



**T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİNÜKLEER ANTİKOR (ANA) SONUÇLARI İLE
EKSTRAKTE EDİLEBİLİR NÜKLEER ANTİKORLARI (ENA)
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bio. Kadriye ERKE

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU

**Ağustos 2015
BOLU**

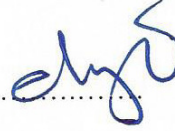
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Mikrobiyoloji
Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Doç Dr Esra KOÇOĞLU (Tez Danışmanı)
Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji EAD

İmza



Doç Dr Tekin TAŞ
Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji EAD



Yrd Doç Dr Tülin FIRAT
Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji EAD



Tarih: 25.08.2015

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Bio. Kadriye
Erke'nin Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYAZ

(İmza)

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

ANTİNÜKLEER ANTİKOR (ANA) SONUÇLARI İLE EKSTRAKTE EDİLEBİLİR NÜKLEER ANTİKORLARI (ENA) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Otoimmün hastalıklar, organizmanın kendi hücre ve dokularına karşı immün yanıt gelişmesi sonucu oluşmaktadır. Anti nükleer antikor (ANA) adı verilen, hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer yapılara karşı gelişen otoantikorlar, otoimmün hastalıkların tanısında büyük önem taşımakta ve özellikle bağ doku hastalıklarının (BDH) teşhisinde önemli bir tanı kriteridir. ANA pozitifliğinin saptanması amacıyla birçok yöntem geliştirilmiş olmasına rağmen en eski yöntem olarak bilinen immünfloresans antikor (IFA) tekniği, hala en yaygın kullanılan yöntem olma özelliğini korumaktadır. ANA tarama testi olarak IFA, antikor titresi hakkında ve boyanma patterni ile de spesifik antikorlar hakkında bilgiler verir. BDH’de, hastalık tipinin belirlenmesi ve şiddetinin takibinde ekstrakte edilebilen nükleer antijenlere karşı gelişen antikorların (anti-ENA) önem taşıdığı vurgulanmaktadır.

Çalışmamızda, farklı kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen, 403 (%72.1) kadın, 156 (%27.9) erkek olmak üzere toplam 559 hasta serumunda IFA ve immunoblot teknikleriyle ANA pozitifliği araştırılmıştır. IFA tekniği ile mikroskopik boyanma şekilleri dikkate alınmış, immünoblot tekniği ile alt grup tayini yapılmıştır.

Çalışmamız neticesinde, IFA yöntemi ile 160 (%28.6) ve immünoblot tekniği ile 190 (%34.0) hastada ANA pozitifliği belirlenmiştir. İmmünoblot tekniğinde, duyarlılık %61.3 ve özgüllük %76.9 olarak hesaplanmıştır.

ANA pozitifliğinin belirlenmesinde tek bir yöntem ile tanıya gidilmesinin doğru bir uygulama tekniği olmadığı bilinmektedir. İmmünoblot yöntemi ile alt gruplarının ayırt edilebilmesinin, hatta aynı hastada birden fazla alt grubun saptanabilmesinin mümkün olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, IFA yöntemi ile beraber bir veya birkaç testin bir arada kullanılmasının, sonuçların güvenilirliği açısından uygun olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Antinükleer antikor, anti-ENA, immünoblot, immünofloresans antikor, otoantikor, otoimmün hastalık.

SUMMARY

INVESTIGATION THE RELATION BETWEEN ANTINUCLEAR ANTIBODIES (ANA) RESULT AND EXTRACTABLE NUCLEAR ANTIGENS (ENA)

Autoimmune diseases occur as a result of the immune response to self antigens and tissues of the organism. Antinuclear antibodies (ANA) autoantibodies generated against to nuclear/ cytoplasmic components of the cell are very important in the diagnosis of these disorders and especially detection of autoantibodies is important diagnostic criteria for connective tissue diseases. Although a number of methods are available for the detection of ANA, immunofloresance antibody (IFA) method, known as the oldest technique, is still widely used. IFA method is served as a ANA scanning test that inform about antibody titration and also specific antibodies by staining pattern. The autoantibodies orginated to extractable nuclear/cytoplasmic antigens, anti-ENA antibodies in connective tissue disease has been noticed for evaluation of the disease differantion and the severity of the course.

In our study, it was investigated ANA positivity by using IFA and immunoblotting techniques on a total 559 patient sera from different clinics. The enrolled patients were 403 (%72.1) women and 156 (%27.9)men. IFA for the examination titration and patterns were taken into consideration and subgroups were determinated by immunoblotting techniques.

As a result of our study, the positivity was found in 160 (%28.6) sera by IFA and 190 (%34.0) sera by immunoblotting. Sensitivity was found %61.3 and specificity was found %76.9 for immunoblotting.

In conclusion, it is known that diagnosis with only one method is not a reliable approach for the detection of ANA positivity. It is available to differantiate subgroups of ANA and to determinate different subgroups in same patient by immunoblotting. Therefore we suggest using one or more than one tests together with IFA was suitable in order to get more reliable results.

Key words: Antinuclear antibody, anti-ENA, autoantibody, autoimmune disease, immunoblotting, immunofloresance antibody.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen, gerekli bütün yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, bilimsel kişiliği ile taktir ettiğim, tezimin hazırlanışı boyunca ilgi ve hoşgörüsüyle yaklaşarak tezimin tamamlanmasında büyük katkısı olan değerli hocam tez danışmanım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca anlayışı, babacanlığı ve hayata karşı verdiği derslerle bizleri destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Erol AYAZ'a, bakış açısıyla örnek aldığım, aklının bir köşesinde bulunsun diyerek bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Tekin TAŞ'a, karşılaştığım problemlerin çözümünde pratik fikirleriyle deneyimlerinden yararlandığım, görüş ve düşünceleri ile bana farklı bir bakış açısı kazandıran değerli hocam Doç. Dr. Zafer MENGELOĞLU'na teşekkür ederim.

Laboratuvarı bütün bilgilerini bizimle paylaşan Uzm. Dr. Özlem Bucak, Uzm. Bio. Şeyda Özsoy Karabörk, Bio. Kübra Ayaz ve diğer tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü hayatımda mutluluğumu paylaştığım ve sıkıntılarımla üstesinden birlikte geldiğimiz daim dostum Bio. Dilek Yüzak'a ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği zamandan bu yana sevgisini ve desteğini her zaman hissettiren ve beni hep destekleyen sevgili eşim A. Kadir DURAN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tanım.....	3
2.2. Tarihçe.....	3
2.3. Epidemiyoloji.....	5
2.4. İmmünolojik Tolerans.....	6
2.5. Otoimmünite.....	7
2.5.1. Otoimmün Mekanizmalar.....	8
2.5.2. Otoimmünite Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	9
2.6. Otoimmün Hastalıklar.....	11
2.6.1. Sistemik Otoimmün Hastalıklar.....	12
2.6.2. Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar.....	14
2.7. Otoantikorlar.....	14
2.8. Antinükleer Antikorlar (ANA).....	15
2.8.1. Antinükleer Antikorlar Subtipleri.....	16
2.8.2. Antinükleer Antikorlakaomponentleri.....	19
2.9. Laboratuvar Tanı Yöntemleri.....	28
2.9.1. İmmünoFloresan Antikor (IFA) Testi.....	29
2.9.2. İmmünoDiffüzyon.....	31
2.9.3. İmmünoBlot.....	31

2.9.4. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. İmmünofloresan Antikor (IFA) Testi.....	33
3.2. İmmunoblotting Test.....	34
3.3. İstatistiksel Analizler.....	35
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇLAR.....	44
7. KAYNAKLAR.....	45
8. ÖZGEÇMİŞ.....	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Otoimmün Hastalıklar.....	12
Tablo 2.2. Antinükleer Antikorlar Subtipleri.....	20
Tablo 2.3. Otoantikorların Klinik Yaygınlığı ve Hastalıklarla Olan İlişkileri.....	28
Tablo 4.1. IFA Yöntemiyle ANA Pozitif Bulunan Hastaların Cinsiyete Göre Dağılımı.....	36
Tablo 4.2. İmmüno blot Yöntemi ile ANA Pozitif Bulunan Hastaların Cinsiyete Göre Dağılımı.....	36
Tablo 4.3. İmmüno blot Yöntemine Göre Anti-ENA Antikorlarının Subtiplerine Dağılımı	37
Tablo 4.4. İmmüno blot Yöntemine Göre Pozitif Bulunan Anti-ENA Antikorlarının IFA Yöntemiyle Karşılaştırılması	37
Tablo 4.5. IFA ve İmmüno blot Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	37
Tablo 4.6. İmmüno blot Yönteminin Duyarlılık ve Özgüllük Oranları.....	38
Tablo 4.7. Paternlerin Karşılaştırılması.....	38

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Homojen nükleoplazmik boyanma	23
Şekil 2.2. Düz nükleer membran boyanma.....	23
Şekil 2.3. Benekli nükleer membran boyanma	23
Şekil 2.4. Küme nükleer dot boyanma.....	23
Şekil 2.5. Few nükleer dot boyanma	24
Şekil 2.6. Geniş benekli nükleoplazmik (granüler) boyanma	24
Şekil 2.7. İnce benekli nükleoplazmik (granüler) boyanma.....	24
Şekil 2.8. Kaba benekli nükleoplazmik (granüler) boyanma.....	24
Şekil 2.9. Homojen nükleolar boyanma	24
Şekil 2.10. Küme nükleolar boyanma	24
Şekil 2.11. Nükleoplazmik boyanma	25
Şekil 2.12. Benekli nükleolar boyanma	25
Şekil 2.13. Sentirol boyanma	25
Şekil 2.14. Midbody boyanma.....	25
Şekil 2.15. Spindle fiber boyanma	25
Şekil 2.16. Spindle kutup boyanma.....	25
Şekil 2.17. Sentromer boyanma.....	26
Şekil 2.18. Lizozomal boyanma.....	26
Şekil 2.19. Golgi boyanma	26
Şekil 2.20. Vimentin boyanma	26
Şekil 2.21. Kromozomal patern	26

KISALTMALAR

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

ACA : Anti-sentromer antikorları

ANA : Antinükleer antikorlar

APC : Antijen sunucu hücrelerin

BDH : Bağ doku hastalıkları

CIE : Counter immünoelektroforez testi

CREST sendromu : Calcinosis, Raynaud's, Esophagus, Sclerodactyly ve Telangiectasia sendromu

DNP : Deoksiribonükleoprotein

EBV : Epstein-Barr virüsü

EIA : Enzim İmmunoassay

ELISA : Enzime Bağlı ImmunoSorbent Analiz Testi

ENA : Ekstrakte edilebilir nükleer antijen

HLA : İnsan lökosit antijenlerini

IDDM : İnsüline bağlı diabetes mellitus

IFA : İmmünofloresan Antikor Testi

IFAT : İndirek immün floresan antikor testi

LAMP : Lizozomal ilişkili membran proteini

LATS : Uzun süreli tiroit uyarıcı

LE : Lupus eritematozus

MCTD : Karışık bağ doku hastalıkları

NOR : Nükleolar organizasyon bölgesi

PBC : Birincil biliyer siroz

PML : Promiyelositer lösemi

PMNL : Polimorfonükleer lökosit

RA : Romatoid Artrit

RANA : Romatoid Artrit ile ilişkili Nükleer Antijen

RF : Romatoid faktör

RIA : Radioimmunoassay testi

RNAP : RNA polimeraz

RNP : Ribonükleoprotein partikülleri

SLE : Sistemik lupus eritematozus

TSH : Tiroid uyarıcı hormon

VDRL : Zührevi Hastalıkları Araştırma Laboratuvarı

WB : Western Blot

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün sistemin temel görevi kendine ait olan (self) ve kendine yabancı (nonself) molekülleri birbirinden ayırt ederek organizmaya yabancı olan mikroorganizmaları, allerjenleri ve diğer molekülleri tanıyıp bir seri savunma mekanizması geliştirerek onları elimine etmektir (1, 2, 3). Normal koşullarda immün sistemin kendi antijenik yapılarına karşı bir immün yanıt geliştirmemektedir. Fakat her bireyin kanında, hücrelerinde ve konnektif dokularında immün yanıt oluşturabilecek yapılar bulunmaktadır. Bu antijenlere self-antijen veya otoantijen adı verilmektedir (2, 4, 5). Bazı patolojik durumlarda, organizmanın self yapılara karşı immün yanıt geliştirmesi durumuna otoimmünite, otoimmünizasyon sonucu gelişen hastalıklara ise otoimmün hastalıklar adı verilmektedir (2, 6, 7). Klinikte hastalığın bulunduğu organa göre otoimmün hastalıklar başlıca iki grupta toplanır; immün yanıt tek bir organ veya dokuda sınırlı ise bu gruba organ spesifik otoimmün hastalıklar ve birden fazla organ tutulumu söz konusu ise bu gruba da organ spesifik olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklar adı verilmektedir (1, 8).

Vücudun birden fazla organ veya dokusunda otoimmün reaksiyonlar görülebilmekte ve antinükleer antikor (ANA) başlığı altında toplanan hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer komponentlere karşı oluşan otoantikorlar; romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematozus (SLE), sjögren sendromu ve dermatomiyozit/polidermamiyozitis gibi sistemik otoimmün hastalıkların tanısında büyük önem taşımaktadır (1, 9). Ancak bu otoantijenler; kanser, sitotoksik ilaç kullanımı ve yaşlılık gibi durumlarda da oluşabileceği için ANA pozitifliğinin, ekstrakte edilebilir nükleer antijenlere (anti-ENA) karşı gelişen antikorların araştırılması ile doğruluğunun desteklenmesi gerekmektedir (10, 11, 12).

Günümüze kadar ANA pozitifliğinin belirlenmesi için bir çok teknik geliştirilmiş olmasına rağmen en eski yöntemler arasında bulunan immünofloresan antikor (IFA) tekniği hala en yaygın yöntem olma özelliğini korumaktadır (13, 14). Bu yöntem ile hücre nükleusunun farklı bölgelerinde gelişen antijenlere karşı oluşan antikorlar, farklı mikroskopik paternler şeklinde belirlenebilmektedir (11, 12, 15).

IFA yönteminin önemli avantajları basit, uygulanması kolay ve maliyeti düşük bir test olmasıdır. Ancak sonuçları değerlendirme tamamen yorumlayan kişinin bilgi ve deneyimine bağlı olduğu için subjektif bir değerlendirme süreci gerektirmektedir. Dolayısıyla laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası çalışmalar karşılaştırıldığında farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca serum örneklerinin aynı anda çalışılması için belli bir sayıya ulaşması gerekmekte dolayısıyla zaman alıcıdır (16, 17, 18). Günümüzde bazı rutin laboratuvarlarda, tek bir yöntem ile ANA pozitifliği belirlenebildiği gibi elde edilen sonuçları karşılaştırma amacıyla birkaç farklı yöntemin de bir arada kullanıldığı görülmektedir. ANA pozitifliğini belirlemede yalnızca bir yöntemin kullanılması, önemli bazı sorunlarla karşılaşılabilen bir uygulama olarak kabul edilmektedir (11, 19). Son yıllarda geliştirilen immünodiffüzyon, immünoblot, ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) gibi yöntemler objektif ve değerlendirmesi kolay yöntemler olarak rutin laboratuvarlarda IFA yöntemiyle beraber veya tek başına kullanılabilmektedir. Fakat bu testlerin, IFA yöntemine göre maliyeti yüksek ve özgüllüğü düşük olarak kabul edildiği için, tek başına kullanılmaları bazı önemli sorunlara neden olabilmektedir (14, 17, 18). Altın standart olarak en eski ve yaygın kullanılan IFA yöntemi ile beraber son yıllarda geliştirilen bir veya birkaç testin birlikte kullanılmasıyla, daha güvenilir ve sağlıklı sonuçlar elde edilmesi açısından gerekli bir uygulama olarak görülmektedir (16, 20).

Çalışmamızda, IFA testi ile elde edilen ANA sonuçlarının, immünoblot tekniği ile saptanan subtipler ile mukayese edilmesi ve istatistiksel olarak her iki yöntem ile elde edilen sonuçların birbiriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu şekilde rutin laboratuvarlarda tercih edilecek en uygun metod belirlenecek, hastalık tipinin belirlenmesi ile birlikte hastalık şiddetinin takibine de katkıda bulunması sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

“İmmün” Latince kökenli bir kelime olup, eski Roma’da vergiden ve askerlikten muaf olanlar için kullanılan “immunis” kelimesinden türemiştir. Kişilerde bazı hastalıklara karşı bağışıklık kazanılabileceği ve böylece hasta olmaksızın hatta belki yaşam boyu bu hastalıklara karşı bağışıklık kazanılabileceği bilinmektedir; bu bağışıklık haline immünite denilmektedir. İmmünoloji ise bu bağışıklığın nasıl oluştuğunu biyolojik ve klinik sonuçları ile birlikte inceleyen bilim dalıdır (13, 21). İmmünite, organizmaya zarar verebilen durumlara karşı gelişmekte olan savunmayı ifade ederken, otoimmünite ise immün sistemin self yapılara karşı immün yanıt geliştirmesi durumudur (22).

2.2. Tarihçe

İmmünolojinin öncü bilim adamlarından biri olan Paul Ehrlich, 1901 yılında immün sistemin kendi yapılarına karşı reaksiyon gösterdiğini ilk kez ortaya koymuş ve bu olay için “horror autotoxicus” ifadesini kullanmıştır. Ehrlich deney hayvanlarında, bazı antikorların organizmanın kendi dokularına toksik etki oluşturduğuna, normal koşullarda ise bu antikorları ve onların zararlı etkilerini önleyici mekanizmalarının bulunduğuna karar vermiştir. Ancak ilerleyen zamanlarda orijinalliğini yitirecek kadar fazla kullanılan ‘horror autotoxicus’ teriminin, aslında kişinin kendi yapılarına karşı geliştirdiği otoantikorların, normal koşullarda bilinmeyen bir mekanizma ile engellenmiş olmasını ifade ettiği düşünülmüştür. Ancak immün yanıtın düzenlenmesinde var olan özelliklerin anlaşılmasının, bazı patolojik durumların açıklanmasından daha önemli olduğu zamanla unutulmuştur (23, 24, 25).

Ehrlich’ten üç yıl sonra, Donath ve Landsteiner 1904 yılında, sıklıkla sifiliz hastalarında görülen ve hemoglobini krizinden sorumlu olan bir antikor tanımlamışlardır. Bu antikoru tanımlanması, patolojik koşullarda kişinin kendi

yapısal komponentlerine karşı antikor oluştuğunu ve hücrel elemanlar üzerinde toksik etki oluşturduğunu göstermesi açısından önem taşımaktadır (22).

Calmette ve Guerin 15 yıl süren çalışmaları neticesinde 1921 yılında buldukları BCG aşısını dünyaya tanıtmışlardır. 1941 yılında ise anne ile baba arasında kan uyuşmazlığına neden olan Rh antikorları bulunmuştur (26).

Ehrlich'in öğrencisi Hans Sach tarafından yetiştirilen Witebsky 1953 yılında, tiroid dokusu enjekte edilmiş tavşanlarda tiroid oluşumunu deneysel olarak gösteren bilgileri sağlamıştır. Ancak Witebsky kendi deneylerinin geçerliliğini kabul edememiş ve üç yılını yaptığını düşündüğü hataları araştırmakla geçirmiştir. Aynı yıllarda Dacie ve Worlledge, Dameshek ve Schwartz'ın araştırmaları üzerinde çalışmışlar ve bunlara Coombs'un anti-immünglobulin testlerini de eklemişlerdir. Ancak Witebsky self yapılarla reaksiyon gösteren antikorların oluşumunun engellendiğine de inandığı için bu durumu da kabul etmek istememiştir (23, 27, 28).

Aynı yıl içinde Roitt ve arkadaşları, Hashimoto tiroidi üzerine olan kendi çalışmalarını yayımlarken, Adams ve Purves hipertiroid hastalarının serumunda bulunan, invitro koşullarda tiroid dokusu üzerinde güçlü ve uzun süreli bir etki gösteren LATS (long-acting thyroid stimulator) adında bir maddeyi bulmuşlardır. Birbirini takip eden araştırmaların neticesinde 1956 yılı, otoimmünitenin hem klinik hem de deneysel alanındaki çalışmaları için verimli bir dönem olmuştur (23, 29).

1969 yılında immünoglobulin G'nin yapısı tanımlanmıştır. Günümüzde birçok alanda halen güncelliğini sürdürmekte olan monoklonal antikorlara ilişkin teknikler 1975 yılında geliştirilmiştir (26).

Doku ve organ transplantasyonlarında araştırılması gereken doku uygunluk antijenleri (HLA) 1980'li yıllarda bulunmuştur. 1982 yılında gastritli hastaların mide biyopsilerinde *Helicobacter pylori* üretilmiş ve 1994 de ise bu bakterinin mide ülseri ve mide kanseri ile ilişkisi gösterilmiştir. Yine aynı yılda, rekombinant Hepatit B aşısı geliştirilmiştir (26).

2.3. Epidemiyoloji

Otoimmün hastalıkların genellikle nadir görülen hastalıklar arasında olduğu düşünülse de, mortalite ve morbidite üzerindeki etkileri araştırıldığında bu oranın oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yapılan araştırmalar sonucunda otoimmün hastalıklar 65 yaşın altındaki kadınlar arasında önemli bir ölüm nedeni olarak gösterilmektedir (30). Bu hastalık grubunun birçoğunun kronikleşmesi, sağlık alanında, yaşam kalitesi üzerinde ve ekonomik anlamda ciddi boyutlarda kayıplara yol açmaktadır (31).

Otoimmün hastalıkların tamamı kadınları daha fazla etkilemektedir. Tiroid, skleroderma, SLE, sjögren sendromu gibi otoimmün hastalıkların kadınlarda görülme olasılığı %85'in üzerindeyken RA ve sistemik skleroz gibi otoimmün hastalıklarda ise bu oran %60-75 arasında değişmektedir. Tip 1 diyabet gibi bazı otoimmün hastalıkların kadın ve erkekler arasında, çocukluk döneminde başlama riskinin ise neredeyse birbirine eşit olduğu bildirilmektedir. Ayrıca juvenil RA gibi otoimmün hastalıkların kadınlarda daha baskın olduğu bildirilmiştir. Otoimmün hastalıkları üzerine yapılan son çalışmalarda ise yetişkin diyabet başlangıcında erkeklerin kadınlara oranla daha fazla risk taşıdığı görülmüştür (32, 33).

Yapılan araştırmalarla otoimmün hastalıkların yaşa bağlı görülme sıklığında önemli bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Ancak iki önemli çocukluk dönemi hastalığı olan Tip 1 diabet ve juvenil artrit hastalık başlangıcının yaklaşık 8-10 yaş civarında görüldüğü belirtilmektedir. Ayrıca graves ve sistemik skleroz gibi hastalıklar sıklıkla 30-50 yaş dönemleri arasında görüldüğü bildirilmektedir. Daha ileri yaş gruplarında (40-70) görülen hastalıklar arasında ise tiroid, sjögren sendromu ve RA gibi otoimmün hastalıklar bulunmaktadır (31).

Otoimmün hastalıklardan olan SLE'nin erkeklere oranla kadınlarda 5-10 yıl daha erken görüldüğü belirtilmesine rağmen bu farklılığın sadece beyaz ırkta görülebileceği düşünülmektedir (34). Bunun tam tersi olarak hipertiroidizm hastalığının kadınlara oranla erkeklerde daha erken yaşlarda görüldüğü bildirilmiştir (35).

Otoimmün hastalıklarda risk faktörleri ülkeler arasında hatta aynı bölgede yaşayan etnik gruplar arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Örneğin Tip 1 diabet hastalığı Güney Avrupa ve Asya ülkelerine oranla Kuzey Avrupa ülkelerinde daha yaygın görülmektedir (36). Yeterli bilgi ve kanıt elde edilmiş olmamasına rağmen otoimmün hastalıklardan biri olan sistemik skleroz da bu duruma bir örnek olarak gösterilebilmektedir (37). ABD’de beyaz ırka oranla siyah ırk SLE için daha yüksek risk taşımaktadır. Ayrıca, Tip 1 diabet hastalığının insidansı ise beyaz ırka oranla siyah ırkta daha nadir görülmektedir. ABD’de yaşayan siyah ırk ve Asyalılar, sistemik skleroz hastalığı açısından daha düşük risk taşımaktadır (31).

2.4. İmmünolojik Tolerans

İmmün sistemin temel görevi organizmaya yabancı olan mikroorganizmaları, allerjenleri ve diğer molekülleri tanıyıp bir seri savunma mekanizması geliştirerek onları elimine etmektir. Bu süreç makrofajlar, T ve B lenfositleri ile çeşitli biyolojik mediatörler ile sağlanmaktadır. Bir taraftan yabancı olan mikroorganizmalara, allerjenlere ve diğer moleküllere karşı cevap geliştirerek onları ortadan kaldırmakla görevli olan immün sistem, diğer taraftan immün homeostazı korumak için çalışmaktadır. Böylece optimum düzeyde bir immün yanıt geliştirmektir. Doğuştan veya kazanılmış immün cevabın minimum düzeye inmesiyle immün yetmezlik ve tümör gelişimi gibi hastalıklar oluşabilirken, maksimum düzeye çıkmasıyla da sitokin patolojisi, süperantijen hastalığı ve otoimmünite gibi patolojilere yol açabilmektedir (3)

Belirli bir antijene karşı immün sistemin yanıtı kalması durumuna immünolojik tolerans adı verilmektedir. Bu yanıtı kalma durumunun organizmanın kendisine ait olup immünojenik özellik gösteren determinantlara karşı gelişmesine doğal immünolojik tolerans (self tolerans), yabancı antijenlere karşı gelişmesine ise kazanılmış immünolojik tolerans adı verilmektedir (2).

Normal şartlar altında immün sistemin kendi antijenik yapılarına karşı bir immün yanıt oluşturmadağı bilinmektedir. Fakat her bireyin kanında, hücrelerinde ve konnektif dokularında immün yanıt oluşturabilecek yapılar bulunmaktadır. Bu

antijenlere self-antijen veya otoantijen adı verilmektedir. Lenfositler ile otoantijenler sıklıkla karşılaşmalarına rağmen immün yanıt oluşturmamaktadırlar. Bu spesifik yanıtı kalma durumundan çeşitli mekanizmalar sorumludur.

Bunlar:

- a) Klonal delesyon: Bu mekanizma, self antijenler ile reaksiyon veren T lenfositleri timusta olgunlaşmadan apoptoz yoluyla ortadan kaldırılmasıdır. Timustan kaçarak perifere geçmeyi başaran T lenfositler ise yine apoptoz ile elimine edilmektedir.
- b) Saklı antijenler: Beyin, göz ve testis gibi organlarda bulunan antijenler immün sistem ile karşılaşmadıkları için bunlara karşı bir immün yanıt gelişmemektedir.
- c) Antijeni görmezden gelme: Antijen sunucu hücrelerin (APC) yüzeyinde bazı self antijenler yoğun bir biçimde sergilendikleri için bunlara karşı ne tolerans, ne de immün yanıt gelişmektedir.
- d) Anerji: APC tarafından T lenfositlerine karşı gönderilen tanıma sinyali bu hücrelerin aktive olması için yeterli olmamaktadır.
- e) Supresyon: Birçok bireyde self antijenler ile güçlü reaksiyon veren B hücreleri bulunmaktadır. Uygun $CD4^{(+)}$ Th hücrelerinin supresör T hücreleri (Ts) ile self reaktif B lenfositlerinin baskılanması sonucunda ortadan kalkmakta veya anerjik fazda kalarak aktive olamamaktadır. Yani self-reaktif B lenfositleri Ts hücreleri ile dolaylı olarak baskılanmaktadır (2, 4, 5).

2.5. Otoimmünite

İmmün sistem, normal şartlar altında kendi antijenik yapılarına karşı immün yanıt geliştirmemek ve ayrıca self ve nonself molekülleri rahatlıkla birbirinden ayırt edebilmektedir. Ancak self yapılara karşı oluşan immünolojik toleransın çeşitli patolojik olaylar sonucu kırılmasıyla immün sistem kendi antijenlerine karşı da immün reaksiyonlar gösterebilmektedir. Self tolerans mekanizmalarının çeşitli patolojik olaylara bağlı olarak kırılması sonucu organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün yanıt geliştirmesi olayına otoimmünite ve

otoimmünizasyon sonucu gelişen hastalıklara ise otoimmün hastalıklar adı verilmektedir (2, 6, 7).

2.5.1. Otoimmün Mekanizmalar

Organizmanın kendi dokularına karşı immün yanıt geliştirmemesi immünolojik tolerans mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. İmmün sistemin bu görevi bazı sebeplerden dolayı yerine getirememesi ise otoimmüniteye neden olmaktadır. Otoimmün reaksiyonlardan sorumlu immünopatolojik mekanizmalar üç ana başlıkta toplanmaktadır (3, 38):

1) Tip II Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları: Bu tip reaksiyonlarda, humoral immün yanıt sonucu oluşan otoantikorların özgül antijenleri ile birleşmesi sonucu kompleman aktivasyonu ve antikora bağlı sitotoksik mekanizmalar ile dokunun zarar görmesine neden olmaktadır. Otoimmün hemolitik anemi, nötropeni, lenfopeni ve trombopeni gibi otoimmün hastalıklar bu mekanizma ile oluşan hastalıklar arasındadır (3, 38).

2) Tip III Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları: Bu tip reaksiyonlarda, immün kompleks olarak tanımladığımız otoantijen-otoantikor kompleksi, dolaşımda veya intraselüler sıvılar oluştuktan sonra vücudun eklem ve böbrek gibi bölgelerinde bulunan geniş süzücü zarlarda depolanabilmektedir. Bu olay sonucunda hem kompleman faktörlerini hem de granülosit ve monosit gibi polimorfonükleer lökositleri (PML) aktive edilerek immün kompleksin bulunduğu bölgeye çekilmektedir. PML'nin görevi immün kompleksi fagosite ederek ortadan kaldırmaktır. Fakat patolojik durumlarda görevini yerine getirememekte ve dışarıya lizozomal enzimlerini salgılamaktadır. Bu enzimlerin kanda nötralizasyonu gerçekleşebilirken dokularda bu durum geçerli değildir. Dolayısıyla, nötralize edilemeyen bu enzimlere bağlı olarak dokular zarar görmektedir. SLE ve RA gibi otoimmün hastalıklar bu mekanizma ile oluşan hastalıklar arasında görülmektedir (3, 38).

3) Tip IV Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları: Bu tip reaksiyonlarda, duyarlı T lenfositleri aracılığı ile oluşan hücresel immün yanıtıdır. Mekanizması tam olarak çözülemese de lenfokinler ve lezyonun bulunduğu bölgeye gelen immün sistem hücrelerinin etkisi ile doku hasarı olduğu düşünülmektedir (3, 38).

Hem hücresel hem de humoral immün yanıtta kontrolden sorumlu olan Th hücreleri ile ilişkili tolerans bozukluklarının otoimmünite ile sonuçlanması oldukça yüksektir. Ancak otoimmün hastalıkların oluşumunun tek bir mekanizma ile açıklanmasının mümkün olmayacağı önemle vurgulanmaktadır. Bu dönemden sorumlu olduğu düşünülen birkaç farklı mekanizma tanımlanmıştır (4, 7):

- a) Daha önce immün sistem ile karşılaşmamış sekestre (saklı) antijenler travma gibi herhangi bir olay sonucu dolaşıma dahil olduklarında immün yanıtı açabilmektedirler.
- b) Organizmanın kendisine ait olarak tanıdığı ve normal şartlarda immün yanıt geliştirmede yapılar fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişikliğe uğradıklarında immün sisteme yabancı hale gelmekte ve bunun sonucunda immün cevaba yol açmaktadırlar.
- c) Vücudun kendisine ait olan bir yapı ile yabancı bir antijen çapraz reaksiyon gösterebilmektedir.
- d) Th hücrelerinin Ts hücreleri ile baskılanması B lenfositlerinin aktive olmasını engellemektedir. Ts hücrelerinde oluşan yapısal bir bozukluk, Th hücrelerinin devamlı olarak oтореaktif B lenfositlerini aktive etmesine neden olmakta ve bu durum sonucunda otoantikor sentezi gerçekleşmektedir (39, 40).

2.5.2. Otoimmünite Oluşumunu Etkileyen Faktörler

a) Genetik Faktörler

Aynı ailenin fertlerinde bazı otoimmün hastalıkların görülme olasılığı daha fazladır. Bunun yanı sıra belirli insan lökosit antijenlerini (HLA) yöneten gen lokusları, bazı otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin, RA HLA-DR4 ile ilişkilendirilirken Addison hastalığı ise HLA-B8 ile ilişkili bulunmaktadır (1, 40).

b) İmmünolojik Faktörler

T hücre toleransı, self yapılara karşı oluşan immün yanıtta önemli bir role sahiptir. Yabancı antijenler ve antijen moleküllerinin yapısında meydana gelen bazı değişiklikler, Th hücre toleransını ortadan kaldırabilmektedir.

Poliklonal B lenfositlerinin, bakteriyel bir yapı veya bir virus tetiklemesiyle özgül olmayan bir şekilde uyarılır ve çoğalır, bu da otoimmün olaylarla sonuçlanabilmektedir. Ts hücreleri otoimmün yanıtın baskılanmasında önemli bir role sahiptir. Th hücreleri, Ts hücreleri tarafından baskılamakta ve dolaylı olarak poliklonal B hücrelerinin aktive olmasını engellemektedir. Ts hücrelerinin fonksiyonlarının bozulması sonucu otoreaktif etkili B lenfositlerinin kontrolsüz çoğalarak otoantikor üretmelerine neden olmaktadır. Merkezi sinir sistemi, göz ve testis gibi immün sistemden uzak kalmış organlarındaki antijenik yapılar herhangi bir olay sonucu dolaşıma karıştığında otoimmün reaksiyonları başlatabilmektedirler (1, 40).

c) Hormonal Faktörler

Bazı durumlarda, bir hormon veya biyolojik mediyatör karşı spesifik idiyotip antikorlar oluşmakta ve bu antikorlara karşı ise antiidiyotip antikorlar sentezlenmektedir. Bunlar hormon veya mediyatör bağlanan antijene benzerlik gösterdiklerinden dolayı antikorların antijen ile ilişki kurdukları hücre yüzey reseptörlerine bağlanmaktadır ve bu yapılara antireseptör antikorlar adı verilmektedir. Bu durumda reseptör hasar görmekte ve dolayısıyla fonksiyon bozukluğu oluşabilmekte ya da hormonun bağlanması engellenerek hormona karşı oluşan direnç artmaktadır. Son olarak reseptör aktive olabilmektedir (1, 40).

d) Enfeksiyon Etkenleri

Epstein-Barr virüsü (EBV) gibi mikroorganizmalar özgün olmayan poliklonal B hücre aktivasyonunu başlatabilmekte ve ayrıca bazı mikroorganizmalara ait antijenler bazı HLA antijenleriyle moleküler açıdan benzerlik göstererek otoimmün hastalıklara yol açmaktadırlar (1, 40).

2.6. Otoimmün Hastalıklar

Farklı dokulara karşı humoral immün cevap aracılığıyla gelişen kronik heterojen hastalık grubu “otoimmün hastalıklar” olarak adlandırılmaktadır. Sistemik dolaşımda ya da spesifik bazı dokularda otoantikorların bulunması otoimmün hastalıklarda kardinal özelliklerden biridir (1, 6).

Otoimmün hastalıkların tanısında ve tedavisinin takibinde 50 yıldan uzun bir süredir otoantikor testleri kullanılmaktadır (20, 41). Belirli düzeylerde otoantikor bulunması, otoimmün hastalığın varlığını düşündürmekte veya otoimmün hastalığı olan bir bireyde hastalığın şiddeti ve hastalığa karşı gelişen immün yanıtın şiddeti hakkında bilgi vermektedir (42). Her laboratuvarın, otoantikor belirlemede kullandığı teknikleri, bu tekniklerin avantajlarını ve dezavantajlarını, sınırlamalarını iyi araştırarak klinik ile birlikte kendi bölgesi için en uygun yöntemi seçmesi gerekmektedir (15).

Otoimmün hastalıklar hakkında giderek artan bilgiye rağmen insanlarda otoimmün hastalıkların heterojen olması, otoimmün tepkimenin hastalığın ortaya çıkmasından çok önceleri başlaması, birçok etmene bağlı olarak gelişebilmesi, immün yanıtı başlatan ve hedefi olan öz antijenlerin sıklıkla bilinmemesi gibi nedenlerden dolayı araştırmalar halen sürmektedir. Ayrıca toplumdaki otoimmün hastalıkları yüzdesinin % 1–2 oranında olduğu tahmin edilmektedir (17).

Klinikte hastalığın bulunduğu organa göre otoimmün hastalıklar başlıca iki grupta toplanır; organ spesifik otoimmün hastalıklar ve organ spesifik olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklar (1, 8).

Organ spesifik otoimmün hastalıklarda (Tablo 2.1), otoimmün yanıtın tipine göre immün yanıt tek bir organla veya dokuyla sınırlı kalmaktadır (1, 8). Örneğin Hashimoto tiroiditinde, tiroit bezi elemanlarına karşı özgül bir şekilde immün yanıt gelişmektedir. Organ spesifik olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklarda (Tablo 2.1) ise birçok farklı organ tutulumu söz konusudur. Örnek olarak RA ve SLE gibi

hastalıklarda sinir sistemi, akciğer, deri, böbrekler ve eklemler gibi vücudun birçok bölgesinde otoimmün reaksiyonlar gelişebilmektedir (1, 43, 44).

Tablo 2.1. Otoimmün Hastalıklar (1).

Sistemik Otoimmün Hastalıklar	Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar
Romatoid Artrit	Hashimoto Tiroidi
Sistemik Lupus Eritematozus	Pernisiyöz Anemi
Sjögren Sendromu	Otoimmün Hemolitik Anemi
Skleroderma	Addison Hastalığı
Polimiyozitis-Dermatomyozitis	Otoimmün Ensefalomyelit
Reiter Sendromu	Goodpasture Sendromu
Karışık Bağ Doku Hastalıkları	Otoimmün Trombositopeni
	Myastenia Gravis
	Toksik Guatr
	İnsüline Bağlı Diabetes Mellitus
	Aktif Kronik Hepatit
	Ülseratif Kolit
	Primer Biliar Siroz

2.6.1. Sistemik Otoimmün Hastalıklar

RA, SLE, skleroderma, sjögren sendromu, dermatomyozit/polidermamiyozitis ve diğer sistemik otoimmün hastalıklara dahil edilemeyen karışık bağ doku hastalıkları (MCTD), organ spesifik olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklara örnek olarak gösterilebilir. Bu gruptaki hastalıklarda, vücudun birden fazla organ veya dokusunda otoimmün reaksiyonlar görülebilmekte ve hastalık sırasında hücre nükleusu ve/veya sitoplazmadaki yapılara karşı otoantikörler oluşmaktadır. Bu otoantikörlere genel olarak ANA adı verilmekte ve sistemik otoimmün hastalıkların tanısında büyük önem taşımaktadır (1, 9).

Romatoid Artrit, eklemlerde yaygın ve simetrik kronik inflamasyonla karakterize olan ve bunun dışında kas, deri, kan damarları, kalp, akciğer ve diğer organları tutan sistemik bir hastalıktır (45, 46). Toplumdaki prevalansı %1-3 oranında ortaya çıkmakta ve kadınlarda erkeklere oranla 3 kat daha fazla görülmektedir. Menarş sonrası ve menapoz öncesi daha sık görülüp, hamilelik döneminde ise artması nedeniyle bu hastalığın oluşumunda hormonal faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir (1, 47). Genetik faktörler %50 - %60 oranında etkilemekte ve RA riskinin HLA-DR geniyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (48).

Enfeksiyon etkeni olarak *Proteus vulgaris*'in yüzey antijeni ile HLA-DR4 arasında çapraz reaksiyon oluşabildiği için persistan *Proteus vulgaris* enfeksiyonuna yakalanmış hastalarda RA'ya rastlanmaktadır. Patogenezinde sinoviyal B lenfositleri tarafından salgılanarak anormal IgG antikorlarına karşı gelişen ve romatoid faktör (RF) adı verilen IgM tipi antikorlar görülmektedir. İmmünolojik olarak en önemli bulgu RF pozitifliği'dir. Bunun yanında ANA pozitifliği, hipergammaglobulinemi, lupus eritematozus (LE) hücrelerinin pozitifliği, lenfositoz ve sedimentasyon hızının artması önem taşımaktadır (1, 47, 48).

Sistemik lupus eritematozus, özellikle 20-40 yaş arasındaki kadınlarda tutulum gösteren sistemik bir hastalıktır. Ayrıca yüzde kelebek şeklinde döküntü ve atralji ile karakteristik özellik gösterip hastaların %90'ını kadınlar oluşturmaktadır (1, 49). ANA pozitifliğinin görüldüğü prototipik bir otoimmün hastalıktır ve hastaların %95'inde spesifik olmadığı düşünülen ANA pozitifliği görülmektedir (1, 47). ELİSA testinin SLE taraması için daha uygun ve kullanışlıdır fakat genellikle IFA testi tercih edilmektedir. Ayrıca ANA duyarlılığı yüksek olmasına rağmen özgüllüğü düşüktür ve ileri yaş hastalarında yalancı ANA pozitifliği görülmektedir. İdeal bir test için pozitif prediktif değerin yüksek olması gerekirken SLE için ANA düşük pozitif prediktif değere sahiptir (50, 51). Bu hastalıkta SLE için en spesifik ANA alt grubu olan dsDNA'nın tek başına veya ssDNA ile beraber saptanması, LE hücreleri, hipergamaglobulinemi, yalancı Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) pozitifliği ve deri biyopsilerinde immün kompleks birikiminin görülmesidir. İmmünolojik olarak tanıda anti-dsDNA pozitifliğinin önemli olduğu düşünülmektedir (1, 47, 51).

Sjögren Sendromu, immün reaksiyonlar sonucunda tükürük ve gözyaşı bezlerinin hasar görmesiyle oluşan ağız, göz ve mukozaların kuruması şeklinde kendini gösteren sistemik inflamatuvar bir hastalıktır (52). Kadınlarda 40 yaşın üzerinde ortaya çıkma olasılığı artmaktadır. Bu hastalık genellikle RA, SLE ve skleroderma gibi hastalıklarla bir arada görülmektedir. Sjögren sendromunda %70'in üzerinde bir ANA pozitifliği görülürken SS-A ve SS-B'ye karşı gelişen spesifik antikorların bulunması da tanıda önem taşımaktadır (1, 47).

Skleroderma, akciğer, böbrek, deri, özefagus, bağırsak kanalı, tiroit, eklemlerdeki oluşumlar ve iç organlarda bağ dokusunun anormal bir biçimde artması ile ortaya çıkan bir otoimmün hastalıktır. Bu hastalıkta ANA pozitifliği %60-90 oranında görülebilmekte ve ayrıca RF pozitifliği de görülmektedir. Skleroderma için çözünebilir nükleer antijenlere karşı gelişen anti Scl-70 antikorunun spesifik olduğu bilinirken anti-sentromer antikoru ise CREST (Calcinosis, Raynaud's, Esophagus, Sclerodactyly, Telangiectasia) sendromu ile ilişkilendirilmektedir (1, 47, 53).

Polimiyozitis/Dermatomyozit, etiyolojisi bilinmeyen, çizgili kasların inflamasyonu, zayıflık ve ağrılarla karakterize, perivasküler sistem tutulumu ile birlikte görüldüğü bir hastalık grubudur. Bu hastalık grubunun tipik deri dejenerasyonu ile beraber görülmesine 'dermatomyozit' adı verilmektedir. Hastalık sıklıkla çocukluk çağında (10-15 yaşlarında) ve orta yaşlarda (45-55 yaşlarında) olmak üzere iki yaş döneminde görülür (54). Polimiyozitis için anti Jo-1 antikorunun özgüllüğünün yüksek olduğu bilinmektedir (1, 47).

2.6.2. Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar

Organ spesifik otoimmün hastalıklarda, hastalık semptomları otoimmün yanıtın tipine göre tek bir organla veya dokuyla sınırlı kalmakta ve hastalığın gerçekleştiği dokunun dışında kalan kısımlar otoimmün mekanizmalardan etkilenmemektedir. Dolayısıyla organ spesifik otoimmün hastalıklar, hastalığın gerçekleştiği organ veya dokuya göre sınıflandırılmaktadırlar (1, 8, 43, 47).

2.7. Otoantikorlar

Otoantikorlar, organizmanın antijenik özellik gösteren yapılarına karşı gelişen antikorlar olarak adlandırılmaktadır (1). Otoimmün hastalıkların tanısında oldukça önemli bir gösterge olan otoantikorlar; hücre çekirdeği, hücre yüzeyi ya da sitoplazma komponentlerine karşı oluşmaktadır (1, 14). Fakat bir otoantikorun saptanması her zaman bir hastalık tanısı için yeterli değildir. Yani sadece otoantikorun saptanması ile tanı konulamaz. Çünkü otoantikorlar belirgin bir hastalığı olmayan normal bireylerde de bulunabilir ve bu otoantikorların bulunma sıklığı normal bireylerde yaşın ilerlemesiyle artar. Ayrıca otoantikorlar, otoimmün

hastalıkların tanısının konulması yanında, bu hastalıkların aktivitesinin belirlenmesinde, tedavinin takibinde, tedaviye yanıtın belirlenmesinde ve bazı otoimmün hastalıklarda hastalık alt gruplarının belirlenmesinde de kullanılır. Klinik belirtilerin doğru tanımlanması ve laboratuvar testlerinin doğru yorumlanması ile otoimmün hastalığın doğru tanısı yapılır (13, 14, 17).

Bazı patolojik durumlarda vücudumuzun çeşitli bölgelerinde bulunan yapılar antijen özelliği gösterebilmektedir. Nükleus, hücre sitoplazmasında bulunan bazı organeller, DNA, RNA ve IgG sınıfı antikorlar gibi moleküller immün yanıt oluşturma özelliğine sahip otoantijenler arasında gösterilmektedir. Otoantijenlere karşı oluşan spesifik antikorlar ise günümüzde otoimmün hastalıkların teşhisi ve tedavisinin takibinde önemli bir yol göstericidir (1, 11, 14).

2.8. Antinükleer Antikorlar (ANA)

Hücre çekirdeğinin bir çok elemanına karşı oluşan geniş antikor grubuna antinükleer antikor denir (55, 56). Bunlar bir çok otoimmün hastalıkta tarama testi olarak kullanılan otoantikorlardır. Bağ doku hastalıkları (BDH) adı verilen RA, SLE, sjögren sendromu, skleroderma, sistemik skleroz, CREST sendromu, polimiyozit/dermatomiyozitis, MCTD gibi hastalıkların tanısında ve tedavisinin takibinde ANA büyük önem taşımaktadır (18, 56, 57). Genellikle romatizmal hastalıklardan şüphelenilen durumlarda rutin bir test halini almıştır ve sıklıkla indirekt immün floresan antikor testi (IFAT) yöntemiyle bakılmaktadır (17, 55).

İlk olarak 1948 yılında, Hargraves ve arkadaşları tarafından kemik iliğinde LE hücre faktörü bulunmuştur (16). Coons ve Kaplan tarafından 1950 yılında IFA yöntemi ile saptanan ANA ilk kez tanımlanmıştır (14). Daha sonra 1960'ların başında, antinükleer faktörlerin, serumun γ (gama) globulin fraksiyonuna ait olduğu ve bunun antikor yapısında olduğu tespit edilmiştir. ANA'ların değişik kaynaklı çekirdekler ile çapraz reaksiyona girdiği gösterilmiştir. Bundan dolayı, ANA'ların doku yada türe spesifik olmadığı düşünülmektedir. Ancak tiroid, gastrik mukoza, adrenal korteks, lökosit ve bazı eritrositlerden izole edilen nükleusların ANA

özelliğine sahip olan bazı örnekler ile spesifik reaksiyona girdiğini gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (13, 58, 59).

Nükleer antijenler; hücrenin kromatin, nükleolus, ribonükleoprotein partikülleri (RNP), nükleer zarf, nükleer porlar ve nükleer sıvı gibi değişik bölümlerine dağılmış olarak bulunmaktadır (56, 60).

İmmünolojik yapı olarak IgM, IgG, IgA, IgD ve IgE sınıfından ANA'lar belirlenmiş olmasına rağmen, anti immunoglobulinler kullanılarak yapılan çalışmalarda, ANA'ların büyük bir kısmı IgG yapısında olduğu bulunmuştur (56, 58, 60). ANA aktivitesine sahip olan IgG'nin de IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ olmak üzere 4 alt grubu vardır. Yapılan çalışmalarda, bu alt grupların antikor spesifitesi ile hastalığın şiddeti arasında bir ilişki bulunamamıştır (58). Fakat IFA ANA testinde, boyanma özellikleri ile IgG alt grupları arasında ilişki bulunmuştur. Bu ilişki, periferik boyanma özelliğine sahip olan antikorların primer olarak IgG₁ ve IgG₃ yapısında, benekli boyanma özelliğine sahip olan antikorların primer olarak IgG₃ yapısında, homojen boyanma özelliğine sahip olanların ise primer olarak IgG₃ ve az olarak da IgG₁ yapısında olmaları şeklinde bulunmuştur (58).

2.8.1. Antinükleer Antikorlar Subtipleri

ANA'ların sistemik otoimmün hastalıklar grubunda yer alan BDH tanısında önemli olduğu bilinmektedir (12, 18). Nükleusta farklı yerleşim gösteren birçok antijene karşı gelişen antikorların genel ifadesi olan ANA, nükleik asitler, bazik histon proteinleri ve asidik nonhiston proteinlerine karşı gelişen antikorlar olarak 3 gruba ayrılmıştır (12, 55). Nükleer antijenler arasında bulunan nRNP, SS-A, SS-B, Sm, Scl-70 ve sitoplazmik bir antijen olan Jo-1'e karşı oluşan antikorların bazı otoimmün hastalıklarla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Serum fizyolojik ile dalak, timus ve hücre kültürlerinden ekstrakte edilen bu antijen grubuna ENA ve bu antijenlere karşı gelişen antikora ise anti-ENA adı verilmiştir (11).

1) Anti-ds DNA ve anti-ssDNA: Anti-ssDNA deoksiriboz iskeletindeki komponentlere, anti-dsDNA ise DNA yapısındaki pürin ve pirimidin antijenlerine karşı gelişen antikorlardır. Anti-ssDNA'nın sıklıkla ortaya çıktığı ve herhangi bir

hastalığa karşı spesifitesinin bulunmadığı bilinmektedir. Anti-dsDNA ise tek başına nadiren bulunmakta ve diğer BDH'da düşük titrelerde bulunmasına rağmen SLE için yüksek bir spesifiteye sahip görülmektedir. Anti-dsDNA antikorlarının titresi hastalık şiddetiyle ilişkili olarak yükselmekte hastalığın takibinde büyük önem taşımaktadır (11, 15, 61).

2) Anti-histon Antikorları: Histonlar deoksiribonükleoproteini oluşturmak üzere DNA ile kompleks yapan temel nükleer proteinlerdir. Memelilerde H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olarak 5 alt fraksiyona ayrılmıştır. Bunlara karşı oluşan anti-histon antikorları genellikle SLE, RA, ilaca bağlı lupus, sistemi skleroz ve MCTD hastalıklarında görülmektedir (61, 62, 63).

3) Anti-Sm ve anti-RNP: Birbirlerine çok yakın, küçük nükleer RNA kompleksleri olan Sm ve RNP antijenleri U1-U6 RNA komplekslerini içerdiği için U-RNA olarak ta bilinmektedirler. Bu antikorların prekürsor mRNA'ların kesilmesi sırasında rol oynayarak mRNA oluşumunu engellediği bilinmektedir. Bu inhibisyonun önemi vurgulansa da romatolojik hastalıklardaki rolü bilinmemektedir. Anti-RNP birçok BDH'da oluşabilmektedir ayrıca yüksek titrelerde görüldüğünde MCTD için tanısal değer taşımaktadır (11, 15, 61).

4) SS-A (Ro) ve SS-B (La) antikorları: Ro antijeni olarakta bilinen SS-A bir nükleik asit antijeni değil, sitoplazmik bir antijendir. Buna karşı gelişen antikorlar ise genellikle SLE ve Sjögren sendromunda görülmektedir. La antijeni olarak bilinen SS-B ise çözünebilir sitoplazmik RNA-protein antijenidir ve SLE'de görülmektedir. SS-A ve SS-B hücrenin fonksiyonlarına göre sitoplazma ve nükleusta bulunabilmekte ve her iki antijen de polipeptitler üzerine yerleşmiş olduklarından tripsine duyarlılık göstermektedirler. SS-A substrat fiksasyonu sırasında bozulabildiği ve yıkama işlemi esnasında ortadan kaldırılabilceği için yalancı negatifliğe yol açabilmektedir. Bundan dolayı hücre kültürleri dondurulmuş dokulardan daha duyarlı kabul edilmektedir. SS-A'ya karşı gelişen antikorlar başta SLE ve sjögren sendromu olmak üzere birçok BDH'da görülebilmektedir. SS-A antikorları tek başına veya SS-B antikorları ile birlikte primer veya sjögren

sendromunda görüldüğü gibi vaskülit, kriyoglobulinemi, lökopeni, lenfopeni, anemi gibi hematolojik hastalıklar ve merkezi sinir sistemi hastalıklarıyla da ilişkilendirilmektedirler (11, 15, 61, 62).

5) Anti Scl-70 ve Anti Sentromer (kinetokor) Antikorları: Scl-70'e karşı gelişen antikorlar ve anti-sentromer antikorları (ACA) çok nadir bir arada bulunmaktadır. Genellikle sistemik skleroz hastalığında ortaya çıkmakta, tanı ve prognozda önem taşımaktadırlar. Scl-70 antijeni temel kromozomal bir proteindir ve DNA topoizomerez enziminin parçalanmasıyla ortaya çıkan ürünlerden biri olduğu bilinmektedir. Scl-70 antijenine karşı gelişen antikorların ise bu enzimin süpersarmal DNA üzerindeki açılma aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir. Bu antikor sistemik sklerozlu hastaların %22-28'inde ve hastalığın diffüz formunda ise %33 oranında saptanmaktadır. Sentromer antijenleri üç tabakalı sentromerin iç ve dış tabakalarında yer alan üç proteinden ibarettir. Anti sentromer antikorlarının ise sistemik sklerozun bir varyantı olan CREST sendromu için oldukça spesifik olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu antikorlar sistemik skleroz, SLE, primer Raynaud fenomeni, MCTD ve PBS hastalıklarında ortaya çıkabilmektedir (11, 61, 62, 64).

6) Nükleolusa Karşı Gelişen Antikorlar: Sistemik skleroz başta olmak üzere SLE, sjögren sendromu ve Raynold fenomeninde nükleolusa karşı gelişen antikorlar görülmektedir. İmmünofloresan boyama teknikleri kullanılarak nükleolar paternde boyanabilen birçok antikor gösterilmiştir. Bu antikorların başında noktalı nükleolar boyanma gösteren anti RNA polimeraz I antikorları gelmekte ve sistemik sklerozlu hastaların %4'ünde görülmektedir. Diğer bir nükleolar antijen olan fibrillarine karşı kümeli nükleolar boyanma gösteren anti fibrillarin antikoru gelişmekte ve bu da sistemik sklerozlu hastaların %8'inde rastlanmaktadır (11, 59, 62).

7) Nükleer/Sitoplazmik Antijenlere Karşı Oluşan Antikorlar: Nükleer/sitoplazmik antijenler arasında Jo-1, PL-7, PL-12, Mi-1, Mi-2 ve Ku bulunmaktadır (65). Jo-1, PL-7 ve PL-12 özgül aminoasıl-tRNA sentetaz molekülleri olup, protein sentezinde amino asitleri aktive ederek kendilerine uygun tRNA'lara

bağlanmalarını sağlayan enzimlerdir. Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar ise polimiyozit/dermatomiyozit hastalarında %4-30 oranında görülmektedir. Birbirinden bağımsız olarak ortaya çıktığı bilinen Anti Mi-1 ve anti Mi-2 antikorlarının dermatomiyozit ile yakın ilişkili olup bu hastalığa özgü iki önemli marker olduğu bilinmektedir. Yaygın benekli ve nükleolar boyanma gösteren Anti-Ku antikoru ise DNA'ya bağlanan p70/p80 nükleer protein çiftine karşı gelişmektedir (11, 61, 62).

8) Romatoid Artrit ile İlişkili Nükleer Antijene (RANA) Karşı Gelişen Antikorlar: RANA'ya karşı gelişen antikorlar RF ile benzerliği bulunmayan IgG yapısında olan antikorlardır. Sadece EBV ile transforme hücrelerde görüldüğü için RA hastalarında bulunmaları EBV'nin olası patojenik rolünü desteklemektedir. Bu antikorlar RA hastalarının çoğunda bulunurken diğer BDH'da ve normal bireylerin az bir kısmında bulunmaktadır (11, 15, 61, 62).

9) Anti-Ma Antikorları: SLE hastalarında saptanan anti-Ma antikorlarının hastalığın ciddiyetini gösterdiği ve hipertansiyon, böbrek tutulumu, nörolojik hastalık, kompleman düzeyinde azalma, hepatosplenomegali, lenfadenopati ile ilişkili olduğu bilinmektedir (11).

2.8.2. Antinükleer Antikor Komponentleri

ANA (IFA) yönteminde nükleus ve sitoplazmik otoantikor pozitiflikleri sayısı otuza yakın farklı boyanma modeli gösterirler. Otoantikor pozitifliklerinde gözlenen boyanma modelleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. ANA Subtipleri (23).

ANA ve Sitoplazma Komponentleri	
Homojen	ssDNA dsDNA Histon Nükleosom
Nükleer Membran	
Nükleoplazma Dot	Nükleer Dot Few Nükleer Dot Sentromer
Nükleoli	Scl-70 Nükleolar homejenus Nükleolar küme RNA Polymerase I NOR
Nükleoplazma Granüler	RNP-Sm SS-A / SS-B KU PCNA (cyclin I) Mitotin (cyclin II)
Sitoplazma Granüler	Jo-1 AMA Lizozomal Golgi Aparatı Ribosomal
Mitotik Hücreler	Kromozomal Spindle Fibers Midbody Sentriol
Sitoplazma Filamentöz	Vimentin Tropomyosin Aktin

1) Homojen: İnterfaz aşamasındaki hücrelerin nükleusunun tamamı tek tip floresan boyanır ve hücre sitoplazması negatiftir. İnterfaz aşamasındaki hücrelerin dış kenarlarını yüksek titreli örnekler, eski reaktifler ya da eski preparatlar daha belirgin boyanmış gösterebilir. Bu boyanma tipinde antikorlar dsDNA, ssDNA, histonlar (başlıca [H2A-H2B]-DNA kompleks) ve nükleosomlara karşı oluşur. SLE, RA, ilaçla indüklenmiş lupus, juvenil kronik artrit ve sistemik sklerozlu hastalarda yaygın olarak görülür (Şekil 2.1) (16, 67).

2) Nükleer: Yaklaşık olarak her hücrede 10 tane nokta şeklinde boyanırlar. Değişik boyutlarda olan bu nükleer dotlar nükleoplazma boyunca yayılırlar fakat nükleoluslardan ayırılırlar. Mitoz sırasında hücrenin çevresinde boyanırlar ve

metafaz sırasında ise kromatin negatiftir. Bu tip boyanmaya neden olan antikolar promyelocytic leukemia protein (PML), Sp-100 protein ve NDP53'e karşı oluşurlar. Bu patern PBC'li hastaların %30'dan fazlasında belirlenirken sjögren sendromlu hastalarda, SLE ve diğer kronik inflamatuvar bağ dokusu hastalıklarında da belirlenebilir. Few nükleer dot boyanma, interfazdaki hücrelerin 1-6 arasındaki (ortalama 2) belirgin noktanın sıklıkla nükleolusuna yakın bölgesinde boyanma göstermesiyle ilişkilidir. Genellikle bölünen hücre kromatini boyanmaz. Bu tip boyanmaya neden olan antikor p80-coilin olarak bilinen 80 kDa'luk nükleer proteine karşı oluşur. Bu patern otoimmün ve kronik aktif hepatit gibi viral karaciğer hastalıklarında, PBC ve nadiren de olsa kollajen vasküler hastalıkları ve çeşitli otoimmün hastalıklarında görülür (Şekil 2.2, Şekil 2.3, Şekil 2.4, Şekil 2.5) (67).

3) Granüler: Granüler paternde birçok farklı antikor nükleusun benekli boyanmasına neden olur. Benekli boyama kaba ve ince olabilir. İnce benekli boyanma nerdeyse homojen boyanma gibi görülür. Granüler patern ve sentromer patternleri birbirine benzerler. Bölünen hücre kromatini sentromer paterninde benekli boyanırken granüler paterninde kromatinde boyanma görülmez (Şekil 2.6, Şekil 2.7, Şekil 2.8) (66, 67).

4) Nükleolar: Bu patern nükleolilerin homojen, nükleoplasmanın ise benekli veya zayıf homojen boyanması ile karakterizedir ve Pm-Scl ve Th/To antikoları ile ilişkilidir. Pm-Scl antikoru miyozitis-skleroderma, overlap sendromu ve nadiren de olsa sistemik sklerozlu ve miyozitisli hastalarda görülür. Nükleolar küme boyanma da interfaz esnasındaki hücrelerin nükleolusu genellikle büyüklüğü ve şekli değişen kümeler (clumpy) tarzında boyanırken, mitoz esnasında kromatin yoğun olarak boyanır (Şekil 2.9, Şekil 2.10, Şekil 2.11, Şekil 2.12) (67).

5) Sentirol: Metafaz fazında mitotik iğ iplikçikleri zıt kutuplarda noktasal floresan benekler şeklinde görülürken bitişik nükleuslu interfaz hücrelerinin sitoplazmasında bir ya da iki noktasal ışık görülür. Bu boyanma tipine nadir olarak rastlanılmasına rağmen en çok Raynaud's sendrom'lu hastalarda görülür fakat

CREST, Sjögren's sendromu ve skleroderma gibi bazı otoimmün hastalıklarda da görülebilir (Şekil 2.13) (67).

6) Midbody: Telofaz ve anafaz fazında midbody ve ayrılma çizgisi, metafaz fazında ise kromatin floresan olarak boyanır. Ayrıca interfaz fazında zayıf nükleer boyanma görülür. Bu boyanma tipi Raynaud's sendromu ve sistemik sklerozlu hastalarda nadiren görülebilir ve ayrıca karakteristik antijeni yoktur (Şekil 2.14) (41).

7) Spindle fibers: Metafaz ve anafaz fazında iğ iplikçiklerinin kutuplara doğru yönelerek floresan boyanması ile görülmektedir. Ayrıca interfaz fazında ise ince benekli nükleer lekeler görülür. Klinik ilişkisi henüz bilinmemesine rağmen Sjögren's sendromu, SLE, MCTD ve poliartritli hastalarda rastlanmıştır (Şekil 2.15, Şekil 2.16) (67).

8) Sentromer: İnterfaz esnasındaki hücrelerin nükleuslarında 40-60 arasında floresan boyalı nokta ile ilişkilidir. Mitoz esnasındaki hücrelerin kromatini belirgin benekli tipte boyanmıştır. Anti sentromer antikorumları dört proteine karşı oluşurlar. Bunlardan en sık CENP-B (80 kDa) ve CENP-A (17 kDa)'a karşı oluşurken bazen de CENP-C (140 kDa) ve CENP-D'ye karşı oluşabilir. Anti CENP-F antikorumları ise bu boyanma tipini göstermezler. Anti sentromer antikorumları Scl için tanısal ve alt tiplerini belirlemeye yardımcı önemli antikordur. Ayrıca bu antikorumlar Scl hastalarının %22-36'sında pozitifdir (Şekil 2.17) (16, 67).

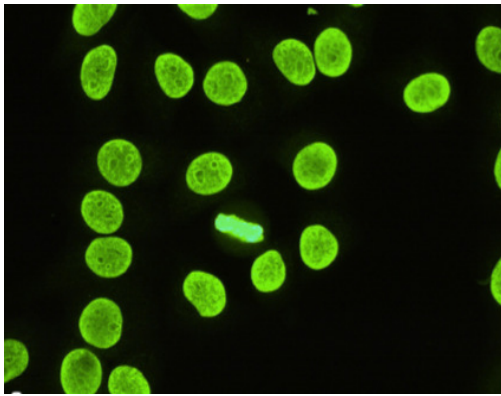
9) Lizozomal: Bu boyanma tipi sitoplazma boyunca dağılmış büyük düzensiz lekeler şeklinde gözlenir. SLE'li hastalarda nadiren görülmesine rağmen klinik önemi bilinmemektedir. Ayrıca lizozomal antijenler ve lizozomal ilişkili membran proteinlerine (LAMPs) karşı antikor oluştuğu durumlarda bulunmaktadır (Şekil 2.18) (67).

10) Golgi: Nükleusa bitişik farklı büyüklüklerde parlak benekli lekeler ile karakterize boyanmadır. Bu boyanma tipine nadir rastlanılmasına rağmen SLE,

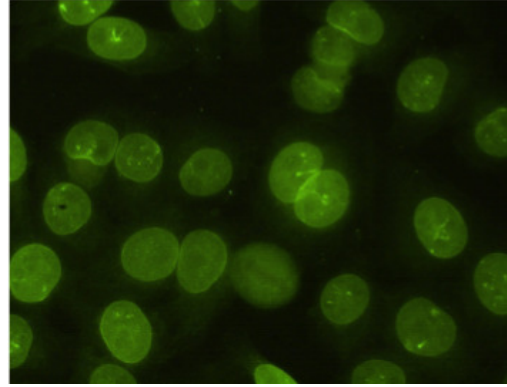
Sjögren's sendromu ve diğer kronik romatoid hastalıklarda saptanabilir (Şekil 2.19) (67).

11) Vimentin: Bu boyanma tipi, bol miktarda ince iplikçik sitoplazmanın her tarafında sarmaşık şeklinde bir ışın yayması şeklinde görülür. Klinik önemi bilinmemesine rağmen anti-vimentin antikorları çeşitli hastalıklarda görülebilir (Şekil 2.20) (67).

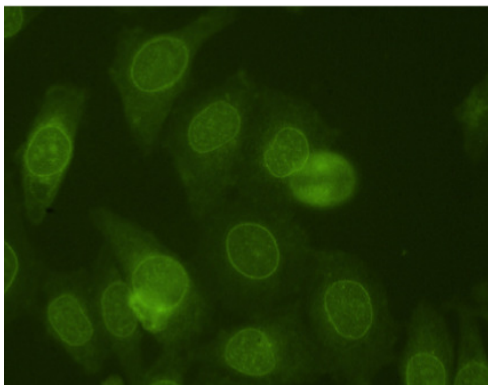
12) Kromozomal: Bazı hücrelerin kromatinleri yoğun bir şekilde floresan boyanırken nükleoplazma ve sitoplazması negatiftir. Fakat kromozoma karşı oluşan antikorların klinik ile ilişkisi henüz bilinmemektedir (Şekil 2.21) (16, 67).



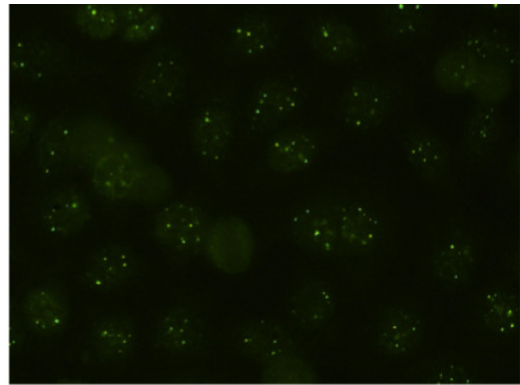
Şekil 2.1. Homojen nükleoplazmik boyanma (66).



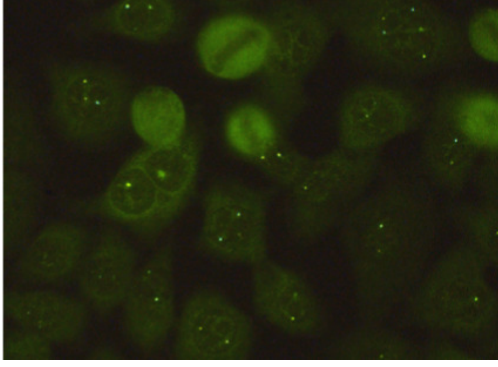
Şekil 2.2. Düz nükleer membran boyanma (66).



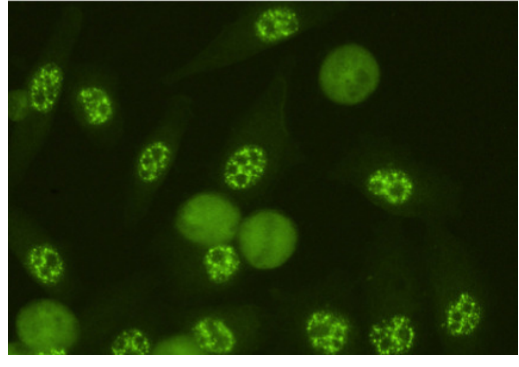
Şekil 2.3. Benekli nükleer membran boyanma (66).



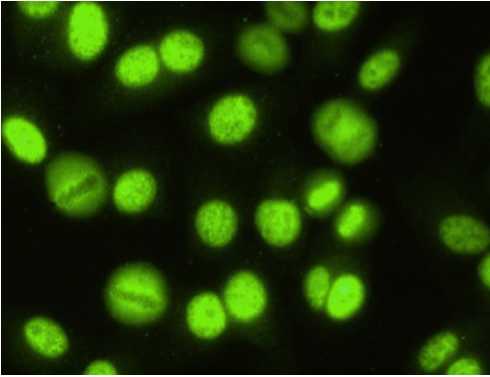
Şekil 2.4. Küme nükleer dot boyanma (66).



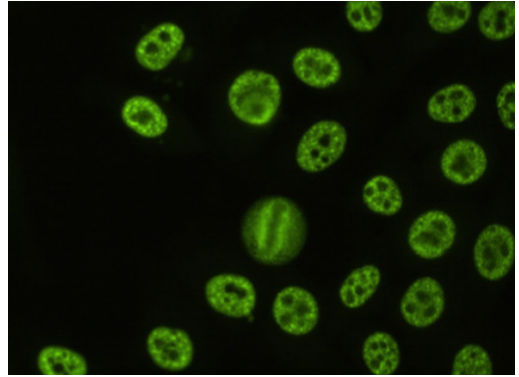
Şekil 2.5. Few nükleer dot boyanma (66).



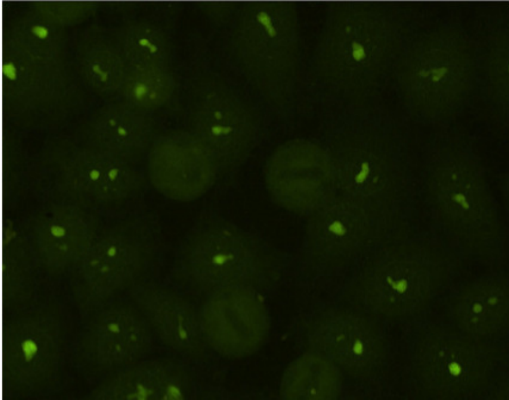
Şekil 2.6. Geniş benekli nükleoplazmik (granüler) boyanma (66).



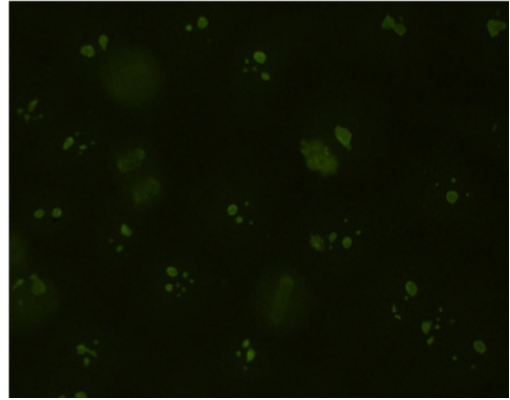
Şekil 2.7. İnce benekli nükleoplazmik (granüler) boyanma (66).



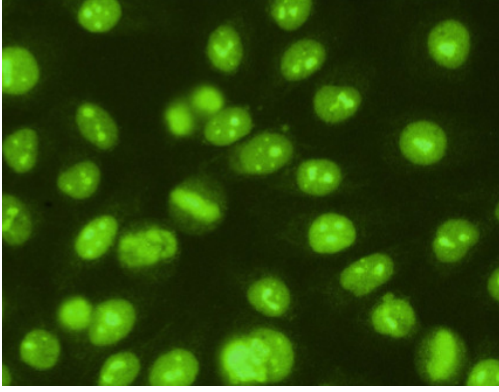
Şekil 2.8. Kaba benekli nükleoplazmik (granüler) boyanma (66).



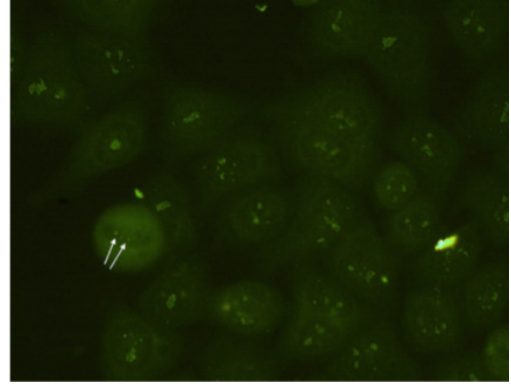
Şekil 2.9. Homojen nükleolar boyanma (66).



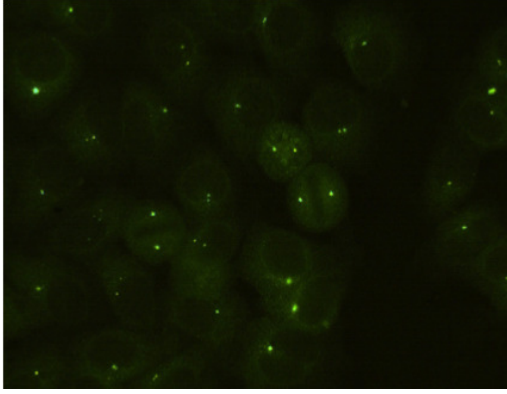
Şekil 2.10. Küme nükleolar boyanma (66).



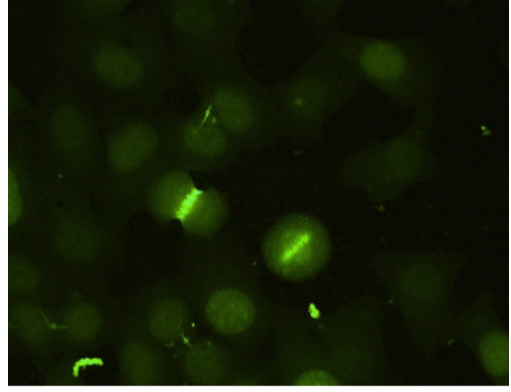
Şekil 2.11. Nükleoplazmik boyanma (66).



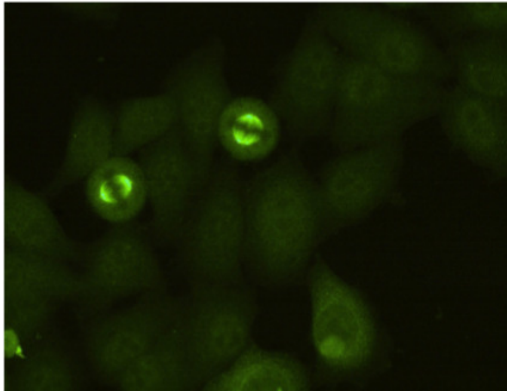
Şekil 2.12. Benekli nükleolar boyanma (66).



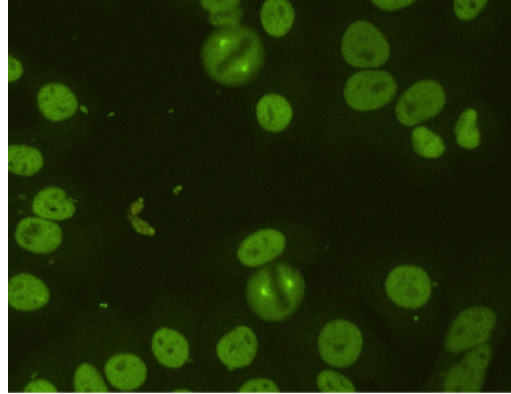
Şekil 2.13. Sentriol boyanma (66).



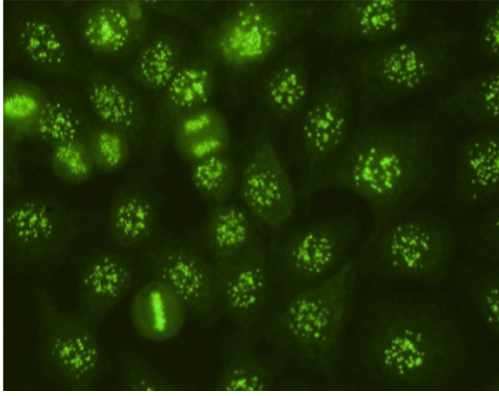
Şekil 2.14. Midbody boyanma (66).



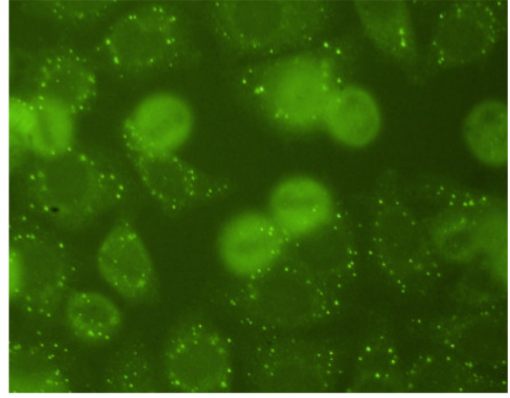
Şekil 2.15. Spindle fiber boyanma (66).



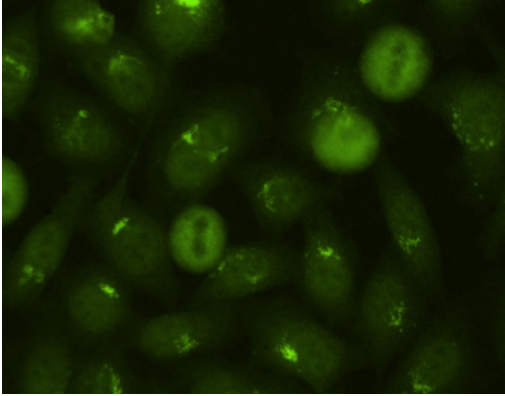
Şekil 2.16. Spindle kutup boyanma (66).



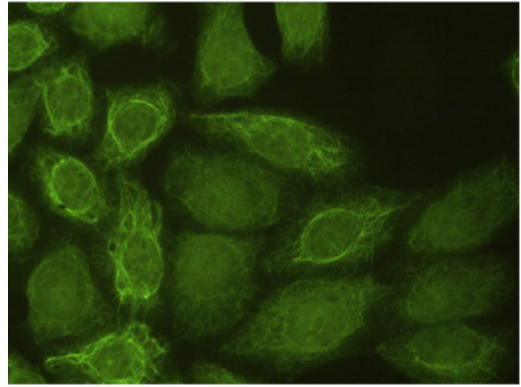
Şekil 2.17. Sentromer boyanma (66).



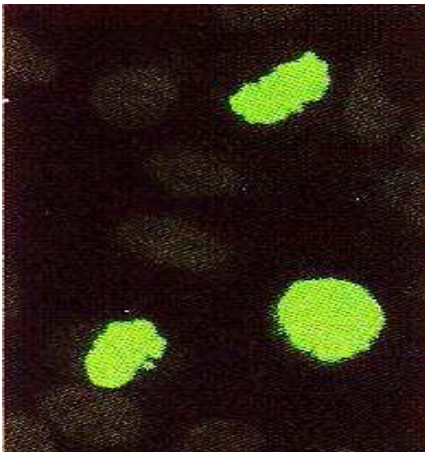
Şekil 2.18. Lizozomal boyanma (66).



Şekil 2.19. Golgi boyanma (66).



Şekil 2.20. Vimentin boyanma (66).



Şekil 2.21. Kromozomal patern (66).

Aşağıdaki durumlarda ANA pozitif bulunur:

- a. Romatizmal hastalıklar: Romatoid artrit, SLE, skleroderma, MCTD, sjögren hastalığı, polimiyozit, dermatomiyozit, diskoid lupus.
- b. Organa özgü otoimmün hastalıklar: Otoimmün hepatit, otoimmün tiroidit, primer bilier siroz, otoimmün kolanjit.
- c. İlaça bağlı: Prokainamid, minosiklin, hidralazin, INH, INF-alfa, kinidin, metildopa, penisilamin gibi ilaçların kullanımı.
- d. Diğer: Kronik enfeksiyonlar, primer pulmoner hipertansiyon, idiopatik pulmoner fibrozis, lenfoproliferatif hastalıklar.

IFAT ile bakıldığında ANA'nın romatizmal hastalıklardan SLE için sensitivitesi (%97) oldukça yüksektir. Ayrıca bu yöntem ilaca bağlı lupus hastalığında tanı kriterlerinden biridir. Skleroderma da ise bu oran %85'dir ve spesifitesi ise %80 civarındadır (68, 69). Otoantikorların klinik yaygınlığı ve hastalıklarla olan ilişkileri Tablo 2.3'de verilmiştir.

ANA'nın titresi dışında tipi de önemlidir;

1) Homojen (difüz) ANA: En sık saptanan ANA tipidir. Fakat yüksek dilüsyonlarda homojen boyanma benekli boyanmaya dönüşebilir. Genellikle anti-histon antikorlar (ilaca bağlı lupus) ve bazen de anti-ds DNA antikorlar homojen tipte ANA pozitifliği verirler.

2) Periferik ANA: Anti-ds DNA antikorlar için tipiktir ve kuvvetle SLE düşündürür.

3) Granüler (Benekli) ANA: Ro, La, Sm gibi ENA'ya karşı oluşmuş antikorlar sorumludur. Granüler ANA'nın iki tipi vardır:

- a. Kaba Granüler: Antisentromer antikorlar
- b. İnce Granüler: Anti- scl 70 (topoizomerez 1) antikorlar

4) Nükleoler ANA: Anti- RNP I, anti-U3rnp, anti-PM-Scl antikorları

5) Sitoplazmik ANA: Sitoplazmik tipte ANA pozitifliği veren antikörler şunlardır: Nötrofilik sitoplazmik antikörler (cANCA ve pANCA, antimitokondrial antikörler, antiribozomal antikörler ve tRNA sentetaz antikörler) (68, 69).

Tablo 2.3. Otoantikörlerin klinik yaygınlığı ve hastalıklarla olan ilişkileri (17).

Otoantikörler	İlişkili Hastalık	İlgili Hastalıkta Saptanma Sıklığı (%)
ANA	Sistemik lupus SLE etkin dönem	95-100
	SLE durgun dönem	80-100
	İlaçla uyarılmış SLE	100
	MCTD	100
	RA	20-40
	Progresif sistemik skleroz	85-95
	Polimiyozit-Dermatomyozit	30-50
	Sjögren sendromu	70-80
	Kronik aktif hepatit	30-40
	Ülseratif kolit	25
	Diğer romatizmal hastalıklar	20-50
ds DNA	SLE	50-60
	RA, MCTD	5
SS-A (Ro)	SLE	15-30
	Sjögren sendromu	60
	Yeni doğan lupusu	100
SS-B (La)	Sjögren sendromu	30
	SLE	30-50
Sm	SLE	25-30
RNP	MCTD	95-100
	Sistemik skleroz	20
	SLE	25-40
Scl-70	Skleroderma	20-30
Jo-1	Polimiyozit	25-45
Sentromer	CREST sendromu (skleroderma)	80
Histon	İlaçla uyarılmış SLE	90

2.9. Laboratuvar Tanı Yöntemleri

Otoimmün hastalıkların tanısında uzun bir süredir otoantikörler kullanılmaktadır. Hargraves ve arkadaşlarının 1948 yılında LE hücreleri üzerine yapılan çalışmaları ANA ile ilgili ilk laboratuvar testi olmuştur (16, 59). Bu yöntem o dönemlerde SLE hastalığının tanısını destekleyebilecek önemli bir buluş olarak görülmesine rağmen daha sonraki yıllarda LE hücrelerinin SLE tanısı için duyarlı ve spesifik bir yöntem olmadığına karar verilmiştir. Bunu takiben gerçekleştirilen birçok çalışma sonucunda LE hücrelerinden sorumlu olan çeşitli nükleer yapılara karşı gelişen antikor topluluğunun farkına varılmıştır. Bu antikörler bugün ANA

başlığı altında toplanmaktadır. 1950’li yıllarda ANA tespiti için hayvan doku substratları kullanılarak uygulanan immunofloresans teknikleri geliştirilmiştir. Daha sonraları daha farklı yöntemler geliştirilmiş, günümüzde ise bu amaçla birçok yöntem kullanılmaktadır (10, 14, 70).

2.9.1. İmmünofloresan Antikor (IFA) Testi

ANA araştırılması romatolojik hastalıkların tanısında büyük önem taşımaktadır. Günümüze kadar bu amaç için birçok teknik geliştirilmiş olmasına rağmen en eski yöntemler arasında bulunan IFA tekniği hala en yaygın yöntem olma özelliğini korumaktadır (14, 71). Antikor spesifikliği sağlaması açısından kullanılan diğer teknikler immünodifüzyon, counter immünoelektroforez (CIE), immünoblot, radioimmunoassay (RIA) ve ELISA gibi yeni tekniklerdir. IFA ise duyarlılık, uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle diğer tekniklere göre daha avantajlı görülmektedir (14, 17, 18). İmmünofloresan yöntemi ANA tespitinde en sık kullanılan yöntemdir (13).

Uygun substrat seçimi IFA tekniğinde büyük önem taşımaktadır ayrıca birçok doku kesiti ve hücre kültürleri substrat olarak kullanılabilir. Fakat substrat olarak çok çeşitli kaynakların kullanılması ve konjugatlar için belirlenmiş bir standardın bulunmaması dikkate değer olumsuzluklara neden olmaktadır. Sonuçları değerlendirme ise tamamen yorumlayan kişinin bilgi ve deneyimine bağlı olduğu için laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası çalışmalar karşılaştırıldığında farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. IFA tekniğini olumsuz etkileyen diğer bir sorun ise floresans mikroskopisi ile ilgili problemlerdir (17, 18, 58).

IFA testinde eskiden antijen kaynağı olarak sıçan doku kesitleri kullanılırken günümüzde ise bunun yerini Hep-2 hücreleri almıştır ve bunlar genellikle larenks kanserli hastalardan elde edilir. Bu hücreler insan epitelyal hücre dizisidir. Ayrıca hücrelerin büyük nükleusları bulunmakta ve hücre siklusu boyunca farklı şekillerde sergilenen antijenlerin daha kolay belirlenmesini sağlamaktadır (18, 68).

Bazen normal bireylerde de ANA pozitifliği görülebilir. Sağlıklı erişkinlerde %15, çocuklarda ise %8 oranında ANA pozitifliği görülür. Otoimmün romatolojik hastalıkları olan bireylerin birinci derece akrabalarında da yüksek görülebilir (68).

Hep-2 kullanıldığında normal bireylerde 1/40 dilüsyonda %10-15 olguda, 1/320 dilüsyonda ise %1 olguda ANA pozitifdir. Titresi arttıkça normal bireylerde görülme sıklığı azalır. Çoğu laboratuvarıda 1:40 ANA titresi pozitif kabul edilir. ANA pozitifliği 1:40 dilüsyonda sağlıklı bireylerin %30'unda saptanabilir (13, 73).

ANA pozitifliği homojen, benekli, periferik ve nükleolar olmak üzere 4 ANA boyanma şekli ile görülmektedir. Belirli hastalıkların tanısında bu paternler büyük önem taşımaktadır (18, 66, 72).

Deoksiribonükleoprotein (DNP), histonlar, dsDNA ve ssDNA'ya karşı gelişen antikorların homojen boyanma özelliği göstermesinden dolayı homojen paternde nükleusun tamamı aynı yoğunlukta boyanmaktadır.

Nükleusta dağılmış halde bulunan antijenlere karşı gelişen antikorlardan dolayı benekli boyanma oluşmaktadır ve büyüklük itibarıyla kaba benekli, ince benekli, kaba ve/veya ince benekli olarak farklı şekillerde görülmektedir.

Nükleusun merkezi boyanmadığı halde çevresinin yoğun bir biçimde boyandığı patern periferik boyanmadır. Bu boyanmanın kondanse olmuş kromozomun etrafındaki metafazik hücrelere karşı gelişen antikorlar ile oluştuğu bilinmektedir.

Nükleolar boyanma ise genellikle diğer boyanma şekilleriyle birlikte görülen karışık tipte bir floresan boyanmayı gösteren paternlerdir. Bu boyanmanın RNAaz ve tripsine karşı duyarlı olması nükleolar RNA proteinine karşı gelişen antikorlar ile gerçekleştiğini düşündürmektedir (58, 66, 72).

2.9.2. İmmünodiffüzyon

İmmünodifüzyon yönteminin geliştirilmesiyle birlikte hücrede çözülebilir komponentlere karşı gelişen antikorların gösterilmesi sağlanmıştır. İFA yönteminde anti-Ro antikorları boyanmayabileceği için, eğer klinik görünümü SLE'yi destekliorsa immünodifüzyon veya ELİSA yöntemleri kullanılarak bu antikorların araştırılması gerekmektedir (61). Bu sebeple gelişmiş araştırma laboratuvarlarında standart immünofloresans tekniği ile immünodifüzyon metodu birlikte kullanılarak ANA bakılması yaygınlaşmıştır. Bu yöntemle monospesifik bir prototip serum ile timus ve dalak doku ekstrakteleri kullanılmaktadır. Ayrıca DNA gibi büyük moleküllerin agarda difüzyonu zayıf olduğundan dolayı bu yöntemle anti DNA tayini zor gerçekleşmektedir (74).

2.9.3. İmmünoblot

İmmünoblot tekniği, nükleer antiijenlere karşı gelişen antikorların alt gruplarını birbirinden ayırarak bu grupları belirleyebilmeyi sağlamaktadır. Bu alt gruplar, bazı otoimmün hastalıkların varlığını göstermektedir. Örneğin Sm antiijenine karşı gelişen antikorlar SLE varlığına işaret ederken, Anti Scl-70 veya fibrillarine karşı gelişen antikorlar ise sklerodermayı düşündürmektedir. Ayrıca hasta serumunda Anti SS-A ve Anti SS-B antikorları genellikle sjögren sendromunda ve SLE'de görülse bile bu hastalıklar için spesifik markerlar olarak kabul edilmemektedir. Normal koşullarda fibrillarine karşı gelişen antikorlar ise kümeli nükleolar floresans paternini göstermektedir, fakat bu paterni deneyim sahibi biri doğru değerlendirebilmektedir. Bundan dolayı immünoblot tekniği kullanılmasının daha güvenilir sonuç vereceği düşünülmektedir. İmmünoblot tekniğinin genellikle spesifik ve duyarlı olduğu düşünülür. Ayrıca kullanılan kontroller ile hatasız bir sonuca ulaşıldığından emin olunması önemlidir. Bundan dolayı immünoblot tekniği bilinen antikor kontrolleri kullanılarak değerlendirme imkanı sağlamaktadır.

Sistemik romatolojik hastalıkların tanısında ANA'ya olan ilginin artması klinik laboratuvarlarda immünoblot tekniğinin yer almasını sağlamıştır. Yaygın bir metod olan İFA, ANA belirlenmesinde bazen yeterince duyarlı ve kesin

olmamaktadır. Bu yüzden immüno blot tekniğinin otoantikorların moleküler düzeyde spesifitesini belirlemekte önemli bir teknik olduğu düşünülmektedir (17, 75).

2.9.4. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA yöntemi özellikle dsDNA ve ssDNA'ya karşı oluşan antikorların belirlenmesinde ayrıca anti-ENA ve anti kardiyolipin antikorların belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra ELISA yönteminde total ANA tespiti de yapılmaktadır. Ancak SS-A ve SS-B nükleusta az miktarda bulunduğundan dolayı ELISA yöntemi ile iyi belirlenemese bile bu durum total ANA tesbitinde önemli bir sorun olarak görülmemektedir.. Bu teknik, az sürede daha çok hasta üzerinde çalışılabildiği için ve nükleus içinde yaygın halde bulunan ANA'ları daha kolay belirlediği için IFA yönteminden daha kullanışlı bir teknik olarak kabul edilmiştir (71, 74, 76). ELISA testlerinde her belirteç ayrı değerlendirilmekte ayrıca yöntemin teknik bir özelliği nedeni ile kuyucukların ilk ve son sıralarında yer alan serumların aynı kalibrasyon eğriyle değerlendirilmesi analitik sapmalara neden olmaktadır (17). ELISA tekniğinin duyarlılığı yüksektir fakat özgüllüğünün düşük olması nedeniyle yanlış pozitifliklere sık rastlanmaktadır (71, 74, 76).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Ağustos 2011-Temmuz 2014 tarihleri arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji İmmünoloji Laboratuvarı'na farklı kliniklerden otoimmün hastalık şüphesi olup ANA yönünden araştırılması istenen 559 hastaya ait sonuçlar retrospektif olarak değerlendirildi. ANA testi IFA yöntemiyle çalışıldı. ANA subtiplerinin tespiti için immüno blot yöntemi kullanıldı.

3.1. İmmüno floresan Antikor (IFA) Testi

ANA testleri üretici firmanın (Euroimmun, Lübeck, Almanya) önerilerine göre çalışıldı. Kullanılan IFA testleri her bir bölmesinde pozitiflik ve patern belirlenmesi için Hep-2 ve primat karaciğer hücreleri içermekteydi.

Çalışma Prosedürü:

Çalışmaya başlamadan önce kitler oda sıcaklığına getirildi. Hasta sayısı kadar gode alındı.

1. Bir litre distile suya PBS tuzu eklendi ve iyice karıştırıldı.
2. Üzerine Tween 20 eklendi.
3. Köpürmemesi için çalkalamadan birkaç defa alt üst edildi.
4. Godelere 990 µL PBS solüsyonu ve 10 µL hasta serumu dağıtıldı. Böylece 1/100'lük dilüsyon yapıldı.
5. Karışımlar vortekslendi ve Tray'e vortekslediğimiz godelerdeki dilue örneklerden 25 µL pipetlendi.
6. Ön yüzeyleri doku kaplı slaytlara hasta numarası yazıldı ve Tray'lerin kenarlarındaki çentiklere geçirip 30 dk inkübasyona bırakıldı.
7. Inkübasyon süresi bitiminde şalelerde 5'er dakika 2 kez PBS solüsyonu ile yıkandı.
8. Temiz Tray alındı ve üzerine 20 µL Ig G konjugat pipetlendi.
9. Yıkama işlemi bittikten sonra slaytların arka yüzleri silinip yine aynı şekilde çentiklere takıldı ve 30 dk inkübasyona bırakıldı.

10. Süre bitiminde yine aynı şekilde şalelerde 5'er dakika 2 kez PBS solüsyonu ile yıkandı.
11. Lamel alındı ve slayların ön yüzeyindeki dokulara denk gelecek şekilde lamellerin üzerine gliserin damlatıldı.
12. Slaytların yıkama işlemi bittikten sonra arka yüzeyleri silinip lamellerin üzerine kapatıldı.
13. Önce 20X'lik sonra 40X'lik büyütmede örnekler incelendi.

Değerlendirme aşamasında floresans mikroskobu kullanıldı. Bu aşamada pozitifliğin yanında hücre nükleusu ve sitoplazmik komponentlere ANA paternleri kaydedildi.

3.2. İmmüno blotting Test

Laboratuvarımıza immüno blot istemiyle gelen ve/veya ANA IFA testi pozitif saptanmış serumlar immüno blot tekniği ile değerlendirildi. Test üretici firmanın (Euroimmun, Lübeck, Almanya) önerilerine göre çalışıldı.

Çalışma Prosedürü:

Çalışmaya başlamadan önce kitler oda sıcaklığına getirildi.

1. 15 µL hasta serumu ve 1,5 mL sample buffer karıştırılarak 1/100 oranında dilue edildi.
2. Hasta sayısı kadar strip çıkarıldı.
3. Striplerin üzerindeki numaralar görünecek şekilde inkübasyon tray'indeki boş kuyulara yerleştirildi.
4. Her bir kuyucuğa 1,5 mL sample buffer eklenerek 5dk oda sıcaklığında shakerın üzerinde inkübasyona bırakıldı.
5. Süre bitiminde kuyucuklar boşaltılarak 1,5 mL dilue edilmiş serum eklendi ve shakerın üzerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı.
6. Süre bitiminde kuyucuklar boşaltıldı ve 5'er dakika 3 kez 1,5 mL wash buffer eklenerek shakerın üzerinde yıkama işlemi yapıldı.
7. Yıkama işlemi bittikten sonra her bir kuyucuğa 1,5 mL konjugat eklenerek shakerın üzerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı.

8. Süre bitiminde tekrar kuyucuklar boşaltı ve 5'er dakika 3 kez wash buffer ile yıka işlemi yapıldı.
9. Yıkama işlemi bitiminde her bir kuyucuğa 1,5 mL substrat solüsyonu eklenerek shakerın üzerinde 10 dk inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon sonunda kuyucuklar tekrar boşaltıldı ve her bir strip 1'er dakika 3 kez distile su ile yıkandı.
11. Stripler değerlendirme protokolünün üzerine yerleştirildi ve değerlendirilmesi için EUROBlotMaster/Euroline programı (Euruimmun, Lubeck, Almanya) kullanıldı.

Membran striplerinde, ANA alt grubu olarak kabul edilen anti-ENA antikorlarının her birine ait özel bir çizgi bulunmaktadır. Stripin en alt kısmında ise çalışma sonunda tüm striplerde pozitif kontrol bulunmaktadır.

3.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda IFA yöntemi referans yöntem kabul edilerek immünoblot yönteminin duyarlılık (sensitivite) ve özgüllük (spesifite) değerleri hesaplandı. Hesaplamalarda 17 versiyon SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamıza 403 (%72,1) kadın ve 156 (%27,9) erkek toplam 559 hasta serumu dahil edildi. IFA yöntemi ile 160 (%28,6) hastanın serumunda ANA pozitif olarak tespit edildi. Pozitif bulunanların 125'i (%78,1) kadın ve 35'i (%21,9) erkek hastalara ait idi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. IFA Yöntemiyle ANA Pozitif Bulunan Hastaların Cinsiyete Göre Dağılımı.

	ANA		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Kadın	125	278	403
Erkek	35	121	156
Toplam	160 (%28,6)	399 (%71,4)	559 (%100)

İmmüno blot yöntemi ile 145'i (%76,3) kadın, 45'i (% 23,7) erkek hastaya ait olan toplam 190 hastanın serumunda ANA pozitifliği saptandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. İmmüno blot Yöntemi ile ANA Pozitif Bulunan Hastaların Cinsiyete Göre Dağılımı.

	İmmüno blot		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Kadın	145	258	403
Erkek	45	111	156
Toplam	190 (%34,0)	369 (%66,0)	559 (%100)

İmmüno blot yöntemiyle pozitif bulunan 190 hastanın 22'si (%11,6) Jo-1, 20'si (%10,5) Scl-70, 17'si (%8,9) SS-B, 29'u (%15,3) Ro-52, 46'sı (%24,2) SS-A, 35'i (%18,4) Sm ve 21'i (%11,1) nRNP/Sm olarak bulundu. Çalışılan hasta serumlarından 369 örnek ise negatif olarak değerlendirildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. İmmüno blot Yöntemine Göre Anti-ENA Antikorlarının Subtiplerine Dağılımı.

İmmüno blot	Pozitif (%)
Jo-1	22 (%11,6)
Scl-70	20 (%10,5)
SS-B (La)	17 (%8,9)
Ro-52	29 (%15,3)
SS-A (Ro)	46 (%24,2)
Sm	35 (%18,4)
nRNP/Sm	21 (%11,1)
Toplam	190 (%100)

Hastaların immüno blot yönteminde saptanan subtiplerinin IFA yöntemiyle saptanan pozitiflik ve negatiflik durumları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. İmmüno blot Yöntemine Göre Pozitif Bulunan Anti-ENA Antikorlarının IFA Yöntemiyle Karşılaştırılması.

ANA	İmmüno blot													
	Jo-1		Scl-70		SS-B (La)		Ro-52		SS-A (Ro)		Sm		nRNP/Sm	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Negatif	14	385	12	387	7	392	9	390	23	376	27	372	12	387
Pozitif	8	152	8	152	10	150	20	140	23	137	8	152	9	151
Toplam	22	537	20	539	17	542	29	530	46	513	35	524	21	538

Hastaların IFA ve immüno blot yöntemleriyle elde edilen sonuçlarının birbiri ile karşılaştırılması Tablo 4.5'te verilmiştir. Toplam 98 örnek hem IFA yöntemi ile hem de immüno blot yöntemi ile pozitif bulunmuştur. ANA testiyle pozitif olarak değerlendirilen 62 örnek immüno blot yöntemi ile negatif saptandı. IFA yöntemi ile negatif olarak değerlendirilen 92 örnek ise immüno blot yöntemi ile pozitif bulundu. 307 örnek ise her iki yöntemle de negatif olarak saptandı.

Tablo 4.5. IFA ve İmmüno blot Yöntemlerinin Karşılaştırılması.

İmmüno blot	ANA		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif	98	92	190 (%34,0)
Negatif	62	307	369 (%66,0)
Toplam	160 (%28,6)	399 (%71,4)	559 (%100)

İmmüno blot tekniğinde, duyarlılık % 61,3, özgüllük %76,9, pozitif prediktif değer %51,6 ve negatif prediktif değer %83,2 olarak bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. İmmünoiblot Yönteminin Duyarlılık ve Özgüllük Oranları.

Kriter	İmmünoiblot (%)
Duyarlılık	61,3
Özgüllük	76,9
Pozitif prediktif değer	51,6
Negatif prediktif değer	83,2
Doğruluk (Accuracy)	72,5

IFA yöntemi ile negatif olarak değerlendirilen örneklerin 14'ü Jo-1, 12'si Scl-70, 7'si SS-B, 9'u Ro-52, 23'ü SS-A, 27'si Sm ve 12'si nRNP/Sm şeklinde immonoblot tekniğiyle pozitif olarak saptandı. IFA yöntemi ile pozitif olarak bulunan örneklerin 2'si borderline granüler, 34'ü granüler, 5'i homojen, 5'i ince granüler, 3'ü kaba granüler, 2'si kromozomal, 18'i nükleolar, 3'ü periferel, 1'i sentromer ve 13'ü sitoplazmik granüler patern olarak saptandı (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. İmmünoiblot ve IFA ile Pozitif Saptanan Paternlerin Karşılaştırılması.

İmmünoiblot ANA	Jo-1	Scl-70	SS-B	Ro-52	SS-A	Sm	nRNP/Sm	Toplam
Homojen	0	0	1	2	2	0	0	5
Granüler	4	1	6	11	14	4	6	46
Nükleolar	2	3	1	5	5	1	1	18
Nükleer Dots	0	0	0	0	0	0	0	0
Periferel	1	2	0	0	0	0	0	3
Sentromer	0	0	0	0	0	1	0	1
Sitoplazmik Granüler	1	2	2	2	2	2	2	13
Negatif	14	12	7	9	23	27	12	104
Toplam	22	20	17	29	46	35	21	190

5. TARTIŞMA

Otoimmün hastalıklar ABD’de önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olarak düşünülmektedir. 1997 yılında yapılan epidemiyolojik bir çalışmada 31 Amerikalıdan birinin otoimmün hastalıklardan etkilendiği görülmüştür (77, 78). Bu hastalıkların oluşumuna neden olan self antijenlere karşı gelişen immün yanıt oluşumu günümüzde tamamen aydınlatılamamıştır. Otoimmün hastalıkların özellikle genç popülasyon üzerinde olumsuz etkileri kayda değer bir risk faktörünü oluşturduğu için bu problemin fiziksel, psikolojik ve ekonomik zararlarının boyutu önem arz etmektedir. Bu yüzden genellikle otoantikör testleri uygulanmaktadır. Fakat otoantikör test sonuçlarının güvenilirliği yönünden laboratuvarlarda uygulanan yöntemler hakkında bilgi ve deneyim sahibi olmak, kliniklerle irtibat kurmak, hasta ve hastalıkla ilgili bilgilerinin göz önünde bulundurmak gerekmektedir (78, 79). Genel olarak laboratuvarlarda uygulanan yöntemler klinisyenlere 3 ana başlık altında yardımcı olmaktadır. Bunlardan ilk olarak tanı, sonra prognoz ve son olarakta aktivite takibidir. ANA testi ise en çok tanısal amaçlı istenmektedir (16).

Sistemik otoimmün hastalık grubuna dahil edilen RA, SLE, Skleroderma, Sjögren Sendromu, Dermatomyozit/Polidermamiyozitis gibi BDH grubundaki hastalıkların tanısında hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer antijenlere karşı gelişen antinükleer antikorlar büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla geliştirilen en eski ve yaygın yöntem olarak IFA kabul edilmektedir. Ayrıca son yıllarda geliştirilen ELISA, immüno blot ve immünodiffüzyon gibi yöntemler de laboratuvarlarda IFA ile beraber veya tek başına kullanılmaktadır (16, 20, 71). ANA kanser, sitotoksik ilaç kullanımı ve yaşlılık gibi durumlarda da ortaya çıkması sebebiyle ANA pozitifliğinin, immüno blot yöntemiyle subtiplerinin belirlenmesiyle desteklenmesinin gerekliliğine dikkat çekilmektedir. Her yöntemin kendi içinde bazı avantajları ve dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda, tek bir yöntemle tanıya gidilmesinin önemli bazı sorunlara yol açabileceği çeşitli çalışmalarla görülmüştür (11, 12, 20, 80).

IFA yönteminin uygulanması kolay, maliyeti düşük ve basit bir test olduğu öngörülmektedir. Fakat zaman alıcı ve subjektif bir değerlendirme gerektirmesi önemli dezavatajları arasında düşünülmektedir. Dolayısıyla değerlendiren kişinin bilgi ve deneyimi test sonuçlarının geçerliliğini büyük ölçüde etkilemektedir (12, 16).

Son yıllarda geliştirilen ELISA, immüno blot ve immünodiffüzyon gibi yöntemlerin uygulamasının daha pratik olması ve değerlendirmesinin objektif olması rutin laboratuvarlarda bu yöntemlerin yaygınlaşmasına olanak sağlamıştır (16). Ayrıca IFA ile karşılaştırıldığında, sonuçların laboratuvar içi veya laboratuvarlar arası tutarsızlığının önemli ölçüde giderildiği bildirilmiştir (12).

Gündüz (81) yapmış olduğu bir çalışmada 44 hastadan 17 (%38,6)'sini ANA pozitif bulurken 27 (%61,4)'sini ise ANA negatif olarak bulduğunu bildirmiştir. Karakeçe (20) yapmış olduğu bir çalışmada toplam 2268 hasta örneği ile IFA yöntemiyle yapılan çalışmaların sonucunda %33,3 (n=755) oranında pozitiflik saptamıştır. Gündüz'ün ve Karakeçe'nin bildirdiği bu oranlar bizim çalışmamızda bulduğumuz %28,6'lık pozitiflik ile uyumludur.

Aitcheson ve arkadaşlarının (82) substrat doku olarak fare böbreklerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada 97 hastanın 39 (%40)'unda ANA pozitifliği tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda substrat doku olarak Hep-2 hücrelerini kullanarak %28,6'sında ANA pozitifliği tespit edildi. Aitcheson ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada tespit ettikleri ANA pozitiflik oranı bizimkinden yüksektir. Bunun sebebinin kullanılan substrat dokuların ANA pozitifliğini belirlemedeki etkinliğinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Cordonnier ve arkadaşlarının (83) yapmış olduğu bir çalışmada 49 hastanın 9 (%18,4)'unda ANA pozitifliği tespit ettiklerini ve ayrıca çalışmalarında karaciğer dokusu kullandıklarını bildirmişlerdir. Bu oran bizim çalışmamızda 559 hasta örneği kullanarak bulduğumuz orandan (%28,6) oldukça düşüktür. Cordonnier ve

arkadaşlarının çalışmalarına dahil ettikleri hasta sayısının az olması iki çalışmanın sonuçları arasındaki farkın kaynağı olarak tahmin edilmektedir.

IFA yönteminde hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasında farklı bölgelere yerleşim gösteren nükleer antijenlere karşı gelişen antikorlar farklı boyanma paternleri ile saptanmaktadır. Ancak IFA yöntemi ile nükleer boyanmaya neden olan antikor tiplerinin birbirinden ayırt edilmesi zorken, immüno blot yönteminde hedef antijene karşı gelişen antikorların özgül ve duyarlı bir şekilde saptandığı bilinmektedir. İmmüno blot yönteminin tek bir örnek ile hızlı sonuç vermesi ve bir test stribi ile birkaç farklı antikorun saptanabilmesi önemli avantajlarından. Fakat teknik hatalara ve solüsyonların saklanma koşullarına bağlı olarak yalancı pozitiflik verebilmesi ve maliyetinin yüksek olması ise bu yöntemin önemli dezavantajlarından (75, 84).

Çağlayan ve ark. (23) yapmış olduğu bir çalışmada 117 hasta üzerinde IFA ve WB yöntemlerinin herhangi birinde pozitiflik tespit ettiği çeşitli otoimmün hastalıklara sahip hastalara ait serum örnekleri ile %69,2'sini pozitif prediktif ve %65,4'ünü negatif prediktif olarak bulduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 559 hasta üzerinde çıkan pozitif prediktif değeri %51,6 ve negatif prediktif değeri %83,2 olarak bulunmuştur. Çağlayan'ın bulduğu bu oranlar bizim yapmış olduğumuz çalışmadaki oranlarla uyuşmamaktadır. Bunun nedeninin ise Çağlayan'ın ve bizim üzerinde çalıştığımız hasta sayısı ile alakalı olduğu düşünülmektedir.

Çalışma süresince çeşitli kliniklerden gönderilen ve çalışmamıza dahil edilen hastalar içinde kadınlar %78,1 oranıyla daha fazla pozitifliğin görüldüğü grubu oluşturmaktadır. Kadınlarda otoimmün hastalıkların erkeklere oranla daha sık görüldüğü bilinmektedir (85). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonucumuz literatürle uyumludur.

Ülkemizde Us ve ark. (86) yapmış olduğu bir çalışmada immüno blot yönteminin anti-ENA antikorlarının saptanmasında kullanılabilir bir yöntem

olduğunu bildirmişlerdir. Ancak çalışmada farklı bir yöntemle karşılaştırma yapılmadığı için özgüllük ve duyarlılıkları hakkında bir yorum getirilmemiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında Kasım 2002 - Ağustos 2003 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada (87) ANA araştırılmasında IFA yönteminin temel yöntem olarak kullanılmasının duyarlılığı artırdığı ve immüno blot yönteminin ise özgül otoantikorların belirlenmesinde kullanılmasıyla alt grupların saptanarak hastalığın kesin tanısını koymaya yardımcı olacağı belirtilmiştir. Böylece ANA pozitifliğinin yanında özgül antikorların da belirlenmesinin hastalıkların ayırt edilmesi ve hastalık şiddetinin takibine yararlı olacağı düşünülmektedir.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında Ekim 2002- Haziran 2004 döneminde yapılan bir çalışmada IFA yöntemi ile 208 pozitif, 313 negatif olarak saptanan toplamda 521 hasta serumunda anti-ENA çalışılmıştır (88). Elde edilen sonuçlara bakıldığında pozitif hastaların 126'sı (%60,5), negatif hastaların ise 4'ü (%1,3) anti-ENA pozitif olarak tespit edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada IFA yöntemi ile 160 (%28,6) pozitif, 399 (%71,4) negatif olarak saptanan toplamda 559 hasta serumunda anti-ENA çalışılmıştır. Pozitif hastaların 98'i (%61,3), negatif hastaların ise 92'si (%48,4) anti-ENA pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında bizim çalışmamız uyumlu gözükmemektedir. Bunun nedeni ENA testlerinde kullanılan antijen miktarıyla ilişkili olabilir. Kocaeli Üniversitesinde kullanılan ENA testi 13 ag içerirken bizim kullandığımız test 7 antijen içermektedir. Antigen sayısının fazlalığı farklı antikorları yakalama imkanı sunarak avantaj sağlamaktadır.

IFA yönteminde değerlendiren kişinin bilgi ve deneyimi test sonuçlarının geçerliliğini büyük ölçüde etkilemektedir. İmmüno blot testi, nükleer antijenlere karşı gelişen antikorların subtiplerini birbirinden ayırarak bu grupları belirleyebilmeyi sağlamak amaçlı kullanılır. Çalışmamızda IFA negatif hastalarda anti-ENA pozitifliğinin yüksek çıkmasının sebebi IFA yöntemi uygulanırken yapılan teknik hatalardan kaynaklandığı, düşük titreli pozitifliklerde negatif olarak değerlendirilmiş

olabileceği düşünölmektedir. Ayrıca değerdendiren kişiler değıştikçe çıkan sonuçlar arasında farklılıklar görölebilmektedir.

6. SONUÇLAR

1. ANA pozitifliğinin belirlenmesi tek başına yeterli değildir.
2. ANA pozitifliğinin yanında titre ve paternler de dikkate alınarak anti-ENA antikorlarının araştırılması için uygun testler seçilmelidir.
3. İmmüno blot tekniği birçok farklı alt grubun birbirinden ayırt edilmesini sağlamaktadır.
4. İmmüno blot tekniği uygulanması ve değerlendirmesi kolay olduğu için kısa sürede sonuç alınabilmektedir.
5. İmmüno blot tekniği sonuçların tamamen kalitatif olması ve çok fazla elde edilen pozitifliğin diğer testler ile doğrulanamaması önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.
6. IFA testinde sonuçların değerlendiren kişilere göre değişme olasılığı yani yorum farklılığı görülebilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Ruacan Ş.** Otoimmünite. In: Ustaçelebi Ş. Eds. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**: 245-249.
2. **Terzioğlu E.** Self Tolerans ve Otoimmünite. In: Gümüşdiş G, Doğanavşargil E. Eds. Klinik Romatoloji Kitabı. İstanbul: Deniz Matbaası, **1999**: 55-57.
3. **Kılıçkaya T.** Self Tolerans ve Otoimmünite. In: Kılıçturgay K. Eds. İmmünoloji Kitabı. Nobel & Güneş Kitabevi Motif Matbaacılık, **2003**: 241-261.
4. **Kamradt T, Mitchison NA.** Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*, **2001**; 344: 655-664.
5. **Abul K, Abbas AK ve Lichtman AH.** Temel İmmunoloji. In: Camcıoğlu Y ve Deniz G. Eds. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, **2007**: 1-5.
6. **Erer Özbek S.** Otoimmün Nörolojik Hastalıkların Neden Olduğu Hareket Bozuklukları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2010**; 36 (3): 127-133.
7. **Nemazee D.** Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rew Immunol*, **2000**; 18: 19-51
8. **Sebik F, Sin A.** Otoimmün Hastalıklarda Tedavi Yaklaşımları. *Türkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol*, **2003**; 3 (1): 47-58.
9. **Shi G, Zhang J, Zhang Z, Zhang X.** Systemic Autoimmune Diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, **2013**.
10. **Von Mühlen CA, Tan EM.** Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **1995**; 24 (5): 323-358.
11. **Us DE.** Antinükleer Antikorlar ve Hastalıklarla İlişkileri. *Mikrobiyol Bült*, **1992**; 26: 379-389.
12. **Chan EKL, Pollard KM.** Detection of autoantibodies to ribonucleoprotein particles by immunoblotting. In: Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM. Eds. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 5th Ed., Washington DC: ASM Press, **1997**: 928-934.
13. **Kokuludağ A.** Otoantikorların Doğru Kullanımı. 7. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, **2005**.
14. **Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al.** International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*, **2013**; 0: 1–7.

15. **Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al.** Range of Antinuclear Antibodies in “Healthy” Individuals. *American College of Rheumatology*, **1997**; 40 (9): 1601-1611.
16. **Birlik AM.** Antinükleer Antikorların Klinikteki Kullanımı. *Türkiye Klinikleri J Rheumatol-Special Topics*, **2013**; 6 (2).
17. **Baskın Y, Afacan G, Erkunt SS, Yiğitbaşı T.** Sistemik Otoimmün Hastalıkların Tanısında Yeni Bir Yöntem: Multipleks Test Sistemi ve Yöntem Performansları. *Türk J Biochem*, **2008**; 33 (1): 19-24.
18. **Copple SS, Giles SR, Jaskowski TD, Gardiner AE, Wilson AM, Hill HR.** Screening for IgG Antinuclear Autoantibodies by HEp-2 Indirect Fluorescent Antibody Assays and the Need for Standardization. *Am J Clin Pathol*, **2012**; 137: 825-830.
19. **Yılmaz Ö, Karaman M, Ergon MC, Bahar İH, Yuluğ N.** Antinükleer Antikorların Saptanmasında İndirek İmmüno Floresan ve Enzim İmmün Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült*, **2004**; 38: 85-90.
20. **Karakeçe E, Atasoy AR, Çakmak G, Tekeoğlu İ, Harman H, Çiftçi İH.** Bir Üniversite Hastanesinde Antinükleer Antikor Pozitiflikleri. *Türk J Immunol*, **2014**; 2 (1): 5-8.
21. **Kılıçturgay K.** İmmünolojiye Giriş. 2.Baskı, Bursa: Güneş Kitabevi, **1991**.
22. **Masllorens FO.** Autoimmune disease and physiological autoimmunity: recognition of self. *Allergol Immunol Clin*, **2000**; 15: 5-12.
23. **Çağlayan ES.** Anti nükleer antikorların farklı yöntemlerle bakılması ve alt gruplarının karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon, **2006**: 61.
24. **Naik S.** The immunological basis for autoimmunity. *J Indian Rheumatol Assoc*, **2004**; 12: 22- 28.
25. **Addams D.** How the immun system works and why it causes autoimmun disease. *Immunol Today*, **1996**; 17: 300-302.
26. **Akşit F.** Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. In: Serter N. Eds. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Web-Ofset Tesisleri, **2006**.
27. **Silverstein AM.** A history of immunology. San Diego: Academic Pres, **1989**.
28. **Coombs RRA, Mourant AE, Race RR.** A new test for the detection of weak and ‘incomplete’ Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol*, **1945**; 26: 255-266.
29. **Rose NR, Witebsky E.** Studies on organ specifity V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyorid extracts. *J Immunol*, **1956**; 76: 417-427.

30. **Walsh SJ, Rau LM.** Autoimmune disease: a leading cause of death among young and middle-aged women in the United States. *Am J Public Health*, **2000**; 90: 1463-1466.
31. **Cooper GS.** The epidemiology of autoimmune diseases: Contributions of previous studies and opportunities for future research. In: Conrad K, Fritzler M, Sack U, Shienfeld Y Eds. *From Proteomics to Molecular Epidemiology: Relevance of Autoantibodies*. 6th Ed., Dresden: Dresden Symposium on Autoantibodies; **2002**: 582-603.
32. **Kyvik KO, Nystrom L, Gorus F, Songini M, Barak L, Burton P et al.** Incidence of type 1 diabetes in young adult across Europe- an EU funded multicentre study (IDA). *Diabetologia*, **2001**; 44: A75.
33. **Ostrauskas K, Zalinkevicius R, Norkus A.** Incidence of Type 1 diabetes mellitus over eight consecutive year among 15-39 year aged Lithuanian population. *Diabetologia*, **2001**; 44: A96.
34. **Cooper GS, Parks CG, Treadwell EL.** Differences by Race, Sex, and Age in the Clinical and Immunologic Features of Recently-Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus Patients in the Southeastern United States. *Lupus*, **2002**; 11: 161-167.
35. **Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM.** The incidence of thyroid disorders in the community: A twenty-year follow-up of the Whickham survey. *Clin Endocrin*, **1995**; 43: 55-68.
36. **Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E.** Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Care*, **2000**; 23: 1516-1526.
37. **Rosati G.** The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*, **2001**; 22: 117-139.
38. **Akkrāju S, Ho WY, Leong D, Canan K, Davis MM, Goodnow CC.** A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity*, **1997**; 7: 255-271.
39. **Kouskoff V, Lacaud G, Nemazee D.** T cell-independent resource of B lymphocytes from peripheral immune response. *Science*, **2000**; 287: 2501-2503.
40. **Fagarasan S, Honjo T.** T-independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*, **2000**; 290: 89-92.
41. **Fritzler MJ, Wiik A, Fritzler ML, Barr SG.** The use and abuse of commercial kits used to detect autoantibodies. *Arthritis Res Ther*, **2003**; 5 (4): 192-201.
42. **Scofield RH.** Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet*, **2004**; 363: 1544-1546.
43. **Gülmezoğlu E, Ergüven S.** *İmmünoloji*, Ankara: Hacettepe Taş Yay., **1994**: 233-244.
44. **Yeğin O.** *Temel İmmünoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları*. Antalya: Akdeniz Üniversitesi Basımevi, **1992**: 255-264.

45. **O'Dell JR.** Rheumatoid arthritis: The clinical Picture. In: Koopman WJ. Eds. Arthritis and Allied Conditions. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2001**: 1157-1186.
46. **Erdem F, Koç B, Sarıkaya S, Uçar M, Yazıcı S, Boyraz İ, et al.** Epicardial fat thickness in patients with rheumatoid arthritis. *African Health Sciences*, **2015**; 15 (2).
47. **Theofilopolus AN.** Autoimmunity. In: Stites DP, StoboJD, Wells JW. Eds. Basis & Clinical Immunology. 6th Ed., USA: Appleton & Lange, **1987**: 128-158.
48. **Yan J, Shang X, Rong X.** Relationship between IL-27 gene polymorphism and susceptibility of rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Int J Clin Exp Med*, **2015**; 8(4): 6262-6266.
49. **Özgüler Y, Melikoğlu M.** Sistemik Lupus Eritematozus: Klinik Bulgulara Genel Bakış. *Türkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol*, **2011**; 4 (3): 1-10.
50. **Egner W.** The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol*, **2000**; 53: 424-432.
51. **Sinico RA.** The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol*, **2002**; 6: 20-27.
52. **Maria NI, Vogelsang P, Versnel MA.** The clinical relevance of animal models in Sjögren's syndrome: the interferon signature from mouse to man. *Arthritis Res Ther*, **2015**; 17: 172.
53. **Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE.** Pathogenesis of systemic sclerosis. *Front. Immunol*, **2015**; 6: 272.
54. **Yeral M, Yüksel A, Sığanık A, Polat H, Alev A.** Dermatomiyozi: Bir Olgu Sunumu. *İstanbul Tıp Dergisi*, **2005**; 4: 50-52.
55. **Çelikkilek N, Özdem B, Açıkgöz ZC.** Evaluation of Anti-Nuclear antibody test results in clinical practice. *J Microbiol Infect Dis*, **2015**; 5 (2): 63-68.
56. **Fenger M, Wiik A, Hoiler-Madsen M, Lykkegaard JJ, Rozenfeld T, Hansen MS, et al.** Detection of Antinuclear Antibodies by Solid-Phase Immunoassays and Immunofluorescence Analysis. *Clin Chem*, **2004**; 50 (11): 2141-2147.
57. **Tan EM.** Autoantibodies, autoimmune disease, and the birth of immune diagnostics. *J Clin Invest*, **2012**; 122 (11): 3835-3836.
58. **Fernandez MF, Mattioli M.** Antinuclear antibodies: immunologic and clinical significance, Seminars in *Arthritis and Rheum*, **1976**; 6 (2): 83-124.
59. **Kumar Y, Bhatia A, Walker Minz R.** Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagnostic Pathology*, **2009**; 4: 1.

60. **Van Boekel MAM, Vossenaar ER, Van den Hoogen FHJ, Van Venrooij W.** Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res*, **2002**; 4: 87-93.
61. **Şener S, Şenol M.** Dermatoloji’de Otoantikörler. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **2008**; 6 (2): 105-115.
62. **Mongey AB, Hes EV.** Antinuclear Antibodies and Disease Specificity. In: Stollerman GH, LaMont JT, Leonard JJ et al. Eds. *Advanced in Internal Medicine*. USA: Mosby Year Book, **1991**: 151-165.
63. **Bernstein RM, Hobbs RN, Lea DJ.** Patterns of antihistone antibody specificity in systemic rheumatic disease, systemic lupus erythematosus, MCTD, primary sicca syndrome and rheumatoid arthritis with vasculitis. *Arthritis Rheum*, **1985**; 28: 285-293.
64. **Earnshaw W.** Three Human Chromosomal Autoantigens Are Recognized by Sera from Patients with Anti-centromere Antibodies. *J Clin Invest*, **1986**; 77: 426-430.
65. **Keser G.** Romatolojik Hastalıkların Tanısında Hematolojik, Biyokimyasal ve Serolojik İncelemeler. In: Gümüşdiş G, Doğanavşargil E. Eds. *Klinik Romatoloji*. İstanbul: Deniz Matbaası, **1999**: 147-159.
66. **Wiik AS, Madsen MH, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J.** Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using Hep-2 cells. *Journal of Autoimmunity*, 2010; 35: 276-290.
67. **Bradwell AR, Huhges and Hardel EL.** Atlas of Hep-2 Pattern. 2nd Ed., UK: Drapkins & Co. Birmingham, **2003**.
68. **Isenberg D, Maddison P, Was P, Glass D, Breedveld F.** Oxford Textbook Of Rheumatology. 3th Ed., UK: Oxford University Pres, **2005**: 491-493.
69. **Doğanavşargil E, Gümüşdiş G.** Klinik Romatoloji El Kitabı. Güven Kitabevi, **2003**.
70. **Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA.** Guidelines for Clinical Use of Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Arch Pathol Lab Med*, **2000**; 124: 72-81.
71. **Copple SS, Sawitzke AD, Wilson AM, Tebo AE, Hill HR.** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Screening Then Indirect Immunofluorescence Confirmation of Antinuclear Antibodies. *Am J Clin Pathol*, **2011**; 135: 678-684.
72. **Ardeniz Ö.** Otoimmün Karaciğer Hastalıklarında Antinükleer Antikörlerin Değerlendirilmesi ve Klinik Uygulamadaki Yeri. *Güncel Gastroenteroloji*, 2006; 10 (2): 187-193.
73. **Imboden J, Stone J, Hellman D.** Current Rheumatology Diagnosis & Treatment. Çeviri: Arasıl T. Lange Medical Books. **2006**: 18-20.
74. **Emerk K.** Romatizmal hastalıklarda laboratuvar bulguları. In: Tuna N. Eds. *Romatizmal Hastalıklar*. İstanbul: Taş Yay., **1994**: 51-87.

75. **Chan EKL, Pollard KM.** Autoantibodies to Ribonucleoprotein Particles by Immunoblotting. In: Rose NR, Demarcio EC et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington, DC: ASM pres, **1992**: 755-761.
76. **Jitsukawa T, Nakajima S, Usui J, Watanabe H.** Detection of anti-nuclear antibodies from patients with sistemic rheumatic diseases by ELISA using Hep-2 cell nuclei. *J Clin Lab Analysis*, **1991**; 49-53.
77. **Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM.** Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune disease in the United States. *Clin Immunol Immunopathol*, **1997**; 84: 223-243.
78. **Rioux JD, Abbas AK.** Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature Publishing Group*, **2005**; 435: 584-589.
79. **Bradwell AR.** Immunofluorescent antinuclear antibody tests. In: Rose NR. Eds. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th Eds. Washington, DC: ASM Pres, **2002**: 922.
80. **Prelog M.** Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity. *Autoimmune Reviews*, **2005**; 5: 136-139.
81. **Gündüz G.** Romatoid artritli hastalarda akciğer tutulumu ile klinik ve laboratuvar bulgular arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul: **2007**.
82. **Aitcheson CT, Peebles C, Joslin F and Tan EM.** Characteristics of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. Reactivity of rheumatoid factor with a histonedependent nuclear antigen. *Arthritis Rheum*, **1980**; 23(5): 528-538.
83. **Cordonnier C, Meyer O, Palazzo E, Bandt MD, Elias A, Nicaise P, et al.** Diagnostic value of anti-RA33 antibody, anti keratin antibody, anti perinuclear antibody and anti nuclear antibody in early rheumatoid arthritis: comparison with rheumatoid factor. *Bri J Rheumatol*, **1996**; 35: 620-624.
84. **Berkem R, Gümüş T, Karakoç E, Acar N.** Antinükleer Antikorların Saptanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült*, **2003**; 37: 171-178.
85. **Fairweather D, Rose NR.** Women and Autoimmune Disease. *Emerging Infectious Disease*, **2004**; 10: 2005-2011.
86. **Us DE, Şener B, Haşcelik G, Günalp A.** Sistemik Lupus Eritematosus'lu Hastalarda Ekstrakte Edilebilir Nükleer Antijenlere Karşı Antikor (Anti-ENA) Varlığının İmmunoblot Yöntemiyle Araştırılması. *Mikrobiyol Bült*, **1997**; 31: 155-163.
87. **Aktepe OC, Altındış M, Çetinkaya Z, Çiftçi İH, Çetinkol Y.** Afyon Bölgesinde Antinükleer Antikorların Dağılımı. XVII. Ulusal İmmünoloji Kongresi Kitabı, **2003**; 251: 34.
88. **Yumuk Z, Çalışkan Ş, Gündeş S, Willke A.** Antinükleer Antikorların (ANA) Araştırılması ve Saptanmasında Kullanılan Teknikler. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2005**; 35: 40-44.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kadriye ERKE 01.01.1989 tarihinde Ankara’da doğdu. İlkokulu Ankara’da Nuh Eskiyan İlköğretim Okulu’nda, liseyi Niğde’de Özel Sungurbey Koleji’nde tamamladı. 2006 yılında girdiği Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji (İngilizce) Bölümünden Haziran 2011’de mezun oldu. 2011 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.