TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİSTEMİK SKLEROZLU HASTALARDA TOPOİSOMERAZ I' E KARŞI OLUŞAN ANTİKORLARIN IFA YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI

Noushin ZIBANDEH

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK

2013-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİSTEMİK SKLEROZLU HASTALARDA TOPOİSOMERAZ I' E KARŞI OLUŞAN ANTİKORLARIN IFA YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI

Noushin ZIBANDEH

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK

2013-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Çevresinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.02.2013

Prof. Dr. Ümit ÖLMEZ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nurşen DÜZGÜN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Devran GERÇEKER
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Türker DUMAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ii
İçindekiler iii
Önsöz vi
Simgeler ve Kisaltmalar vii
Şekiller ix
Çizelgeler x

1. GİRİŞ 1
1.1. Sistemik Sikleroz 1
1.1.1 Sınıflandırma 2
1.1.2. Epidemiyoloji 4
1.1.3. Etiyopatogenez 4
1.1.4. Klinik Bulgular 8
1.2. Otoimmünite, Otoantikorlar ve Otoimmün Hastalıklar 10
1.2.1. Anti Nükleer Antikor (ANA) 13
1.2.3. ANA IFA Testinde Hücre Çekirdeğinde Gözlenen Boyanma Şekilleri ve Hastalıklar İle İlişkileri 15
1.2.4. ANA IFA Testinde Hücre Sitoplazmasında Gözlenen Boyanma Şekilleri ve Hastalıklar İle İlişkileri 17
1.3. Sistemik Skleroz'da oluşan spesifik antikorlar 18
1.3.1. Anti sentromer antikor (CENP) 18
1.3.2. Topoisomeraz- I (Scl-70) Antikoru 19
1.3.2.1. Topoisomerazlar ve Anti Topoisomeraz I Antikorun Epitop Haritası 22
1.3.3. Anti-RNA polimeraz I, II, III 23
1.3.4. Th/To Antikorları 24
1.3.6. U11/U12RNP Antikorları 25
1.3.7. B23/Nucleophosmin/Numatrin Antikorları 25
1.4. Diğer SARD İle İlgili Olan Otoantikorlar 25
1.4.1. Ro52/TRIM21, SS-A/Ro60 ve SS-B/La Otoantikoru 25

1.4.2. U1RNP Antikorlar 26
1.4.3. Nükleozom, Histon, Yüksek Hareketli Protein Antikorları 26
1.4.4. Ku Antikorları 27
1.4.5. Polymyositis/Skleroderma (Anti-PM/Scl) Antikorları 28
1.4.6. Human Upstream Binding Factor (Anti-hUBF, Yaygın Bilinen İsmi Anti-NOR 90) Antikorları 28
1.4.7. Nükleer Membran ve Nükleer Gözenek Kompleksine Karşı Antikorlar 28
1.5. Sistemik Sklerozda Görülen diğer Otoantikorlar 29
1.5.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktör Reseptör (PDGFR) Antikorları 29
1.5.2. Endotelyal Hücre Antikorları (AECA) 29
1.5.3. Fibroblast Antikorları (AFA) 29
1.5.4. Otoimmün Karaciğer Hastalıklarıyla İlişkili Otoantikorlar 30
1.5.5. Anti-Nötrofil Sitoplazmik Antikor (ANCA) 30
1.5.6. 2 β2 Glikoprotein I (anti- β2GPI) Antikoru 30
1.5.7. GW Cisimcik Antikorları 30
1.5.8. Survivin Antikorlar 31
1.5.9. Aktif Transkripsiyon Faktör-2 (anti-ATF-2) Antikorları 31
1.6. İstatiksel Analiz 33
1.6.1. ROC Analizi 33
1.6.2. ROC eğrisi altında kalan alan 33
2. GEREÇ VE YÖNTEM 35
2.1. Gereç 35
2.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması 35
2.1.2. Sistemik Skleroz Hasta ve Kontrol Grupları 35
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Laboratuar Cihazları 35
2.2.1. İndirekt İmmün Floresans (IFA) Yönteminin Uygulanması ve Prensibi 36
2.2.2. Floresans Mikroskobik Değerlendirme 38
2.2.3. Hep-2 Westernblot (WB) Test Yönteminin Uygulaması ve Prensibi 39
2.2.4. Scl-70 Antikorunun ELISA Yöntemiyle Tayini 42
3. BULGULAR 45
3.1. Sistemik Skleroz Hasta Grubu ANA, IFA, ELISA ve WB Sonuçları 45
3.2. ROC Curve İstatistiği 53

3.3. Sistemik Sklerozlu Hastalarının Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Çalışma Değerlendirilmesi 54
4. TARTIŞMA 58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 63
ÖZET 64
SUMMARY 65
KAYNAKLAR 66
ÖZGEÇMİŞ 78

ÖNSÖZ

Çalışmamızda, 93 sistemik skleroz'lu hasta serum örneği ve 90 olguluk kontrol grubu serum örneklerinde topoisomeraz I'e karşı oluşan antikorların özgün boyanma modeli gösterip göstermediği ve şayet özgün boyanma modeli gösteriyorsa bunun nasıl tanımlanabileceğini, ELISA, Hep-2 WB gibi daha spesifik tanı yöntemleriyle karşılaştırarak tespit etmeyi amaçladık.

Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK'a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ümit ÖLMEZ'e, teorik ve pratik konularda desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Türker DUMAN , Prof. Dr. Fulya İLHAN, Doç. Dr. Yasemin YAVUZ GENÇ ve Dr. Orhan KÜÇÜKŞAHİN'e teşekkürü borç bilirim .

Tez çalışmamın; pratik aşamasında yardımcı olan Bio. Rahime AKSOY'a, Laborant Necibe ASLAN, Laborant Çiğdem GENÇDOĞAN, yazım aşamasında yardımcı olan Bio, Özgün BAĞLAN'a, yüksek lisans eğitimin süresince sıcaklıklarını ve ilgilerini daima hissettiğim A. Ü. İbn-i Sina Hastanesi İmmünoloji Laboratuarı çalışanlarına ve emeği geçen tüm diğer dostlarıma tesekkür ve şükranlarımı sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca koşulsuz desteklerini hissettiğim, sevgilerini ve sabırlarını benden esirgemeyen sevgili annem; Farah BAGHERI, canım babam; Biyouk ZIBANDEH ve ablam Shirin ZIBANDEH'e çok teşekkür ederim.

Ankara İç Hastalıkları Araştırma ve Geliştirme Derneği'ne projeye verdiği destekten dolayı teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

µl	Mikro**l**itre
ACA	Anti Centromer Antibody
ACR	American College of Rheumatology
AECA	Anti Endothelial Cell Antibody
AFA	Anti Fibroblast Antibody
ALBIA	Addressable Laser Bead Immunassays
ANA	Anti Nükleer Antikor
ANCA	Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody
ATA	Anti Topoisomerase Antibody
ATF	Active Transcription Factor
CCP	Cyclic Citrulinated Peptid
CENTP	Centromer Protein
CREST	Calcinosis cutis, Raynaud phenomenon, Esophageal Dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia
dcSSc	Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GWB	GW Body
Hep-2	Human Epithelial Cell line 2000
HLA	Human Leukocyte Antijen
IFA	İndirekt İmmün Floresans Assay
Ig	Immünglobulin
kDa	KiloDalton
lcSSc	Limited Cutaneous Systemic Sclerosis
MCDT	Mixed Connective Tissue Disease
ml	Mililitre
MRP	Mitokondrial RNA Processing
NOR	Nucleolar Organiser
PBS	Primary Billary Cirrhosis
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor

RA	Rheumatoid Arthritis
ROS	Reactive Oxygen Species
RP	Raynaud Phenomenon
SARD	Systemic Autoimmune Rheumatic Disease
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SSc	Sistemik Skleroz
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
WB	WesternBlot
β_2GP I	β_2 Glicoprotein I

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Sklerodermanın Farklı Evrelerinde Oluşan Hasar 7
Şekil 1.2. Anti- Sentromer IFA Pozitif Görüntüleri a. Hep 20-10 Hücresi b. Maymun Karaciğer Doku Kesiti. 19
Şekil 1.3. Anti Topoisomeraz I (Scl-70) Westernblot'da Oluşturduğu Görüntüsü.... 20
Şekil 1.4. ANA (IFA) Testinde Anti Topoisomeraz I (Scl-70) Pozitifliği a. HEp-2010 Hücresinde b. Maymun Karaciğer Doku Kesitinde. 21
Şekil 1. 5. Topoisomeraz I Enzim Epitop Haritası 23
Şekil 1.6. Roc Eğriside Üç Kurumsal Diagnostik Doğruluk Durumu. A çizgileri: Altın Standard, AUC:1 (İdeal Test, Tanı Koydurucu Test Prosedürleri %100 Duyarlılık Ve %100 Özgüllüktedir), B çizgileri: 0,85 (Makul test), C Çizgileri: AUC: 0,5 Rastgele Değişim, Diagnostik Prosedürün Prediktif Değeri Yok. 34
Şekil 3.1. SSc'li Hasta Grubunda Scl-70 ELISA Yöntemi ROC Eğirisi (Eğri Altındaki Alan, AUC = 0.954 P=0.000) 53
Şekil 3.2. SSc'li Hasta Grubunda Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) 'da Pozitif Bant Tespit Edilen 1(1), 2(2), 4(4), 5(7), 6(9), 7(11), 8(12), 9(13), 11(12),12(13), 13(14), 14 (19), 15(27), 16(28) Serum Örnekleri ve Bant Tespit Edilmeyen 3 (3),10(5) Serum Örneklerinin WB Çalışma Görüntüleri 54
Şekil 3.3. SSc'li Hasta Grubunda Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) 'da Pozitif Bant Tespit 2(29), 4(30), 5(33), 6(35), 7(36), 8(37), 9(39), 11(42),12 (43), 13(47), 14(51), 15(52), 16(59) Serum Örnekleri ve Bant Tespit Edilmeyen 3(15),10 (16) Serum Örneklerinin WB Çalışma Görüntüleri .. 55
Şekil 3.4. SSc'li Hasta Grubu Serumlaında Scl-70 Boyanma Modeli Gösteren 12, 26,27,33,35,40,42,48,61,62,67,84 No Örneklerine Ait Zeiss, Eurostar II Floresans Mikroskopunda Digital Kamera Sisteminde Çekilen Hep-20-10 ve Karaciğer IFA Görüntüleri 56
Şekil 3.5. SSc'li Hasta Grubu Serumlaında Scl-70 ve Sentromer Boyanma Modeli Gösteren 47, 49, 51, 52, 59, 60, 74, 78, 79, 81, 84, 86 No Örneklerine Ait Zeiss, Eurostar II Floresans Mikroskopunda Digital Kamera Sisteminde Çekilen Hep-20-10 ve Karaciğer IFA Görüntüleri ... 57

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Amerikan Romatoloji Derneğinin Sistemik Skleroz'lu Hastalar İçin Oluşturduğu Tanı/Sınıflandırma Kiriterleri 2
Çizelge 1.2. Skleroderma Hastalığının Sınıflandırılması (Şentürk, 2010)..... 4
Çizelge 1.3. Sistemik Ve Organ Spesifik Hastalıklarda Otoantikorların Oluştuğu Otoantijenler (Scolfield, 2004)..... 13
Çizelge 1.4. Sistemik Sklerozlu Hastalara Özgü Otoantikorların Farklı Etnik Gruplardaki Dağılımı (Rodriguez-Reyna, 2011) 18
Çizelge 1.5. Topoisomeraz Enzimleri Alt Tipleri (Czömpöly ve ark. 2009)..... 22
Çizelge 1.6. Sistemik Sklerozlu hastalarda Bulunan Klasik ve Yeni Otoantikorlar (Gabrielli,2009) 32
Çizelge 2.1. Tarama Testi ve Doğrulama Testi Arasındaki Benzerlikler 40
Çizelge 3.1. SSc'li Hasta Grubun'da Kadın –Erkek Oranı, Yaş Aralığı ve Yaş Ortalaması 45
Çizelge 3.2. Kontrol Grubun'da Kadın –Erkek Oranı, Yaş Aralığı ve Yaş Ortalaması 45
Çizelge 3.3. Sistemik Sklerozlu Hasta Grubu ANA IFA Sonuçları 46
Çizelge 3.4. Sistemik Skleroz Hasta Grubunda ANA Boyanma Modelleri, Scl-70 (ELISA) ve WB 100 kDa (nativ Scl-70) Saptanan Olguların Dağılımı 47
Çizelge 3.5. Kontrol Grubu ANA IFA Sonuçları 48
Çizelge 3.6. Kontrol Grubunda ANA Boyanma Modelleri, Scl-70 (ELISA) ve WB 100 kDa (nativ Scl-70) Saptanan Olguların Dağılımı 48
Çizelge 3.7. Sistemik Skleroz Hasta Grubu ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Pozitif Olguların Yüzdesi 49
Çizelge 3.8. Sistemik Sklerozlu 93 Hasta serumunda Scl-70 ELISA Pozitif ve Negatif Örnekleri ile ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Pozitif ve Negatif Örneklerin Karşılaştırılması 49

Çizelge 3.9. Sistemik Sklerozlu 93 Hasta Serumunda ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Pozitif ve Negatif Örnekler ile Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Pozitif ve Negatif Örneklerin Karşılaştırılması 50
Çizelge 3.10. Sistemik Sklerozlu 93 Hasta Serumunda Scl-70 ELISA Pozitif ve Negatif Örnekleri ile Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Pozitif ve Negatif Örneklerin Karşılaştırılması 50
Çizelge 3.11. Kontrol Gurubunda Serum ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Gösteren Örneklerle Scl-70 ELISA Pozitif ve Negatif Örneklerle Karşılaştırılması 51
Çizelge 3.12. Kontrol Gurubunda Serum ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Gösteren Örneklerle Hep-2 WB Pozitif ve Negatif Örneklerle Karşılaştırılması 51
Çizelge 3.13. Kontrol Gurubunda Scl-70 ELISA Pozitif ve Negatif Örnekleri ile Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Pozitif ve Negatif Örneklerin Karşılaştırılması 52
Çizelge 3.14. Sistemik Sklerozlu Hastalarda ve Kontrol Gurubunda ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli, Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Sonuçları 52
Çizelge 3.15. ANA IFA Scl-70 boyanma modeli ve Scl-70 ELISA Yöntemlerinin Duyarlılığı ve Özgüllüğü 53

1. GİRİŞ

1.1. Sistemik Sikleroz

Sistemik sklerozis (SSc) veya skleroderma etyolojisi bilinmeyen nadir bir bağ dokusu hastalığıdır. Skleroderma kelimesi Yunanca sıkı anlamında ‘‘skleroz’’ ve deri anlamında ‘‘derma’’ kelimelerinden oluşur ve hastalıkta görülen derinin kronik sertleşmesi ve kalınlaşmasını tanımlar. Sistemik Sklerozun klinik bulguları küçük bölgeleri etkileyen lokalize deri lezyonlarından (lokalize skleroderma), multipl organ sistemlerini tutan sistemik tutuluma (diffüz skleroderma) kadar değişir. Sistemik skleroz damarlar, deri, sinovya, iskelet kası ve iç organlarda değişikliklere yol açan inflamasyon veya fibrozis ile karakterizedir. Morbidite ve mortalite organ veya sistem tutulumuna bağlıdır. Sistemik belirtilerin çoğu için zamanında uygulandığında efektif tedaviler vardır, bu yüzden erken tanı ve tedavi önemlidir (Steen, 2008).

Amerika Birleşik Devletlerinde hastalığın sıklığı 1/4000'dir. Bayanlarda erkeklere nazaran daha sıktır ve bu oran 1/4 gibidir. Ayrıca siyah amerikalıların beyazlara göre hastalığa daha çok yatkınlık gösterdikleri görülmüştür (Opitz ve ark, 2011; Barnes ve Mayes, 2012).

1980 yılında Amerikan Romatoloji Derneği (American college of rheumatology, ACR) sistemik skleroz hastalığı için yeni bir tanı klavuzu oluşturdu ve bu hastalığı systemic autoimmune rheumatic disease (SARD) dan tamamen ayrılması gerektiğini savundu (Masi ve ark, 1980). Bu klavuzdaki SSc tanı/sınıflandırma kriterleri çizelge 1.1’ de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Amerikan Romatoloji Derneğinin Sistemik Skleroz'lu Hastalar İçin Oluşturduğu Tanı/Sınıflandırma Kiriterleri

Majör kriterleri yada 2 minör kesin tanı için yeterli	
Major kriterler	Parmaklarda ve Metokarpofalingeal eklemlerin proksimalinde ciltte simetrik kalınlaşma, sertleşme ve endürasyon bulunması. (yüz, boyun ve gövdeyi etkileyebilir)
Minor kriterler	1- Sklerodaktili 2- Digital 'pitting', skar veya pulpa atrofisi 3- Bibaziler pulmoner fibroz

1.1.1 Sınıflandırma

Skleroderma ile ilişkili hastalıkların en basit ayrımı hastalığı lokalize ve sistemik formu olarak ayırmaktır:

I. Lokalize Skleroderma: kendi içinde 3 ayrı klinik alt gruba ayrılır:

1. Linear skleroderma: Sıklıkla çocuklukta görülür ve genelikle dermatomal bir dağılım içinde deri ve subkutan dokunun sklerozuna neden olur.

2. Morfea: Lokalize veya yaygın şekilde, daha önce normal olan gövde veya ekstremite bölgelerinde gelişen sklerotik deri yamaları ile karakterizedir. Yaygın deri tutulumu olan vakalar diffüz sklerodermadan ayrılmalıdır. SSc'dan farklı olarak yaygın morfea da tipik olarak ellere ve yüze yayılır, fakat vasküler semptomlar veya visseral hastalık yoktur.

3. En coup de sabre: Kafaya alınan bir darbe sonucu oluşmuş lezyona benzerliği için bu isim konulmuştur. Yüz veya kafa derisi lezyonları, altta yatan mezenkimal orijinli dokunun belirgin anormalitesi ile birliktedir.

II. Sistemik Skleroz (SSc): Sistemik skleroz terimi, hastalığın sistemik formu için uygun bir isimdir ve genellikle iç organların sık tutulumu bu hastalığın en önemli belirtisidir. Deri lezyonların dağılımı ve birlikte olan iç organ tutulumunun paterni güncel sınıflama sisteminin temelini oluşturur ve SSc 3 alt gruba ayrılır. Vakaların %60 kadarı sınırlı tutulum, %35 kadarı diffüz tutulumu ve az bir kısmı da (%5) sistemik skleroz sine skleroderma denilen ve deri tutulumu olmaksızın iç organ tutulumu ile karakterize olan şeklinde seyreder.

1. Sınırlı kutanöz SSc (lcSSc): Distal ekstremitelerin (dirsek ve dizlerin distali) kutanöz kalınlaşması ile karakterizedir ve gövdesel tutulum olmaksızın yüz ve boynu da tutabilir.
2. Diffüz kutanöz SSc (dcSSc): Yaygın deri sklerozu ve böbrek. Akciğer ve kardiak hastalık gelişimi riski yüksektir. Tanı için temel kriter, deri sklerozunun el bileğinin proksimaline kadar yayılımıdır.
3. Sistemik Skleroderma sine scleroderma: Hastalığın nadir bir formudur. Tipik vasküler bulgular ve iç organ fibrozisi ile birlikte deri sklerozunun olmaması ile karakterizedir. İç organ tutulumuna rağmen prognozu lcSSc'li hastalara benzer.
4. Overlap sendromları: Sistemik lupus eritmatozus (SLE), dermatomyozit veya romatoid artrit (RA) gibi romatizmal hastalıkların belirtileri ile birlikte SSc'nin bazı özellikleri beraber bulunabilirler (Şentürk, 2010). Çizelge 1.2' de skleroderma hastalığının sınıflandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Skleroderma Hastalığının Sınıflandırılması (Şentürk, 2010)

I.	**Lokalize Sikleroderma**
a.	Lineer scleroderma
b.	Morfea
c.	En coup de sabre
II.	**Sistemik Skleroderma**
a.	Limitli tutulumlu sistemik skleroz
b.	Diffüz tutulumlu sistemik skleroz
c.	Sistemik skleroz sine skleroderma
d.	Overlap sendromları

1.1.2. Epidemiyoloji

Sistemik sklerozda hastalığın insidans hızı yetişkinlerde yaklaşık milyonda 10-20, yeni vaka ve prevalans hızı yaklaşık milyonda 28-253 vaka arasında tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalar hastalığın toplumda randomize olarak görülmediği, artmış riske sahip özel bazı grupların olduğunu göstermektedir. Hastalığa eğilimini belirleyen en önemli faktörler yaş, cinsiyet ve etnik durumdur. Diğer kollajen doku hastalıkları gibi, SSc'da kadınlarda daha sıktır ve kadın erkek oranı 3-5/1 gibidir. 15-40 yaş arası kadın hastalarda daha sıktır ve menapoz sonrası azalır. Siyah Amerikalılar insidansı beyazlara göre daha sıktır ve hastalığın başlaması daha erken yaştadır. Ayrıca, bu hastalarda interstisyel akciğer tutulumu ve kötü prognoz ile birlikte, hastalığın diffüz formunun olasılığı daha yüksektir (Chifflot ve ark., 2008).

1.1.3. Etiyopatogenez

Genetik ve çevresel faktörler hastalık gelişiminde etkilidir. Human Leukocyte Antijen (HLA) A1, B8, DR3 ile birlikte DRw52 ve DR5 varlığı ile hastalık gelişimi arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Johnson R. Ve ark., 2002). Anti sentromer antikor varlığı HLA-DQB1*0301 ile, anti topoizomeraz-1 (anti Scl-70) antikor

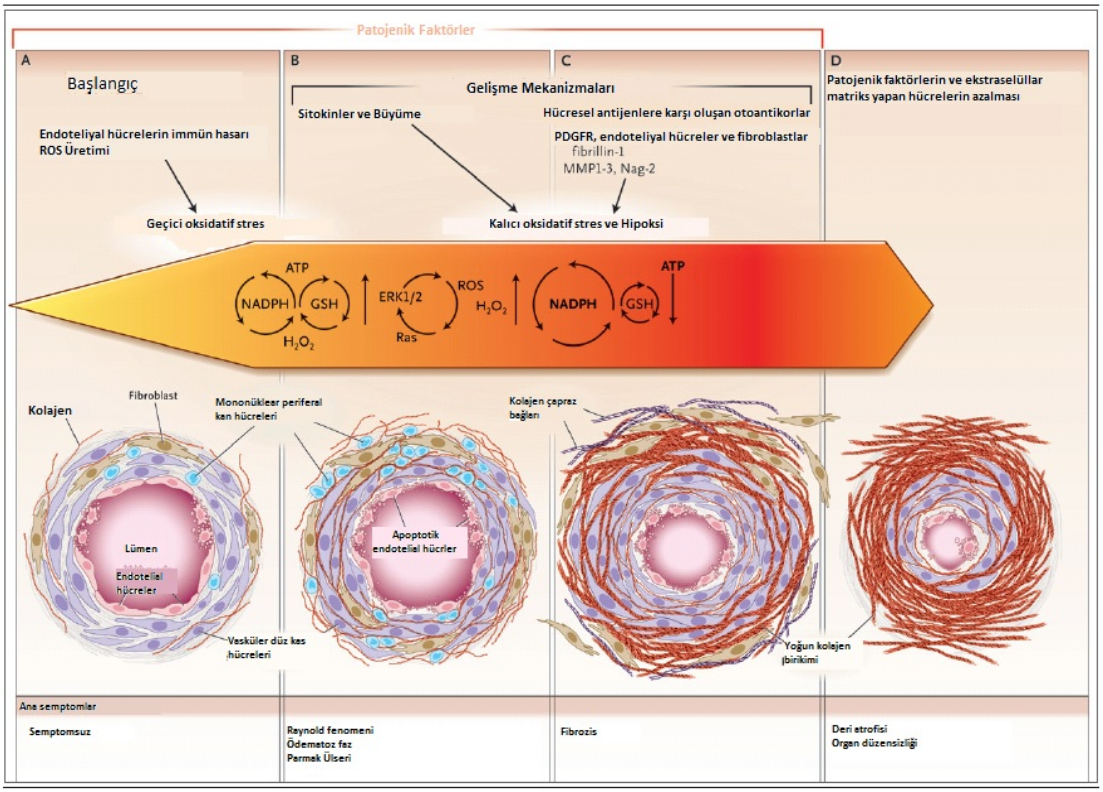
varlığı ise HLA- DRB1, DQB1 ve DPB1 ile ilişkilidir ve DRB1*11 bütün ırklarda bulunan bir markırdır (Reveille J, 1992). Beyaz ve Afriko-amerikalın topluluğunda DRB1*1101, Japon grubunda DRB1*1104 ve beyaz ve İspanyol topluluğunda bu marker DRB1*1502 olarak belirtilmiştir (Reveille ve ark, 2001; Kuwana ve ark, 1993). SSc'lu hastalar ve ailelerinde kromozom kırıklarında artış bildirilmiştir. Fibrilin-1 ve fibronektin genlerinin hastalık gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Sklerodermalı hastaların ailelerinde hastalığın görülme sıklığı artmış olmakla birlikte, ailesel kümelenme belirgin değildir. Çevresel faktörler de hastalık gelişiminde önemlidir. Silika tozları, silikon, organik çözücülerle temas, bleomisin ve vinblastin kullanımı hastalığa neden olabilecek çevresel etkenler arasında sayılmaktadır (Jimenez ve Derk, 2004; Johnson ve ark., 2002).

Sklerodermanın karakteristik özelliği dokularda ekstrasellular matriks artışı ve kollajen birikimidir. Erken dönemde özellikle damar çevresinde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu dikkat çekicidir. Mikrovaskülar alanda görülen patojenik bulgular endotel hücrelerinde apopitoz, intima proliferasyonu, media tabakasında incelme ve trombus oluşumudur (Denton ve Black, 2004).

Skleroderma sürecinin; endotel hasarına ve immün sistem aktivasyonuna yol açan bilinmeyen bir neden tarafından başlatıldığı, endotel, trombosit ve immün hücreler tarafından fibroblastların uyarılması sonucu dokularda artmış kollajen birikimi ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Bu hipoteze göre; immün hücreler, endotel ve fibroblastlardan salınan sitokin ve büyüme faktörleri, patojenik süreçte bir kısır döngü yaratarak hastalığın kronikleşmesine katkıda bulunmaktadır. Mikrovaskulopati, immün sistem aktivasyonu ve fibrozis skleroderma patogenezinin üç temel öğesidir (Denton ve Black, 2004).

Skleroderma patogenezindeki ilk aşama mikrovasküler hasar oluşumudur. Bu hasara endotelyal hücrelerin zarar görmesi, bazal laminanın poliferasyonu, nadirende olsa mononükleer periferal kan hücrelerinin damar duvarı içinde kalmasına, başlangıçtaki damar çevresi mononükleer hücre infiltrasyonu sebep olabilmektedir. Endotel hücreleri artan programlanmış hücre ölümü belirtileri göstermektedir. Bir ya da daha

fazla reaktif oksijen türleri (ROS) tetikleyici ajanlar olarak bu aşamada sorumlu olabilir. ROS vasküler lümende periferal kan hücreleri tarafından veya damar duvarı içinde makrofajlar, endotelyal hücreleri, vasküler düz kas hücreleri veya fibroblastların bir yada birçok zararlı maddeye karşı verdiği cevap sonucu üretilebilir. ROS'un düşük seviyesi normal vasküler fonksiyonlar için gerekli olsada, fazla miktarda bulunması fonksiyonel ve yapısal hasara neden olabilmektedir. ROS'un kontrolsüz üretimini lokal mezankimal hücrelerin, kemotaksisi, proliferasyonu, ekstrasellüler matriks üretimi ve inflamasyonu artıran sitokin ve growth faktörlerinin salımını aktive eder. Otokrin sirkülasyon (Ha-Ras–extracellular-signal–regulated kinases 1 and 2 [ERK1/2] / ROS) sitokin reseptörlerinin azalması ile bağlantılı yüksek ROS seviyelerini sağlayabilmektedir. Damar duvarınının yapısal ve fonksiyonel anormallikleri ve intravasküler değişiklikleri klinik septomları meydana getirirler. Sonraki aşama fibrozis başlangıcıdır. Organın yapısı bozulur ve kan damarları azalmaya başlar. Bu olaylar fibrozisi artıran hipoksiye neden olur. Bir kere tek yada çoklu mezenkimal hücre aktivasyonundan sorumlu mekanizmalar çökerse yada kendileri apoptozu seçerse hastalık kendini göstermeye başlar (Gabrielli ve ark, 2009). Sklerodermanın farklı evrelerinde oluşan hasar Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Sklerodermanın Farklı Evrelerinde Oluşan Hasar (Gabrielli ve ark, 2009)

Endotel hücre hasarının skleroderm gelişmesinde önemli rol aldığı düşünülmektedir. Endotel adezyon molekül ekspresyonu ve geçirgenlik artışı inflamatuvar hücre göçüne neden olur. Hasarlı endotel nedeni ile aktive olan trombositlerden salınan; transforming büyüme faktör-β (TGF-β) ve Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktör Reseptör (PDGF) fibroblastlarda kollajen yapımını uyaran önemli medyatörlerdir. Endotelin ise patogenezde yer aldığı düşünülen ve endotel hücrelerinde sentezlenen önemli bir vazokonstriktördür (Denton ve Black, 2004). Sklerodermada anjiogenezin bozulduğu ve bu durumun lezyonların oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (D'alessio ve ark, 2004).

Sklerodermada hem hücresel hem de humoral immün sistem aktivasyonu vardır (Jimenez ve Derk, 2004; Denton ve Black, 2004). Cilt lezyonlarında CD4+ T hücreleri, akciğerde ise CD8+ T hücreleri belirgin olarak artmıştır (White ve Yurovsky,1995). Sitotoksik T hücreler endotel hasarının gelişiminde rol oynarken , CD4+ T hücreler ise antikor yapımının yanı sıra sitokinler aracılığı ile fibroblast aktivasyonuna neden olmaktadır. Sklerodermalı hastaların %95'inde anti nükleer

antikorun (ANA) pozitif bildirilmiştir. Anti sentromer antikor, anti Scl-70 antikorlar, anti RNA polimeraz I-II-III, anti ribonükleoprotein, anti endoteliyal antikorlar ve anti kollajen antikorlar gibi çeşitli otoantikorların varlığı, humoral immün sistem aktivasyonunu göstermektedir (Jimenez ve Derk, 2004; Denton ve Black, 2004).

İnterlökin-2 (IL-2) düzeyleri ile hastalık aktivasyonu arasındaki ilişki, immün sistem aktivasyonunun hastalık patogenezindeki önemini vurgulayan bir başka bulgudur (Kahaleh ve Leroy, 1989). Sklerodermada T-helper-2 kaynaklı sitokin düzeylerinde artış saptanmıştır. IL-4, IL-13 fibroblastları uyaran sitokinler olup sklerodermada düzeyleri artmaktadır (Hasegawa ve ark, 1997).

Skleroderma hastalarından alınan fibroblastların doku kültüründe de aşırı kollajen sentezine devam ettikleri gösterilmiştir. Fibroblastların bu özelliklerinin mikroçevrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sklerodermada arttığı gösterilmiş olan IL-4, IL-6, IL-13, TGF-β, PDGF ve bağ dokusu büyüme faktörü, fibrozis gelişiminde rol oynayan mediyatörlerdir (Jimenez ve Derk, 2004; Denton ve Black, 2004).

1.1.4. Klinik Bulgular

Genel belirtiler: En sık görülen semptomlar halsizlik, yorgunluk, artralji ve miyaljidir. Yapılan bir çalışmada, 107 hastada ortalama 10 yıllık bir izlemle (range 1-37) görülen semptomların sıklığı değerlendirilmiş ve %76'sında yorgunluk, %74'ünde tutuk ve sert eklemler, %68'inde güç kaybı, %67'sinde ağrı, %66'sında uyku bozukluğu ve %47'sinde deride renk değişikliği saptanmıştır (Sandusky ve ark, 2009). Daha az görülen semptomlar ise nefes almakta zorluk, mide bozukluğu, gözlerde ağrı, depresyon, bulantı ve kilo kaybıdır (Şentürk, 2011).

Deri değişimleri: Skleroderma başlangıç semptomları deride meydana gelmektedir. Özellikle ellerin üzerinde derin yaralar oluşur. Vücudun diğer bölgelerindeki deride ise sertleşmiş ve kalınlaşmış yama şeklinde alanlar gelişebilir. Deri kalınlığı, sınırlı

SSc'de azalmasına ya da uzun süre minimalde kalmasına rağmen, diffüz SSc'de hızlı bir artışla 1-2 yıl içinde maksimuma ulaşır, dermis belirgin şekilde kalınlaşırken, epidermis ise incelir (Clements ve ark, 1995). Deride kırışıklıklar meydana gelir, tüy-saç, ter bezi ve yağ kaybı olur. Yüzdeki tutulum mimiklerin kaybolmasına neden olur. Ağız açıklığı azalır, dudaklar incelir ve dudak çevresindeki deri kırışır.

Eklem, tendon ve kemik Semptomları: Derideki fibroz oluşumunu periferal eklemlerde geçici, düzensiz şişme ve eklem sıvısı içerigindeki mononüklear lökositlerin birikimi izler (Brandt ve Krey, 1977).

Sindirim sistemi semptomları: Özofageal fonksiyon bozukluğu hastaların neredeyse %80'inde gelişir ve en yaygın olan ise iç organların tutulumudur. Hastalarda yutkunma zorluğu gözlenir. Eğer tutulum sfinkterlerde ise, gastroözofageal reflü oluşumuna neden olur ki bu durum oldukça yaygındır (Martin ve ark, 2001) .

Hastaların %80'inde mide de fonksiyon bozuklugu bildirilmiştir. Bir çok hastada midede sindirim süresi uzamıştır. Midenin tutulumu, mide kanser riskini önemli ölçüde arttırır. Sindirim sisteminin aşağı kısımlarında da nadir olarak tutulum gerçekleşebilir. Bu tutulum genellikle kabızlığa neden olur (Elkayam ve ark,2000; Singh ve ark, 2001).

Akciğer semptomları: Akciğer problemleri Sklerodermanın meydana getirdigi en önemli semptomdur ve hastalarının ölümüne yol açan en büyük etkendir. Akciğerlerde SSc'nin yol açtığı pulmoner fibroz ve pulmoner hipertansiyon, birlikte veya bağımsız şekilde meydana gelebilir (Steen, 1994). Akciğerle ilgili fibrozunda en önemli güçlügü akciğer fonksiyonunu bozan ve nefes almayı zorlaştıran intestisiyal akciğer rahatsızlığıdır. Bu durum hastalardaki akciğer kanseri riskini de önemli ölçüde arttırır (Oor, 2003).

Pulmoner hipertansiyon ise % 50 civarında bir sıklıkta meydana gelir. Bu durumda akciğerdeki kan basıncı tehlikeli seviyelere erişebilir. Bazı durumlarda pulmoner hipertansiyon "kor pulmonare" olarak bilinen bir duruma yol açabilir. Bu olay, hipertansiyon sonucu akciğerlerin büyümesi ve kalbe baskı yaparak kalp yetmezliğine neden olması sonucudur (Gunduz, 2001) .

Böbrek semptomları: SSc'deki böbrek tutulumunun ilk belirtisi normal tansiyonda idrardaki protein seviyeleridir. En güçlü böbrek komplikasyonu, böbrek krizidir (Renal Crisis). Genellikle hastalığın erken safhalarında başlayan diffüz SSc'li hastaların az bir kısmında görülen nadir bir olaydır ve kan basıncındaki ani bir artışla hızlı ilerleyen böbrek yetmezliğine neden olur (Steen, 1996; Steen ve ark, 1990).

Kalp semptomları: Sklerodermanın kalpteki en doğrudan etkisi sklerozdur. En sık gözlenen bulgu kan basıncı düşüklüğü ve bu düşüşün getirdiği temel rahatsızlıklardır. Sklerodermanın neden olduğu kalp kası tutulumu, kalpteki ritim bozukluğunun temel nedenidir. Bu tutulum elektriksel iletide problemler ve kalp yetmezliği yaratabilir. Ayrıca kalp zarının etkilenmesi iltihaba neden olabilir (Deswal, 1996).

Dolasım sistemi farklılaşmaları : Damarla ilgili anormallikler SSc patogenezinde en yaygın ilk belirtilerdendir. Bazı hipotezler SSc'de endotelin temel hedef doku olduğunu ileri sürmektedir. Değişimler sadece deride değil iç organlarda da meydana gelir (Stafford, 1998).

1.2. Otoimmünite, Otoantikorlar ve Otoimmün Hastalıklar

Otoimmün hastalıklar konakçının öz antijenlerine karşı immün yanıtları sonucu oluşur (Villalta ve ark, 2007). Otoimmünite birçok faktörler, moleküller, hücresel yolaklar ve olaylarla tetiklenir. Otoimmün yanıt ve hastalıkların en önemli tetikleyicisi enfeksiyona neden olan mikrobik antijenlerdir. Konak proteinleri ile mikrobik proteinlerin dizi benzerlikleri (moleküler benzerlik) otoimmün yanıtı ve hastalıkları tetikleyebilmektedir. Değişmiş konakçı proteinler, protein mutasyonları,

değişmiş protein oluşumları, proteindeki posttranslasyonal modifikasyonlar, kovalent modifikasyonlar, proteinlerin enzimlerle işlenmesi, denatüre proteinler, apoptozis, proteazomlar ve nükleozomlar otoimmün yanıtı tetikleyebilir (Atassi ve Casali, 2008). Otoimmün hastalıkların serolojik belirteci hücre içi ve dışı moleküllere karşı mevcut dolaşan otoantikorlardır. Kendi moleküllerine karşı (öz antijenlere) reaksiyon veren antikorlar sağlıklı insanlar da bulunabilir ve bunlar doğal antikorlar olarak adlandırılırlar (Fritzler, 2008).

Doğal antikorların büyük bölümü değişime uğramamış V(D)J genleriyle kodlanan immünglobulin (Ig) M sınıfında, birbiriyle ilişkisiz orta derecede afinite ile bağlayabilen polireaktif özelliktedirler. Doğal mono-reaktif antikorlar da mevcuttur. Doğal IgM antikorları hücrelerin, dokuların, bakteri ve virüslerin yüzeyindeki tekrarlayan antijenlere karşı yüksek bağlama aviditesi gösterir. Doğal antikorlar enfeksiyonlara karşı oluşan ilk savunma hattıdır. Bakteriler, virüsler, mantarlar gibi dış kaynaklı antijenlere bağlanarak muhtemel temizlik işlevi gördükleri gibi kendi antijenlerine karşı da (örneğin; nükleik asitler, fosfolipidler, eritrositler, serum proteinleri, hücresel yapılar, insülin ve tiroglobulin gibi) oluşabilirler. Doğal otoantikorlar, inflamasyon esnasında hücre artıklarının ortadan kaldırılmasında faydalı ve inflamatuar sitokinlere karşı istenmeyen inflamasyona karşı koruyucu olabilir.

Patojenik otoantikorlar, doğal antikorlardan farklı olarak mutasyona uğramış IgG sınıfındadırlar. Mutasyona uğramamış doğal otoantikorları kalıp olarak kullanan patojenik otoantikorlar, somatik hipermutasyon ve sınıf değişimi sonucu oluşabilirler. Patojenik otoantikorların üretimi öz antijenlere karşı tolerans bozulmasının önemli bir işaretidir. İnsanlarda yapılan genetik çalışmalar, otoimmün hastalıkların, çevresel faktörlerin çok sayıdaki genetik değişimler sonucunda ortaya çıktığını göstermektedir (Elkon ve Cassali, 2008)

Sistemik veya organa özgü otoimmün hastalıkların ortak özellikleri vardır. Lenfoid hiperplazi otoimmün hastalıklarda görülebilir. Ancak, lenf bezleri ve dalağın genellikle çok büyük boyutlara ulaşması beklenmez. Otoimmün hastalıklarla birlikte

immün yetmezlikler de sıkça görülür. Primer olarak selektif IgA eksikliği ve bazı kompleman komponentlerin eksikliklerinde otoimmün hastalıklar gelişebileceği gibi, otoimmün hastalıkların zemininde hipogamaglobulinemi, IgA eksikliği ve kompleman eksiklikleri ortaya çıkabilir. Otoimmün hastalıkların çoğunda spesifik bir neden saptanamaz. Hastalığın şiddet ve yaygınlık derecesi, çevresel ve genetik özelliklerden etkilenmektedir. Antikorların saptanması tanı için yardımcıdır.

Sistemik otoimmün hastalıklarda birçok otoantikor dokuda depolanmaları sonucunda direkt olarak hasar verici inflamasyonu ve otoantikor üretimi arttırıcı etki göstermektedir (Lleo ve ark, 2010). Sistemik ve organ spesifik hastalıklarda otoantikorların oluştuğu otoantijenler Çizelge 1.3'de gösterilmiştir (Tutkak, 2011).

İndirekt immünfloresans yönteminde Hep-2 hücreleri kullanılarak çalışılan Anti Nükleer Antikor (ANA) testinin negatifliği sistemik otoimmün hastalıkların mühtemelen olmadığını gösterirken, 1/160 titreden daha fazla dilüsyondaki pozitiflik ise tanıyı destekleyebilir (Klareskog ve ark, 2006). Az sayıda antikor otoimmün hastalık tanısında klinik bulgularla birlikte kulanılabilir. Klinik belirtiler ortaya çıkmadan otoimmün hastalıkla ilişkili antikorlar saptanabilmektedir .

Çizelge 1.3. Sistemik ve Organ Spesifik Hastalıklarda Otoantikorların Oluştuğu Otoantijenler (Scolfield, 2004).

Sistemik hastalıklar	**Otoantijen**
Sistemik lupus eritematozus	dsDNA, histon, Ro/La (SSA/SSB) partiküller, spliceosomal SnRNP
Sjögren sendromu	Ro/La ribonükleer partiküller, muskarinik reseptör
Romatoid artrit	Sitrüllenmiş siklik peptidleri (CCP), Romatoid faktör (IgM)
Dermatomiyozit/ polimiyozit	t-RNA sentetaz
Diffüz sistemik skleroz	Topoisomerazlar
Limited sistemik skleroz (CREST)	Sentromer proteinleri
Organ spesifik hastalıklar	Otoantijen
Addison hastalığı	21-hidroksilaz
Çölyak hastalığı	Doku transglutaminaz
Tip I diyabet	GAD-65, insülin,1A-2A
Graves hipertiroidizm	Tiroid-situmulan-hormon reseptörü
Hashimato tiroidi	Tiroid peroksidaz, tiroglobulin
Myasthenia gravis	Asetil kolin reseptörü
Goodpasture sendromu	Tip IV kollajen
Pemfigus vulgaris	Desmoglein-3
Pernisiyöz anemi	H/K ATPase, intrinsik factor
Primer biliyer siroz	E2 Piruvat dehidrogenaz kompleksi
Vitiligo	Tirozinaz, SOX-10
Mültipl skleroz	Miyelin basic protein, miyelin oligodentritik glikoprotein

1.2.1. Anti Nükleer Antikor (ANA)

ANA; hücre çekirdeğindeki yapılara karşı oluşan antikorlara verilen genel isimdir. ANA'lar çoğunlukla sistemik otoimmün hastalıkların teşhisinde kullanılır (Bagnasco ve ark, 2007). ANA testlerinde hücre çekirdeğinin yanı sıra hücre sitoplazmasındaki hedef antijenlere karşı oluşan otoantikorları da saptamak mümkün olur. Hedef antijenler genelde; hücre yapısında bulunan çeşitli nükleoproteinler, enzimler, doğal ve denatüre olmuş DNA, histonlar, RNA ve ribonükleer proteinler, çözünebilen

hücresel reseptörler ve mitoz ile ilişkili proteinler olabilmektedir. Nükleer antijenik yapılara karşı oluşan otoantikorlar genelikle IgG sınıfı antikorlardır (Aboyussef, 2004). Otoimmün romatolojik hastalıklarda otoantikor pozitiflikleri, hastalığın semptomları oluşmadan yıllar önce bulunabilmektedir. İngilterede 130 SLE hastası üzerinde yapılan çalışmanın sonuçlarına göre; bu hastaların 115 inde 5 yıl öncesine ait otoantikor pozitiflikleri saptanmış ve antikor titrelerinin yıllar içinde arttığı görülmüştür. Bu hastalarda otoantikor seviyelerinin en yüksek olduğu dönemde hastalık semptomlarının görülmeye başladığı bildirilmiştir (Arbuckle ve ark, 2003).

Hücrenin çekirdeğinde veya sitoplazmasında bulunan self antijenlere karşı oluşan otoantikorlar, indirekt immün floresan (IFA) yöntemi ile tayin edilebilir. İndirekt immün floresans testi ANA'ların rutin olarak tayinde ilk olarak tanımlandıkları 1954 yılından beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde önceleri rodent dokuları özellikle karaciğer, böbrek ve mide dokularından alınan kesitler substrat hücresi olarak kullanılmıştır. Son yirmi yılda insan monolayer tümör hücreleri olan Hep-2 hücreleri ANA testinde substrat hücreleri olarak çok daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücrelerin insan kaynaklı olması hayvan dokularına göre daha spesifik olmalarını sağlar. Hep-2 hücrelerinin nükleuslarının daha büyük olması detaylarının daha iyi görülebilmesini, hücre bölünme hızlarının daha yüksek olması, sadece hücre bölünmesinde ortaya çıkan antijenlere karşı antikorların tayinini kolaylaştırmaktadır. Hücre siklusunun değişik aşamalarında eksprese olan antijenlere karşı antikorlar, bu tip hücre kültürlerinde kolayca saptanabilir (Muro, 2005). ANA, IFA yönteminde nükleus ve sitoplazmik otoantikorlar, sayısı otuza yakın farklı boyama modeli gösterir. ANA'lar genelde, hücre çekirdeğinde bulunan protein ve nükleik asitlere karşı oluşurlar (Ganapathy ve ark, 2003). Bu hücreler düz cam yüzeylere etanol veya asetonla fikse edilir ve bu şekilde inkübasyon sırasında antikorların hücre içine girmeleri mümkün olur. Cam yüzeye fikse edilmiş substrat üzerine dilüe edilmiş test serumu eklenir ve inkübasyon süresi boyunca, substrat üzerindeki antijenler ile serum içindeki antikorların bağlanması sağlanır. Bağlanan bu antikorlara karşı Fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge edilmiş ikinci kat antikor (anti-IgG-FITC) ile, otoantikor pozitiflikleri floresans mikroskopta saptanabilir. Floresans mikroskopta hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında gözlenen

floresans boyanma şekilleri, değişik antikorların varlığını göstermektedir. Örneğin; hücre nükleusunda saptanan homojen boyanma paterni, histon, dsDNA ve/veya nükleozomlara karşı otoantikorların varlığını gösterir.

İndirekt immünfloresan çalışmalarında belli boyama şekilleri oluşturan bazı antikorlar, sistemik otoimmünopatilerin karakteristik özelliğidir. Birçok durumda bu otoantikorlar, onlarla ilişkili hastalıklar için ön bir klasifikasyon sağlarlar (Fritzler, 2008).

ANA; EIA, immünblot, westernblot ve boncuk temelli immünassay gibi farklı yöntemlerle de tayin edilebilir.

Enzim immün assay (EIA), immünblot, westernblot ve boncuk temelli immünassay gibi başka farklı yöntemlerle de tayin edilebilen ANA çok çeşitli hastalıklarda ve sağlıklı bireylerde saptanabilirler. Anti nükleer antikor pozitifliği görebileceğimiz hastalıklar; aktif SLE (%95-100), ilaç ile indüklenmiş SLE (~%100), sistemik sikleroz (%60-80), sjögren sendromu (%40-70), romatoid artrit (%30-50) dir (Kavanaugh ve ark, 2000).

1.2.3. ANA IFA Testinde Hücre Çekirdeğinde Gözlenen Boyanma Şekilleri ve Hastalıklar İle İlişkileri

ANA IFA yönteminde hücre çekirdeğinde otoantikorlarla ilişkili boyama şekilleri gözlenebilir.

- Homojen: Histon, dsDNA ve/veya nükleozomlara (histon ve DNA kompleksi) karşı otoantikorların varlığı gösterir (Muro, 2005). Bu boyanma şekilleri SLE, ilaçla indüklenmiş lupus, romatoid artrit, juvenile kronik artrit ve sistemik skleroz gibi hastalıklarda tespit edilebilir.
- Nükleer Membran: Otoantikorlar, Nükleer membrandaki laminler (A, B1, B2, C) gp120 gibi nükleer pore kompleks integral proteinlerine, laminle

birlikte bulunan proteinlere (LAP 1A, LAP 2) karşıdır. Kronik hepatit, vaskülitler, trombositopeni ve SLE gibi mikst tip kronik otoimmün hastalıklarda tespit edilirler. (Kavanaugh ve ark, 2000).

- Benekli:
    I. Büyük Benekli (Nükleer matriks): Otoantikorlar başlıca heterojen nükleer ribonükleoproteinlere (hnRNP) karşı olabilir, SLE, RA ve MCTD gibi hastalıklarda (hn- A1, A2, B2) ve skleroderma (hnRNP-C1, C2 ve I)
    II. Kaba Benekli: Sm ve U1-snRNP'e karşı otoantikor varsa gözlenen bir boyama modeli olup MCTD ve SLE' de tesbit edilebilir.
    III. İnce Benekli: Bu boyamada antikorlar SSA (Ro), SSB (La), RNA polimeraz II ve III, Ku, Ki, Mi-2'ye karşı olabilir. SLE, Sjögren, skleroderma, myositis ve MCTD gibi hastalıklarda gözlenebilir.
    IV. Yoğun İnce Benek: Antikor, ~75kd'luk lens epiteliyum kaynaklı büyüme faktörüne (LEDGF) karşı olup, sağlıklı kişilerde veya alopecia areata'lı ve atopik dermatitli hastalarda görülebilmektedir.
    V. Sentromer: Bu antikorlar CENP-B, -A, -C ve daha nadir olarak CENP-D'ye karşıdır. CENP-F antikorları daha farklı boyama modeli ile saptanabilirler. Sentromer boyama şekli CREST sendromu, primer biliyer siroz, Raynoud fenomeninde saptanabilir.
- Nükleolar:
    I. Nükleolar Homojen: Bu boyama şekli anti Th/To antikorları olarak bilinir ve 40Kda'luk iki küçük ribonükleoproteinlere karşı olduğunda gözlenebilirler. Th/To antikorları sistemik skleroz, SLE, polimiyozitis ve romatoid artritte saptanabilir.
    II. Nükleolar Küme: Sistemik skleroz için yüksek spesifiklikle hastaların %5'inde ve pulmoner hipertansiyonda görülür.
    III. Nükleolar Benekli: SLE, RA ve MCTD'de gözlenen RNA Polimeraz I kompleksine karşı antikorları gösterebilir.

1.2.4. ANA IFA Testinde Hücre Sitoplazmasında Gözlenen Boyanma Şekilleri ve Hastalıklar İle İlişkileri

ANA IFA yönteminde hücre sitoplazmasında otoantikorlarla ilişkili çeşitli boyanma şekilleri gözlenebilir.

- **Sitoplazmik İnce Benek:** Aminoaçil-tRNAsentetazlar (jo-1, PL7, PL12) karşı olup idiopatik otoimmün miyozitis (polimiyozit/dermatomiyozit, overlap sendromunda miyozitis, yumuşak bağ dokusu hastalıkları) için diagnostik belirteçtir. Anti Jo-1 (histidil-tRNA sentetaz) ve anti-EJ (glisil-tRNA sentetaz) antikorları klinik miyozit gelişmeden 5 ay önceden tespit edilebilmektedir (Bizzaro, 2007).
- **Sitoplazmik Büyük Benekli:** Boyanma sitoplazmaya yayılmış olup lizozomlar ve endozom gibi organellere karşı otoantikorları gösterir.
- **Sitoplazmik Kaba Benekli İpliksi (Mitokondri):** Boyanma çoğunlukla M2'ye karşı gözlenir ve primer biliyer karaciğer sirozu, diğer kronik karaciğer hastalıkları, SLE ve sistemik sklerozda görülebilir.
- **Sitoplazmik Homojen:** Otoantikorlar ribozomal P fosfoproteinlerden PO, P1,ve P2'ye karşı ve diğer antijen hedefleri 28S Trna, S10, JA, L12 ve L5/5S'ye karşı oluşurlar. Bazen dsDNA antikorlarının yokluğunda SLE'li hastaların%10-20'sinde tespit edilebilir.
- **Sitoplazmik Golgi:** SLE, Sjögren sendromu ve diğer kronik romatolojik hastalıklarda saptanabilir. Sitoplazmanın perinükleer bölgesinde düzensiz granüler boyanma ile karakterizedir (Muro, 2005).
- **Sentriol:** Skleroderma, CREST, ve Sjögren sendromu ve diğer otoimmün hastalıklarda saptanabilir.
- **Midbody:** Mitotik hücrelerin midbody kısmında bulunan proteinler olup çoğu halen tam olarak tanımlanmıştır, bu otoantikor sistemik skleroz ve Reynaud fenomeninde görülebilmektedir.

1.3. Sistemik Skleroz'da oluşan spesifik antikorlar

Tanıda karakteristik otoantikorların varlığı önemlidir. SSc'li hastaların %90' dan fazlasında, ANA saptanır. SSc'li olgularda immün floresans yöntemle yapılan ANA testinde pozitifliklerde sıklıkla nükleolar boyanma paterni gözlenir. Pozitif ANA testine ek olarak, SSc için spesifik otoantikorlar da bulunabilir. Karakteristik otoantikorların varlığı SSc tanısını destekler.

Anti-sentromer ve anti-topoisomeraz I (anti Scl-70) SSc'li hastalarda saptanan önemli antikorlardır. Sistemik sklerozlu hastalarda başka otoantikor pozitiflikleri de gözlenebilir ve bu otoantikorlar farklı etnik gruplarda değişebilen oranlarda tesbit edilmişlerdir (Çizelge 1.4) (Okano, 1996, Rodriguez-Reyna, 2011).

Çizelge 1.4. Sistemik Sklerozlu Hastalara Özgü Otoantikorların Farklı Etnik Gruplardaki Dağılımı (Rodriguez-Reyna, 2011)

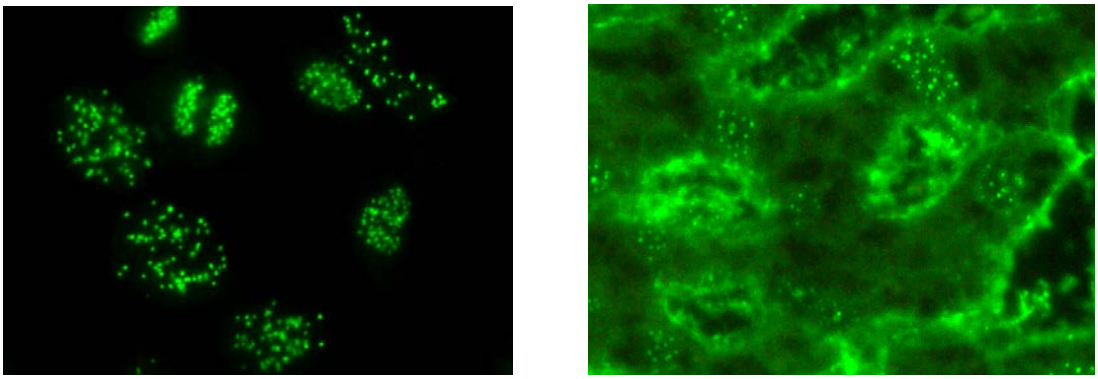
	Irk				
Otoantikor	**Meksikalı**	**Kafkas**	**Japon**	**Afrika kökenli Amerikalı**	**Latin Amerikalı**
ACA (%)	29	32	16	4-11	18
Anti-DNA Topo (%)	28	13	25-28	14-16	19
Anti U1 RNP (%)	11	5-10,5	8-35	29-32	11
Anti-PM-Scl (%)	9	2-4	0	0-3	TE
Anti-RNA-pol III (%)	1.4	8	5	13-24	TE
Anti- Ku (%)	10	2	3	8-9	TE
Anti-Th/To (%)	TE*	5	2	0-5	TE
Anti-U3 RNP (%)	TE	4	4	17-45	TE
Anti-U11/U12 RNP (%)	TE	5	TE	TE	TE

*TE: Test edilmemiş.

1.3.1. Anti sentromer antikor (CENP)

Bu antikorun SSc'li hastalardaki sensitivitesi % 20-40, spesifitesi >%90 dır (Steen, 2005; Walker ve Fritzler, 2007). CENP-B, 80 Kd'luk bir kinetekor proteini olup

anti-sentromer pozitifliği olan bütün SSc hasta serumlarıyla reaksiyon verir (Fritzler ve ark ,2010; Mahler ve ark, 2011). Anti-sentromer antikoru IFA yönteminin yanı sıra EIA (ELISA) ve ALBIA yöntemleriyle tayin edilebilir (Mahler ve ark., 2011). Sentromer antikor pozitifliği, IFA yönteminde Hep-2 hücre çekirdeğinde eşit ince büyüklükte fark edilebilir benekli (benek sayısı; 46-92 arasında), primat karaciğer doku kesitinde hücre çekirdeğinde sayısı 10-20 arasında değişen benekli tarzda boyanma modeliyle kolayca tanımlanabilir (Şekil1.2).



a b

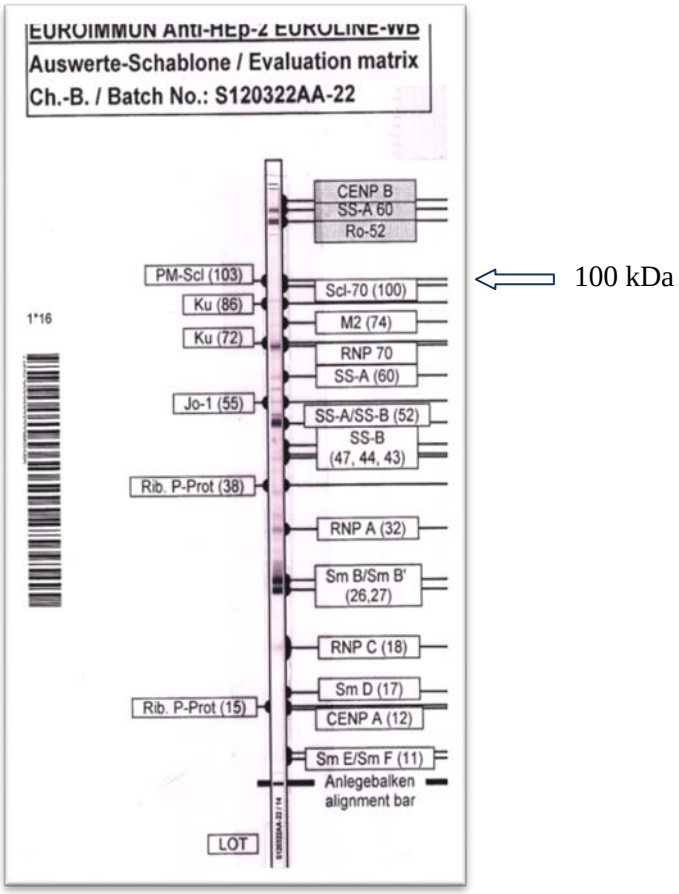
Şekil 1.2. Anti- Sentromer IFA Pozitif Görüntüleri a. Hep 20-10 Hücresi b. Maymun Karaciğer Doku Kesiti.

SSc'da anti-sentromer sıklığı bir çok çalışmada %20-40 oranında raporlanmış olsa da farklı ırklarda değişkenlik gösterebilir. Bu oran beyaz ırkta yaklaşık olarak 30% olmakla birlikte Afrika kökenli Amerika'lılarda ve Tayland' lılarda bu oranın daha düşük olduğu bildirilmiştir (Reveille ve ark, 2001). Sınırlı sistemik skleroz hastaların %50-90'nında ve özellikle CREST sendromunda (kalsinozis, Reynaud fenomeni, özfagus dismotilitesi, sklerodaktili, telenijektazi) anti sentromer antikor pozitifliği vardır. (Grassegger A. ve ark., 2008, Gabrielli A. ve ark., 2009, Gliddon,2011).

1.3.2. Topoisomeraz- I (Scl-70) Antikoru

Topoisomeraz I (Scl-70) antikoru, diffüz kutanöz sistemik skleroz hastalığında oluşan en spesifik serolojik belirteç olup temel tanısal sınıflama kriterleri arasındadır (Shero, 1986). Bu antikorun hastalığın prognoz ve tedavi sürecinde çok önemli rolu vardır (Tsay ve ark, 1990; Verheijen ve ark, 1990). Topoisomeraz I'e karşı oluşan

otoantikor skleroderma hastalarının serumunda ilk kez 1979 yılında, immünblot tekniğiyle 70Kd'luk bir proteine karşı tanımlandı (Dauvas ve ark, 1979). Daha sonra bu otoantijenin doğal uzunluğunun 100 KDa olduğu ve 70 KDa'luk kısmının 100 Kd'luk proteinin parçalanması sonucu oluştuğu kanıtlandı (Shero, 1986). Scl-70 terimi halen kullanılmakla birlikte, daha güvenilir adlandırma olarak anti topoisomeraz I (ATA) terimi tercih edilmektedir.



Şekil 1.3. Anti Topoisomeraz I (Scl-70) Westernblot'da Oluşturduğu Görüntüsü

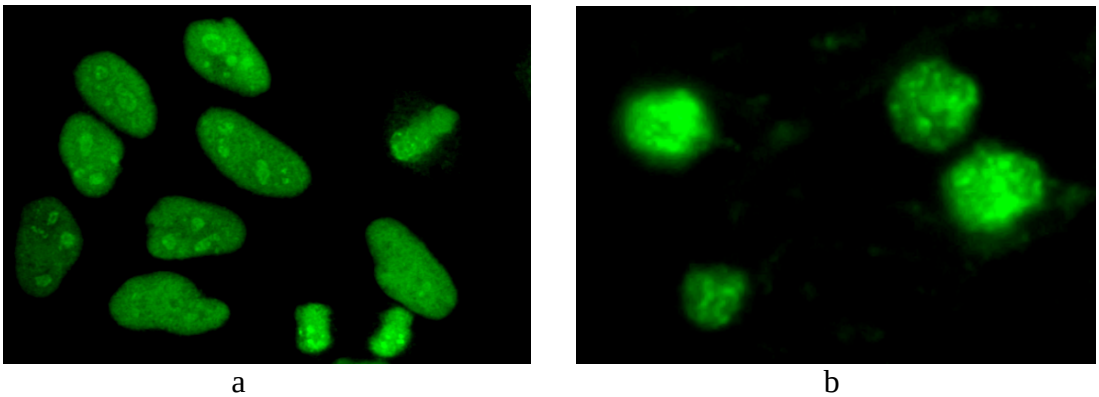
Bu otoantikorun skleroderma hastalarındaki prevalansı ortalama %40 olarak bildirilmekle birlikte bu oran farklı topluluklarda %28-70 arasında değişkenlik gösterebilir (Reveille ve ark, 2001; Kuwana ve ark, 1994). Latin Amerikalı'larda bu antikorun perevalansı %29 iken Japonlarda %65 olarak bildirilmiştir (Kuwana ve ark, 1994). Topoisomeraz I antikoru sağlıklı bireylerde, skleroderma hastalarının

akrabalarında, başka otoimmün hastalığı olan bireylerde ve primer Raynaud sendromunda saptanmamıştır (Reveille ve Solomon, 2003).

Topoisomeraz I antikoru sıklıkla IgG sınıfında gösterilmiş olmakla birlikte IgM ve IgA izotipleri de tesbit edilmiştir (Hildebrandts, 1990).

Bu otoantikor IFA, çift yönlü immündiffüzyon, ELISA, immünblot, LIA (line immunoassay), westernblot ve ALBIA (addressable laser bead immunassays) gibi çeşitli yöntemlerle tayin edilebilir (Mahler ve ark, 2010). Bu yöntemler arasında IFA, ELISA ve immünblot daha yaygın kullanılmaktadır.

Sistemik skleroz hastalığında topo isomeraz I antikorunun IFA yönteminde Hep-2 hücrelerinde, nükleus ve nükleolusda benekli tarzda boyanma gösterdiği bildirilmiştir (Şekil 1.4) (Grasssegger ve ark, 2008). Dellavence ve arkadaşları sistemik sklerozlu hastalarda DNA topoisomeraz I'e karşı oluşan antikorların IFA yönteminde tipik boyama şekilleriyle tanımlanabileceğini bildirmişlerdir. Bu tipik boyamaların; nükleus, nükleolus, interfaz hücre sitoplazmaları, NOR (nucleolar organizing region) ve mitotik hücrelerin metafaz hattındaki kromozomlarda olabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca bu otoantikorların tanısında kullanılan yöntemlerin farklı duyarlılıkta olabileceği bildirilmiştir (Dellavence ve ark, 2009).



a b

Şekil 1.4. ANA (IFA) Testinde Anti Topoisomeraz I (Scl-70) Pozitifliği a. HEp-2010 Hücresinde b. Maymun Karaciğer Doku Kesitinde.

EUSTAR (European League Against Rheumatism Scleroderma Trails and Research) yaptığı bir çalışmada anti topoisomeraz I antikorunun diffüz kutanöz sistemik sklerozda bulunma sıklığını %64 ve limitli sistemik sklerozda ise %34 olarak bildirilmiştir (Walker, 2007). Sistemik sklerozlu hastaların yarısından fazlasında pulmoner fibrozis oluşabilir ve bu vakaların %80'inde anti topoisomeraz I antikorları oluşabilir (Silver, 1996).

1.3.2.1. Topoisomerazlar ve Anti Topoisomeraz I Antikorun Epitop Haritası

Topoisomeraz enzimleri DNA'nın tersiyer yapısındaki değişikliği 2 farklı yolla yaparlar. Topoisomeraz I, DNA'nın tek zincirini, topoisomeraz II enzimi çift sarmallı DNA'yı kırıp tekrar birleştirerek DNA'nın yeniden yapılanmasını sağlar (Liu ve ark, 1980). Topoisomeraz I enzimi IA ve IB 'den oluşan 2 gruba ayrılır. IA ailesi enzimlerin kırılmış DNA'nın 5' bölgesine ve IB ailesi enzimlerinin 3' kısmına kovalent bağlarla bağlanır. Topoisomeraz enzimleri bakteriden memelilere kadar birçok canlıda bulunabilir. İnsanlarda bu enzimin 6 alt tipi vardır. Bu alt tipler çizelge 1.6 da gösterilmiştir.

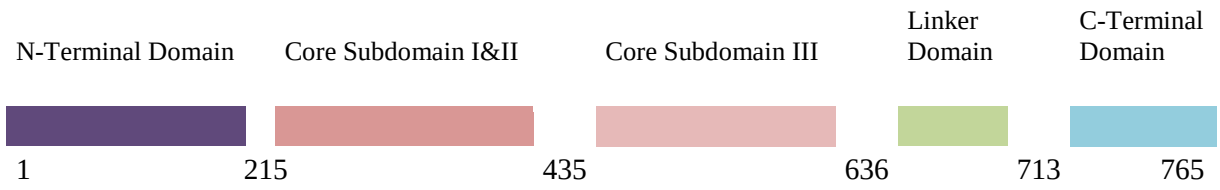
Çizelge 1.5. Topoisomeraz Enzimleri Alt Tipleri (Czömpöly ve ark. 2009)

	Topoisomeraz enzimleri alt tipleri
1	Topoisomeraz I IB
2	Topoisomeraz Iıα
3	Topoisomeraz Iıβ
4	Topoisomeraz IIIα
5	Topoisomeraz IIIβ
6	Mitokondrial topoisomeraz, (topoisomeraz I formuyla homologdur)

Topoisomeraz I, 765 amino asit (aa) içeren bir DNA relaxing enzimdir ve 5 ayrı bölgeden oluşur. N-terminal bölgesi (1-215 aa), core subdomain I-II (216-435), core subdomain III (436-636 aa), linker domain (637-713 aa), C-terminal domain (714-

765 aa) (Redinbo, 1998). Bir çok araştırma grubunun yaptığı çalışmalarda SSc'li hastalarda anti topoisomeraz I antikorunun topoisomeraz I'deki bir çok bölgeyi tanıdığı belirtilmiştir . Verheijen ve arkadaşları bu proteinin yapısında 3 farklı epitop bölgesi tanımlamışlardır. Başka bir çalışmada bu proteinin 6 ayrı epitop bölgesi olup, topoisomeraz I e karşı antikorun bu 6 bölgenin bir çoğunu tanıyabildiğini öne sürülmüştür (D'Arpa ve ark).

Diffüz skleroderma hastalarında serumdaki antikorların topoisomeraz I epitopunun N-terminal bölgesine, SLE hastalarda ise Core subdomain I-II (216-436 aa) bölgesine ve limitli SSc tanıma bölgesinin molekülün tamamına yayıldığı gösterilmiştir (Şekil 1.5) (Czömpöly ve ark, 2009).



Şekil 1. 5. Topoisomeraz I Enzim Epitop Haritası

1.3.3. Anti-RNA polimeraz I, II, III

Anti- RNA polimeraz (RNAP) I ve III genellikle birlikte bulunurlar ve sistemik skleroz hastalarına özgü bir antikordur (Kuwana ve ark, 1993, Okano ve ark, 1993). RNAP'a karşı antikorların IFA'da nükleolusun benekli tarzda bir boyanma patterni ile tanınabileceği bildirilmiş olmakla birlikte, bu tarzda boyamaların bu antikorlara özgül olmadığı, IFA tekniğinin bu antikoru saptamak için yeterli olmayabileceği bildirilmiştir (Yamasaki ve ark 2006). Günümüzde bu antikorun varlığını saptamak için ELISA tekniği kullanılmaktadır (Satoh ve ark, 2009). Anti-RNAP II antikoru SSc hastalar dışında SLE ve overlap sendromunda da bulunabilmektedir (Parker ve ark, 2008). RNAP I ve II'ye karşı antikorlar diffüz sklerodermada gözlenmekte olup, bu antikorların mevcudiyeti renal kriz riskini arttırmaktadır (Santiyago ve ark, 2007, Okano ve ark, 1993)

1.3.4. Th/To Antikorları

Th/To antikorları mitokondrial RNA Processing (MRP) ve ribonükleaz P kompleksine karşı oluşan bir antikordur (Van Eenennaam ve ark, 2002). Bu antikorlar IFA yöntemiyle ANA tayininde Hep-2 hücrelerinin nükleolusunda noktalı tarzda boyanma modeliyle belirlenebilirler. Bu otoantikorun prevelansı SSc'li hastalarda yaklaşık %2-5 oranındadır ve SSc'li hastalara özgün olduğu düşünülebilir ve başka SARD hastalığında nadiren bulunmaktadır (Okano ve Medsge, 1990). Anti Th/To pozitifliğinin HLA DRB1*11'le ilişkili olabileceği ve limitli skleroderma hastalarında bu duruma sıkça rastlanıldığı bildirilmiştir (Falkner ve ark, 1998).

1.3.5. Fibrillarin/U3 Ribonükleoprotein Antikoru

Fibrillarin, 34 kDa'luk bir protein olup küçük nükleolar anti-U3RNP (snoRNP) makromoleküler kompleksinin major otoantijenidir (Smith ve Steitz, 1997). Nükleolar protein fibrillarine yönelen otoantikorlar sistemik skleroz hastalığı için spesifik otoantikor olarak bilinselerde, bu hastaların %7 sinde gözlenmektedir. Bu otoantikorun saptamakta ileri tekniklerin kullanılması gerekmektedir. Array yöntemleri kullanıldığında anti-fibrillarin antikorunun genellikle anti sentromer antikoru, anti-topoisomeraz I antikoru veya PM/Scl antikoruyla birlikte görüldüğü tespit edilmiştir. Bu sebepten dolayı bu otoantikoru ilk defa IFA yöntemiyle saptanması zor olabilir ve bazı hastalardaki pozitiflikler gözden kaçırılabilinir (Mehra ve ark, 2012).

Anti-U3RNP antikoru sistemik sklerozlu hastaların % 4-10'unda bulunmaktadır ve bir çok çalışmada ATA, CENP ve anti-RNAP'den bağımsız olarak eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu otoantikor sıklıkla HLA DQB1*06:04 ve HLA DRB1*08:04'la birliktedir ve Afrikalı-Amerikalı'larda sarı ırka göre daha yüksektir. Önceden bu otoantikorun IFA yönteminde nükleolar küme (clumpy) boyanma modeli gösterdiği bildirilmiş olmakla birlikte bu otoantikorun sadece IFA yöntemiyle tayini tartışmalıdır (Mehra ve ark, 2012). Anti-U3RNP antikorunun ELISA yöntemiyle

tayininin CENP ve ATA antikoru negatif olgularda yüksek diagnostik özgüllüğe sahip oldukları rapor edilmiştir.

1.3.6. U11/U12RNP Antikorları

Siplosomların bileşini olup pre-mesenger RNA 'yı pre-mRNA intronlarına birleştiren U11/U12 RNP makromoleküler kompleksleri ökaryotik hücrelerde düşük miktarda bulunurlar. SSc için oldukça yüksek özgüllüğe sahip (~ %100), akciğer fibrozisi ile birlikteliği saptanan bu otoantikor SSc'lu hastaların %3'ünde mevcut olduğu bildirilmiştir. Bu olguların tümünde Reynaulds fenomeni ve %82'sinde gastrointestinal tutulum saptanmıştır (Wassarman ve Steitz, 1992; Fertig ve ark, 2009).

1.3.7. B23/Nucleophosmin/Numatrin Antikorları

B23/Nucleophosmin Hücre proliferasyonunu düzenleyen nükleolar bir protein olup SSc'lu hastalarda nükleolar bir otoantijen olarak tanımlanmıştır. Bu antikorun hastaların %80'ninde anti-fibrillarin antikoruyla birlikte bulunur ve anti-B23-pozitif hastalarda anti-kardiolipin antikorlarının perivalansı artmıştır. Ayrıca anti-CENP antikoru negatif sınırlı SSc ile ilişkidir. Anti-B23 antikoru hepatoselüler karsinoma, SLE ve romatoid artrit gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda da tesbit edilebilirler (Ochs ve ark, 1983; Li ve ark. 1989; Ulanet ve ark, 2003).

1.4. Diğer SARD İle İlgili Olan Otoantikorlar

1.4.1. Ro52/TRIM21, SS-A/Ro60 ve SS-B/La Otoantikoru

Ro/SS-A antijenleri karşı oluşan otoantikorlar SSc hastalarının % 15-20`sinde tespit edilmiştir. SS-A/Ro60 otoantikorlar da SLE, subakut kutanöz lupus, Sjögren

sendromu, SSc, RA ve dermatomiyozit ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Ben- Chetrit, 1997). Kanada'da çok merkezli bir çalışmada, antikorlarını 963 SSc hastasnın %20'sinde anti-Ro52/TRIM21 antikorunu saptamışlardır ve bu otoantikoru çalışma grubu içinde sentromerle birlikte görülen en önemli ikinci otoantikor olarak belirtmişlerdir. Anti-Ro52/TRIM21 antikoru bağımsız bir serolojik marker değildir ve anti-CENP, anti-RNA polimeraz III ve ATA antikorlarıyla birlikte bulunmaktadırlar (Hudson ve ark, 2012).

1.4.2. U1RNP Antikorlar

Küçük ribonükleoproteinlere (snRNP) bağlanan anti-U1RNP antikorları, ribonükleaza duyarlı makromoleküler kompleks şeklindedirler ve heterojen nükleer RNA yı mRNA'ya bağlarlar (Tarn ve Steitz, 1997). Anti-U1RNP mikst bağ dokusu hastalarının ~% 90'ında bulunurken SSc'lı hastalardakı prevalansı yaklaşık % 6 (aralık% 2-14) 'dır (Keith ve ark. 2007; Babst, 2004). Anti-U1RNP antikorları genellikle overlap sendrom ile ilişkilidir ve saptanma sıklığı lcSSc'li hastalarda dcSSc'li hastalara göre daha fazladır (Ihn ve ark, 1999). Anti-U1RNP pozitif SSc'li hastalarda, anti-Ro60/SS-A, anti-La/SS-B ve anti-Smith (U2-U6 snRNP) antikorları sıklıkla da pozitiftir (Nihtyanova ve Denton, 2010). Avustralyalı SSc'li hastalarda yapılan bir çalışmada, anti-U1RNP antikorlarının pulmoner arteryel hipertansiyon ile birlikteliği gösterilmiştir ve anti-CENP pozitifliği mevcut hastalara göre önemli ölçüde yaşam süreleri daha kısadır (Borkovski ve ark, 1991).

1.4.3. Nükleozom, Histon, Yüksek Hareketli Protein Antikorları

Nükleozomlar, histon ve yüksek hareketli grup (HMG) proteinlerini içeren bir çekirdek ile çevresindeki çift sarmallı DNA'dan oluşur (Burlingame ve ark, 1985). Nükleozoma karşı antikorları (ayrıca kromatin olarak adlandırılır) genellikle SLE için çok spesifik bir biomarker olarak kabul edilir ve bu hastalığın patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir (Gomez ve ark,2008; Amoura ve ark, 1999). Bununla birlikte

bu otoantikorlar, MCTD, SSc, lokalize SSc ve ilaca bağlı Lupusda da tespit edilebilirler (Amoura ve ark, 1999; Sato ve ark, 2004; Gomez ve ark, 2008). Anti-histon antikorları SSc'li hastaların %16-29'unda oluşabilir ve yaşam süresini azaltan pulmoner fibrozis, kardiyak ve renal tutulum ile birlikte görülürler (Kohlstead ve Cole, 1994).

HMG proteinleri DNA transkripsiyonunda önemli rölü vardır ve son çalışmalar, özellikle sistemik lupus eritematozus, Sjögren sendromu ve ilerlemiş SSc hastalıklarında HMGB1'rin pro-inflamatuar mediatör olarak rol aldığı üzerine yoğunlaşmıştır (Ayer ve ark, 1994; Urbonaviciute ve Voll, 2011; Dupire ve ark, 2011). HMG-1 ve HMG-2 karşı oluşan antikorlar ELISA ve IB kullanılarak SSc hastaların (n = 197) yaklaşık üçte birinde bulunmuştur (Ayer ve ark, 1994). Bir başka çalışmada, 50 SSc'lu hastanın % 33'ünde anti-HMG-17 antikorları tespit edilmiştir ancak diğer otoantikorların veya hastalığın alt grupları ile herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir (Tzioufas ve ark, 1993).

1.4.4. Ku Antikorları

Anti-Ku antikorları, nükleus ve interfaz hücrelerinin nükleoluslarındaki proteinlere bağlanırlar. Bu antikorların hasarlı DNA'nın tamiri, V (D) J rekombinasyonu, telomer korumada, ayrıca DNA replikasyonu ve gen transkripsiyonun düzenlenmesinde rolü vardır (Lees-Miller ve Meek, 2003). Anti-Ku antikorları, miyozit ile ilişkili SSc'lu hastaların yaklaşık % 2'sinde tespit edilmiştir (Rozman ve ark, 2008). Aksine, anti-Ku antikorları, polimiyozit ve SSc'nin birlikte bulunduğu (overlap) hastaların % 55'inde bulunabilir (Belizna ve ark, 2010). SSc'lu hastalarda, anti-Ku pozitifliği kas ve eklem tutulumu ile ilişkilidir ve şiddetli dijital vaskülopati ve benzeri komplikasyonlara karşı koruyucu olabilir (Rozman ve ark, 2008).

1.4.5. Polymyositis/Skleroderma (Anti-PM/Scl) Antikorları

PM-Scl antijeni, 75 ve 100 kDa'luk 16'dan fazla protein içeririr. Anti-PM-Scl'nin IFA'da göstermiş olduğu boyanma modeli; genellikle homojen nükleolar ve nükleoplazmada ince benekdir (Mahler ve Fritzler, 2008).

PM/Scl antikorları, SSc hastalarının % 4-11'inde saptanmış olup en sık bilinen hedefi 75 kDa'luk proteindir (Mahler ve ark, 2005). Bu antikor SSc hastaları için spesifik bir belirteç değildir (Hanke ve ark, 2009).

1.4.6. Human Upstream Binding Factor (Anti-hUBF, Yaygın Bilinen İsmi Anti-NOR 90) Antikorları

Yaklaşık 90 kDa'luk bu otoantikorlar, başlangıçta anti-NOR 90 olarak adlandırılmışlardır fakat daha sonra yapılan çalışmalarda otoantijenin hUBF olduğu bulunmuştur (Chan ve ark, 1991; Imai ve ark, 1994). hUBF antikoru, hafif iç organ tutulumlu ve iyi prognoz gösteren lcSSc ile ilişkili bulunmuştur (Dagher ve ark, 2002). Bu otoantikorların, SSc için spesifik olmadığı, ancak Raynaud hastalığı, romatoid artrit, SLE ve Sjögren sendromu gibi diğer SARD hastalıklarında ve malignitelerde de bulunabileceği gösterilmiştir (Firitzler ve ark, 1995).

1.4.7. Nükleer Membran ve Nükleer Gözenek Kompleksine Karşı Antikorlar

Ökaryotik organizmalarda, nükleer membran birbirine bağlı çeşitli bölgelerden oluşmuştur; dış çekirdek membranı, iç membran veya perinükleer alan, nükleer laminin ve gözenek domenlerinin altında integral membran proteinlerinin bir grubunu oluşturan iç nükleer membranı (Enarson ve ark, 2004). Nükleer gözenek kompleksine karşı antikorlar primer biliyer siroz (PBC) 'ile birlikte bulunurken SSc'da nadirdir (Mehra ve ark, 2012).

1.5. Sistemik Sklerozda Görülen diğer Otoantikorlar

1.5.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktör Reseptör (PDGFR) Antikorları

PDGFR antikorlarının, SSc'da patojenik rolü olduğu düşünülmektedir. PDGFR'ye karşı oluşan otoantikorlar SSc'li hastalarda saptanmıştır fakat SLE, romatoid artrit, idiyopatik PF, primer Raynaud fenomeni ve sağlıklı bireylerde gözlenmemiştir (Baroni ve ark, 2006). Kanada Skleroderma araştırma grubunun 800 SSc'li hastada LIA yöntemiyle yaptığı çalışmada PDGFR antikoru %6 olarak bulunmuştur.

1.5.2. Endotelyal Hücre Antikorları (AECA)

AECA antikorları, SSc'lu hastaların % 25-85'inde bulunur, fakat bunlar aynı zamanda diğer SARD hastalıklarında da görünürler (Negi ve ark, 1998). Bu otoantikorların, hastalık patogenezinde gösterilmiş bazı rolleri vardır; endotelyal hücre aktivasyonu, antikor-bağımlı hücre-aracılıklı sitotoksisite ve endotelyal apoptoz. Bu son olasılık SSc'lu hastalarda oluşan fibrozis sürecini tetiklemektedir (Sgonc ve ark, 1996). Topo-I'lerin dcSSc'lu hastalarda endotelyal hücre yüzeylerinde hedef otoantikor olduğu gösterilene kadar SSc'lu hastalardaki AECA otoantikorların moleküler kimliği tanımlanmamıştı. Antikor negatif SSc'lu hastaların % 50'sinde, endotelyal hücre yüzeyi topo-I'le pozitif bulunmuştur (Mehra ve ark, 2012).

1.5.3. Fibroblast Antikorları (AFA)

SSc'lu hastalarda fibroblastlar anormal olarak aktive olurken buna fibrogenez ve kollajen döngüsündeki sapma eşlik eder (Rimer, 1990). Hücre bazlı ELISA ile SSc'lu hastaların %58'inde AFA antikorları tespit edilmiştir ve dcSSc'lu hastalarda da en yüksek prevalansa sahip oldukları gösterilmiştir (Chizzollini ve ark, 2002).

1.5.4. Otoimmün Karaciğer Hastalıklarıyla İlişkili Otoantikorlar

SSc'lu hastalarının % 5'inden fazlasında PBS gelişir ve bu hastalarda mitokondriyal hedeflere karşı oluşan antikorlar tanımlanmıştır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada 817 SSc'lu hastanın, %2 'sinde PBC saptanmıştır (Assassi ve ark, 2009; Gupta ve ark, 1984). İtalya'da SSc'lu hastalarda yapılan bir diğer çalışmada, AMA-MIT3, anti-gp210 ve anti-Sp100 antikorları olguların % 21,4'ünde bulunmuştur (Cavazzana ve ark, 2011). IFA yöntemi kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, SSc'lu hastaların % 14.3'ünde, en az bir karaciğer otoantikoru pozitifliği gösterilmiştir; anti-düz kas antikoru % 6.4 ve AMA % 9.52 oranında pozitif olarak saptanırken hiçbir olguda karaciğer-böbrek-mikrozomal antijen (LKM-1) pozitifliğine rastlanmamıştır (Skare ve ark, 2011).

1.5.5. Anti-Nötrofil Sitoplazmik Antikor (ANCA)

SSc'lu hastaların %5'inde proteinaz 3 (PR3) ve miyeloperoksidaz (MPO) otoantikorları bulunmuştur (Casari ne ark, 2002).

1.5.6. 2 β2 Glikoprotein I (anti- β2GPI) Antikoru

SSc'lu hastaların % 5 ila % 41'inde β2 GPI antikorları saptanmıştır (Marie ve ark, 2008).

1.5.7. GW Cisimcik Antikorları

Sitoplazmik yapıya sahip olan GW cisimcik (GWB) antikorlarının, mRNA işlenmesinde, yıkımında ve RNA etkileşim yolağında önemli rolleri vardır (Moser ve Firitzler, 2010; Jakymiw ve ark, 2007). Anti-GWB'nin en sık görüldüğü hastalıklar: nöropatiler (% 33), Sjögren Sendromu (% 31), SSc (% 14), artrit (% 14), SLE (%

12), PBS (% 10), romatoid artrit (% 7), kanser (% 5) ve multipl sklerozdur (% 2).(Bhanji ve ark, 2007).

1.5.8. Survivin Antikorlar

Survivin, ilk olarak apoptoz protein inhibitörleri (IAP) ailesinin bir üyesi olup 142 amino asit uzunluğunda bir proteindir (Li ve Ling, 2006). SSc'lu hastaların erken dönemlerinde, endotel hücrelerde apoptoz tespit edildiğinden bu otoantikorun hastalığın gelişiminde etkili olduğu düşünmektedirler (Musacchio, 2010). Yapılan bir çalışmada, IgG-anti surviving antikorunun lcSSc'lu hastalarda, dcSSc'lu hastalara nazaran daha yüksek olduğu ve bu otoantikorun SSc hastalığında koruyucu bir antikor olabileceği bildirilmiştir (Koike ve ark, 2010). Bu otoantikorun SSc gelişimindeki rolünün daha fazla araştırılmasına gerek vardır.

1.5.9. Aktif Transkripsiyon Faktör-2 (anti-ATF-2) Antikorları

ATF-2 antikoru, SSc'da tanımlanan yeni otoantikorlardan biridir. Bu otoantikorların, SSc'un inflamasyon ve akciğer tutulumu sürecinde yeni bir belirteç olarak rol oynayabileceği belirtmişler (Akiyama ve ark, 2009).

Sistemik sklerozda başka otoantikorlarda araştırılmıştır. Bunlar; glycan antikorları, vascular reseptör antikorları, annexin V antikorları , fibrillin-1 antikorları, matriks metalloproteinaz antikorları , siklik sitrüllenmiş peptid (CCP) antikorlar, romatoid faktör, agalaktosil IgG antikorları, doku plazminojen aktivatör antikorları, peroksiredoksin I antikorları ve interferon-indüklenebilir gen (IFI16) antikorlarıdır.

SSc'lu hastalarda CCP antikor prevalansı % 2.6 ile % 12 arasında değişmektedir (Morita ve ark, 2008; Polimeni ve ark, 2012). Yine bu hastalarda, agalaktosil IgG antikor sıklığı % 34, IgM-RF % 12, IgG-RF %3 oranında bulunmuştur.

Bir başka araştırmada, SSc'lu hasta grubunda PRX I antikoru % 33 oranında bulunmuştur (Iwata ve ark, 2007). PRX I antikorunun artmış hastalık süresiyle, pulumoner fibrozisiyle, kalp tutulumuyla, ATA pozitifliğiyle, artmış immunoglobulin ve eritrosit sedimantasyon ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Henaualt ve ark, 2006). Son dönemde SSc'lu hastalarda interferon-indüklenebilir gen (IFI16) antikorları % 21 oranında bulunduğu gösterilmiştir ve lcSSc hastalarda bu frekansın daha yüksek olduğu bildirilmiştir(Mehra ve ark,2012).

Sistemik skleroz'lu hastalarda bulunan otoantikor sıklığı çizelge 1.7'de verilmiştir.

Çizelge 1.6. Sistemik Sklerozlu Hastalarda Bulunan Klasik ve Yeni Otoantikorlar (Gabrielli,2009)

Klasik otoantikorlar	Oran (%)	Yeni bildirilen otoantikorlar	Oran (%)
Topoisomeraz I (Scl-70)	28-70	Endothelial hücre antikor (AECA)	25-85
Sentromer	20-40	Fibroblast antikoru (AFA)	58
RNA polimeraz I,II,III	20	otoimmün karaciğer hastalıklarıyla ilişkili otoantikorlar	5
Fibrillarin/U3	7	Anti-neutrophil cytoplasmic antikor (ANCA)	5
Ribonükleoprotein	-	2 glycoprotein I (anti- 2GPI) ve anti-cardiolipin (aCL)	5-41
Th/T0	2-5	Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)	-
U11/U12RNP	3	GW bodies	-
B23/nükleophosmin/numatrin	-	Survivin	-
		Activating transcription factor-2 (anti-ATF-2)	-

Çalışmamızda, 93 SSc'li hasta serum örneği ve 90 olguluk kontrol grubu serum örneklerinde topoisomeraz I'e karşı oluşan antikorların özgün boyanma modeli gösterip göstermediği ve şayet özgün boyanma modeli gösteriyorsa bunun nasıl tanımlanabileceğini, ELISA, Hep-2 WB gibi daha spesifik tanı yöntemleriyle karşılaştırarak tespit etmeyi amaçladık.

1.6. İstatiksel Analiz

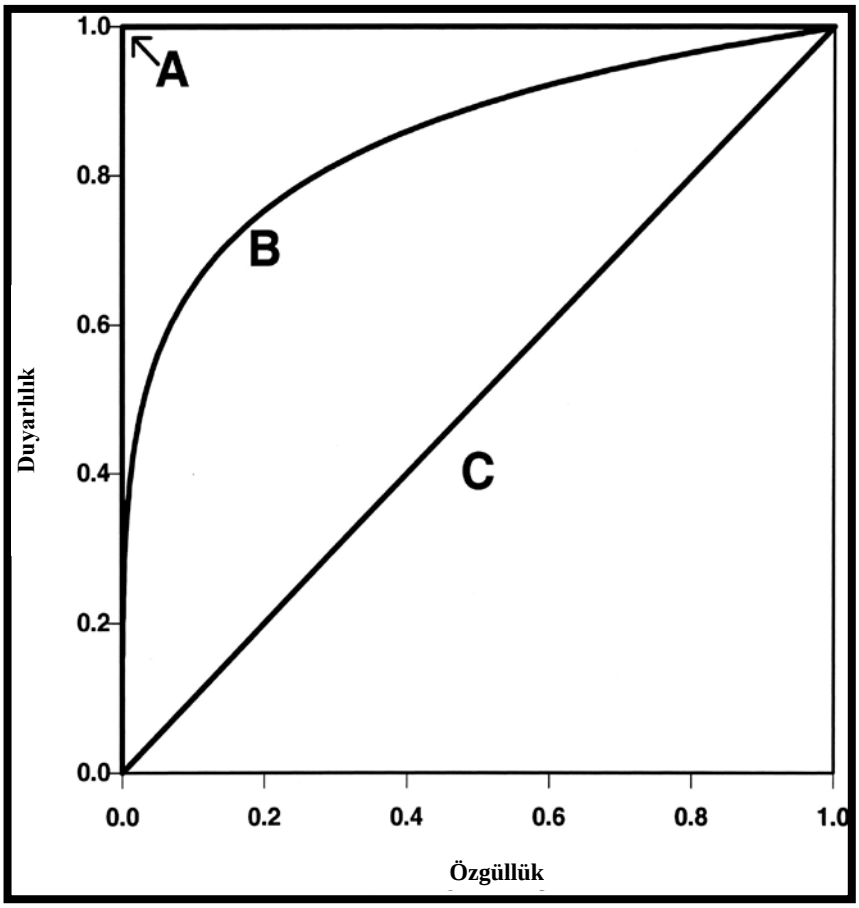
Sonuçlarımızı deyerlendirirken Kappa istatistiği ve Roc eğrisi yöntemi kullanıldı.

1.6.1. ROC Analizi

ROC Analizi, sadece bir duyarlılık ve özgüllük değeri kullanarak tanı koymanın getirdiği sakıncaları ortadan kaldırmak için geliştirilmiş istatistik değerlendirme. Bir ROC eğrisi, farklı eşik değerleri için dikey eksen üzerinde doğru pozitiflik (duyarlılık) ve yatay eksen üzerinde yanlış pozitiflik (1-özgüllük) oranlarının yer aldığı bir eğridir. ROC eğrisi üzerindeki her nokta, farklı eşik değerlerine karşılık gelen duyarlılık ve 1- özgüllük değerlerini ortaya koyar. ROC eğrisi; testin ayırt etme gücünün belirlenmesine, çeşitli testlerin etkinliklerinin kıyaslanmasına, uygun pozitiflik eşiğinin belirlenmesine, laboratuar sonuçlarının kalitesinin izlenmesine, uygulayıcının gelişiminin izlenmesine ve farklı uygulayıcıların tanı etkinliklerinin kıyaslanmasına olanak sağlar. En faydalı tanı testi, doğru pozitiflik oranı yüksek ve yanlış pozitiflik oranı düşük olan testtir. Mükemmele yakın bir tanı testi, hemen hemen dikey (0,0)'dan (0,1)'e ve sonra yatayda (1,1)'den geçen bir ROC eğrisine sahip olmalıdır. Kısaca sol üst köşeye en yakın geçen ROC eğrisini veren test en kullanışlı testtir.

1.6.2. ROC eğrisi altında kalan alan

Bir tanı testinin tanısal yeterliliğini belirlemek için kullanılabilen pratik bir yöntem, performansın tek bir değer ile ifadesidir. En yaygın kullanılan ölçüm ise, ROC eğrisinin altında kalan alandır (Area Under Curve). AUC ne kadar büyük ise hastalığın tahmin edilmesinde test o kadar iyi olur. AUC'nin olası değerleri 0.5'ten (tanı konulamaz) 1.0'e (mükemmel tanı konulabilir) kadar değişim gösterir (Zou ve ark, 2007).



Şekil 1.6. Roc Eğriside Üç Kurumsal Diagnostik Doğruluk Durumu. A çizgileri: Altın Standard, AUC:1 (İdeal Test, Tanı Koydurucu Test Prosedürleri %100 Duyarlılık Ve %100 Özgüllüktedir), B çizgileri: 0,85 (Makul test), C Çizgileri: AUC: 0,5 Rastgele Değişim, Diagnostik Prosedürün Prediktif Değeri Yok (Zou ve ark, 2007). .

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hasta ve Kontrol Grubu Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Araştırmamızı oluşturan hasta ve sağlıklı kontrol grubu örnekleri düzenlediğimiz onam formlarını doldurarak onay veren A.Ü Cebeci ve İbn-i Sina hastanesi kan merkezlerine başvuran olgulardan oluşuyordu. Bu merkezlere başvuran SSc tanısı almış , yaşları 18-73 arasında değişen İmmünoloji Laboratuarından rutin test istekleri yapılmış ve testleri çalışıldıktan sonra kalan serum örneklerinden yaklaşık 300 mikro litre çalışmamız için ependorf tüplerine ayrıldi ve çalışma gününe kadar -20˚C derin dondurucuda saklandi.

2.1.2. Sistemik Skleroz Hasta ve Kontrol Grupları

Bu çalışmada hasta grubumuz, 93 SSc'lu olgudan oluşturuldu. SSc'li hastalar ACR kriterlerine göre tanı almışlardı. Kontrol grubu, rutin İmmünoloji Laboratuar testlerinde ANA IFA testi çalışılmış, neticesi nükleolar ve nükleolar + benekli boyanma paterni gösteren ve otoimmün romatolojik hastalık tanısı almamış 90 olgudan oluşturuldu. Bu olguların 38'inde nükleolar tarzda boyama ve 52'sinde nükleolar boyanmayla birlikte nükleus boyanması mevcuttu.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Laboratuar Cihazları

Çalışmada kullanılan laboratuar cihazları: derin dondurucu (Bosch marka, -20˚'lik), floresans mikroskop (EuroStarII, Zeiss marka, Almanya), santrifüj (Hettich marka), tam otomatik ELISA cihazı (EUROIMMUN Analyzer I, Almanya), karıştırıcı (FALC INS. Mix 20 marka), 10-100 µl ve 100-1000 µl'lik ayarlanabilir otomatik

pipetler (HTL marka), çalkalayıcı (BIOSAN Mini Rocker marka), Arçelik marka buzdolabıdır.

Çalışmada kullanılan kitler;

- ANA IFA kiti (EUROIMMUN, ALMANYA)
- Anti- Hep-2 Westernblot kiti (EUROIMMUN, ALMANYA)
- Anti- Scl-70 ELISA (IgG) kiti (EUROIMMUN, ALMANYA).

2.2. Yöntem

2.2.1. İndirekt İmmün Floresans (IFA) Yönteminin Uygulanması ve Prensibi

Prensibi:

Otoimmün bağ dokusu hastalıkların tanısında indirekt immün floresan (IFA) tekniği ile otoantikorların tespiti en çok tercih edilen yöntemdir. IFA testi, bir in vitro test tekniği olup serum örneklerinde , hücre çekirdeğinde ve hücre sitoplazmasında bulunan antijenik yapılara karşı oluşmuş otoantikorların tayin edilmesine olanak verir. Bu yöntemde sonuçlar, hem nitel hemde nicel olarak saptanabilmektedir.

ANA IFA testinin çalışılması:

1. ANA IFA kiti +4˚C'lik buzdolabından ve çalışacak serum örnekleri -20˚lik derin dondurucudan en az 40 dakika önceden, oda sıcaklığına ulaşması için çıkartıldı. ANA IFA kit içeriğinde bulunan ve test aşamasında kullanılacak tüm içerik oda sıcaklığına daha hızlı ulaşması için kutusundan çıkarıldı.
2. Oda sıcaklığına ulaşan serum örnekleri, yaklaşık 4 sn. süre ile iyice vortekslenerek karıştırıldı.
3. Kit içinde bulunan PBS (Fosfat Tuz Tamponu) (pH 7.2), 1L distile su içersinde balon joje de çözülerek iyice karıştırıldı.

4. Elde edilen PBS çözeltisine yine kit içeriğinde bulunan 2 ml'lik Tween 20 solüsyonu eklendi. Tween 20'nin bu karışım içinde homojen dağılabilmesi için balon joje 5-6 kez altüst edilerek karıştırıldı. Tween 20 deterjan yapısında bir solüsyon olup hızlı çalkamalarda köpürmeye sebep olmaktadır, bu sebeple karıştırma işlemi yavaşca yapıldı. Hazırlanmış olan PBS-Tween 20, serum dilüsyonu ve yıkama aşamalarında kullanıldı.
5. Hasta listesi hazırlandı ve dilüsyon tüpleri numaralandı. Üretici firmanın da önerdiği gibi başlangıç dilüsyon 1:100 olmak üzere serum dilüe edildi. 1:100 dilüsyon oranı elde etmek için 10 µl serum örneği 990 µl PBS-Tween 20 karışımı içeren polistiren tüpe eklendi.
6. Dilüe edilen serum örnekleri tekrar yaklaşık 4 sn, vortekslendi.
7. Dilüe edilen serum örneklerinden alınan 25 µl, inkübasyon tepsisi olarak adlandırılan numaralı hasta alanlarına sırası ile pipetlendi. Hücre ve doku içeren slaytlar bu inkübasyon tepsilerinin üzerine kapatılarak, serum inkübasyonu başlatıldı.
8. İnkübasyon, oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakikada tamamlandı.
9. 30 dakikalık serum inkübasyonu tamamlandıktan sonra slaytlar, PBS-Tween 20 karışımı ile doldurulmuş şalelere konuldu. Şalelere konmadan önce slaytların üzerinden küçük bir beherle bir miktar PBS-Tween 20 karışımı döküldü ve slaytlar hemen şalelere konuldu. Her bir yıkama küvetine maksimum 4 slayt konarak yıkama yapıldı.
10. Şalelerde 5 dakika tutulan slaytlar, bu süre sonunda yeni bir yıkama şaleye aktarılarak 5 dakika daha yıkandı.
11. Bu aşamada yeni inkübasyon tepsileri hazırladı. Hasta sayısı kadar alana bu defa kullanıma hazır 20 µl floresans işaretli anti-IgG (konjugat) pipetlendi.
12. Slaytların sadece arka yüzeyi silinerek konjugat pipetlenmiş inkübasyon tepsilerin üzerine kapatıldı ve 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon direk güneş ışığı almayan bir ortamda gerçekleştirildi.
13. 30 dakika konjugat inkübasyonu tamamlandıktan sonra slaytlar, PBS-Tween 20 karışımı ile dondurulmuş şalelere konuldu. Şalelere konulmadan önce slaytların üzerinden küçük bir beherle bir miktar PBS-Tween 20 karışımı döküldü ve slaytlar hemen şalelere konuldu. Her bir şalede maksimum 4 slayt

konarak yıkama yapıldı. Yıkama işlemi sürerken, kit içeriğinde bulunan lameller, inkübasyon tepsilerinin altında bulunan köpük alana yerleştirildi ve her bir hasta alanına denk gelecek bir şeklinde yaklaşık 10 µl, embedding medium eklendi.

14. Yıkama işlemi bittikten sonra slaytların sadece arka yüzeyi silindi ve lamellerin üzerine kapatıldı.
15. Slaytlar, bu şekilde mikroskobik değerlendirmeye hazırlandı.

2.2.2. Floresans Mikroskobik Değerlendirme

ANA'lara karşı oluşmuş otoantikorların değerlendirmesinde Zeiss marka floresans mikroskopla 20X ve 40X objektifler kullanılarak Hep-20-10 hücrelerinin ve maymun karaciğer dokusunda gösterdikleri boyanma şekilleri açısından değerlendirildi.

ANA negatif örneklerde hücrelerin nükleusunda ve sitoplazmasında belirgin floresans gözlenmedi. Pozitif örneklerde ise hücre çekirdeğine ve sitoplazmasına karşı oluşmuş otoantikorlar, IFA testi sonucunda çok çeşitli ve hatta bazıları için karakteristik olan boyanma şekilleri kayıt edildi. Pozitifliklerde Hep-20-10 hücrelerindeki görüntüleriyle maymun karaciğer dokusundaki görüntüleri karşılaştırılarak nihai kararlar verildi.

Mikroskop değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar hasta listesine kaydedildi.

Pozitiflikler, floresan şidetine göre sınıflandırıldı. Artan floresan şiddeti, bahsi geçen otoantikorun konsantrasyonunun yüksek olduğunu göstermektedir.

Dilüsyonlar ve floresan şiddetli ilişkisi:

- 1/40; (+) zayıf pozitif
- 1/100; +
- 1/320; ++
- 1/1000; +++

- 1/3200; ++++ olacak şekilde değerlendirme yapıldı.

2.2.3. Hep-2 Westernblot (WB) Test Yönteminin Uygulaması ve Prensibi

Prensip:

Hep-2 WB test yöntemi ile, insan serum veya plazmasında Hep-2 hücrelerine karşı oluşmuş otoantikorlar kalitatif olarak saptanabilir. Test içeriğinde bulunan striplerinde elektroforetik olarak ayrılmış Hep-2 hücre antijenlerini içermektedir.

Dilüe edilmiş hasta serumu strip üzerine eklenir eğer serum örneğinde otoantikor mevcut ise strip üzerindeki ilgili antijene bağlanır. Serum inkübasyonu takiben yapılan yıkama işlemi ile bağlanmayan serum içeriği ortamdan uzaklaştırılır. Serum inkübasyonunda gerçekleşen bağlanmayı görünür kılmak için enzimle işaretlenmiş anti- insan IgG (enzim konjugat) ile stripler muamele edilir. İkinci kat antikor olan konjugat testin ilk kademesinde antijene bağlanan antikora bağlanır. Bağlanmamış enzim konjugatı yıkama işlemiyle ortamdan uzaklaştırılır. Bu aşamadan sonra stripler substrat solüsyonu ile muamele edilir. Substrat solüsyonu, enzim bağlı konjugatın kataliziyle renkli ürüne dönüşür ve strip üzerinde hasta serumunda hangi antijene karşı antikor varsa strip üzerinde antijenin bulunduğu yerde izlenebilir bir bant oluşur. Otoantikorların ANA IFA tarama testi boyanma modelleriyle Hep-2 WB'da saptanan otoantikorlar çizelge 3.1'de verilmiştir

Çizelge 2.1. Tarama Testi ve Doğrulama Testi Arasındaki Benzerlikler

Otoantikorlar	Tarama testi sonuçları (HEp-2/karaciğer substrat kombinasyonu ile indirekt immunofloresan)	Doğrulama testinde beklenen sonuçlar (Anti-HEp-2 hücre antijeni)
U1-nRNP /Sm	HEp-2 hücreleri: Kaba granüler, bazı durumlarda ortadan ince granülere doğru floresans tüm hücre çekirdeğine dağılmış durumdadır. Nükleolus ve mitotik hücrelerde kromozomal bölge boyanmamıştır. Primat karaciğer: Hücre çekirdeğinde granüler floresans, nükleulus boyanmamıştır. Hep-2 hücreleri ve primat karaciğerinde aynı derecede boyanır.	U1-nRNP 'e karşı antikorlar: RNP 70 (70kDa), RNP A (32 kDa) ve/veya RNP C (18 kDa) 'de yoğun ve orta yoğunlukta bantlar. Sm'e karşı antikorlar: Sm B' (27 kDa) ve Sm – B (26 kDa) 'daki güçlü pozitif çifte bant ya da düşük yoğunlukta Sm B', Sm – B) pozitif çifte bant, beraberinde Sm-D (17 kDa) ,Sm E veya Sm F (11 kDa) farklı bir pozitif bant.
SS-A **SS-B**	HEp-2 hücreleri: Hücre çekirdeğinde ince granüler floresans, bazı nükleoluslar görülmez, mitotik hücrelerde kromozomal bölge boyanmamıştır. Primat karaciğer: Hücre çekirdeğinde ince granüler floresans, bazı nükleoluslar pozitifdir. Hep-2 hücrelerindeki antikor reaksiyonu primat karaciğerinden daha güçlüdür.	SS-A'ya karşı antikorlar: Membran çipi üzerindeki doğal SS-A bandı pozitif , SS-A antikorlarının değerlendirilmesi membran çipindeki antijenlere göre yapılır. HEp-2 hücreleri eksraktında aşağıdaki antijen bantları da saptanabilr: SS-A 60 (60 kDa) bant ve / veya SS-A 52 (52 kDa) 'de ince bir bant SS-B'ye karşı antikorlar:, 52 kDa 'da geniş, bir bant ve 47,44 ve 43 kDa bantlar
PM/Scl **(PM-1)**	HEp-2 hücreleri: Hücre çekirdeğinde homojen floresans, aynı zamanda nükleoplazmada zayıf ince granüler reaksiyon. Mitotik hücrelerin kromozomları hariç kromozomların etrafında ince granüler floresans. Primat karaciğer: Nükleolusda homojen floresans	PM/ Scl' karşı antikorlar: PM/ Scl (103 kDa) 'da bant
Sentromer	HEp-2 hücreleri: İnce , eşit büyüklükte granüler (her bir hücre nükleosunda 46- 92arasında) aynı zamanda interfaz hücrelerinin çekirdeklerinde eşit olarak dağılmış farkedilebilir benekler. Primat karaciğer: hücre çekirdeğinde dağılmış. 10- 20 granüler tarzda floresans. Hep-2 hücrelerindeki antikor reaksiyonu primat karaciğerinden daha güçlüdür.	Sentromerlere karşı antikorlar: Rekombinant CENP B ve/ ve ya CENP A (12 kDa) pozitif bantlar. CENP C (120 kDa) ve CENP B (88 kDa) sentromer protein epitopları, elektroforezde örnek denaturasyonu nedeniyle negatif olarak etkilenebilir. Bu yüzden bu antijenler değerlendirilemez.
Scl-70	HEp-2 hücreleri: İnterfazdaki hücrelerin çekirdeklerinin hemen hemen tümü homojen, nükleolusda belirgin floresans, Primat karaciğer: Hücre çekirdeğinde ve nükleolusunda homojen floresans.	Scl-70 'e karşı antikorlar: Scl-70 (100 kDa) bantı pozitif
Ku	HEp-2 hücreleri: Hücre çekirdeğinde ince granüler floresans, bazılarında nukleolusun bir kısmı pozitif. Primat karaciğer: Hücre çekirdeğinde ince granüler, bir kısım çekirdeğin çevresinde belirgin floresans.	Ku'ya karşı antikorlar: Ku 86 (86 kDa) ve / ve ya Ku 72 (72 kDa) bantı pozitif
Ribozomal .P-Protein	HEp-2 hücreleri: Sitoplazmada pürüzsüz,ince granüler floresans. Primat karaciğer: Karaciğer dokusunun bütün yüzeyinde ve belirgin benekli floresans,	Ribozomal P-Protein'e karşı antikorlar: Ribozomal. P .- Protein P0 (38 kDa) ve/veya ribozomal. P .-Protein P1/P2 (15 kDa) de pozitif bantlar.
M2	HEp-2 hücreleri: Sitoplazmada belirgin kaba granüler floresans. Primat karaciğer: Karaciğer dokusunda granüler floresans.	M2'e karşı antikorlar: M2 (74 kDa) de pozitif bant.
Jo-1	HEp-2 hücreleri: Tüm sitoplazmada ince yoğun granüler, bazen stoplazmadan daha zayıf hücre çekirdeğinde ince benekli floresans.	Jo-1'e karşı antikorlar: Jo-1 (55 kDa) de pozitif bant.

Hep-2 westernblot çalışması

Reaktiflerin hazırlanması

1. Tüm kit içeriği ve hasta serumları, çalışmaya başlamadan 40 dakika önce oda sıcaklığına ulaşması için derin dondurucu ve buzdolabından çıkartıldı.
2. Hep-2 Westernblot kitinin içeriğinde bulunan konsantre üniversal bufferPlus (tampon çözelti) çalışacak örnek sayısına göre her bir hasta için; 1,5 ml tampon çözelti üzerine 13,5 ml distile su eklenerek seyreltilerek kullanıma hazır hale getiri. Tampon çözelti, membran striplerinin ıslatılmasında, striplerin yıkama basamaklarında ve serum örneklerinin dilüsyonunda kullandı.
3. Konsantre enzimle işaretlenmiş anti- insan IgG çalışmaya başlamadan önce çalışacak örnek sayısına göre gerekli hacim hesaplanarak seyreltildi. Bir test için 0,15ml konsantre konjugat üzerine, 1,35ml tampon çözelti eklendi. Hazır hale getirilen enzim konjugatı aynı gün içinde kullanıldı.
4. Substrat solüsyonu (NBT/BCHIP) kullanıma hazır halde kitin içinde mevcuttu.

Testin çalışılması

1. Çalışılacak her bir serum örneği için oda sıcaklığına getirilmiş bir strip inkübasyon kanalına konuldu. Kanallara yerleştirilen striplerin üzerine 1,5 ml tampon çözelti konularak çalkalayıcı üzerinde 15 dakika tutularak stripler ıslatıldı.
2. Süre sonunda kanaldaki tampon çözelti aspire edildi ve 1,5 ml dilüe serum (1:51) örnekleri kanallara aktarılarak 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
3. İnkübasyonun sonunda kanallardaki içerikler aspire edildi ve bağlanmamış serum içeriğinin ortamdan uzaklaştırılması için her bir kanala 1,5 ml tampon çözelti eklenerek 5 dakika yıkama yapıldı. Yıkama işlemi üç defa tekrarlandı.

4. Yıkama işlemi bittikten sonra her bir kanala 1,5 ml enzim konjugat eklenerek 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi.
5. Konjugat inkübasyonu sonrasında yıkama işlemi 7.'inci basamaktaki gibi yapıldı
6. Yıkama işleminden sonra her bir kanala 1,5 ml substrat eklendi ve 10 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bu aşamada stripler üzerinde kontrol bandı ve serum örneklerinde pozitiflikler varsa bantlar gözlendi.
7. Substrat inkübasyonunu takiben, kanallardaki tüm sıvı aspire edildi ve 3 kez 1dk. distile su ile yıkandı.
8. Stripler değerlendirme kağıdına yapıştırılarak otoantikor pozitiflik değerlendirmeleri yapıldı.

2.2.4. Scl-70 Antikorunun ELISA Yöntemiyle Tayini

Test Prensibi

ELISA yöntemi, duyarlılığının yüksekliği, hücre gerektirmemesi ve kantitatif tayinlerin yapılabilmesine imkan verdiğinden rutin uygulamalarda sık başvurulan yöntemlerden birisidir. Yöntemde seyreltilmiş hasta serumu antijen ile kaplanmış mikrotitrasyon kuyucuklarına eklenir ve inkübe edilir. Serum örneklerinde antijeni tanıyan antikorlar mevcut ise kuyucuklardaki antijene bağlanırlar. Serum inkübasyonu sonunda tüm kuyucuk içeriği aspire edilir ve kuyucuklar en az üç kez PBS ile yıkanır. Her kuyucuğa enzimle işaretlenmiş anti-IgG (konjugat) eklenir ve inkübe edilir. İnkübasyonu takiben tüm kuyucuk içeriği aspire edilir ve en az üç kez PBS ile yıkanır. Testin son kademesinde tüm kuyucuklara substrat eklenip kısa süre inkübe edilir ve tüm kuyucuklara stop çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur. Subsrat, bağlanan konjugat varsa bunun katalizlediği reaksiyonla renkli ürüne çevrilir. Standartlardan elde edilen absorbans değerlerine karşı standart derişimleri kullanarak çizilen kalibrasyon eğrisi yardımıyla örnekteki anti-Scl70 konsantrasyonu hesaplanır.

Testin Çalışması:

Reaktif ve Örneklerin Hazırlanması:

1. Tüm kit içeriği ve hasta serumları, çalışmaya başlamadan 30 dakika önce oda sıcaklığına ulaşması için derin dondurucu ve buzdolabından çıkartıldı.
2. Konsantre (x10) yıkama tamponu distile su ile seyreltildi. Hazırlanan yıkama çözeltisi içinde gözlenen kristaller var ise yıkama solüsyonu 37˚C de bekletilerek kristaller çözüldü.
3. Antijen kaplı ELISA plağı, standartlar, enzim konjugat (perosidaz işaretli anti-insan IgG, tavşan) , örnek tampon çözeltisi, substrat (3,3´,5,5´,tetrametilbenzidin,TMB/H_2O_2) ve stop (0.5 M sülfürik asit) solüsyonları kullanıma hazırdı.
4. Serum örnekleri örnek tampon çözeltisi ile 1/201 oranında seyreltildi (5 µl serum+ 1ml örnek tamponu).
5. Seyreltilmiş serum örnekleri, standartlar ve kontrollerin herbiri farklı mikrotitrasyon kuyucuklarına 100'er µl olarak pipetlendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. İnkübasyon süresinin sonunda, herbir kuyucuk içeriği aspire edildi ve kuyucuklar 3 kez 300 µl yıkama tamponuyla yıkandı.
7. Her kuyucuğa 100 µl konjugat pipetlenerek, 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. İnkübasyon süresinin sonunda, herbir kuyucuk içeriği aspire edildi ve kuyucuklar 3 kez 300 µl yıkama tamponuyla yıkandı.
9. Her kuyucuğa 100 µl substrat pipetlendi, 15 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi ve sürenin sonunda her kuyucuğa 100 µl stop çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu.
10. Stop çözeltisi eklendikten sonra her bir kuyucukta 450 ve 620 nm çift dalga boyunda absorbanslar ölçüldü. Delta absorbans değerleri, A=A450-A620 formülüyle hesaplandı. 620 nm'de yapılan okumalar kuyucuklarda gözlenebilecek plastikten gelen farklılıklar ve gözle fark edilemeyecek kirlilikleri elimine etmek için yapıldı. Standartların A değerlerine karşı

standart konsantrasyonları grafiği çizildi. Serum örneklerinin A değerlerinden Scl-70 antikor derişimleri U/ml olarak bulundu. Anti Scl-70 IgG ELISA testi, reaktiflerin kullanıma hazır hale getirilmesi dışında tam otomatik ELISA (EUROIMMUN Analyzer I, Almanya) cihazında yapıldı. 20 RU/ml'nin üzerinde bulunan sonuçlar anti-Scl-70 pozitif olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Sistemik Skleroz Hasta Grubu ANA, IFA, ELISA ve WB Sonuçları

Sistemik siklerozlu hasta grubu Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji ve Allerji Hastalıkları Bilim Dalı ve Romatoloji Bilim Dalı polikliniklerine başvuran ve ACR kriterlerine göre SSc tanısı konmuş 93 hasta ve kontrol grubu rutin İmmünoloji Laboratuar testlerinde ANA IFA testi çalışılmış, neticesi nükleolar ve nükleolar + benekli boyanma paterni gösteren ve otoimmün romatolojik hastalık tanısı almamış 90 olgudan oluşturuldu. SSc'li hasta gurubunun; 84'ü kadın (%90,3, yaş aralığı 21-73, yaş ortalaması 48,2±12,6) 9'u erkek (%9,7, yaş aralığı 21-73 yaş ortalaması 48,2±12,6) bireyden oluşturuldu (Çizelge 3.1). Kontrol grubu da 69'u kadın (%76,7, yaş aralığı 18-83 yaş ortalaması 46,8±14,9) 21'i erkek (%23,3, yaş aralığı 21-77, yaş ortalaması 46,3±14,5) bireyden oluşturuldu (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. SSc'li Hasta Grubun'da Kadın –Erkek Oranı, Yaş Aralığı ve Yaş Ortalaması

Cinsiyet	N Birey Sayısı(%)	Yaş Aralığı	Yaş Ortalaması
Kadın	84 (%90,3)	21-73	48,2±12,6
Erkek	9 (%9,7)	21-73	48,2±12,6

Çizelge 3.2. Kontrol Grubun'da Kadın –Erkek Oranı, Yaş Aralığı ve Yaş Ortalaması

Cinsiyet	N Birey Sayısı(%)	Yaş Aralığı	Yaş Ortalaması
Kadın	69 (%76,7)	18-83	46,8±14,9
Erkek	21 (%23,3)	21-77	46,3±14,5

SSc'li grupta indirekt immün floresan yöntemi ile ANA (IFA), Anti-Scl-70 (ELISA) ve testi çalışıldı. Sistemik Skleroz hasta grubunda floresans mikroskopta saptanan ANA pozitiflikleri ve titreleri çizelge 3.3'de, ANA pozitifliklerinde gözlenen

boyanma modelleri, Scl-70 (ELISA) ve WB toplu neticeleri çizelge 3.4'de verilmiştir. SSc'li grupta ANA IFA testinde en sık bulunan boyanma modeli % 55 ile Scl-70 olarak bulunurken bunu %17,2 ile sentromer takip etmiştir. Daha az sıklıkla gözlenen boyanma modelleri sırasıyla benekli tarzda nükleolar %5,4, benek ve benek+nükleolar %4,3, homojen nükleolar %3,2, homojen+benek %2,2 bulunmuş olup ANA negatif hasta oranımız %8,6'dır. ANA IFA testinde Scl-70 boyanma modeliyle tanımlayabildiğimiz 51 hasta serumunun tümünde Scl-70 ELISA testi de pozitif bulunurken, WB testinde nativ Scl-70 antijenine karşı gelen 100 kDa'luk bantlar sadece 46 (%49,5) serum örneğinde saptanabilmiştir.

Çizelge 3.3. Sistemik Sklerozlu Hasta Grubu ANA IFA Sonuçları

Dilüsyon oranı		Nükleolus		Nükleüs			Mitotik Hücre kromatin boyaması		Sitoplazmik Boyama Modeli	
		Homojen	Benek	Homojen	Benek	Sentromer	Homojen	Benek	Homojen	Benek
1/40	n	4	3	2	11	0	0	7	8	23
	%	3,7	2,8	1,9	10,2	0	0	6,5	7,4	21,4
1/100	n	0	11	5	19	0	0	18	0	0
	%	0	10,2	4,6	17,7	0	0	16,7	0	0
1/320	n	0	19	2	29	1	0	31	0	10
	%	0	17,7	1,9	27	1	0	28,8	0	9,3
1/1000	n	0	29	0	4	8	0	3	0	4
	%	0	27	0	3,7	7,4	0	2,8	0	3,7
1/10000	n	0	3	0	0	7	0	0	0	0
	%	0	2,8	0	0	6,5	0	0	0	0

Çizelge 3.4. Sistemik Skleroz Hasta Grubunda ANA Boyanma Modelleri, Scl-70 (ELISA) ve WB 100 kDa (nativ Scl-70) Saptanan Olguların Dağılımı

ANA Boyama Paterni	Oran%	ELISA(+)	WB(+)
Scl-70	**51 (%55)**	**51(%55)**	**46(%49.5)**
Sentromer	16 (%17,2)	0	-
Benek	4 (%4,3)	0	-
Nükleolar benek	5 (%5,4)	0	-
Nükleolar Hom	3 (%3,2)	0	-
Benek+ nükleolar	4 (%4,3)	0	-
Homojen+ Benek	2 (%2,2)	0	-
Negatif	8 (%8,6)	0	-
Toplam	93(%100)	51(%54,8)	46(%49.5)

Kontrol grubunda da indirekt immün floresan yöntemi ile ANA (IFA), Anti-Scl-70 (ELISA) ve WB testi çalışıldı. Kontrol grubunda floresans mikroskopta saptanan ANA pozitiflikleri ve titreleri çizelge 3.5'de, ANA pozitifliklerinde gözlenen boyanma modelleri, Scl-70 (ELISA) ve WB toplu neticeleri çizelge 3.6'de verilmiştir. Kontrol grubunun ANA IFA testinde en sık gözlenen boyanma modeli; nükleolar homojen %30, olarak bulunurken, bunu nükleolar homojen+benek %17,8, nükleolus homojen+ nükleusta homojen+ benek %13,4, nükleolus benek+ nükleus benek %10, Scl-70 boyanma paterni %8,9, benekli nükleolar %8.9, nükleolus homojen+ nükleus homojen %5,5, nükleolus benek+ nükleusta homojen+ benek %2,2, benek %1.1 ve negatif %2 oranında bulunmuştur. ANA IFA testinde Scl-70 boyanma modeliyle tanımlayabildiğimiz 8 hasta serumunun tümünde Scl-70 ELISA testi de pozitif bulunurken, ANA IFA testinde Scl-70 boyanma modeli tanımlanmayan 82 olguda Scl-70 ELISA testi negatif bulunmuştur. WB testinde nativ Scl-70 antijenine karşı gelen 100 kDa'luk bantlar sadece 8 (%8,9) serum örneğinde saptanabilmiştir.

Çizelge 3.5. Kontrol Grubu ANA IFA Sonuçları

Dilüsyon oranı		Nükleolus		Nükleüs			Mitotik Hücre kromatin boyaması		Sitoplazmik Boyama Modeli	
		Homojen	Benek	Homojen	Benek	Sentromer	Homojen	Benek	Homojen	Benek
1/40	n	21	8	1	15	0	0	0	4	16
	%	23,3	8,9	1,1	16,7	0	0	0	4,4	17,8
1/100	n	23	9	8	19	0	0	0	2	25
	%	25,5	10	8,9	21,1	0	0	0	2,2	27,8
1/320	n	11	3	2	9	0	0	0	0	0
	%	12,2	3,3	2,2	10	0	0	0	0	0
1/1000	n	6	6	2	7	1	0	0	0	0
	%	6,7	6,7	2,2	7,8	1,1	0	0	0	0
1/10000	n	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 3.6. Kontrol Grubunda ANA Boyanma Modelleri, Scl-70 (ELISA) ve WB 100 kDa (Nativ Scl-70) Saptanan Olguların Dağılımı

ANA Boyama Paterni	Oran%	ELISA(+)	WB(+)
Scl-70	8 (%8,9)	8 (%8,9)	8 (%8,9)
Nükleolar Benek+ Benek	9 (%10)	0	-
Nükleolar Homojen+ Homojen	5 (%5,5)	0	-
Nükleolar Homojen	27 (%30)	0	-
Nükleolar Homojen +Benek	16 (%17,8)	0	-
Nüklolar Homojen+ Homojen+ Benek	12 (%13,4)	0	-
Benek	1 (%1.1)	0	-
Benekli Nükleolar	8 (%8.9)	0	-
Nüklolar Benek+ Homojen+ Benek	2 (%2,2)	0	-
Negatif	2 (%2,2)	0	-
Toplam	90 (%100)	8 (% 8,9)	8 (%8,9)

Hasta grubunun; ANA IFA testi sonucuda toplam 85 olguda ANA pozitifliği, bunların 51'indeyse (%54,8) Scl-70 boyanma modeli gözlenmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Sistemik Skleroz Hasta Grubu ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Pozitif Olguların Yüzdesi

ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli	N(Birey Sayısı)	(%)Oran
Pozitif	51	54,8
Negatif	42	45,2
Toplam	93	100

Sistemik sklerozlu 93 Hasta serumunun 50'sinde hem ANA IFA Scl-70 boyanma modeli pozitifliği ve hem de Scl-70 ELISA pozitifliği saptanmıştır. ANA IFA Scl-70 boyanma modelinde pozitiflik saptanan1 serum örneğinde Scl-70 ELISA test sonucu negatif bulunmuştur. Benzer şekilde Scl-70 ELISA pozitif bulunan bir serum örneğinde ise ANA IFA Scl-70 boyanma modeli gözlenmemiştir. SSc'li 41 olgu serumunda hemANA IFA Scl-70 boyanma modeli ve hem de Scl-70 ELISA negatif bulunmuştur (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Sistemik Sklerozlu 93 Hasta serumunda Scl-70 ELISA Pozitif ve Negatif Örnekleri ile ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Pozitif ve Negatif Örneklerin Karşılaştırılması

	Scl-70 ELISA Negatif	Scl-70 EIISA Pozitif	Toplam
Scl-70 IFA Negatif	41(%97.6)	1 (%2.4)	42 (%100)
Scl-70 IFA Pozitif	1 (%2.0)	50 (%98)	51(%100)
Toplam	42 (%45.2)	51 (%54.8)	93 (%100)

Sistemik sklerozlu 93 Hasta serumunun 45'sinde hem ANA IFA Scl-70 boyanma modeli pozitifliği ve hem de Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) pozitifliği saptanmıştır. ANA IFA Scl-70 boyanma modeli pozitiflik saptanan 6 serum örneğinde Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) test sonucu negatif bulunmuştur. Benzer şekilde Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) pozitif bulunan bir serum örneğinde ise ANA IFA Scl-70 boyanma modeli gözlenmemiştir. SSc'li 41 olgu serumunda hem ANA IFA Scl-70 boyanma modeli ve hem de Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) negatif bulunmuştur (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Sistemik Sklerozlu 93 Hasta serumunda ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Pozitif ve Negatif örnekler ile Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Pozitif ve Negatif Örneklerin Karşılaştırılması

	Scl-70 IFA Negatif	Scl-70 IFA Pozitif	Toplam
Hep-2 WB 100 kDa Negatif	41(%87.2)	6 (%12.8)	47 (%100)
Hep-2 WB 100 kDa pozitif	1 (%2.2)	45 (%97.8)	46 (%100)
Toplam	42 (%45.2)	51 (%54.8)	93 (%100)

Sistemik sklerozlu 93 Hasta serumunun 45'sinde hem Scl-70 ELISA pozitifliği ve hem de Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) pozitifliği saptanmıştır. Scl-70 ELISA pozitiflik saptanan 6 serum örneğinde Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) test sonucu negatif bulunmuştur. Benzer şekilde Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) pozitif bulunan bir serum örneğinde ise Scl-70 ELISA boyanma modeli gözlenmemiştir. SSc'li 41 olgu serumunda hem Scl-70 ELISA ve hem de Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) negatif bulunmuştur (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Sistemik Sklerozlu 93 Hasta Serumunda Scl-70 ELISA Pozitif ve Negatif Örnekleri ile Hep-2 WB 100 kDa (Nativ Scl-70) Pozitif ve Negatif Örneklerin Karşılaştırılması

	Scl-70 ELISA Negatif	Scl-70 ELISA Pozitif	Toplam
Hep-2 WB 100 kDa Negatif	41 (%87,2)	6 (%12,8)	47 (%100)
Hep-2 WB 100 kDa pozitif	1 (%2,2)	45 (%97,8)	46 (%100)
Toplam	42 (%45,2)	51 (%54,8)	93(%100)

Kontrol grubunu oluşturan 90 olgunun serumunda ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli ve Scl-70 ELISA çalışmaları yapılmıştır. Bu grupta ANA IFA Scl-70 boyanma modeli pozitifliği gözlenen 8 (%8,9) olgunun hepsinde de Scl-70 ELISA pozitifliği saptanmıştır. ANA IFA Scl-70 boyanma modeli göstermeyen 82 serum örneğinin tümünde Scl-70 ELISA negatif bulunmuştur (Çizelge 3.11) .

Çizelge 3.11. Kontrol Gurubunda Serum ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Gösteren Örneklerle Scl-70 ELISA Pozitif ve Negatif Örneklerle Karşılaştırılması

	ELISA Negatif	ELISA pozitif	Toplam
Scl-70 IFA Negatif	82(%100)	0 (%0)	82 (%100)
Scl-70 IFA Pozitif	0 (%0)	8 (%100)	8 (%100)
Toplam	82 (%91.1)	8 (%8.9)	90(%100)

ANA IFA Scl-70 boyanma modeli pozitifliği gözlenen 8 olguların hepsinde de Scl-70 Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) pozitifliği saptanmıştır. ANA IFA da nükleolusta benekli tarzda boyanma modeli gösteren ancak nükleusta ve mitotik hücre kromatinlerinde tipik nokta tarzında boyanma göstermeyen (IFA değerlendirmesinde Scl-70 negatif olarak değerlendirilen) 5 serum örneğinde de Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) daha çalışmaya alınmış ancak Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) negatif olarak bulunmuştur (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12. Kontrol Gurubunda Serum ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli Gösteren Örneklerle Hep-2 WB Pozitif ve Negatif Örneklerle Karşılaştırılması

	Scl-70 IFA Negatif	Scl-70 IFA Pozitif	Toplam
Hep-2 WB 100 kDa Negatif	5(%100)	0 (%0.0)	5(%100)
Hep-2 WB 100 kDa Pozitif	0(%0.0)	8 (%100)	8 (%100)
Toplam	5 (%38.5)	8 (%61.5)	13 (%100)

Scl-70 ELISA pozitifliği gözlenen 8 olgunun hepsinde de Scl-70 Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) pozitifliği saptanmıştır. Scl-70 ELISA negatif olan 5 olgu daha çalışmaya alınmış ancak Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) negatif olarak bulunmuştur (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. Kontrol Gurubunda Scl-70 ELISA Pozitif ve Negatif Örnekleri ile Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Pozitif ve Negatif Örneklerin Karşılaştırılması

	Scl-70 ELISA Negatif	Scl-70 ELISA pozitif	Toplam
Hep-2 WB 100 kDa Negatif	5 (%100)	0 (%0)	5 (%100)
Hep-2 WB 100 kDa Pozitif	0 (%0)	8 (%100)	8 (%100)
Toplam	5 (%38.5)	8 (%61.5)	13(%100)

Sistemik Skleroz ve kontrol gurubu ANA IFA Scl-70 boyanma modeli, Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) sonuçları topluca çizelge 3.14'de verilmiştir.

Çizelge 3.14. Sistemik Sklerozlu Hastalarda ve Kontrol Gurubunda ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli, Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Sonuçları

	Sistemik Skleroz			Kontrol	
	Pozitif	**Negatif**		**Pozitif**	**Negatif**
Scl-70 IFA n:93	51 (%55)	42 (%45)	**Scl-70 IFA n:90**	8 (%8.9)	82 (%91.1)
Scl-70 ELISA n:93	51 (%55)	42 (%45)	**Scl-70 ELISA n:90**	8 (%8.9)	82 (%91.1)
Hep-2 WB 100 kDa n:93	46 (%49.5)	47 (%50.5)	**Hep-2 WB 100 kDa n:13**	8 (%61.5)	5 (%38.5)

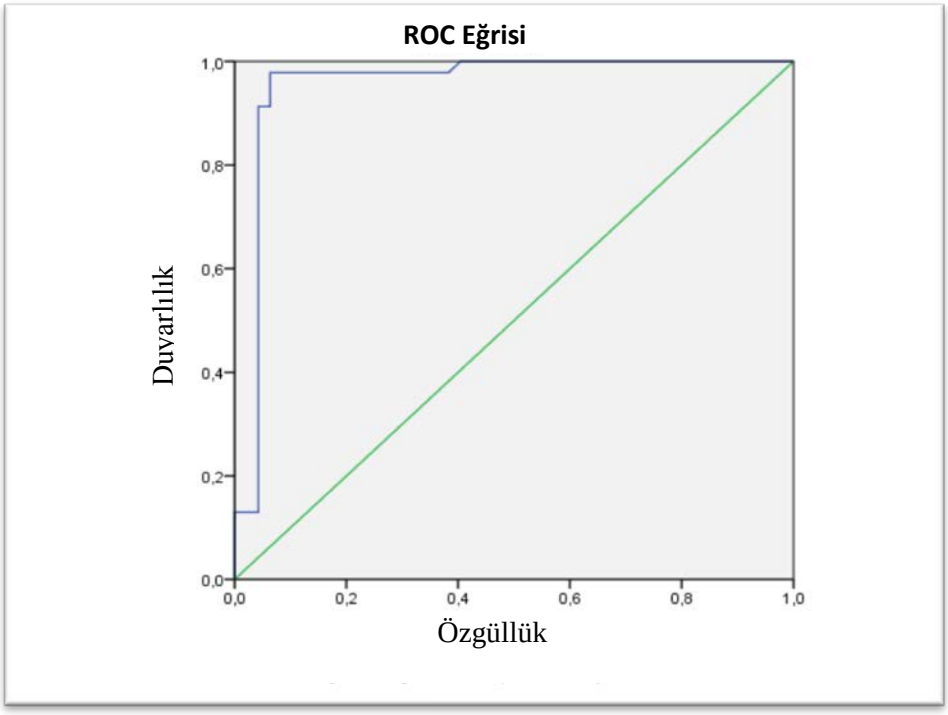
SSc'lu hasta grubunda Scl-70 ELISA yönteminin duyarlılığı % 97,8 ve özgüllüğü % 87,2 oranındadır. Bu testin güven aralığı % 95 (% 88.62- % 99.60) dir.

SSc'lu hasta grubunda ANA IFA Scl-70 boyanma modeliyle Scl-70 pozitifliği yöntem duyarlılığı % 97,8 ve özgüllüğü % 87,2 dir. Bu testin güven aralığı % 95 (% 88.62- % 99.60) dir (Çizelge 3.15).

Çizelge 3.15. ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli ve Scl-70 ELISA Yöntemlerinin Duyarlılığı ve Özgüllüğü

	Scl-70IFA	Scl-70 ELISA
Duyarlılık	%97.8	%97.8
Özgüllük (Seçicilik)	%87.2	%87.2

3.2. ROC Curve İstatistiği



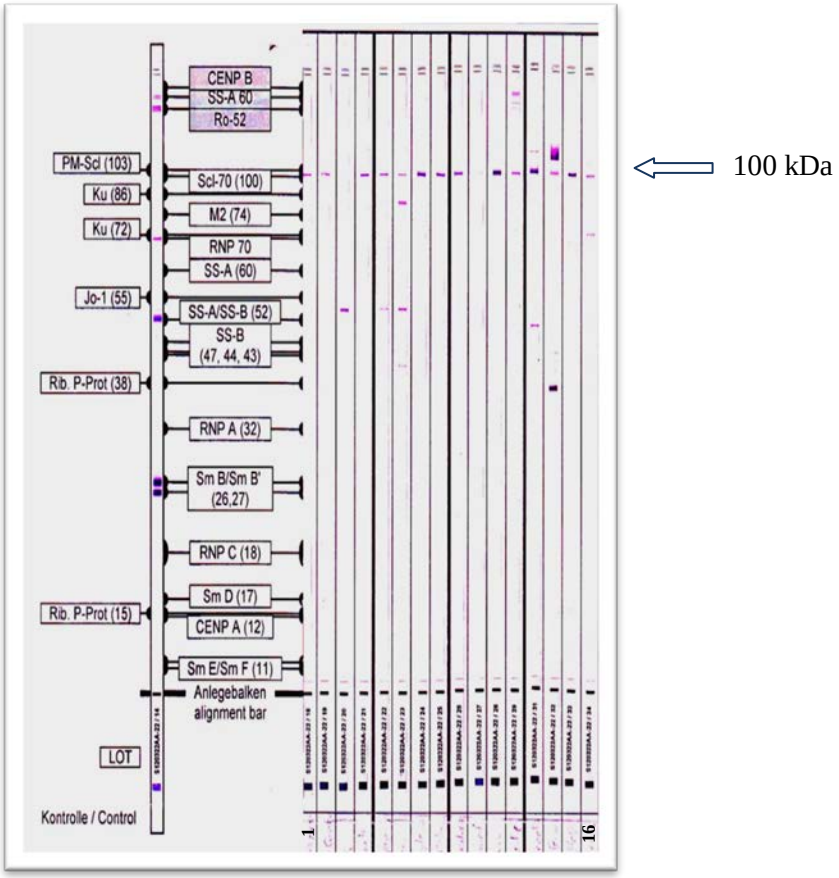
Şekil 3.1. SSc'li Hasta Grubunda Scl-70 ELISA yöntemi ROC Eğirisi (Eğri Altındaki alan, AUC = 0.954 P=0.000)

ROC Analizi, sadece bir duyarlılık ve özgüllük değeri kullanarak tanı koymanın getirdiği sakıncaları ortadan kaldırmak için geliştirilmiş istatistik değerlendirmedir. Bir ROC eğrisi, farklı eşik değerleri için dikey eksen üzerinde doğru pozitiflik (duyarlılık) ve yatay eksen üzerinde yanlış pozitiflik (1-özgüllük) oranlarının yer aldığı bir eğridir. En yaygın kullanılan ölçüm ise, ROC eğrisinin altında kalan alandır. AUC ne kadar büyük ise hastalığın tahmin edilmesinde test o kadar iyi olur. AUC'nin olası değerleri 0.5'ten (tanı konulamaz) 1.0'e (mükemmel tanı konulabilir) kadar değişim gösterir.

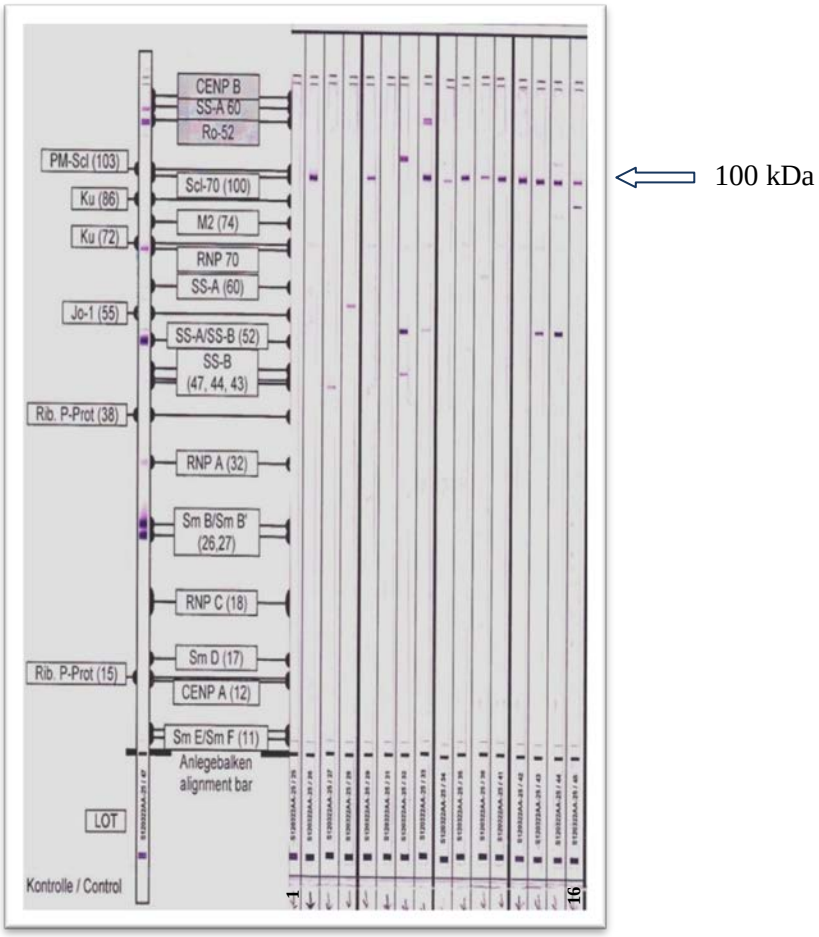
SSc'lu 93 hastada Scl-70 ELISA yöntemi için Roc Curve analizi yapıldı. Bu yöntemde eğri altındaki alan (AUC) 0.954, P=0.000 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup bu sonuçlar Scl-70 ELISA yönteminin SCL-70 pozitifliğini göstermede iyi bir tanı testi olduğunu göstermektedir.

3.3. Sistemik Sklerozlu Hastalarının Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) Çalışma Değerlendirilmesi

Sistemik Sklerozlu hastaların serum örneklerinden Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) yöntemi çalışıldı. Yapılan çalışmanın sonucunda 46 hastada pozitif bulundu. Şekil 3.2 ve 3.3 WB çalışmamızda 100 kDa'da bant gözlenen pozitif ve negatif serum örneklerine ait WB görüntüleri verilmiştir.



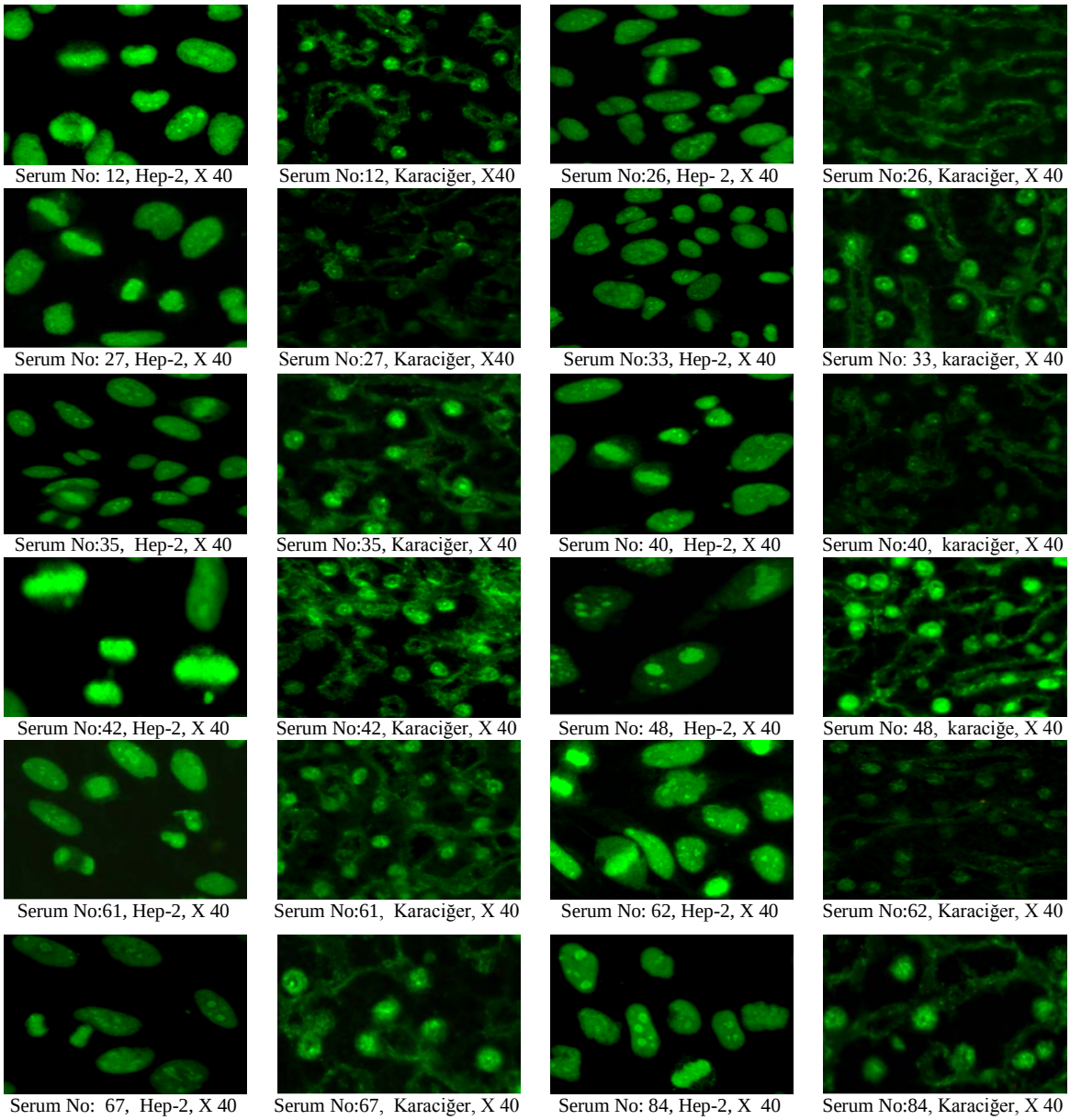
Şekil 3.2. SSc'li Hasta Grubunda Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) 'da Pozitif Bant Tespit Edilen 1(1), 2(2), 4(4), 5(7), 6(9), 7(11), 8(12), 9(13), 11(12),12(13), 13(14), 14 (19), 15(27), 16(28) Serum Örnekleri ve Bant Tespit Edilmeyen 3 (3),10(5) Serum Örneklerinin WB Çalışma Görüntüleri



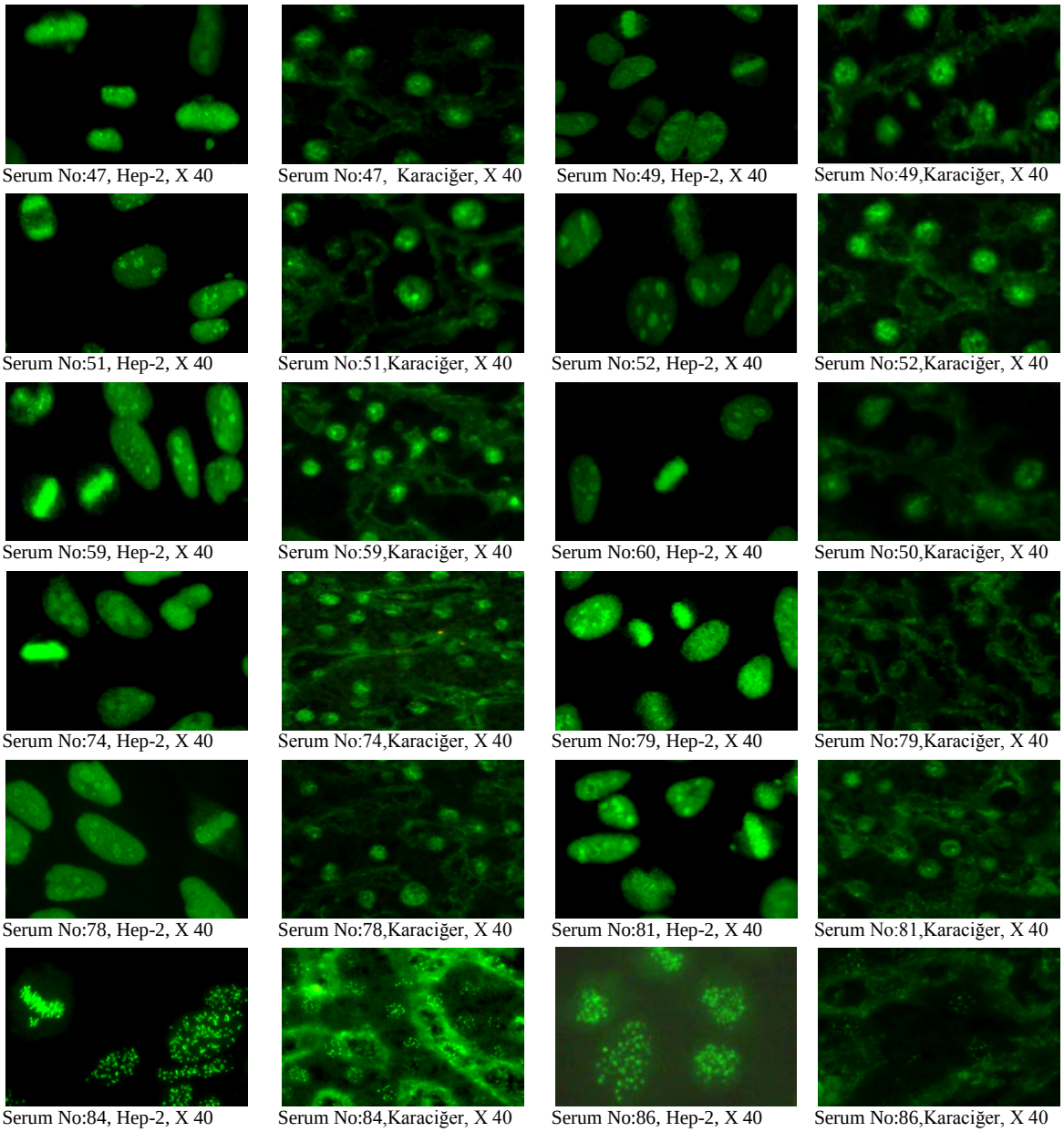
Şekil 3.3. SSc'li Hasta Grubunda Hep-2 WB 100 kDa (nativ Scl-70) 'da Pozitif Bant Tespit 2(29), 5(33), 7(36), 8(37), 9(39), 11(42),12 (43), 13(47), 14(51), 15(52), 16(59) Serum Örnekleri ve Bant Tespit Edilmeyen 1(6),3(8),4(10), 6(15), 10 (16) Serum Örneklerinin WB Çalışma Görüntüleri

Şekil 3.5 ve 3.6 Sistemik sklerozlu hastlarin ANA IFA Scl-70 Boyanma Modeli görüntüleri göstermektedir.

SSc'li hasta grubunda ANA IFA Scl-70 boyanma modeli ve sentromer boyanma modeli gösteren hasta serum örneklerine ait Hep-20-10 ve maymun karaciğer doku kesiti Zeiss, EuroStarII floresans mikroskopunda dijital kamera sisteminde çekilen görüntüleri Şekil 3.3 ve 3.4 'de verilmiştir.



Şekil 3.4. SSc'li Hasta Grubu Serumlaında Scl-70 Boyanma Modeli Gösteren 12, 26,27,33,35,40,42,48,61,62,67,84 No Örneklerine Ait Zeiss, Eurostar II Floresans Mikroskopunda Dijital Kamera Sisteminde Çekilen Hep-20-10 Ve Karaciğer IFA Görüntüleri



Şekil 3.5. SSc'li Hasta Grubu Serumlaında Scl-70 ve Sentromer Boyanma Modeli Gösteren 47, 49, 51, 52, 59, 60, 74, 78, 79, 81, 84, 86 No Örneklerine Ait Zeiss, Eurostar II Floresans Mikroskopunda Dijital Kamera Sisteminde Çekilen Hep-20-10 Ve Karaciğer IFA Görüntüleri

4. TARTIŞMA

Otoimmün hastalıkların tanı aşamasında, IFA yöntemi ile yapılan ANA taraması çok önemli bir basamaktır. Anti-topoisomeraz I (Scl-70) antikoru sklerodermalı hastalara özgü antikorlardan biridir (Shero, 1986). Bu otoantikor özellikle diffüz sistemik sklerozlu hastalarda diagnostik bir otoantikor olarak bilinmektedir (Tsay ve ark, 1990). Bu otoantikorun SSc'li hastalardaki gözlenme sıklığı yaklaşık olarak % 40 olarak bildirilmiş olmakla birlikte etnik farklılıklarda bu otoantikorun bulunma sıklığı % 28-70 arasında değişkenlik gösterebilmektedir (Reveille ve ark, 2001; Kuwana ve ark, 1994). SSc'li hastalarda bu otoantikor beyaz ırkta daha düşük oranlarda gözlenirken, Japon ve Taylandlılarda daha yüksek oranlarda bulunmuştur. Çalışmamızda, 93 SSc'li hasta serum örneği ve 90 olguluk kontrol grubu serum örneklerinde topoisomeraz I'e karşı oluşan bu antikorların özgün boyanma modeli gösterip göstermediği ve şayet özgün boyanma modeli gösteriyorsa bunun nasıl tanımlanabileceğini, ELISA, Hep-2 WB gibi daha spesifik tanı yöntemleriyle karşılaştırarak tespit etmeyi amaçladık.

SSc'li grupta ANA IFA testinde en sık bulunan boyanma modeli %55 ile Scl-70 olarak bulunurken bunu %17,2 ile sentromer takip etmiştir. Daha az sıklıkla gözlenen boyanma modelleri sırasıyla benekli tarzda nükleolar %5,4, benek ve benek+nükleolar %4,3, homojen nükleolar %3,2, homojen+benek %2,2 bulunmuş olup ANA negatif hasta oranımız %8,6'dır. SSc'li hasta grubunda toplam ANA IFA pozitifliği %91,4 (n=85) olarak bulunmuştur. SSc'li hasta örneklerinde gözlediğimiz anti-topoisomeraz I antikor boyanma modeli gösteren ANA pozitiflik oranı, SSc'li hastalarda yaklaşık ortalama olarak bildirilen %40'ın üzerinde olmakla birlikte Türk popülasyonunda etnik farklılıklar göz önüne alındığında bildirilen oran (% 28-70) aralığındadır. SSc'lu hastalarda anti sentromer pozitifliği bir çalışmada %20-30 arasında bildirilirken bu oranların farklı etnik gruplarda değişken olabileceği bildirilmiştir (Hamaguchi, 2010). Bizim bulduğumuz sentromer antikor pozitifliği (%17,2) bildirilen oranlara oldukça yakındır.

Kontrol grubunu, ANA IFA testi çalışılmış, neticesi nükleolar, nükleolar + benekli ve nükleolar+homojen boyanma paterni gösteren ve otoimmün romatolojik hastalık tanısı almamış 90 olgudan oluşturduk. Çalışmamızda, Scl-70 tipik boyanma modeli ile yakın boyanma modeli gösteren serum örneklerinin ayrımının sağlanması amaçladık. Kontrol grubunun ANA IFA testinde en sık gözlenen boyanma modeli; nükleolar homojen %30, olarak bulunurken, bunu nükleolar homojen+benek %17,8, nükleolus homojen+ nükleusta homojen+ benek %13,4, nükleolus benek+ nükleus benek %10, Scl-70 boyanma paterni %8,9, benekli nükleolar %8.9, nükleolus homojen+ nükleus homojen %5,5, nükleolus benek+ nükleusta homojen+ benek %2,2, benek %1.1 ve negatif %2 oranında bulunmuştur. Kontrol grubunda toplam ANA IFA pozitifliği %97,8 (n=88) olarak bulunmuştur.

ANA IFA'da anti-topoisomeraz I antikoru boyanma modelinde, nükleus, nükleolus, interfaz hücrelerinin sitoplazması, NOR ve mitotik hücrelerin kromozomlarının metafaz hattında kendine özgün bir boyanma modeli gösterdiğini bildiren şu ana kadar yapılmış tek bir çalışma vardır (Dellavence ve ark, 2009). ANA IFA'da anti-topoisomeraz I antikorunun boyanma modelini göstermeyi hedefleyen çalışmamız bu alandaki ikinci araştırmadır. IFA görüntülerinden elde ettiğimiz sonuçlarda anti-topoisomeraz I antikorunun nükleus, nükleolus ve mitotik hücre kromozomlarının metafaz hattındaki benekli boyamalarla belirlenebildiğini ancak daha önce yapılan çalışmada bildirilen NOR ve interfaz hücrelerinin sitoplazmasında boyanma modellerine rastlamadık. Bu farklılık ANA IFA testinde kullanılan Hep-2, Hep-2000 ve bizim substrat hücre olarak kullandığımız Hep-20-10 fikse edilmiş hücrelerinde farklılıklar gösterebilir. Özellikle Hep-2 hücrelerinin kullanımında interfaz hücreleri kısmen daha fazlayken mitoza giden hücre oranları daha düşüktür. Bu nedenle mitotik hücrelerdeki özelliklerin saptanması zor olabilir. Bu açıdan bizim kullandığımız Hep-20-10 hücreleri daha elverişli olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca substrat hücrelerinin lamlara veya lamellere fikse edilmesinde kullanılan kimyasalların bazı antijenleri daha iyi veya daha zayıf fikse edebildiği de bilinmektedir. Bu konuda yapılan ilk çalışmada, Hep-2 hücre slaytları altı farklı üreticiden (Hemagen, Bion Enterprise, Bio-Rad, Inova, The binding site, IMMCO) temin edildiği, ayrıca laboratuarlarında üretilen Hep-2 hücrelerinin -20ºC'da 5 dakika

metanol ve ardından 2 dakika asetonla fikse edildiği ve hücrelerin fiksasyonunda alternatif olarak %4'luk paraformaldehitle 30 dakika inkübasyonu takiben PBS'le yıkandığı, son aşamada -20ºC'da aceton'da 2 dakika inkübasyonu takiben 4ºC'da PBS içinde kullanılana kadar saklandığı belirtilmiştir. Ancak farklı üreticilerden elde edilen ve kendileri tarafından farklı yöntemler yapılan Hep-2 hücre fiksasyonlarının anti-topoisomeraz I boyanma modelinin tanımlanması ile ilgili bir görüş bildirmemişlerdir. ANA IFA testinde kullanılan farklı hücrelerin ve farklı hücre fiksasyon yöntemlerinin sonucunda elde edilen ANA IFA slaytları kullanılarak aynı topoisomeraz I boyanma modellerinin gözlenmesinin güç olduğunu düşünüyoruz. Çalışmamızda kullandığımız Hep-20-10 hücreleri farklı bir üreticiye ait olup bu hücrelerin fiksasyonu aseton ile yapılmaktadır. ANA IFA'da anti-topoisomeraz I antikoru boyanma modelinin tanımlanmasında bulgularımız daha önce yapılan çalışmadan farklılık göstermesi bu nedenle olabilir. Bu antikorun IFA yöntemiyle boyanma modellerinin tanımlanmasının standart bir hücre ve fiksasyon yöntemiyle yapılması gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca bu konudaki çalışmalarımız IFA mikroskopik değerlendirmelerinin subjektiv ve uzmanlık gerektirdiğini göstermiştir. Mikroskopik değerlendirmelerimiz bu konuda uzman farklı 2 kişi tarafından birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmiştir. Araştırmamız doğru değerlendirilmeyle bu otoantikoru IFA yöntemiyle tanımlanmasının Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB yöntemlerine çok yakın duyarlılıkta tayin edilebileceğini göstermiştir.

Bizzaro ve ark.'larının (2000) yaptığı bir çalışmada topoisomeraz I antikoru 27 sistemik sklerozlu hasta serumu ve 9 kontrol serumundan oluşturulan toplam 36 olguda, 50 farklı laboratuarda test edilmiştir. Çalışmada, farklı immünolojik yöntemlerin anti topoisomeraz I antikorunu saptanmasındaki özgüllüğü ve hassasiyeti, 23 farklı firma ürünü 42 ELISA, 21 immünblot (IB), 3 counterimmunoelectrophoresis (CIE) ve 2 dot- blot yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Anti-topoisomeraz I (Scl-70) antikorunun ELISA yöntemiyle özgüllüğü % 99,2 duyarlılığı % 97,2 , immünblot yöntemiyle özgüllüğü % 97,6 duyarlılığı %96,1 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda 93 SSc'lu hastada Scl-70 ELISA yönteminin özgüllüğü % 87,2 ve duyarlılığı % 97,8 olarak bulunmuştur. Scl-70 ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü için güven aralığı % 95 (% 88,6-99,6) dir. ANA IFA Scl-70 boyanma modeliyle bu antikorun tanımlanmasındaki duyarlılığı %97,8 özgüllüğü ise %87,2 dir. ANA IFA Scl-70 boyanma modelinin antikoru tanımladaki duyarlılığı ve özgüllüğü için güven aralığı %95 (% 88,6-99,6) dir. SSc'li hasta grubu serumlarında topoisomeraz I antikor taramalarında yapılan Hep-2 WB testinde 46 olguda 100 kDa'da nativ Scl-70 'e karşı gelen bölgede bant tespit edilmiştir. Bu yöntem altın standart olarak kabul edilerek Scl-70 ELISA'da 5 hastada (%5,4), ANA IFA Scl-70 boyanma modeli gösteren 5 (% 5,4) hastada yanlış pozitiflik verdiği saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız yöntemlerin farklı avantaj ve dezavantajları vardır. ANA IFA yöntemi kullanılan hücre, hücrenin fiksasyon işlemi, işaretli ikinci kat antikor kalitesi, floresans mikroskop ayarları gibi bir çok faktörden etkilenebilir. Bu yöntem yarı kantitatifdir ve mikroskopik değerlendirmeleri subjektifdir. Ancak değerlendirmedeki uzmanlıkla bir tarama testi olması yanı sıra bir çok otoantikorun tanımlanabilmesine olanak verir. ELISA yöntemiyle antikor tayinleri, mikro kuyucukların kaplamasında kullanılan antijenin saflığı, çalışma ortamının koşulları, test kademelerindeki yıkamalar ve antijenlerin yapı benzerliklerinden etkilenir. Bu yöntemle kantitatif tayinler yapılabilir. Ancak her otoantikor için farklı ELISA testleri yapmak gerekir. Ekonomik olarak da daha pahalıdır. Hep-2 WB yöntemiyle farklı molekül ağırlığındaki antijenlere karşı antikorlar aynı anda tayin edilebilir. Ancak antijenlerin stabilitesi, test kademelerindeki yıkamalar, çalışma ortamı koşulları testin kalitesini etkiler ve bu yöntem kalitatifdir. Genelde WB yöntemi HIV gibi bazı enfeksiyon parametrelerinde doğrulama testi olarak kullanılmaktadır. Otoantikorların tayininde WB yöntemi bazen düşük antijen konsantrasyonlarında zayıf bantlar verebilir. ANA IFA, Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB yöntemleri ekonomik olarak karşılaştırıldığında en ekonomik test ANA IFA olup bunu Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB izlemektedir. ANA IFA testi 30'un üzerinde otoantikorun tanımlanabilmesine olanak verir. Bu tanımlama testinde ANA IFA boyanma modellerinin titiz bir şekilde tanımlanması, sentromer antikorları, DFS-70, AMA gibi otoantikorların yanı sıra topoisomeraz I'e karşı antikorların da etkin bir şekilde saptanabileceğini gösterdik.

Kullandığımız yöntemlerden Scl-70 ELISA testi sonuçları kantitatifdir. Bu nedenle bu testin duyarlılık ve özgüllüğünün saptanmasında ROC analizi yapılmıştır. SSc'lu 93 hastada Scl-70 ELISA yöntemi için Roc Curve analizi yapıldı. Bu yöntemde eğri altındaki alan (AUC) 0.954, P=0.000 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup bu sonuçlar Scl-70 ELISA yönteminin SCL-70 pozitifliğini göstermede iyi bir tanı testi olduğunu göstermektedir.

SSc'lu hastalarda en sık bulunan topoisomeraz I ve sentromer antikorları Hep-20-10 hücreleri kullanılarak yapılan ANA IFA testinde yüksek duyarlılıkta ve en ekonomik şekilde tanımlanabileceği gösterilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamızda, sistemik skleroz tanısı almış 93 hastada ve 90 kontrol grubunda Hep-20-10 hücreleri kullanılarak ANA IFA, Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB testleri yapılarak topoisomeraz I antikoru tayin edilmiştir. SSc'li grupta ANA IFA testinde en sık bulunan boyanma modeli % 55 ile Scl-70 olarak bulunurken bunu %17,2 ile sentromer takip etmiştir. ANA IFA boyanma modeliyle topoisomerasz I ile tanımlanmasına odaklanan bu araştırmamız kaynaklarda bulunan ikinci çalışmadır. ANA IFA Scl-70 boyanma modeli gösteren serum örnekleri Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB yöntemleriyle de karşılaştırılmış ve bu otoantikorun tayinde kullanılan ANA IFA yönteminin otoantikorların taramasında kullanılabileceği gibi titiz değerlendirmelerle topoisomeraz I antikorunun yüksek duyarlılıkta ve en ekonomik şekilde tayinine olanak verdiği kanıtlanmıştır.

ANA IFA boyanma modelleriyle topoisomeraz I antikorunun mikroskopik tanımlanmasında Hep-20-10 hücrelerinde 3 farklı boyanma modelinin; nükleolusta benekli, nükleusda benekli ve kromozomların metafaz hattında daha belirgin boyanmalarla tespit edilebileceği belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular daha önce rapor edilmemiştir. ANA boyanma modelleriyle topoisomeraz I antikor tanımlama Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB yöntemleriyle de teyit edilmiştir.

SSc'lu hastalarda en sık görülen Scl-70'de anti sentromer antikorları Hep-20-10 hücrelerinin kullanıldığı ANA IFA testinde yüksek duyarlılıkta tanımlanabilmekte olup bizim araştırmamız bu konudaki çalışmalara öncülük edeceği umulmaktadır.

ÖZET

Sistemik Sklerozlu Hastalarda Anti Topoisomeraz I'e Karşı Oluşan Antikorların IFA Yöntemiyle Tanımlanması

Çalışmamızda, 93 SSc'li hasta serum örneği ve 90 olguluk kontrol grubu serum örneklerinde topoisomeraz I'e karşı oluşan antikorların özgün boyanma modeli gösterip göstermediği ve şayet özgün boyanma modeli gösteriyorsa bunun nasıl tanımlanabileceğini, ELISA, Hep-2 WB gibi daha spesifik tanı yöntemleriyle karşılaştırarak tespit etmeyi amaçladık.

Topoisomeraz I (Scl-70) antikoru, diffüz kutanöz sistemik skleroz hastalığında oluşan en spesifik serolojik belirteç olup temel tanısal sınıflama kriterleri arasındadır. Bu antikorun hastalığın prognoz ve tedavi sürecinde çok önemli rolü vardır.

Bu konuda daha önce yapılmış bir çalışma mevcut olup Hep-2 hücreleri kullanılarak yapılan ANA IFA testinde Scl-70 boyanma modelinin nükleus, nükleolus, interfaz hücrelerinin sitoplazması, NOR ve mitotik hücrelerin kromozomlarının metafaz hattında boyanma gösterdiği bildirilmiştir.

Araştırmamızda ACR kriterlerine göre tanı almış 93 SSc'lu hasta ve 90 kontrol dahil edilmiştir. Olgularımızın tümünde topoisomeraz I (Scl-70) antikorun ANA IFA tarama testi, Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB testleri çalışılmıştır. Hep-20-10 hücreleri kullanılarak yaptığımız ANA IFA tarama testinde topoisomeraz I antikorunun nükleus, nükleolus ve mitotik hücre kromozomlarının metafaz hattındaki benekli boyamalarla tanımlanabileceğini gösterdik. Daha önce yapılan çalışmada bu otoantikorun ayrıca NOR ve interfaz hücrelerinin sitoplazmasında da boyanma gösterdiği bildirilmiş olmakla birlikte, araştırmamızda biz bu boyanma modellerini gözlemedik. ANA IFA Scl-70 boyanma modeli gösteren serum örneklerinde Scl-70 ELISA ve Hep-2 WB testleri çalışılarak ANA IFA tarama testinde bu antikorunun %97,8 duyarlılıkta ve %87,2 özgüllükte tanımlanabileceğini, yöntemin ekonomik ve pratik olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Anti-topoisomeraz I, Otoantikor, Scl-70, Sistemik Skleroz, IFA, Hep-2 WB, ELISA

SUMMARY

Screeing of Antibodies Against Topoisomerase I with IFA in Sistemic Sclerosis Patients

Purpose of this study is to investigate whether antibodies against topoisomerase I show a specific staining pattern or not in 93 sistemic sclerosis patients and 90 control grup and if it shows original staining pattern how it could be defined and compared with specific diagnostic methods like ELISA, Hep-2 WB.

Autoantibodies to topoisomerase I have been considered a specific serological marker for diffuse systemic sclerosis. This autoantibody provides important diagnostic and prognostic information and is useful in defining clinical subsets of the disease.

In an earlier study made in this topic shows, the IFA pattern designated anti Scl-70 pattern comprises the staining of five cell domain: nucleus, nucleolus, cytoplasm in interfase cells, NOR and chromosome metaphase plate in mitotic cells.

In our study, Sera with 93 sistemic sclerosis patients were collected according to ACR criteria. Topoisomerase I (Scl-70) antibody were studied with ANA IFA, Scl-70 ELISA and Hep-2 WB tests in all our patients. We observed speckled staining in nucleus, nucleolus, chromosome metaphase plate in mitotic cells but not in cytoplasm in interfase cells or NOR. We used Scl-70 ELISA and Hep-2 WB test for serum samples showing IFA ANA Scl-70 staining pattern and found 97.8% sensitivity and 87.2% specificity for this method. It seems to be an economical and practical test.

Key Word: Anti-topoisomerase I, Autoantibody, Scl-70, Systemic Sclerosis, IFA, Hep-2 WB, ELISA

,

KAYNAKLAR

ABOYUSSEF, M. (2004). The value of the anti-nuclear antibodies (ANA). ASJOG, **1:** 68-71.

AKIYAMA, Y., OGAWA, F., IWATA, Y., KOMURA, K., HARA, T., MUROI, E. (2009). Autoantibody against activating transcription factor-2 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*, **27:**751-7.

AMOURA, Z., KOUTOUZOV, S., CHABRE, H., CACOUB, P., AMOURA, I., MUSSET, L. (2000). Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases - Antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*; **43:**76-84.

ARBUCKLE, M., MCCLAİN, M., RUBERTONE, M., HAL SCOFİELD, R., DENNİS, JAMES, J., HARLEY, J. (2003). Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. N Engl J Med , **349:**1526-1533.

ASSASSI, S., FRITZLER, MJ., ARNETT, FC., NORMAN, GL., SHAH, KR., GOURH, P. (2009). Primary Biliary Cirrhosis (PBC), PBC Autoantibodies, and Hepatic Parameter Abnormalities in a Large Population of Systemic Sclerosis Patients. *J Rheumatol*,36:2250-2256.

ASSASSİ, S., FRİTZLER, MJ., ARNETT, FC., NORMAN, GL., SHAH, KR., GOURH, P. (2009). Primary Biliary Cirrhosis (PBC), PBC Autoantibodies, and Hepatic Parameter Abnormalities in a Large Population of Systemic Sclerosis Patients. *J Rheumatol*, **36:**2250-2256.

ATASSI, MZ., CASALI, P. (2008). Molecular mechanisms of autoimmunity. Autoimmunity, **41(2):** 123-132.

AYER, LM., SENÉCAL, J-L., MARTİN, L., DİXON, GH., FRİTZLER, MJ. (1994). Antibodies to high mobility group (HMG) proteins in systemic sclerosis. *J Rheumatol*; **21:**2071-2075.

BABST,M. (2004). GGAing ubiquitin to the endosome. *Nat Cell Biol*; **6:**175-177.

BAGNASCO, M., GRASSIA, L., PESCE, G. (2007). The managment of the patient with unexpected autoantibody positivity. *Autoimmunity Reviews*, **6:** 347-353.

BARNES, J., MAYES, MD. (2012). Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol*; **24:**165-70.

BARONİ, SS., SANTİLLO, M., BEVİLACQUA, F., LUCHETTİ, M., SPADONİ, T., MANCİNİ, M. (2006). Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*; **354:**2667-2676.

BELİZNA, C., HENRİON, D., BEUCHER, A., LAVİGNE, C., GHAALİ, A., LEVESQUE, H. (2010). Anti-Ku antibodies: Clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev*, **9:**691-694.

BEN-CHETRİT, E. (1997). Anti Ro/La antibodies and their clinical association. *Isr J Med Sci*; **33:**251-253.

BHANJİ, R., EYSTATHİOY, T., CHAN, EKL., BLOCH, DB., FRİTZLER, MJ. (2007). Clinical and Serological Features of Patients with Autoantibodies to GW/P Bodies. *Clin Immunol*, **123:**247-56.

BIZZARO, N. (2007). Autoantibodies as predictors of disease: the clinical and experimental evidence. Autoantibody Reviews, **6:** 325-333.

BIZZARO, N., TONUTTI, E., VILLALTA, D., BASSETTI, D., TOZZOLI, R., MANONI, F., PIRRONE,S., PIAZZA, A.,RIZZOTTI,R., PRADELLA, M. (2000). Sensitivity and Specificity of Immunological Methods for the Detection of Anti-Topoisomerase I (Scl70) Autoantibodies: Results of a Multicenter Study. *Clinical Chemistry*,**46:**1681-1685.

BORKOWSKİ, A., GYLİNG, M., MUQUARDT, C., BODY, JJ., LECLERCQ, G. (1991). Estrogen-like activity of a subpopulation of natural antiestrogen receptor autoantibodies in man. *Endocrinology*;**128:**3283-3292.

BRANDT, KD., KREY, PR. (1977). Chalky joint effusion: the result of massive synovial deposition of calcium apatite in progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, **20:**792–796.

BURLİNGAME, RW., LOVE, WE., WANG, B-C., HAMLİN, R., XUONG, N-H., MOUDRİANAKİS, EN. (1985). Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 A. *Science*, **228:**546-553.

CASARİ, S., HAENEY, M., FARRAND, S., HERRİCK, A. (2002). Antineutrophil cytoplasmic antibodies - A "Red Flag" in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*, **29:**2666-7.

CAVAZZANA, I., CERİBELLİ, A., TARABORELLİ, M., FREDİ, M., NORMAN, G., TİNCANİ, A. (2011). Primary Biliary Cirrhosis-related Autoantibodies in a Large Cohort of Italian Patients with Systemic Sclerosis. *J Rheumatol*, **38:**2180-2185.

CHAN, EKL., IMAİ, H., HAMEL, JC., TAN, EM. (1991). Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolar organizer region auotantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *J Exp Med;* **174:**1239-1244.

CHIFFLOT, H., FAUTREL, B., SORDET, C. (2008). Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. Semen Arthritis Rheum, **37:** 223-235.

CHIZZOLINI, C., RASCHI, E., REZZONICO, R., TESTONI, C., MALLONE, R., GABRIELLI, A. (2002). Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum, **46:**1602-1613.

CLEMENTS, P., LACHENBRUCH, P., SEIBOLD, J. (1995). Inter or interaobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis, *J Rheumatol*, **22**:1281–1285.

CZÖMPÖLY, T., SIMON, S., CZİRJAK, L., NEMETH, P. (2009). Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews,* **8:**692-696.

D'ALESSIO, S., FIBBI, G., CINELLA, M., GUIDUCCI, S., DEL ROSSO, A,. MARGHERI, F., SERRATI, S., PUCCI, M., KAHALEH, B. (2004). Matrix metalloproteinase 12- dependent cleavage of urokinase receptor in systemic sclerosis microvascular endothelial cells results in impaired angiogenesis. *Arthritis Rheum*, **50:**3275-3285.

D'ARPA, P., WHİTE-COOPER, H., CLEVELAND, DW., ROTHFIELD, NF., EARNSHAW, WC. (1990). Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. Arthritis Rheum, **33:** 1501- 1511.

DAGHER, JH., SCHEER, U., VOİT, R., GRUMMT, I., LONZETTİ, L., RAYMOND, Y . (2002). Autoantibodies to NOR 90/hUBF: Longterm clinical and serological followup in a patient with limited systemic sclerosis suggests an antigen driven immune response. *J Rheumatol*; **29:**1543-1547.

DELLAVENCE, A., GALLİNDO, C., GUANAES Soares M. (2009). Redefinding the Scl-70 indirect İmmunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immune fluorescence pattern. *Rheumatology*; **48:**623-637.

DENTON, CP., BLACK, CM. (2004). Scleroderma – clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, **18:** 271-290.

DESWAL, A., FOLLANSBEE, W.F. (1996).Cardiac involvement in scleroderma, *Rheum Dis North Am*, **22:**841–860.

DICK, T., MIERAU, J., BART-BAZZANELLA, P., ALAVİ, M., STOYANOVA-ACHOLZ., KINDLER, J., GENTH, E. (2002). Coexistence of antitopoisomerase I and antisentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis, **61:** 121-127.

DOUVAS, AS., ACHTEN, M., TAN, EM,. (1979). Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem*;**254:**10514-22.

DUPİRE, G., NİCAİSE, C., GANGJİ, V., SOYFOO, M. (2012). Increased serum levels of high-mobility group box 1 (HMGB1) in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol*, **41:**120-123.

ELKAYAM, O., OUMANSKI, M., YARON, M. (2000). Watermelon stomach following and preceding systemic sclerosis, *Semin Arthritis Rheum*, **30:**127–131.

ELKON, K., CASALI, P. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nature Reviews Rheumatology*,**4(9):**491-498.

ENARSON, P., RATTNER, JB., OU, Y., MIYACHI, K., HORIGOME, T., FRITZLER, MJ. (2004)Autoantigens of the nuclear pore complex. *J Mol Med*, **82:**423-33.

FALKNER, D., WILSON, J., MEDSGER TA, Jr., MOREL, PA. (1998). HLA and clinical associations in systemic sclerosis patients with anti-Th/To antibodies. *Arthritis Rheum*, **41:**74-80.

FERTIG, N., DOMSIC, RT., RODRIGUEZ-REYNA, T., KUWANA, M., LUCAS, M., MEDSGER, TA. (2009). Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: A new serologic marker associated with pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*,**61:**958-65.

FRITZLER, MJ., RATTNER, JB., LUFT, LM., EDWORTHY, SM., CASIANO, CA., PEEBLES, C. (2010). Historical perspectives on the discovery and elucidation of autoantibodies to centromere proteins (CENP) and the emerging importance of antibodies to CENP-F. *Autoimmun Reviews*, **10:**194-200.

FRİTZLER, MJ. (2008). Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmun Reviews*, **7(8):** 616-620.

FRİTZLER, MJ., VON MUHLEN, CA., TOFFOLİ, SM., STAUB, HL., LAXER, RM. (1995). Autoantibodies to the nucleolar organizer antigen NOR-90 in children with systemic rheumatic diseases. *J Rheumatol*; **22:**521-524.

Gabrielli, A., Avvedimentoand, EV,. Krieg, T. (2009). Scleroderma. N Engl J Med; **360:**1989-2003.

GANAPATHY, V., DANİELS, T., CASİANO, CA. (2003). LEDGF/p75: a novel nuclear autoantigen at the crossroads of cell survival and apoptosis. *Autoimmun Rev*, **2(5):**290-297.

GLIDDON, AE. DORE, CJ., DUNPHY, J., BETTERIDGE, Z., MCHUGH, NJ., Maddison PJ. (2011). Antinuclear Antibodies and Clinical Associations in a British Cohort with Limited Cutaneous Systemic Sclerosis. *Journal of Rheumatol*, **38:**702-5.

GOMEZ-PUERTA, JA., BURLİNGAME, RW., CERVERA, R. (2008). Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: Diagnostic and clinical value. *Autoimmun Rev*; **7:** 606-611.

GRASSEGGER, A., POHLA-GUBO, G., FRAUCHER, M., HINTNER, H. (2008). Autoantibodies in systemic sclerosis (scleroderma): Clues for clinical evaluation, prognosis and pathogenesis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, **2:** 19-28.

GROVE, WM. (2006). Mathematıcal aspects of diagnosis. *United States of America*, 50-75.

GUNDUZ, O.H., FERTIG, N., LUCAS, M. (2001). Systemic sclerosis with renal crisis and pulmonary hypertension, *Arthritis Rheum*, **44:**1663–1666.

GUPTA, RC., SEİBOLD, JR., KRİSHNAN, MR., STEİGERWALD, JC. (1984). Precipitating autoantibodies to mitochondrial proteins in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*, **58:**68-76.

HANKE, K., BRUCKNER, CS., DAHNRICH, C., HUSCHER, D., KOMOROWSKI, L., MEYER, W. (2009). Antibodies

HASEGAWA, M., FUJIMOTO, M., KIKUCHI, K., TAKEHARA, K. (1997). Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10 and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *Journal Rheumatol*, **24:** 328-332.

HENAULT, J., ROBITAILLE, G., SENECAL, JL., RAYMOND, Y. (2006). DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum*, **54:**963-73.

HILDEBRANDT, S., WEINER, E., SENECAL, JL., NOELL, S., DANIELS, L., EARNSHAW, WC. (1990). The IgG, IgM, and IgA isotypes of anti-topoisomerase I and anticentromere autoantibodies. *Arthritis Rheum*, **33:**724-7.

HUDSON, M., POPE, J., MAHLER, M., TATİBOUET, S., STEELE, R., BARON, M. (2012). Clinical significance of antibodies to Ro52/TRIM21 in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*;**14:**R50.

IHN, H., YAMANE, K., YAZAWA, N., KUBO, M., FUJİMOTO, M., SATO, S. (1999). Distribution and antigen specificity of anti-U1RNP antibodies in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*;**117:**383-387.

IMAİ, H., FRİTZLER, MJ., NERİ, ., BOMBARDİERİ, S., TAN, EM., CHAN, EKL. (1994) . Immunocytochemicaln localization of two Mr forms of human NOR-90 (Upstream Binding Factor) and associated antigens reactive with autoimmune sera. *Mol Biol Rep,* **19:**115-24.

IWATA, Y., OGAWA, F., KOMURA, K., MUROI, E., HARA, T., SHIMIZU, K. (2007). Autoantibody against peroxiredoxin I, an antioxidant enzyme, in patients with systemic sclerosis: possible association with oxidative stress. *Rheumatology (Oxford),* **46:**790-795.

JAKYMİW, A., PAULEY, KM., Lİ, S., IKEDA, K., LİAN, S., EYSTATHİOY, T. (2007). The role of GW/P bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci,* **120:**1317-1323.

JIMENEZ, SA., DERK, CT. (2004). Following the molecular pathways towars an understating of pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med;* **140:** 37-50.

JOHNSON, RW., TEW, MB., Arnett, FC. (2002). The genetics of systemic of sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* , **4:** 99-107.

KAHALEH, MB., LEROY, EC. (1989). Interleukin-2 in scleroderma: correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration. *Ann Intern Med*, **110:** 446-450.

KAVANAUGH, A., TOMAR, R., REVEİLLE, J., SOLOMON, DH., HOMBURGER, HA. (2000). Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med,* **124(1):**71-81.

KEİTH, MP., MORATZ, C., TSOKOS, GC. (2007). Anti-RNP immunity: Implications for tissue injury and the pathogenesis of connective tissue disease. *Autoimmun Rev*, **6:**232-236.

KLARESKOG, L., PADYUKOV, L., RÖNNELİD, J., ALFREDSON, L. (2006). Genes, environment and immunity in development of rheumatoid arthritis. Curr Opin Immunol, **18(6):** 650-655.

KOHLSTAEDT, LA., COLE, RD. (1994). Specific interaction between H1 histone and high mobility protein HMG1. *Biochemistry*; **33:**570-575.

KOİKE, Y., MUROİ, E., YOSHİZAKİ, A., OGAWA, F., YANABA, K., TAKENAKA, M. (2010). Autoantibody against survivin in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*, **37:**1864-70.

KUWANA, M., KABURAKI, J., MIMORI, T., TOJO, T., HOMMA, M. (1993). Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest*, **91:**1399-1404.

KUWANA, M., KABURAKI, J., OKANO, Y., INOKO, H., TSUJI, K. (1993). The HLA-DR and DQ genes control the autoimmune response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest*, **92:**1296-301.

KUWANA, M., KABURAKİ, J., OKANO, Y., TOJO, T., MEDSGER TA, JR. (1994). Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patiants with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, **37:** 75-83.

LEES-MİLLER, SP., MEEK, K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, **85:**1161-73.

LI, X., MCNEILAGE, J., WHITTINGHAM, S. (1989). Autoantibodies to the major nucleolar phosphoprotein B23 define a novel subset of patients with anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum*,**32:**1165-1169.

LIU, LF., LIU, CC., ALBERTS, BM. (1980). Type II DNA topoisomerase: enzyms that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible doubleüstrand break. Cell, 19: 697-707.

Lİ, F., LİNG, X. (2006). Survivin study: an update of "what is the next wave"?. *J Cell Physiol* , **208:**476-486.

LLEO, A., INVERNIZZI, P., GAO, B., PODDA, M.GERSHWIN, ME. (2010). Definition of human autoimmunity- autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmune Reviews*, **9(5)**:259-266.

MAHLER, M., FRİTZLER, MJ. (2009). The changing landscape of the clinical value of the PM/Scl autoantibody system. *Arthritis Res Ther*; **11:**106.

MAHLER, M., RAİJMAKERS, R., DAHNRİCH, C., BLUTHNER, M., FRİTZLER, MJ. (2005). Clinical evaluation of autoantibodies to a novel PM/Scl peptide antigen. *Arthritis Res Ther*, **7:**R704- R713.

MAHLER, M., SILVERMAN, E. D., SCHULTE-PELKUM, J., FRITZLER, M. J. (2010). Anti- Scl-70 (topo-I) antibodies in Scl: Myth or reality?. *Elsevier(Ams)*, **9**:756-760.

MAHLER, M., YOU, D., BARON, M., TAILLEFER, SS., HUDSON, M., FRITZLER, MJ. (2011). Anti-centromere antibodies in a large cohort of systemic sclerosis patients: Comparison between immunofluorescence, CENP-A and CENP-B ELISA. *Clin Chim Acta*, **412:**1937-43.

MARİE, I., JOUEN, F., HELLOT, MF., LEVESQUE, H. (2008). Anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibodies and lupus-like anticoagulant: prevalence and significance in systemic sclerosis. *Br J Dermatol*, **158:**141-4.

MARTIN, J., FERRARO, P., DURANCEAU, A. (2001). Reflux esophagitis and scleroderma. *Chest Surg Clin North Am*, **11:**619–638.

MASI, A.T., RODNAN, G.P., MEDSGER T, J.r., ALTMAN, R.D., D'Angelo, W.A,. FRIES, J.F. (1980). Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*; 23:581- 590.

MEHEA, s., WALKER, j., Patterson, K., Fritzler,MJ. (2013). Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmunity Rewiews*, **12:** 340-354.

METZ, CE. (2006). Receiver operating characteristic analysis: a tool for the quantitative evaluation of observer performance and imaging systems. *J Am Coll Radiol*, **3:** 413-422.

MORİTA, Y., MURO, Y., SUGİURA, K., TOMİTA, Y. (2008). Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*, **26:**542-7.

MOSER JJ, FRİTZLER MJ. (2010). Cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) bodies and their relationship to GW/P bodies. *Int J Biochem Cell Biol*, **42:**828-43.

MURO, Y. (2005). Antinuclear antibodies. Autoimmunity, **38(1):** 3-9.

MUSACCHİO, A. (2010). Molecular biology. Surfing chromosomes (and Survivin). *Science* ,330:183-4.

NEGİ, VS., TRİPATHY, NK., MİSRA, R., NİTYANAND, S. (1998). Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol*; **25:**462-466.

NİHTYANOVA, SI., DENTON, CP. (2010). Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*, **6:**112-6.

OBUCHOWSKI, NA. (2005). ROC analysis. *AJR Am J Roentgenol*, **184:** 364-372.

OBUCHOWSKI, NA., LIEBER, ML., WIANS, FH. (2004). ROC curves in clinical chemistry: uses,misuses, and possible solutions. *Clin Chem*, **50:**1118-1125.

OCHS, RL., LISCHWE, MA., O'LEARY, P., BUSCH, H. (1983). Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Exp Cell Res*,**146:**139-149.

OKANO, Y. (1996). Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma), *Rheum Dis Clin North Am*, **22(4):**709-735.

OKANO, Y., MEDSGER, TA. (1990). Autoantibody to Th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, **33:**1822.

OKANO, Y., STEEN, VD., MEDSGER, Jr. (1993). Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med*,**119:**1005-1013.

OOR, G.C., MOK, M.Y., TSANG, K.W.T. (2003).Interstitial lung disease in systemic sclerosis, *An HRCT-clinical study*. *Acta Radiol*, **44:**258–264.

OPITZ, C., KLEIN-WEIGEL, P.F., RIEMEKASTEN, G. (2011). Systemic sclerosis-a systematic overview: part 2 -immunosuppression, treatment of SSc-associated vasculopathy, and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Vasa*;**40:**20-30.

PARKER, JC., BURLINGAME, RW., WEBB, TT., BUNN, CC. (2008). Anti-RNA polymerase III antibodies in patients with systemic sclerosis detected by indirect immunofluorescence and ELISA.*Rheumatology (Oxford),***47:**976-979.

POLİMENİ, M., FENİMAN, D., SKARE, TS., NİSİHARA, RM. (2012). Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in scleroderma patients. *Clin Rheumatol*.

REDINBO, MR., STEWART, I., KUHN, P., CHAMPOUX, JJ., HOL, WG. (1998). Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. Science, **279:** 1504- 1513.

REİMER, G. (1990). Autoantibodies against nuclear, nucleolar, and mitochondrial antigens in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am*; **16:**169-183.

REVEILLE, J., D., DURBAN, E., MACLEOD-ST CLAIR, M., J. GOLDSTEIN, R. MOREDA, R., ALTMAN, R. D., ARNETT, F. C. (1992). Association of amino acid sequences in the HLA-DQB1 first domain with antitopoisomerase I autoantibody response in scleroderma (progressive systemic sclerosis). *J Clin Invest*, **90:** 973-80.

REVEILLE, JD., FISCHBACH, M., MCNEARNEY, T., FRIEDMAN, AW., AGUILAR, MB., LISSE, J. Fritzler, MJ. Frank CA. Arnett, C. (2001). Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic,serologic, and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum*, **30:**332-346.

REVEİLLE, JD., SOLOMON, DH. (2003). American college of Rheumatology, ad hoc committee on Immunological Testing Guideline: Evidence- based guidlines for the use of immunologic tests: anicentromere, Scl-70, and anti nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum*, **43:** 399-412.

RODRIGUEZ-REYNA, TS., HINOJOSA-AZAOLA, A., MARTINEZ-REYES, C., NUÑEZ-ALVAREZ, CA., TORRICO-LAVAYEN, R., GARCÍA-HERNÁNDEZ, JL., CABIEDES-CONTRERAS, J. (2011). Distinctive autoantibody profile in Mexican Mestizo systemic sclerosis patients. *Autoimmunity*, **44(7):**576-584.

ROZMAN, B., CUCNİK, S., SODİN-SEMRL, S., CZİRJAK, L., VARJU, C., DİSTLER, O. (2008). Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case-control study. *Ann Rheum Dis,* **67:**1282-1286.

SANDUSKY, SB., MCGUIRE, L., SMITH, MT., WIGHLY, FM., HAYTHORNTHWAİTE, JA. (2009). Fatigue: an overlooked determinant of physical function in scleroderma. *Rheumatology (Oxford),* **48:** 165-169.

SANTIAGO, M., BARON, M., HUDSON, M., BURLINGAME, RW., The Canadian Scleroderma Research Group, FRITZLER, MJ. (2007). Antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis as detected by an ELISA. *Journal of Rheumatol,***34:**1528-34.

SATO, S., KODERA, M., HASEGAWA, M., FUJİMOTO, M., TAKEHARA, K. (2004). Antinucleosome antibody is a major autoantibody in localized scleroderma. *Br J Dermatol;***151:**1182-1188.

SATOH, T., ISHIKAWA, O., IHN, H., ENDO, H., KAWAGUCHI, Y., SASAKI, T. (2009). Clinical usefulness of anti- RNA polymerase III antibody measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rheumatology (Oxford),***48:**1570-4.

SCOLFIELD, RH. (2004). Autoantibodies as predictors of disease. Lancet, **363:** 1544-1556.

SGONC, R., GRUSCHWİTZ, MS., DİETRİCH, H, RECHEİS H, GERSHWİN ME, WİCK G. (1996). Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest;* **98:**785-92.

SHERO, JH., BORDWELL, B., ROTHFIELD, NF., EARNSHAW WC. (1986). High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science,* **231:**737-40.

SILVER, RM. (1996). Clinical peoblems: the lungs. *Rheum Dis Clin North AM,* **22:** 825-840.

SINGH, D., SHILL, M., KAUR, H. (2001). The watermelon rectum. *J Cli Gastroenterol,* **33:**164–166.

SKARE, TL., NİSİHARA, RM., HAİDER, O., AZEVEDO, PM., UTİYAMA, SR. (2011). Liver autoantibodies in patients with scleroderma. *Clin Rheumatol,* **30:**129-32.

SMITH, CM., STEITZ, JA. (1997). Sno storm in the nucleolus: New roles for myriad small RNPs. Cell, **89:**669-672.

STAFFORD, L., ENGLERT, H., GOVER, J. (1998). Distribution of macrovascular disease in scleroderma. *Ann Rheum Dis,* **57:**476–479.

STEEN, V.D. (1996). Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am,* **22:**861–878.

STEEN, VD. (2005). Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin ArthritisRheum,* **35(1):**35-42

STEEN, V.D., CONTE, C., OWENS, G. (1994). Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum,* 1283–1289.

STEEN, V.D., COSTANTINO, J.P., SHAPIRO, A.P. (1990). Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability to angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Ann Intern Med*,**113:**352–357.

STEEN, VD. (2008). The many faces of Scleroderma. *Rheum Dis Cli N Am,* **34:**1-15.

ŞENTÜRK, T. (2011). Sistemik Skleroz. Romatology. Editörler. Şebnem Ataman, P Yalçın. MN Medikal and Nobel Tıp Kitabevi; s:871-880.

TARN, WY., STEİTZ, JA. (1997). Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. Trends Biochem Sci; **22:**132-137.

TSAY, G.J., Fann, RH., Hwang, J. (1990). Specificity of anti Scl-70 antibodies in scleroderma: increased sensitivity of detection using purified DNA topoisomerase I from calf thymus. Journal of Rheumatol, **17:**1314-1319.

TUTKAK, H. (2011). Romaolojik hastalarda serolojik testler (Otoantikorlar). Romatoloji. Editörler. Ataman, Ş., Yalçın, P. MN Medikal and Nobel Tıp Kitabevi, s.:189.

TZİOUFAS, AG., BOUMBA, VA., SEFERİADİS, C., TSOLAS, O., MOUTSOPOULOS,. HM. (1993). Autoantibodies to HMG-17 nucleosomal protein in autoimmune rheumastic diseases.Correlation with systemic lupus erythematosus clinical activity and with antibodies to doublestranded DNA. *Arthritis Rheum*,**36:**955-61.

ULANET, DB., WIGLEY, FM., GELBER, AC., ROSEN, A. (2003). Autoantibodies against B23, a nucleolar phosphoprotein, occur in scleroderma and are associated with pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum*,**49:**85-92.

URBONAVİCİUTE, V., VOLL, RE. (2011). HMGB1 represents a potential marker of disease activity and novel therapeutic target in SLE. *J Intern Med*,**270**:309-318.

VAN EENENNAAM, H., VOGELZANGS, JHP., LUGTENBERG, D., VAN DEN HOOGEN, FHJ., VAN VENROOIJ, WJ., PRUIJN, GJM. (2002). Identity of the RNase MRP- and RNase P-associated Th/To autoantigen. *Arthritis Rheum*,**46:**3266-3272.

VERHEİJİN, R., VAN DEN HOOGEN, F., BEİJİR, R., RİCHTER, A.,PENNER E., HABETS, WJ. (1990). A recombinant topoisomerase I used for antibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin EXP Immunol*, 80:38-43.

VİLLALTA, D., TOZZOLLİ, R., TONUTTİ, A., BİZARRO, N. (2007). The laboratory approach to the diagnosis of autoimmune disease: Is it time to change?. *Autoimmunity Reviews*, **6:** 359-365.

WALKER, JG., FRITZLER, MJ. (2007). Update on autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*, **19:**580-591.

WALKER, UA., TYNDALL, A., CAIRJAK, L., DENTON, CP., FARGE-BANSEL, D., KOVAL-BIELECKA, O., MULLER- LADNER, U., BOCELLİ-TYNDALL, C., MATUCCİ-CERINIC, M.,and EUROSTAR co-authors. (2007). Clinical assessment of organ manifestation in systemic sclerosis- a report from the EULAR Scleroderma Trails And Research (EUSTAR) group data base. *Ann Rheum Dis*, **66(6):** 754-763.

WASSARMAN KM, STEITZ JA. (1992). The low-abundance U11 and U12 small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) interact to form a two-snRNP complex. Mol Cell Biol, **12:**1276-1285.

WEINSTEIM, S., OBUCHOWSKI, NA., LIEBER, ML. (2005). Clinical evaluation of diagnostic tests.*AJR Am J Roentgenol*,**184:**14-19.

WHITE, B., YUROVSKY, W. (1995).Oligoclonal expansion of V delta 1+ gamma/delta Tcells in systemic sclerosis patients. Ann N Y Acad Sci, **756:** 382-391.

YAMASAKI, Y., HONKANEN-SCOTT, M., HERNANDEZ, L., IKEDA, K., BARKER, T., Bubb, MR. (2006). Nucleolar staining cannot be used as a screening test for the scleroderma marker anti-RNA polymerase I/III antibodies. *Arthritis Rheum*, **54:**3051-3056.

ZOU, K.H., O MALLEY, J., MAURİ, L. (2007). Receiver- Operating characteristic avalysis for evaluating diagnostic tests and oredictive models. *Circulation*, **115:** 654-657.

ÖZGEÇMİŞ

I. KİŞİSEL BİLGİLER

Adı	Noushin
Soyadı	Zibandeh
Doğum yeri ve tarihi	Tabriz, 16/09/1987
Uyruğu	İranlı
Medeni Durumu	Bekar
İletişim Adresi ve Telefonu	Ankara Üniversites Öğrenci Evi, Fatih Caddesi, Gazino Durağı Keçiören Ev: (312) 380 84 01, Cep: (539) 612 72 55

II. Eğitim Durumu

2001-2004 Özel Mobtakeran Koleji
2006- 2010 Biyoloji Bölümü, Tabriz Devlet Üniversitesi
2010 –2012 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi- İç Hastalıkları ABD Diagnostik İmmünoloji Tezli Yüksek Lisans

Yabancı Dili İngilizce

III. Ünvanları

Biyolog

IV. Bilimsel Etkinlikleri

08- 10 kasım 2010/ 17-18 Ekim 2011 : Ankara Bioteknoloji Günleri

6-9 Nisan 2011 **:** 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi
21-24 Nisan 2011 **:** 3.” Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi Ve Genetiği Kongresi"
21-24 Nisan 2011 **:** Transplantasyon’da Temel İmmünolojik Yaklaşımlar Kursu
27 Eylül- 1 Ekim 2011 : Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 7. Ulusal Kongresi Poster İkincilik Ödülü (Ankara Mamak Bölgesi Geriatrik 1010 olguda paraprotein sıklığı)
10-11 Mayıs 2012 **:** Türk İmmünoloji Derneği Bölgesel Sempozyomları KAHRAMANMARAŞ