvı uzaklaştırıldı. Yıkama sonrası 100 µl peroksidaz-işaretli anti-human IgG her bir kuyucuğa eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. 450 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez 1'er dk'lık yıkama yapıldı. 100 µl kromojen/substrat eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 15 dk inkübasyon sonrası sırasıyla her bir kuyucuğa hızlı bir şekilde 100 µl stop solüsyonu eklenip 450 nm dalga boyunda 30 dk içinde Bio-Rad iMark microplate reader (ABD) ile fotometrik olarak okutuldu.

4. BULGULAR

Analizler IBM SPSS Statistics 23 paket programı üzerinden yapılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken kategorik değişkenler (örneğin cinsiyet) için sıklıklar (sayı, yüzde), sayısal değişkenler (örneğin yaş) için ise tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum) verilmiştir.

İki bağımsız kategorik değişken arasındaki ilişkiler ise Ki Kare analizi ile incelenmiştir. Ki Kare analizinde beklenen değer varsayımı sağlanamadığı durumlarda Fisher's Exact test sonuçları kullanılmıştır. Ki Kare analizi anlamlı çıkan bazı analizlerde Relatif Risk katsayısı yorumlanmıştır.

Tablo 4.1. Gruplara göre dağılımlar

	Sayı (n)	Yüzde (%)
Allerjik Astım	30	16,7
Allerjik Rinit	30	16,7
Romatoid Artrit	30	16,7
Sistemik Lupus Eritematozus	30	16,7
Ürtiker	30	16,7
Kontrol	30	16,7
Toplam	180	100,0

Çalışmaya her grup için 30'ar kişi alınmış toplamda 180 kişi ile çalışılmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.2. Gruplara göre yaşların tanımlayıcı istatistikleri

	Yaş				
	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum
Allerjik Astım	44,63	13,90	47,00	18,0	64,0
Allerjik Rinit	36,17	9,71	35,50	18,0	55,0
Romatoid Artrit	45,57	9,19	47,50	25,0	62,0
Sistemik Lupus Eritematozus	42,57	14,69	44,00	20,0	65,0
Ürtiker	45,07	11,89	46,50	21,0	62,0
Kontrol	37,10	9,63	35,50	23,0	59,0

Allerjik astım grubundaki hastaların yaş ortalaması 44,63 iken, allerjik rinit grubundaki hastaların 36,17, romatoid artrit grubundaki hastaların 45,57, sistemik

lupus eritematozus grubundaki hastaların 42,57, ürtiker grubundaki hastaların 45,07 ve kontrol grubundaki hastaların ise 37,10'dur (Tablo 4.2).

Tablo 4.3. Gruplara göre cinsiyet dağılımları

	Cinsiyet			
	Kadın		Erkek	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Allerjik Astım	23	76,7	7	23,3
Allerjik Rinit	16	53,3	14	46,7
Romatoid Artrit	22	73,3	8	26,7
Sistemik Lupus Eritematozus	28	93,3	2	6,7
Ürtiker	21	70,0	9	30,0
Kontrol	21	70,0	9	30,0

Allerjik astım grubundaki hastaların %76,7'si kadın iken allerjik rinit grubunda bu oran %53,3, romatoid artrit grubunda %73,3, sistemik lupus eritematozus grubunda %93,3, ürtiker grubunda %70 ve kontrol grubunda ise %70'dir (Tablo 4.3).

Tablo 4.4. Sistemik lupus eritematozus ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Ki Kare	p	Risk (%95 Güven Aralığı)
			Sistemik Lupus Eritematozus	Kontrol				
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	11	1	12	10,417	0,001*	2,316 (1,570-3,417)
		Yüzde	36,7	3,3	20,0			
	Negatif	Sayı	19	29	48			
		Yüzde	63,3	96,7	80,0			
Toplam		Sayı	30	30	60			
		Yüzde	100,0	100,0	100,0			

*: $p < 0,05$ (İstatistiksel olarak anlamlı)

Uygulanan ki kare analizi sonucunda sistemik lupus eritematozus ve kontrol grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p < 0,05$). Buna göre sistemik lupus eritematozus grubunda DFS pozitif olanların

oranı (%36,7) kontrol grubundan (%3,3) anlamlı derecede daha fazladır. Ayrıca lupus eritematozus grubunda DFS pozitif olma riski kontrol grubundan 2,316 kat daha fazladır (Tablo 4.4).

Tablo 4.5. Romatoid artrit ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Fisher Exact*	p
			Romatoid Artrit	Kontrol			
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	3	1	4	1,071	0,612
		Yüzde	10,0	3,3	6,7		
	Negatif	Sayı	27	29	56		
		Yüzde	90,0	96,7	93,3		
Toplam		Sayı	30	30	60		
		Yüzde	100,0	100,0	100,0		

*: Ki Kare analizinin beklenen değer varsayımı sağlanamadığı için Fisher Exact sonuçları kullanılmıştır.

Uygulanan ki kare analizi sonucunda romatoid artrit ve kontrol grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.6. Allerjik astım ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Fisher Exact*	p
			Allerjik Astım	Kontrol			
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	1	1	2	0,000	1,000
		Yüzde	3,3	3,3	3,3		
	Negatif	Sayı	29	29	58		
		Yüzde	96,7	96,7	96,7		
	Toplam		Sayı	30	30		
Yüzde			100,0	100,0	100,0		

*: Ki Kare analizinin beklenen değer varsayımı sağlanamadığı için Fisher Exact sonuçları kullanılmıştır.

Uygulanan ki kare analizi sonucunda allerjik astım ve kontrol grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.7. Allerjik rinit ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Fisher Exact*	p
			Allerjik Rinit	Kontrol			
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	5	1	6	2,963	0,195
		Yüzde	16,7	3,3	10,0		
	Negatif	Sayı	25	29	54		
		Yüzde	83,3	96,7	90,0		
Toplam		Sayı	30	30	60		
		Yüzde	100,0	100,0	100,0		

*: Ki Kare analizinin beklenen değer varsayımı sağlanamadığı için Fisher Exact sonuçları kullanılmıştır.

Uygulanan ki kare analizi sonucunda allerjik rinit ve kontrol grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.8. Ürtiker ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Fisher Exact*	p
			Ürtiker	Kontrol			
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	4	1	5	1,964	0,353
		Yüzde	13,3	3,3	8,3		
	Negatif	Sayı	26	29	55		
		Yüzde	86,7	96,7	91,7		
Toplam		Sayı	30	30	60		
		Yüzde	100,0	100,0	100,0		

*: Ki Kare analizinin beklenen değer varsayımı sağlanamadığı için Fisher Exact sonuçları kullanılmıştır.

Uygulanan ki kare analizi sonucunda ürtiker ve kontrol grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.9. Allerjik solunum yolu hastalıkları (Rinit+Astım) ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Fisher Exact*	p
			Allerjik SYH (R+A)	Kontrol			
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	6	1	7	1,239	0,417
		Yüzde	10,0	3,3	7,8		
	Negatif	Sayı	54	29	83		
		Yüzde	90,0	96,7	92,2		
Toplam		Sayı	60	30	60		
		Yüzde	100,0	100,0	100,0		

*: Ki Kare analizinin beklenen değer varsayımı sağlanamadığı için Fisher Exact sonuçları kullanılmıştır.

Uygulanan ki kare analizi sonucunda allerjik solunum yolu hastalıkları (Rinit+Astım) ve kontrol grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.10. Allerjik hastalıklar (Rinit+Astım+Ürtiker) ve kontrol grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Fisher Exact*	p
			Allerjik H (R+A+Ü)	Kontrol			
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	10	1	11	1,635	0,288
		Yüzde	11,1	3,3	9,2		
	Negatif	Sayı	80	29	109		
		Yüzde	88,9	96,7	90,8		
Toplam		Sayı	90	30	60		
		Yüzde	100,0	100,0	100,0		

*: Ki Kare analizinin beklenen değer varsayımı sağlanamadığı için Fisher Exact sonuçları kullanılmıştır.

Uygulanan ki kare analizi sonucunda allerjik hastalıklar (Rinit+Astım+Ürtiker) ve kontrol grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.11. Allerjik rinit ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Ki Kare	p
			Allerjik Rinit	Sistemik Lupus Eritematozus			
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	5	11	16	3,068	0,080
		Yüzde	16,7	36,7	26,7		
	Negatif	Sayı	25	19	44		
		Yüzde	83,3	63,3	73,3		
Toplam		Sayı	30	30	60		
		Yüzde	100,0	100,0	100,0		

Uygulanan ki kare analizi sonucunda allerjik rinit ve sistematik lupus eritematozus grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.12. Allerjik astım ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Ki Kare	p	Risk (95 Güven Aralığı)
			Allerjik Astım	Sistemik Lupus Eritematozus				
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	1	11	12	10,417	0,001*	2,316 (1,570- 3,417)
		Yüzde	3,3	36,7	20,0			
	Negatif	Sayı	29	19	48			
		Yüzde	96,7	63,3	80,0			
Toplam		Sayı	30	30	60			
		Yüzde	100,0	100,0	100,0			

*: $p<0,05$ (İstatistiksel olarak anlamlı)

Uygulanan ki kare analizi sonucunda allerjik astım ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre sistemik lupus eritematozus grubunda DFS70 pozitif olanların oranı (%36,7) allerjik astım grubundan (%3,3) anlamlı derecede daha fazladır. Ayrıca lupus eritematozus grubunda DFS pozitif olma riski allerjik astım grubundan 2,316 kat daha fazladır (Tablo 4.12).

Tablo 4.13. Ürtiker ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Ki Kare	p	Risk (95 Güven Aralığı)
			Sistemik Lupus Eritematozus	Ürtiker				
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	11	4	15	4,356	0,037*	1,737 (1,098-2,746)
		Yüzde	36,7	13,3	25,0			
	Negatif	Sayı	19	26	45			
		Yüzde	63,3	86,7	75,0			
Toplam		Sayı	30	30	60			
		Yüzde	100,0	100,0	100,0			

*: $p < 0,05$ (İstatistiksel olarak anlamlı)

Uygulanan ki kare analizi sonucunda ürtiker ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p < 0,05$). Buna göre sistemik lupus eritematozus grubunda DFS70 pozitif olanların oranı (%36,7) ürtiker grubundan (%13,3) anlamlı derecede daha fazladır. Ayrıca sistemik lupus eritematozus grubunda DFS pozitif olma riski ürtiker grubundan 1,737 kat daha fazladır (Tablo 4.13).

Tablo 4.14. Romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Ki Kare	p	Risk (95 Güven Aralığı)
			Romatoid Artrit	Sistemik Lupus Eritematozus				
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	3	11	14	5,963	0,015*	1,902 (1,225-2,953)
		Yüzde	10,0	36,7	23,3			
	Negatif	Sayı	27	19	46			
		Yüzde	90,0	63,3	76,7			
Toplam		Sayı	30	30	60			
		Yüzde	100,0	100,0	100,0			

*: $p < 0,05$ (İstatistiksel olarak anlamlı)

Uygulanan ki kare analizi sonucunda romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre sistemik lupus eritematozus grubunda DFS70 pozitif olanların oranı (%36,7) romatoid artrit grubundan (%10) anlamlı derecede daha fazladır. Ayrıca sistemik lupus eritematozus grubunda DFS pozitif olma riski romatoid artrit grubundan 1,902 kat daha fazladır (Tablo 4.14).

Tablo 4.15. Allerjik hastalıklar (Rinit+Astım+Ürtiker) ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 pozitifliği arasındaki ilişkinin incelenmesi

			Grup		Toplam	Ki Kare	p	Risk (95 Güven Aralığı)
			Allerjik H (R+A+Ü)	Sistemik Lupus Eritematozus				
DFS70 Pozitifliği	Pozitif	Sayı	10	11	21	10,178	0,001	2,729 (1,537-4,846)
		Yüzde	11,1	36,7	17,5			
	Negatif	Sayı	80	19	99			
		Yüzde	88,9	63,3	82,5			
Toplam		Sayı	90	30	60			
		Yüzde	100,0	100,0	100,0			

*: $p<0,05$ (İstatistiksel olarak anlamlı)

Uygulanan ki kare analizi sonucunda allerjik hastalıklar (rinit+astım+ürtiker) ve sistemik lupus eritematozus grupları ile DFS70 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre sistemik lupus eritematozus grubunda DFS70 pozitif olanların oranı (%36,7) allerjik hastalıklar (rinit+astım+ürtiker) grubundan (%11,1) anlamlı derecede daha fazladır. Ayrıca sistemik lupus eritematozus grubunda DFS pozitif olma riski allerjik hastalıklar (rinit+astım+ürtiker) grubundan 2,729 kat daha fazladır (Tablo 4.15).

Tablo 4.16. Gruplara göre DFS70 ELISA ile DFS70 immünblot arasındaki ilişkilerin incelenmesi

			DFS70 Immünblot				Ki Kare	p
			Pozitif		Negatif			
			Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)		
DFS70 ELISA	Allerjik Astım	Pozitif	1	100,0	0	0,0	30,000	0,033*
		Negatif	0	0,0	29	100,0		
	Allerjik Rinit	Pozitif	2	50,0	2	50,0	0,205	0,004
		Negatif	1	3,8	25	96,2		
	Romatoid Artrit	Pozitif	2	66,7	1	33,3	19,286	0,007*
		Negatif	0	0,0	27	100,0		
	Sistemik Lupus Eritematozus	Pozitif	4	80,0	1	20,0	5,880	0,031*
		Negatif	6	24,0	19	76,0		
	Ürtiker	Pozitif	2	100,0	0	0,0	13,929	0,014*
		Negatif	2	7,1	26	92,9		
	Kontrol	Pozitif	1	100,0	0	0,0	30,000	0,033*
		Negatif	0	0,0	29	100,0		

*: $p < 0,05$ (İstatistiksel olarak anlamlı), Ki Kare analizinin beklenen değer varsayımı sağlanamadığı için Fisher Exact sonuçları kullanılmıştır.

Uygulanan ki kare analizi sonucunda tüm gruplarda DFS70 ELISA ile DFS70 immünblot arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p < 0,05$). Buna göre tüm gruplar için DFS70 ELISA pozitif olanlarda DFS70 immünblot pozitif olanların oranı DFS70 ELISA negatif olanlarından anlamlı derecede daha fazladır (Tablo 4.16).

Uygulanan ki kare analizi sonucunda DFS70 ELISA ile DFS70 immünblot arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p < 0,05$). Buna göre DFS70 ELISA pozitif olanlarda DFS70 immünblot pozitif olanların oranı (%73,3) DFS70 ELISA negatif olanların oranından (%6,7) anlamlı derecede daha fazladır.

Tablo 4.17. Gruplara göre DFS70 pozitifliği ile ANA pozitifliği arasındaki ilişkilerin incelenmesi

			ANA				Ki Kare	p
			Pozitif		Negatif			
			Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)		
DFS70	Allerjik Astım	Pozitif	1	100,0	0	0,0	3,122	0,067
		Negatif	1	3,4	28	96,6		
	Allerjik Rinit	Pozitif	1	20,0	4	80,0	3,765	0,167
		Negatif	0	0,0	25	100,0		
	Romatoid Artrit	Pozitif	2	66,7	1	33,3	1,556	0,251
		Negatif	8	29,6	19	70,4		
	Sistemik Lupus Eritematozus	Pozitif	10	90,9	1	9,1	1,292	0,372
		Negatif	14	73,7	5	26,3		
	Ürtiker	Pozitif	1	25,0	3	75,0	1,720	0,253
		Negatif	1	3,8	25	96,2		
	Kontrol	Pozitif	1	100,0	0	0,0	3,362	0,200
		Negatif	5	17,2	24	82,8		

Ki Kare analizinin beklenen değer varsayımı sağlanamadığı için Fisher Exact sonuçları kullanılmıştır.

Uygulanan ki kare analizi sonucunda tüm gruplarda DFS70 ile ANA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Tablo 4.17).

Uygulanan ki kare analizi sonucunda DFS70 ile ANA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre DFS70 pozitif olanlarda ANA pozitif olanların oranı (%62,5) DFS70 negatif olanların oranından (%19) anlamlı derecede daha fazladır.

5. TARTIŞMA

Anti-DFS70 antikorü günümüzde birincil hedefi olan lens epitel  büyüme faktörü (LEDGF), DNA bağlayıcı transkripsiyon koaktivatör p75 olarak da adlandırılmaktadır.

DFS70/LEDGF prostat tümör dokusunda ve diğer kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Viral integras ile bir etkileşim sayesinde, insan bağışıklık sistemi bozucu virüsün (HIV)  oğalması için bir kofaktör olarak görev alır ve bunun gibi bir dizi fizyolojik işleve sahiptir (50).

DFS70/LEDGFp75 ve kısa ek varyantı olan LEDGF/p52, 15 ekzon ve 14 introndan oluşan aynı genden derive olmuştur. Bu varyantlar farklı nükleer bölgeleri lokalize eder ve ektopik olarak aşırı eksprese edildiğinde karşıt roller oynarlar, DFS70 bir stres sağkalım proteini, p52 ise bir pro-apoptotik protein olarak davranır (51).

DFS70, alkol, ultraviyole B (UVB) ışını, sitotoksik ilaçlar ve bazı virüsler gibi çevresel stres faktörleri karşıısında hücre sağkalımının desteklenmesinde önemli bir rol oynar (52). Sonuç olarak, bu gibi stres faktörleri, DFS70 aktivasyonuna yol açan artmış hücresel oksidatif strese yol açar. DFS70'in stres sağkalım fonksiyonları, stres koruyucu, antioksidan ve inflamatuvar genleri transkripsiyonel olarak aktive etme yeteneğine bağlıdır (52).

Anti-DFS70 antikorunun herhangi bir hastalığa özgül olmaması, sistemik otoimmün romatizmal hastalıklar dışındaki birçok inflamatuvar durumda, allerjik hastalıklarda ve özellikle de sağlıklı bireylerde sık oranda saptanmasından dolayı klinik uygulamadaki yeri tam olarak belirlenememiştir.

Çalışmamızda, tedavi alan ve almayan, astım, allerjik rinit, ürtiker, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus tanılı hastalar ve sağlıklı gönüllüler grubunda IIF, immünblot ve ELISA yöntemi ile, ANA, ENA profil ve Anti-DFS70 Antikoru çalışılarak bu hastalıklarla ilişkisi analiz edildi.

Çalışmaya her grup için 30'ar kişi alınmış toplamda 180 kişi ile çalışılmıştır.

Anti-DFS70 antikoruna başlangıçta, hedef otoantijenin moleküler kitlesi ve IIF paternine göre adlandırılmıştır. Tipik DFS70 IIF paterni benzersiz bir benekli paterndir, interfazdaki nükleus ve metafazdaki kromatin boyunca dağılmıştır ve çekirdekteki beneklerin yoğunluğuna, büyüklük ve parlaklığına göre görünümü değişir (49).

Watanabe ve arkadaşlarının sağlıklı 597 hastane çalışanında anti-DFS70 antikor sıklığını değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmada IIF testinde 64 kişide anti-DFS70 pozitif saptanmıştır (%11). IIF testinde pozitif saptanan 64 kişi IB testinde de pozitif bulunmuştur. ELISA testinde ise 82 örnek pozitif saptanmıştır. IB de pozitif saptanan 64 örnekten 57'si ELISA testinde gerçek pozitif, 7'si yalancı negatif olarak bulunmuştur. ELISA testinin sensitivitesi %89 olarak saptanmıştır (9).

Muro ve arkadaşları yaptıkları çalışmada çeşitli SARD tanılarına sahip 500 hastada anti-DFS70 antikorunu IIF, IB ve ELISA yöntemiyle araştırmışlardır. Araştırmacılar 22 hastada anti-DFS70 antikorunu pozitif bulmuşlardır. ELISA yöntemi ile 18 hastada diğer ANA'lar pozitif, 3 hastada diğer ANA'lar negatif ve bir hastada ise sadece antisitoplazmik antikor pozitif bulunmuştur (10).

Mariz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 918 sağlıklı birey ve 153 SARD tanısı olan hastada ANA pozitifliğini IIF yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Toplam 918 sağlıklı bireyin 118'inde ANA pozitifliği gözlenmiş olup, 118 ANA pozitif sağlıklı bireyin de 39 (%4.2)'unda DFS paterni saptanmıştır. Bu çalışmada 153 SARD tanısı olan hastanın hiçbirinde DFS paterni saptanmamıştır (5).

Bizim çalışmamızda ELISA testinde Anti-DFS70 antikorunu, kontrol grubunda 1, astım grubunda 1, RA grubunda 3, allerjik rinit grubunda 4, SLE grubunda 5 ve ürtiker grubunda 2 bireyde pozitif saptadık.

İmmünoelot testinde Anti-DFS70 antikor pozitif olan birey sayısını, kontrol grubunda 1, astım grubunda 1, RA grubunda 2, allerjik rinit grubunda 3, SLE grubunda 10 ve ürtiker grubunda 4 birey olarak saptadık.

IIF testinde ANA pozitif bireylerin oranını kontrol grubunda %20, astım grubunda %6,6, RA grubunda %36,6, allerjik rinit grubunda %6,6, SLE grubunda %80 ve ürtiker grubunda %10 olarak saptadık.

SLE, RA,  rtiker, astım ve kontrol grubunda ELISA ile Anti-DFS70 pozitif saptanan tüm bireylerde, immünblot ile Anti-DFS70 ve IIF yöntemi ile ANA pozitif saptandı. allerjik rinit grubunda ise, Anti-DFS70 pozitif olan 4 bireyin 2'sinde immünblot ile Anti-DFS70 ve IIF yöntemi ile ANA negatif saptandı.

Muro ve arkadaşlarının çalışmasında Anti-DFS70 pozitif saptanan 7 SLE hastasının 4' nde Anti-SSA/Ro antikoru, 6/7 hastada Anti-dsDNA ve 2/7 hastada da Anti-Sm antikoru pozitif bulunmuştur (10). Bizim  alışmamızda Anti-DFS70 pozitif saptanan 11 SLE hastasının, 5'inde Anti-ds DNA, 3' nde Anti-SSB, Anti-SSA, 2'sinde Anti-Sm, 6'sında Anti-Histon antikor pozitif bulundu.

SLE grubunda Anti-DFS70 pozitif olanların oranının (%36,7) kontrol grubundan (%3,3) anlamlı derecede daha fazla olduğu görüldü (p<0,05). Ancak SLE grubundaki Anti-DFS70 pozitif olan bireylerin %81,8'inde, immunblot yöntemiyle bakılan hastalık ile ilişkili çeşitli diğer antikor pozitifliklerinin de eşlik ettiği görüldü. Kontrol grubundaki Anti-DFS70 pozitif bireyde ek antikor pozitifliği görülmedi.

Bizim  alışmamızda da g r ld ğu üzere, SARD tanısı olanlarda, Anti-DFS70 antikoru genellikle diğer hastalığa spesifik otoantikorlar ile birlikte bulunmaktadır. Ancak izole Anti-DFS70 antikorlarının varlığı SLE, Sistemik Skleroz, Sjögren Sendromu, MCTD gibi otoimmün inflamatuvar hastalıkları dışlamada yardımcı, değerli bir biyobelirteç olarak önerilmektedir (10).

Allerjik rinit, ürtiker ve astım grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Anti-DFS70 pozitifliği arasında anlamlı fark gözlenmedi (p>0,05). Bu sonucun öncelikle gruplardaki birey sayılarının az olması ile ilişkili olabileceği d ş n ld .

Allerjik astım ve SLE grupları ile Anti-DSF70 antikoru arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır (p<0,05). Buna göre SLE grubunda Anti-DSF70 antikoru pozitif olanların oranı (%36,7) Allerjik astım grubundan (%3,3) anlamlı derecede daha fazladır.

Ürtiker ve SLE grupları ile Anti-DSF70 antikoru arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır (p<0,05). Buna göre SLE grubunda Anti-DSF70 antikoru pozitif olanların oranı (%36,7)  rtiker grubundan (%13,3) anlamlı derecede daha fazladır.

Allerjik rinit ve sistematik SLE grupları ile Anti-DSF70 antikoru arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$).

RA ve SLE grupları ile Anti-DSF70 antikoru arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre SLE grubunda Anti-DSF70 antikoru pozitif olanların oranı (%36,7) RA grubundan (%10) anlamlı derecede daha fazladır.



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada amaç DFS70 ANA antikorunun sağlıklı bireylerden özellikle allerjik rahatsızlığı olanlarda astım rinit veya ürtiker pozitif olabileceği ve gene bu gruplarda diğer ANA antikor subgruplarının negatif olması literatür bilgisinin de tekrarlanabilir olup olmadığını görmek üzere planlanmıştır. SLE hastalığı olanlarda çalışmamızda kontrol grubuna göre anlamlı oranda DFS70 pozitifliği saptanmıştır. Ancak bu hastaların çoğunda diğer otoantikorlar da pozitiftir. Bu durum zaten poliklonal antikor yanıtı olan bir otoimmün hastalık olan SLE için beklenen bir durumdur.

Ancak sağlıklı bireylerde DFS70 antikor pozitifliği 1 adet saptanmıştır. Ancak allerjik rinit, astım veya ürtiker olan hastalarda bu DFS70 antikor pozitifliği daha fazla oranda pozitiftir. Özellikle allerjik rinit olan 5 hastada DFS70 pozitiftir. Bu hastalarda diğer otoantikorlar pozitif saptanmamıştır. Bu durum literatür bilgisi ile de paralel görülmektedir. Muhtemel hasta sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel anlamlı olmasa da, allerjik rinitli hastalarda en fazla oranda DFS70 pozitifliği görülmektedir. Bu anlamda DFS70 ANA antikorunun aslında patolojik bir antikor olmaktan çok. otoimmün hastalık dışında da görülebildiği literatür bilgisi ile uyum göstermektedir. Anti DFS70 antikoru değişik metodlarla bakılabilmektedir. Özellikle ELISA ile yapılan testler daha fazla klinik uyum sağlamaktadır. İmmunfloresan yöntemle gözle bir teknisyen tarafından testin bakılmasında bazen kişisel farklılıklara rastlanılabilmektedir. Keza immünblot yönteminin duyarlılığı konusunda ve false pozitif veya negatif değerler görülebilmesi açısından ELISA ile kıyaslandığında nispeten duyarlılığının daha düşük olduğu söylenebilir.

Bu tezde hasta sayısına tam olarak ulaşılabilmesi tezin zayıf yönüdür. Keza hastaların heterojen yapısı, tedavi almakta olan ve olmayan hastaların da çalışmada yer alması diğer bir zayıflatıcı etkidir.

Bununla beraber, bu tezde literatür bilgisine benzer şekilde, özellikle allerjik rinitli hastalarda tamamen sağlıklı bireylere göre DFS70 antikor pozitifliğinin tek başına görülebileceğini göstermesi açısından önemlidir. Çalışmanın sadece

allerjik rinitli hastalarda, daha fazla hastada yapılması daha faydalı olacaktır diye düşünülmüştür.



7. ÖZET

Anti-DFS70 Antikorlarının Otoimmün ve Allerjik Hastalılardaki Rolü Nedir ve Otoimmün Hastalılarda Koruyucu Rolü Var mıdır?

Anti-DFS70 antikorunun herhangi bir hastalığa özgül olmaması, sistemik otoimmün romatizmal hastalıklar dışındaki birçok inflamatuvar durumda, allerjik hastalıklarda ve özellikle de sağlıklı bireylerde sık oranda saptanmasından dolayı klinik uygulamadaki yeri tam olarak belirlenememiştir.

ANA IIF testindeki DFS70 paterni başlangıçta interstisyel sistitli hastalarda tanımlanmıştır. Daha sonra çok çeşitli kronik inflamatuvar durumlarda, otoimmün tiroidit, Vogt-Koyanagi – Harada sendromu (%66.7), atopik dermatit (%30), kanser ve hatta belirgin bir oranda sağlıklı bireylerde raporlanmıştır.

Tipik DFS70 IIF paterni benzersiz bir benekli paterndir, interfazdaki nükleus ve metafazdaki kromatin boyunca dağılmıştır ve çekirdekteki beneklerin yoğunluğuna, büyüklük ve parlaklığına göre görünümü değişir. Antikor günümüzde birincil hedefi olan lens epiteli büyüme faktörü (LEDGF), DNA bağlayıcı transkripsiyon koaktivatör p75 olarak da adlandırılmaktadır.

Çalışmamızda, tedavi alan ve almayan, astım, allerjik rinit, ürtiker, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus tanılı hastalar ve sağlıklı gönüllüler grubunda, her grupta 30'ar kişi olmak üzere toplam 180 kişi alınarak, IIF, immünblot ve ELISA yöntemi ile, ANA, ENA profil ve Anti-DFS70 Antikoru çalışılarak bu hastalıklarla ilişkisi analiz edildi.

Bu çalışmada amaç Anti-DFS70 antikorunun sağlıklı bireylerden özellikle allerjik rahatsızlığı olanlarda, astım rinit veya ürtiker, pozitif olabileceği ve gene bu gruplarda diğer ANA antikor subgruplarının negatif olması literatür bilgisinin de tekrarlanabilir olup olmadığını görmek üzere planlanmıştır.

SLE hastalığı olanlarda çalışmamızda kontrol grubuna göre anlamlı oranda DFS70 pozitifliği saptanmıştır. Ancak bu hastaların çoğunda diğer otoantikorlar da pozitifdir. Bu durum zaten poliklonal antikor yanıtı olan bir otoimmun hastalık olan SLE için beklenen bir durumdur.

Sağlıklı bireylerde DFS70 antikor pozitifliği 1 adet saptanmıştır. Ancak allerjik rinit, astım veya ürtiker olan hastalarda DFS70 antikor pozitifliği daha fazla oranda pozitifdir. Özellikle allerjik rinit olan 5 hastada DFS70 pozitifdir. Bu hastalarda diğer otoantikorlar pozitif saptanmamıştır. Bu durum literatür bilgisi ile de paralel görülmektedir.

ELISA ile yapılan testler daha fazla klinik uyum sağlamaktadır. Immünfloresan yöntemle gözle bir teknisyen tarafından testin bakılmasında bazen kişisel farklılıklara rastlanılabilmektedir. Keza immünblot yönteminin duyarlılığı konusunda ve yanlış pozitif veya negatif değerler görülebilmesi açısından ELISA ile kıyaslandığında nispeten duyarlılığın daha düşük olduğu söylenebilir.

Muhtemel hasta sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel anlamlı olmasa da, allerjik rinitli hastalarda en fazla oranda DFS70 pozitifliği görülmektedir. Bu anlamda Anti-DFS70 antikorumun aslında patolojik bir antikor olmaktan çok, otoimmün hastalık dışında da görülebildiği literatür bilgisi ile uyum göstermektedir.

Bu çalışmada literatür bilgisine benzer şekilde özellikle allerjik rinitli hastalarda tamamen sağlıklı bireylere göre DFS70 antikor pozitifliğinin tek başına görülebileceğini göstermesi açısından önemlidir. Çalışmanın sadece allerjik rinitli hastalarda daha fazla hastada yapılması daha faydalı olacaktır diye düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Anti-DFS70, ELISA, SARD,

8. ABSTRACT

What is the Role of Anti-DFS70 Antibodies in Autoimmune and Allergic Diseases and Does it Have a Protective Role in Autoimmune Diseases ?

Since the anti-DFS70 antibody was not specific for any disease and was found in many inflammatory conditions other than systemic autoimmune rheumatic diseases, especially in allergic diseases and in healthy individuals, its importance in clinical practice has not been fully established.

The DFS70 pattern in the ANA IIF assay was initially described in patients with interstitial cystitis. Subsequently, in a wide variety of chronic inflammatory conditions, autoimmune thyroiditis, Vogt-Koyanagi - Harada syndrome (66.7%), atopic dermatitis (30%), cancer, and even a significant proportion of healthy individuals were reported.

The typical DFS70 IIF pattern is a unique speckled pattern, distributed throughout the chromatin in the interphase of nucleus and in the metaphase, and changes in appearance according to the density, size and brightness of the spots in the nucleus. The antibody is now referred to as the primary target lens epithelium growth factor (LEDGF), DNA binding transcription coactivator p75.

In our study, 30 people in each group, including a total of 180 people, including patients with asthma, allergic rhinitis, urticaria, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and healthy volunteers, ANA, ENA profile and Anti-DFS70 antibody studied with IIF, Immunoblot and ELISA method and the relationship between these illnesses was analyzed.

The aim of this study was to determine whether anti-DFS70 antibody may be positive for asthma, rhinitis or urticaria, especially in patients with allergic discomfort, and negative for other ANA antibody subgroups in these groups and planned to see whether the literature information is reproducible.

In our study, DFS70 positivity was significantly higher in patients with SLE disease than in the control group. However, other autoantibodies are positive in the majority of these patients. This is an expected situation for SLE, an autoimmune disease with a polyclonal antibody response.

DFS70 antibody positivity was 1 in healthy individuals. However, DFS70 antibody positivity is more positive in patients with allergic rhinitis, asthma or urticaria. DFS70 was positive in 5 patients, especially allergic rhinitis. Other autoantibodies were not positive in these patients. This situation is seen parallel to the literature information.

Tests with ELISA provide more clinical compliance. There may sometimes be personal differences in the testing of the test by a technician using an immunofluorescent method. Likewise, it can be said that the sensitivity of the immunoblot method is relatively low compared to ELISA in terms of sensitivity and false positive or negative values.

Although there is no statistical significance due to the low number of patients, DFS70 positivity is the highest in Allergic Rhinitis patients. In this sense, the anti-DFS70 antibody is in fact compatible with the literature, which can be seen outside the autoimmune disease rather than as a pathological antibody.

In this study, similar to the literature, it is important to show that DFS70 antibody positivity can be seen alone, especially in patients with allergic rhinitis compared to completely healthy individuals. it was thought that it would be more beneficial to perform the study in more patients with allergic rhinitis.

Key Words: Anti-DFS70, LEDGF, SARD

9. KAYNAKLAR

1. Tan EM. Autoantibodies and autoimmunity: a three-decade perspective. A tribute to Henry G. Kunkel. *Ann NY Acad Sci* 1997; 815: 1–14.
2. Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1183: 267-87. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05127.x.
3. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1420-2.
4. Conrad K, Röber N, Andrade LE, Mahler M. The Clinical Relevance of Anti-DFS70 Autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017; 52(2): 202-16. doi: 10.1007/s12016-016-8564-5.
5. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 191-200.
6. Ganapathy V, Casiano CA. Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell Us?. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(3): 684–8.
7. Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, Elliot ML, Yamada B, Heeb MJ, et al. Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* 2005; 62(1): 14–26.
8. Mahler M, Hanly JG, Fritzler MJ. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases *Autoimmun Rev* 2011; 11: 642-5.
9. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, Usuda T, Tan EM, Takasaki Y, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(3): 892–900.
10. Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody-positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus* 2008; 17(3): 171–6.
11. KLİMUD KİTAP
12. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4(9): 491-8.

13. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003; 56: 481-90. doi:10.1136/jcp.56.7.481
14. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
15. Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 2012; 64(8): 2677-86. doi: 10.1002/art.34473
16. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-16.
17. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1): 30-7.
18. Sokolove J, Johnson DS, Lahey LJ, Wagner CA, Cheng D, Thiele GM, et al. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(4): 813-21. doi: 10.1002/art.38307
19. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376(9746): 1094-108. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4
20. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention 2014.
21. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5): 1720-45.
22. Leff AR. Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. *Annu Rev Med* 2001; 52: 1-14.
23. Schatz M, Rosenwasser L. The allergic asthma phenotype. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; 2: 645-8.
24. Szczeklik A, Nizankowska E, Serafin A, Dyczek A, Duplaga M, Musial J. Autoimmune Phenomena in Bronchial Asthma with Special References to Aspirin Intolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1753-6.
25. Brozek J, Baena-Cagnani C, Bonini S, Canonica GW, Rasi G, van Wijk RG, et al. Methodology for development of the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma guideline 2008 update. *Allergy* 2008; 63(1): 38-46.

26. White M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 103: 378-81.
27. Kaplan AP. Urticaria and angioedema. In: Middleton's Allergy: Principles and practice, 7th, Adkinson NF, Bochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, Simons FER (Eds), Mosby, St Louis, MO 2009; 2: 1063.
28. Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine 2007
29. Confino-Cohen R, Chodick G, Shalev V, Leshno M, Kimhi O, Goldberg A. Chronic urticaria and autoimmunity: associations found in a large population study. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129(5): 1307-13.
30. Kaplan AP, Greaves M. Pathogenesis of chronic urticaria. *Clinical & Experimental Allergy* 2009; 39(6): 777-87.
31. Friou GJ, Finch SC, Detre KD. Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody. *The Journal of Immunology* 1958; 80(4): 324-9.
32. Ersöz Us D. Antinükleer antikorlar ve hastalıklarla ilişkileri. *Mikrobiyoloji Bülteni* 1992, 26: 379-89.
33. Ganapathy V, Casiano CA. Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us?. *Arthritis Rheum* 2004; 50(3): 684-8.
34. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 71-81.
35. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten?. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13(8): 495-502. doi: 10.1038/nrrheum.2017.74. Epub 2017 May 25
36. Yumuk Z, Çalışkan Ş. Klinik laboratuvarında kullanılan otoantikör tanı testlerinin değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008; 38(1): 37-41.
37. Jitsukawa T, Nakajima S, Usui J, Watanabe H. Detection of anti-nuclear antibodies from patients with systemic rheumatic diseases by ELISA using HEp-2 cell nuclei. *J Clin Lab Anal* 1991; 5(1): 49-53.
38. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982; 33: 167-240.

39. Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: Important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. 1: 2 DOI: 10.1186/1740-2557-1-2
40. Hep-2-image-library. Univ. Birmingham 2014. Available at: <http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinicalimmunologyservices/autoimmunity/hep-2-image-library/index.aspx>.
41. Fritzler MJ, Ali R, Tan EM. Antibodies from patients with mixed connective tissue disease react with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins or ribonucleic acid (hnRNP/RNA) of the nuclear matrix. *J Immunol* 1984; 132: 1216–22.
42. Tan EM. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; 44: 93–151.
43. Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010; 35(3): 276-90.
44. Muro Y. Antinuclear antibodies. *Autoimmunity* 2005; 38(1): 3-9. DOI: 10.1080/08916930400024612
45. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current Concepts and Future Directions for the Assessment of Autoantibodies to Cellular Antigens Referred to as Anti-Nuclear Antibodies. *J Immunol Res* 2014; 2014: 315179.
46. Conrad K, Schössler W, Hiepe F, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases. In: A diagnostic reference. 2nd ed., PABST 2007; vol. 2. Lengerich.
47. Wiik A. Anti-nuclear antibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. *Scand J Rheumatol* 2005; 34: 260-8.
48. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 2009; 4(1): 1-10.
49. Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 494356.
50. Ochs RL, Mahler M, Basu A, Rios-Colon L, Sanchez TW, Andrade LE, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin Exp Med* 2016; 16(3): 273-93. doi: 10.1007/s10238-015-0367-0.

51. Brown-Bryan TA, Leoh LS, Ganapathy V, Pacheco FJ, Mediavilla-Varela M, Filippova M, et al. Alternative splicing and caspase-mediated cleavage generate antagonistic variants of the stress oncoprotein LEDGF/p75. *Mol Cancer Res* 2008; 6(8): 1293-307.
52. Leoh LS, Mediavilla-Varela M, Basu A, Casiano CA. Autoantibodies to LEDGFp75/DFS70: natural autoantibodies or sensors of an augmented state of cellular oxidative stress. In: Conrad K, Chan EKL, Fritzler MJ, Humbel RL, von Landenberg P, Shoenfeld Y, editors. "From Pathogenesis to Therapy of Autoimmune Diseases" Autoimmunity, Autoantigens, and Autoantibodies. (Vol. 6), Lengerich: PABST Science Publishers 2009; 137–55.
53. Basu A, Sanchez TW, Casiano CA. DFS70/LEDGFp75: An Enigmatic Autoantigen at the Interface between Autoimmunity, AIDS, and Cancer. *Front Immunol* 2015; 6: 116. Published online 2015 Mar 20.

10. EKLER

Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

2017

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	etik@akdeniz.edu.tr
	ETİK KURUL KODU	2012-KAEK-20
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI		Prof.Dr.Ender TERZİOĞLU
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Anti-DFS70 Antikorlarının Otoimmün ve Alerjik Hastalıklardaki Rolü Nedir ve Otoimmün Hastalıklarda Koruyucu Rolü Var mıdır?
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 187	Tarih: 22.03.2017
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın bütçesinin Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr. Arda TUNÇATARGİL
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Öğr.Gör.Dr.M. Levent ÖZGÖNÜL
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Murat CANPOLAT
Üye

Prof.Dr.Dilara İNAN
Üye

Prof.Dr.Necmiye HATİMOĞLU
Üye

Prof.Dr.Selahattin KUMRU
Üye

Doç.Dr.Gülşüm Özge BAYSAI
Üye

Doç.Dr.Dijle KİPMEN KORGUN
Üye

Doç.Dr.Öğuz DURSUN
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehtap TÜRKAY
Üye

Yrd.Doç.Dr.Banu NUR
Üye

Dr.Ünal HÜLÜR
Üye
(İzinli)

Fergut ALTUN
Üye

Av.Mustafa AÇIKEL
Üye

Ek 2. Aydınlatılmış Onam Formu



AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

Araştırmanın Adı: Anti-DFS70 antikorlarının otoimmün ve alerjik hastalıklardaki rolü nedir ve otoimmün hastalıklarda koruyucu rolü var mıdır ?

- a. Araştırmanın İçeriği: DFS 70 antikoruna ile romatizmal ve alerjik hastalıklar arasındaki ilişki
- b. Araştırmanın Amacı: DFS70 proteininin alerjik ve sistemik otoimmün romatolojik hastalıklardaki klinik önemini ortaya çıkarmak
- c. Araştırmanın Nedeni:
 - () Bilimsel araştırma
 - (X) Tez çalışması
- d. Araştırmanın Öngörülen Süresi: 1 yıl
- e. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 180
- f. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler: SOR

.....
.....
.....
.....

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Hastalar rutin poliklinik kontrolüne geldiklerinde rutin kan tahlillerini verirken ek olarak 1 serum tüpü kan, çalışma için alınacaktır. Araştırmanın içeriği olarak extradan bir riskle karşılaşmayacaklardır.

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Yoktur

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Hastaların klinik olarak aktivasyonu ile Anti-DFS70 antikor arasında ilişki olup olmadığına bakılacak, Anti-DFS70 antikoru otoimmün ve alerjik hastalıklarla olan ilişkisi saptanacaktır.



4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

Adı- Soyadı: Ümran Yıldırım Telefon: 5321780195

5. Zararların Karşılanması:

Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı tarafından yerine getirileceği, uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımın Ümran Yıldırım tarafından karşılanacağı bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

- a. Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.**
- b. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.**
- c. Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.**
- 8. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmalim nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.**

9. Gizlilik:

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:



Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih: