

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

OTOİMMÜN HASTALIKLARDA KARBONİK ANHİDRAZ II
OTOANTİKORLARININ BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet MENTEŞE

TRABZON-2005

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

OTOİMMÜN HASTALIKLARDA KARBONİK ANHİDRAZ II
OTOANTİKORLARININ BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet MENTEŞE

TRABZON-2005

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

OTOİMMÜN HASTALIKLARDA KARBONİK ANHİDRAZ II
OTOANTİKORLARININ BELİRLENMESİ

Ahmet MENTEŞE

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27.05.2005

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 15.07.2005

Tez Danışmanı : Prof. Dr. E. Edip KEHA

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ekin ÖNDER

Jüri Üyesi : Doç. Dr. S. Caner KARAHAN

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Fahri UÇAR

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

MAYIS 2005

TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı başta danışman hocam sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA olmak üzere bilgilerinden faydalandığım saygı değer hocalarım Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Cihangir EREM, Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Doç. Dr. S. Caner KARAHAN, Yrd. Doç. Dr. Birgül KURAL, ve Yrd. Doç. Dr. İlknur TOSUN'a, özellikle çalışmalarında her an yanımda olan ve değerli bilgilerinden yararlandığım sayın Dr. Ahmet ALVER'e, Endometriyozisli hasta serumlarının temininde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Mesut Ünsal'a, romatoid artritli hasta serumlarının temininde yardımcı olan Fiziksel Tedavi ve Rehabilitasyon anabilim dalı asistanlarından Arş. Grv. Dr. Münevver Serdaroğlu ve Biyokimya anabilim dalı asistanlarından Arş. Grv. Sevil Öztürk Cengiz'e, laboratuvar uygulamalarında yardımcı olan Biyokimya anabilim dalı asistanlarından Arş. Grv. Fulya Balaban ve Yaşam Barlak'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsüne ve Biyokimya anabilim dalındaki bütün çalışma arkadaşlarıma, ayrıca beni bu günlere getiren kıymetli aileme, güler yüzünü ve desteğini esirgemeyen eşime, beni yetiştiren hocalarıma ve örnek aldığım ağabeylerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet MENTEŞE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karbonik Anhidraz.....	3
2.1.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi.....	3
2.1.2. Karbonik Anhidraz II (CAII).....	4
2.2. Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar.....	6
2.2.1. Otoimmünite	6
2.2.2. Otoimmün Hastalıklarda İmmünopatolojik Mekanizmalar..	7
2.2.3. Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler	8
2.2.4. Otoimmün Hastalıklar.....	10
2.3. CA II ve Otoimmün Hastalıklar.....	11
3. MATERYAL ve METOD.....	14
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	14
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler.....	15
3.3. Protein Tayini.....	18
3.4. Numunelerin Toplanması.....	20
3.5. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	20
3.6. Western Blotting.....	22
3.6.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi(SDS-PAGE).....	22

3.6.2. Western-Blot.....	23
3.7. İnhibisyon testi.....	24
3.8. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Western blotting sonuçları.....	25
4.2. ELISA Yönteminin Performans Değerlendirilmesi.....	26
4.3. İnhibisyon Testi Sonuçları.....	27
4.4. Endometriyozisli Hastaların ELISA Sonuçları.....	28
4.5. Romatoid Artritli Hastaların ELISA Sonuçları	29
5. TARTIŞMA.....	31
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	36
7. ÖZET.....	37
8. SUMMARY.....	38
9. KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	44

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri.....	3
Tablo 2. Memeli karbonik anhidraz II izoenzimlerinin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi.....	6
Tablo 3. Karaciğer hastalarının serum CA II otoantikorunun prevalansı....	12
Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri.....	13
Tablo 5. Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri.....	15
Tablo 6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.....	19
Tablo 7. Protein tayini standart numunelerinin miktarı ve eklenme sırası...	20

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Karbonik anhidraz II'nin katalizlediği CO ₂ hidrasyon reaksiyonunun mekanizması.....	4
Şekil 2. Protein tayini standart grafiği.....	23
Şekil 3. CA II otantikorlarının Western-Blot yöntemi ile değerlendirilmesi	26
Şekil 4. Seyreltilen hasta ve kontrol serumlarının absorbans değişimi....	27
Şekil 5. Hasta ve kontrol serumlarında seyreltme ile ELISA değeri / back ground değeri oranının değişimi.....	28
Şekil 6. İnhibisyon testi sonuçları.....	29
Şekil 7. Serumlarında CA II otoantikoru içeren endometriyozisli ve sağlıklı bireylere ait serum absorbans değerleri	30
Şekil 8. Serumlarında CA II otoantikoru içeren romatoid artritli ve sağlıklı bireylere ait serum absorbans değerleri.....	31

KISALTMALAR

CA	: Karbonik Anhidraz
ELISA	: Enzyme-linked immunesorbent assay
WB	: Western blot
Ia	: I region associated
HLA	: Human Leucocyte Antigen
Ig G	: Immün globulin G
RA	: Romatoid Artrit
NC	: Normal kontrol
PBC	: AMA (-/+): primary biliary cirrhosis with seronegative or seropozitive anti-mitochondrial antibody
AIH	: Autoimmun hepatitis
C/B-CH	: Chronic hepatitis type C or B
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
MHC	: Major Histocompatibility Complex

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karbonik Anhidrazlar (CA, E.C 4.2.1.1., Karbonat Hidroliyaz), mikroorganizmalardan yüksek yapıli hayvanlara kadar dağılımı olan enzimlerdir (1). Aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonu ihtiva eden monomerik proteinler olup, temel olarak karbondioksitin hidrasyonunu katalizlerler (2). CA enzimleri organizmada CO_2 'in taşınması, asit-baz dengesinin düzenlenmesi, elektrolit sekresyonu gibi olaylarda rol oynar. Bugüne kadar omurgalıların farklı organ ve dokularında, farklı hücre içi yerleşimleri olan 14 CA izoenzimi belirlenmiştir(3,4).

Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmalarına bağıli olarak gelişen otoimmün hastalıklarda vücudun kendi proteinlerine karşı otoantikör oluşturduğu bilinmektedir (5) . İlk kez 1991 yılında, Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus eritematos ve Sjögren sendrom'lu hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin varlığı gösterilmiştir (6). Bu tarihten sonra çeşitli otoimmün hastalıklarda CA II otoantikörleri Western blot ve ELISA yöntemleri ile belirlenmiştir (7,8,9,10,11,12). CA II safra kanalları, pankreatik kanallar, renal tubüler ve tükürük bezi kanallarının epitel hücrelerinde bol miktarda sentezlenir. Bu yüzden CA II' nin çeşitli ekzokrin bezlerin epitel hücrelerinden salgılanan yaygın bir hedef antijen olarak, otoimmün ekzokrinopati ve otoimmün epitelitis olarak isimlendirilen hastalık komplekslerinin patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (13). Ayrıca, CA II otoantikörleri sistemik lupus eritematos, sistemik sikleros, dermatomiyosit, polimiyosit, endometriosis, otoimmün hepatitli ve kronik viral hepatitli hastalarda da belirlenmiştir. Bu hastalıklarda CA-II otoantikörlerinin hastalıkların patolojisindeki rolü anlaşılamamıştır (13, 14, 15).

Bu çalışmada, bölümümüzde yapılması planlanan CA II otoantikörleri ile ilgili araştırmalarda CA II otoantikör seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir

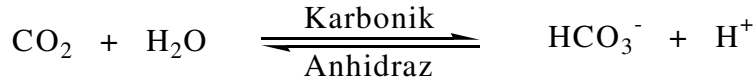
ELISA yönteminin oluşturulması, yöntemin işlerliğinin daha önce çalışıldığı bildirilen endometriyosisli hasta serumlarıyla ve Western blotting metoduyla teyit edilmesi, ve ardından da romatoid artritli hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karbonik Anhidraz

2.1.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (Karbonat Hidroliyz E.C. 4.2.1.1) ilk keşfedilen Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir. İlk defa memelilerin eritrositlerinden 1933 yılında (16) saflaştırılmış, Karbonik anhidraz karbondioksit (CO_2)' in hidrasyonu ve HCO_3^- ' in dehidrasyonundan sorumlu olan bir enzimdir (17) .



Bu reaksiyon ve ürünleri ile metabolizmada, asit-baz dengesinin sağlanması, CO_2 'nin taşınması, elektrolit sekresyonu, üre döngüsü ve glukoneogenez gibi metabolik yollar için öncül maddelerin sentezlenmesi gibi fizyolojik ve metabolik olaylar gerçekleştirilir (17). Karbonik anhidraz yukarıdaki reaksiyonun dışında karboksilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehytlerin ve piruvatın hidrolizini de katalizler. Ancak, bunların fizyolojik önemi bugüne kadar gösterilememiştir (18)

Canlılarda, α , β , γ olmak üzere üç farklı CA tipi karakterize edilmiştir. Memelilerde bulunan α tipi CA'ların doku dağılımı, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri farklı on dört ayrı (CA I-XIV) izoenzimi tarif edilmiştir (Tablo 1). Bu enzimlerden birkaçı çeşitli hastalıkların tedavisiyle doğrudan ilişkilidir (16).

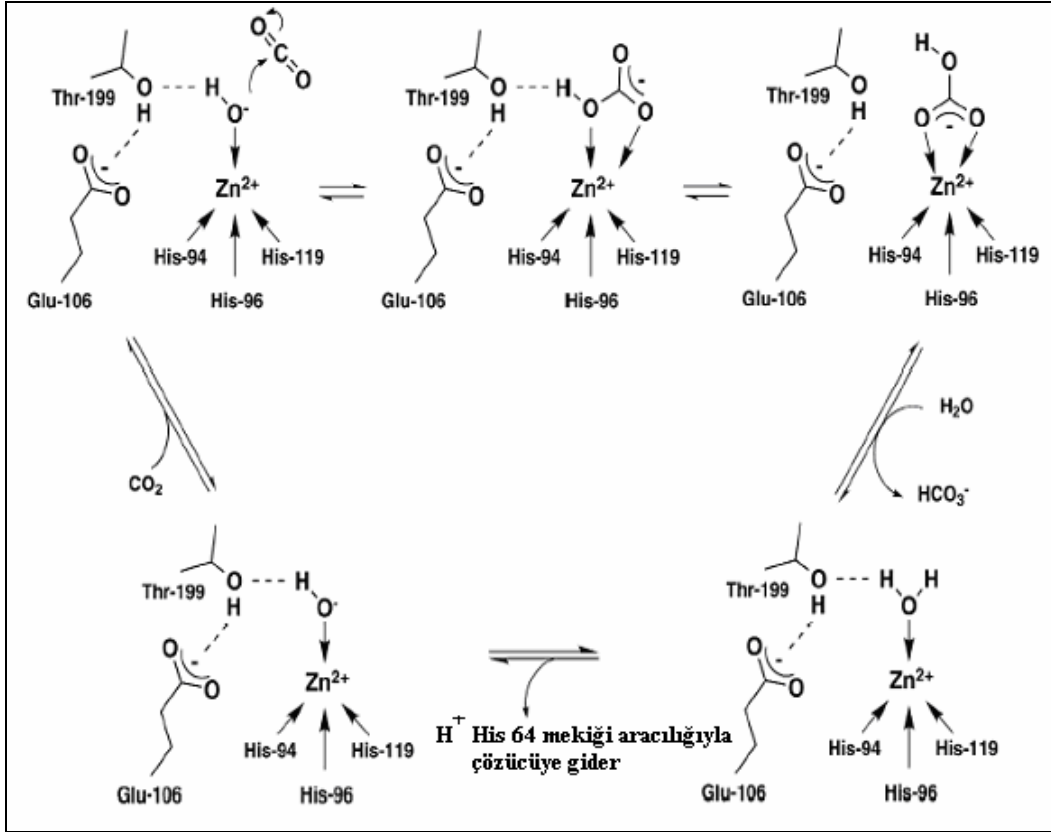
Tablo 1. Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri (19)

İzoenzim	Katalitik aktivite (hidrataz)	Hücre İçi Yerleşimleri
CA-I	Düşük	Sitozol
CA-II	Yüksek	Sitozol
CA-III	Çok düşük	Sitozol
CA-IV	Yüksek	Plazma membranı
CA-V	Orta dereceli * / yüksek	Mitakondri
CA-VI	Orta dereceli*	Tükrük içinde
CA-VII	Yüksek	Sitozol
CARP-VIII	Yok	Sitozol
CA-IX	Yüksek	Plazma membranı
CARP-X	Yok	Sitozol
CARP-XI	Yok	Sitozol
CA -XII	Düşük	Plazma membranı
CA-XIII	Düşük	Sitozol
CA -XIV	Yüksek	Plazma membranı

*pH 7.4'de orta dereceli, pH : 8.2'de yüksek

2.1.2. Karbonik Anhidraz II (CA II)

CA-II, hemen hemen her doku veya organdaki bazı hücre tiplerinin sitozolünde bulunan, maksimum CO₂ hidrasyonu turnover sayısına sahip olan (1.10^6 s^{-1}) ve en geniş dağılımlı yüksek aktiviteli bir izoenzimdir (20). Karbonik anhidraz II'nin katalizlediği genel reaksiyon mekanizması Şekil 1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1. Karbonik anhidraz II'nin katalizlediği CO₂ hidrasyon reaksiyonunun mekanizması (17).

Bu enzimatik mekanizmada hız belirleyici basamak protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması safhasıdır. Bu nedenle aktif bölgedeki proton taşıma kapasitesine sahip His 64 aktivitede önemlidir (17).

CA II kemikte osteoklastlarda, beyinde, oligodendrositler ve beyin epitelyumunda, gözde lensler ve retina müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrekte, salgı bezlerindeki asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterusun endometriumunda, endotel hücrelerde, spermatozoada, eritrositlerde, trombositlerde bulunur (17,30). Bu hücre tiplerinde CA II'nin fiziksel rolü dönüşümlüdür. Bazı hücrelerde CA II asit-baz homeostasis için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon üretimi için H⁺ salgılayan renal tubuler, gastrik parietal hücreler tarafından H⁺ salgısına katkıda bulunur (17). CA II pankreas sıvısı için HCO₃⁻ katkısı yapan pankreatik kanal hücrelerine HCO₃⁻ temin eder. Dönüşümsüz körlüğe sebep olan glaucoma'da CA II enziminin önemli rolü vardır. Glaucoma anormal derecede

yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkmaktadır (21). Dünyada on milyonu aşkın kişinin yüksek göz içi basıncına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (21). Aköz humorun salgılanmasında da CA II enziminin uyarıcı etkisi vardır. CA II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tubüllerde CO₂ değişimine katkıda bulunur (22). Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi Tablo 2’de gösterilmiştir (19).

Tablo 2. Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi (19)

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

2.2. Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar

2.2.1. Otoimmünite

İmmün sistemin başlıca görevi bünyenin kendisine yabancı antijenleri tanıma ve onlara karşı immün cevap oluşturmaktır. B ve T tipi lenfositler ile makrofajlar immün cevap oluşumundan ve denetiminden sorumludur (5). Canlılar normalde kendi doku

antijenlerine karşı immün cevap vermemektedir. Ancak, bazı patolojik durumlara bağlı olarak hücre reseptörlerinin bozulması ile veya immün cevap ürünlerinden bazılarının değişik aktivite göstermesi ile, organizmada değişen doku antijenlerine karşı immün cevap oluşmaktadır. Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya otoimmünite, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara da otoimmün hastalıklar denilmektedir. Oluş mekanizması kesin olarak bilinmeyen bu tür hastalıkların tanısında organizmanın kendi dokularına karşı oluşan hücresel tip immün cevap ve oto-antikorların belirlenmesinden yararlanılmaktadır.

2.2.2. Otoimmün Hastalıklarda İmmünopatolojik Mekanizmalar

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

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

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

4- Otoimmünite oluşumunda hücresel immün cevabın önemi de büyüktür. T ve B lenfositler normalde organizmanın kendi doku antijenleri ile uyarılmamaktadır. Bu olay gelişme sürecinde otoantijenlerle temas sonucu anerji (cevapsızlık) oluşmasıyla ve yetişkin dönemde ise otoantijene özgül supresör T hücresi oluşmasıyla açıklanmaktadır. Gelişim sırasında bir mutasyonla supresör T lenfositlerin fonksiyonlarının azalması sonucu, Th lenfositlerin B lenfositleri sürekli aktive etmesi

ile oto-antikorlar sentezlenmektedir. Lepra, sifiliz, tüberküloz gibi kronik bakteri infeksiyonlarında adjuvant gibi kuvvetli ve devamlı uyarım yapan antijenler, B lenfositleri normal dışı uyararak otoantikorların sentezine neden olmaktadır.

2.2.3. Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler

Genetik Faktörler

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

İmmünolojik Faktörler

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

Hümmoral İmmün Cevap

Eritrositlere karşı oluşan antikorların, eritrositlerle birleşmesi ve komplemanın da aktivasyonu sonucu, sitolitik etki ile doku hasarı olmaktadır ve bu tür hastalıklara otoimmün hemolitik anemi denilmektedir. Eritrositlere karşı oluşan antikorlar eritrositlerle birleştiğinde, bu eritrositlerin dalak ve karaciğer fagositer hücreleri tarafından tutulma ve tahrip edilmeleri hızla artmaktadır. Eritroblastozis fetalside de mekanizma aynıdır. Tiroid hücre membran antijenlerine (tirotropin)karşı oluşan plasentadan geçebilen LATS antikorlarının Fab kısımları, tiroid hücrelerini sürekli uyararak neonatal hipertiroidizme neden olmaktadır. Spermleri aglutine eden

antikorlar, spermilerin servikal mukus içine girmesini engelleyerek steriliteye yol açmaktadır.

İmmün Kompleksler

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

Hücresel İmmün Cevap

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

Viral Faktörler

Bazı virüslerle duyarlı hayvan ve insanlarda kalıcı kronik tipte viral infeksiyonlar gelişmektedir. Yavaş virüslerin otoimmün hastalıklarla ve immün komplekslerin oluşumuyla ilişkisi kesin bilinmektedir. Fare lenfositik koriyomenenjit virüsü, kalıcı kronik viral infeksiyon ve immün komplekslerin oluşumuna neden olmaktadır. Aynı mekanizma ile hepatit B virusu poliartrit nodoza, Epstein-Bar virusu infeksiyoz mononükleoz ve Burkitt lenfoması oluşturmaktadır. İnfeksiyoz mononükleozlu hastaların B lenfositlerinin yüzeyinde bulunan Epstein-Bar virusunun

viral antijen reseptörlerine (CD21) karşı duyarlılaşmış atipik T lenfositleri bulunmaktadır.

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

2.2.4. Otoimmün Hastalıklar

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

Romatoid Artrit

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

Hastaların eklem sıvısındaki B lenfositleri tarafından salgılanan anormal Ig G ve bunlara karşı oluşan romatoid faktörler, ki bunlar Ig G ye karşı oluşmuş Ig M dir,

birleşerek immün kompleksler oluşturmaktadır. Bu immün kompleksler klasik ve alternatif yoldan komplemanı aktive ederek inflamasyonu başlatmaktadır. Eklem sıvısında oluşan immün kompleksler bir miktar kanda da olduğu için vaskülitlere ve SLE benzeri semptomlara neden olmaktadır. SLE den farklı olarak immün kompleksler çok nadiren nefrite yol açar (26).

Endometriyozis

Normalde uterus (rahim) iç yüzeyini örten dokunun, uterus iç yüzeyi dışında bulunmasına endometriyozis (endometriosis) adı verilir. Adet görmeyen bayanlarda görülmez (ilk adetten önce ve menopozdan sonra görülmez). Çocuk doğurmamış ve gebe kalmamış kadınlarda daha sık gözlenir. Üreme çağındaki kadınların %10-20 sinde görülmektedir, en sık olarak 25-35 yaş arasında tanı konur. Kısırlık problemi olan kadınların %30-50'sinde endometriyozis saptanmaktadır. Ailesinde endometriyozis olan kadınlarda endometriyozis gelişme riski 6 kat daha fazladır. Nedeni tam olarak ispatlanamamıştır. Otoimmün mekanizmaların bu hastalıkta rol oynayabileceği öne sürülmüş ve bazı otoantijenlere karşı gelişmiş antikorların varlığı gösterilmiş. Ayrıca, sitotoksik T hücrelerinin aktivitesinde azalma, doğal öldürücü hücrelerin aktivitesinde değişme, endometriyal antijenlere karşı proliferatif cevaplar ve poliklonal B hücre aktivasyonun ortaya çıkması endometriyoziste geniş immünolojik değişikliklerin varlığını göstermiştir (28, 37).

2.3. CA II ve Otoimmün Hastalıklar

Sjögren sendromu, idiopatic kronik pankreatit, primer safra sirozu (PBC), primer sklerotik, renal tübüler asidoz'u içeren kuru gland sendromu veya otoimmün ekzokrinopati adı verilen hastalık grubunda farklı organların duktal epitel hücrelerinde exprese edilen yaygın bir antijene karşı otoimmün bir cevabın varolabileceği ileri sürülmüştür (31,32). Bu organlardan elde edilen ekstraktların çeşitli hayvan türlerine farklı adjuvantlarla immünizasyonu bazı immün

hastalıklar oluşturulmuştur. Ancak bu ekstraktlardaki uyarıcı antijenin yapısı tanımlanamamıştır (33,34).

İlk kez 1991 yılında Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus erithematos ve Sjögren sendrom(SS)'lu hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin varlığı gösterilmiştir(6). Nishimori ve arkadaşları SS 'lu hastalarda pankreas, tükürük bezi, böbrek ve özefagus gibi ekzokrin organların ekstraktlarında, CA II'ye bağlanan monoklonal bir Ab'un varlığını göstermişlerdir (35). Yine aynı araştırmacılar 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada insan CA-II'yi PL/J ırkı farelere immunize ederek otoimmun sialoadenitis oluşturmayı başarmışlardır (24). Daha sonraki yıllarda Ueno ve arkadaşları CA II immunizasyonu ile immün aracılıklı kolangitis oluşturmuşlardır (25).

Bu çalışmaları takiben, polimiyozit, sistemik skleroz, endometriyozis, otoimmun kolonjit (AIC), kronik viral hepatit, diyabet gibi çeşitli hastalıklarda CA otoantikörleri belirlenmiş ve hastaların serumlarından saflaştırılmıştır (5, 6, 7, 8, 9, 10, 37). Bazı hastalıklar için bu antikörlerin güvenilir bir teşhis göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür (23). Özellikle AIC ile antimitokondrial antijeni negatif PBC hastaların ayırımında kullanılabileceği ifade edilmiştir (29).

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

Tablo 3. Karaciğer hastalarının serum CA II otoantikörünün prevalansı (12, 13, 14, 38, 39, 40, 41)

Yıl	Yazar (referans)	Metot	Serum		Pozitif / n (%)				
			dilüsyonu	NC	PBC: AMA(-)	PBC: AMA(+)	AIH	C-CH	B-CH
1995	Gordon	WB	X40	-	5/6 (83)	1/12 (8)	1/12(8)	-	-
1997	Muratori	WB	X100	5/20(25)	1/2 (50)	5/20 (25)	3/7(43)	-	-
1998	Invernizzi	WB	X100	0/73 (0)	2/26	15/189	0/13(0)	-	-
		WB	X40	5/73 (7)	(8)	(8)	-	-	
					7/26 (27)	52/189 (28)			
1999	Akisawa	ELISA	X100	1/24 (4)	7/23 (30)	14/40 (35)	2/13(15)	-	-
2000	Comay	WB	X200	-	8/16 (50)	9/21 (43)	3/10(30)	-	-
2001	Ueno	WB	X100	-	2/5 (40)	7/45 (16)	10/21(48)	-	-
2004	Hosoda	ELISA	X200	1/26 (4)	4/14 (29)	5/15 (33)	-	12/44(27)	3/7(43)
2004	Nishimori	ELISA	X100	1/30 (3)	-	-	8/16	5/20(25)	2/10(20)
		ELISA	X25	2/24 (8)	-	-	-	6/20(30)	-

WB: Western blot; ELISA: enzyme-linked immunesorbent assay; NC: normal kontrol; PBC: AMA (-/+): primary biliary cirrhosis with seronegative or seropozitive anti-mitochondrial antibody; AIH: autoimmun hepatitis; C/B-CH: chronic hepatitis type C or B.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeleri üreticileri ile Tablo 4’te listelenmiştir.

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Dondurucu	Vestel, Arçelik, Bosch
Saf su cihazı	Aquatron 4AD
ELISA yıkayıcısı	Diağnostics Pasteur LP 35
ELISA okuyucusu	Spektraflour plus, TECAN
ELISA pleyti	Coostar, yüksek bağlama kapasiteli
Etüv	Gallenkamp
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Hassas analitik terazi	Oertling NA 164
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet, 0.5-10 µL	Biohit, Proline
Otomatik pipet, 10-100 µL	Socorex
Otomatik pipet, 50-200 µL	Biohit, Proline
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Transferpette
Otomatik pipet, 1-5 mL	Exelpette
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Santrifüj	Heraeus, Labofuge 200
Soğutucu	Philco FRT 152 D
Spektrofotometre	Shimadzu, UV – 1601
Vorteks karıştırıcı	Nüve, NM 110
Nitroselüloz membran (0.45µm çaplı)	Sigma, Lot:67H1494

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Tablo 5'te bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri verilmiştir.

Tablo 5. Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin satın alındıkları firmalar ve özellikleri

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Satın Alındığı Firma, Kodu ve Saflığı
Disodyummonohidrojenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, A547474
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Merck, absolute, d=0.790-0.793 (100986)
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Merck, % 30, d=1.11 (1.08597)
Hidroklorik asit (HCl)	Carlo Erba, % 37, d=1.186 (7647-01-0)
Sığır serum albumini (BSA)	Sigma (P6529)
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	Merck, > % 99.5 (6329)
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Sigma, lot 2029A
Na-K-Tartarat	Merk, Lot: A100285
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merk, A 894987
Tween-20	Sigma, %10, P8942
Folin ve Ciocolteu phenol reaktifi	Sigma, F-9252
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merk, 646 A-153371
Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human Ig G antikoru	Sigma, A-8792, Lot 103K4848
Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma, C-1909, Lot 47H0808
Ortho-phenylene-diamin tabletleri	Sigma, P-1063, Lot 092K8205
Sülfürik asit (H_2SO_4)	Carlo-Erba, %96, (d=1.84 g/ml) no: 306657
Sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, (6345)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, > % 99 (6462)
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, % 99.5-100.5 (1.06400.1000)
Potasyum klorür (KCl)	Merk, %99-100.5 (711 TA299855)
Gliserol	Sigma, %99, Lot: 54H00723
Sodyum dodesil sulfat (SDS)	Merk, %99, Lot: 9263888
N,N,N,N Tetrametiletildiamin (TEMED)	Sigma, T 9281
Glisin	Sigma, %99, Lot: 52H03131
Etilen diaminetetraasetik asit (EDTA)	Carlo Erba, Lot: 303227
Asetik asit	Merk, Lot: K27574156
4-kloro-1-naftol çözeltisi	Sigma, C 8302
Metanol	J.T.Barker, Lot: 0126010002
Ammonyum sulfat	Merk, Art. 1226
Amido black	Sigma
β -Merkaptoetanol	Sigma, M 7522
Brom fenol mavisi	Sigma, Lot: 32H3626

Çalışmamızda kullanılan insan CA II izoenzimi Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden temin edilmiştir. Kullanılan çözeltiler ve bazılarının hazırlanışlarıyla yararlanıldığı yerler liste halinde Tablo 6'da gösterilmiştir

Tablo 6. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Kullanıldığı Yer ve Hazırlanışı
1 M NaOH	10 g NaOH saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
1 M HCl	Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı
Kaplama Tamponu (PH:9.6)	A çözeltisi: 0,2 M Na ₂ CO ₃ (2,12 g / 100ml), B çözeltisi: 0,2 M NaHCO ₃ (1,68 g/ 100ml) 8mL A çözeltisi ve 17mL B çözeltisi distile su ile 100mL'ye tamamlandı. pH: 9,6'ya ayarlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.
Birinci Yıkama Tamponu (PBS çözeltisi)	0,14 M (0,8 g) NaCl, 2,7 mM (0,02 g) KCl, 1,5 mM (0,02 g) KH ₂ PO ₄ ve 8,1 mM (0,2169 g) Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O tartılıp bir miktar distile suda pH: 7,4'e NaOH ile ayarlandı. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
İkinci Yıkma Tamponu (Tween-20 – PBS çözeltisi)	0,14 M (0,8 g) NaCl, 2,7 mM (0,02 g) KCl, 1,5 mM (0,02 g) KH ₂ PO ₄ ve 8,1mM (0,2169 g) Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O tartılıp bir miktar distile suda pH: 7,4'e NaOH ile ayarlandı. 50µL tween-20 eklendi.Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
Bloklama Tamponu	%3 bovin serum albumin ihtiva eden birinci yıkama tamponu PBS çözeltisi. 3g BSA 100mL PBS'de çözülerek hazırlandı.
2M Sülfürik asit çözeltisi	Reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.
Sitrat-fosfat tamponu (pH: 4.8)	0,1 M (2,101 g) Sitrik asit (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O), 0,2 M (3,12g) Sodyum hidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.) alınır. Distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. pH 4,8'e ayarlanır. Substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı.

Tablo 6'nın devamı

Substrat çözeltisi	10 mg orto-phenylene-diamine pH: 4,8 olan sitrat-fosfat tamponunun 25 ml'sinde çözülür. Kullanılmadan hemen önce çözeltiye 10µL, %30'luk hidrojen peroksit ilave edilir.
Antikor (konjugat) çözeltisi	5 µL Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikorunu alınır ve bloklama tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.
% 2 Na-K-Tartarat	Lowry protein tayininde kullanıldı.
% 2 CuSO ₄ .5H ₂ O	Lowry protein tayininde kullanıldı
Seyreltme tamponu	%1 bovin serum albumin ihtiva eden birinci yıkama tamponu PBS çözeltisi. 3g BSA 100mL PBS'de çözülerek hazırlandı.
1M Tris-HCl,pH 8,8	Ayırma jeli tamponu
1M Tris-HCl,pH 6,8	Yığılma jeli tamponu
Stok jel çözeltisi	% 30 akrilamid + % 0,8 metilenbisakrilamid deiyonize suda çözülerek hazırlandı. Buzdolabı koşullarında saklandı.
% 10 SDS	Yürütme, numune tamponu ve ayırma ve yığılma jeli hazırlanırken kullanıldı
% 12'lik ayırma jeli	15 mL 1M Tris-HCl pH = 8,8, 13,2 mL (%30 akrilamid + %0,8 metilenbisakrilamid), 0,4 mL %10 SDS, 0,1 mL %5 TEMED ve 9,4 mL saf su karıştırıldı, son olarak üzerine taze hazırlanmış 0,8 mL %10'luk APS ilave edildi.
% 5'lik Yığılma jeli	1,24 mL Tris-HCl pH = 6,8; 1,0 mL (%30 akrilamid + %0,8 metilenbisakrilamid), 0,1 mL %10 SDS; 0,1 mL %5 TEMED ve 7,36 mL saf su karıştırıldı, son olarak üzerine taze hazırlanmış 0,2 mL %1,5 APS ilave edildi.
Numune tamponu	0,65 g Tris-HCl pH: 6,8; 3 mL % 10 SDS, 1 mL % 100'lük gliserin ve 1 mL % 0,1'lik brom fenol mavisi karıştırılıp saf su ile 10 mL'ye tamamlanır. Kullanılmadan hemen önce 950 µL numune tamponuna 50 µL β-merkaptoetanol ilave edilir.

Tablo 6'nın devamı

Yürütme tamponu	1,5 g tris ve 7,2 g glisin 50 mL saf su içinde çözünür. Daha sonra 5 mL % 10 SDS ilave edilir ve toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.
Bloklama çözeltisi	% 5 yağsız süt tozu, 1 L PBS, % 0.25 tween-20 karıştırılarak hazırlanır.
%10'luk APS	Jel polimerizasyonunda katalizör olarak kullanıldı
Western Blot Tamponu	3,03 g Trisma base, 14,4 g glisin, 200 mL metanol, 800 mL saf su ilave edilerek hazırlandı (metanol en son ilave edildi).
Renklendirme çözeltisi (Amido black)	% 0,1 amido black, % 10 metanol, % 2 asetik asit olacak şekilde saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
Boya çıkarma çözeltisi	% 90 metanol, % 2 asetik asit ve % 8 saf su kullanılarak hazırlanır.

Hazırlanan tüm çözeltiler kullanılana kadar +4 °C'de saklandı.

3.3. Protein Tayini

Deneylerde kullanılacak CA II'nin konsatrasyonunu belirlemek amacıyla Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bu yöntemde protein, önce, alkali bakır çözeltisiyle reaksiyona sokuldu. Alkali ortamdaki Cu^{+2} , proteinin peptit bağlarıyla kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgendi. Daha sonra, Folin ve Ciocolteu'nun fenol reaktifi ilave edildi. Fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana geldi (27).

Kullanılan Çözeltiler:

Reaktif I : % 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Reaktif II : % 2 Na-K – Tartarat

Reaktif A : 0.1 M NaOH içerisinde % 2 Na_2CO_3

RI : RII : RA = 1 : 1 : 100 = RB

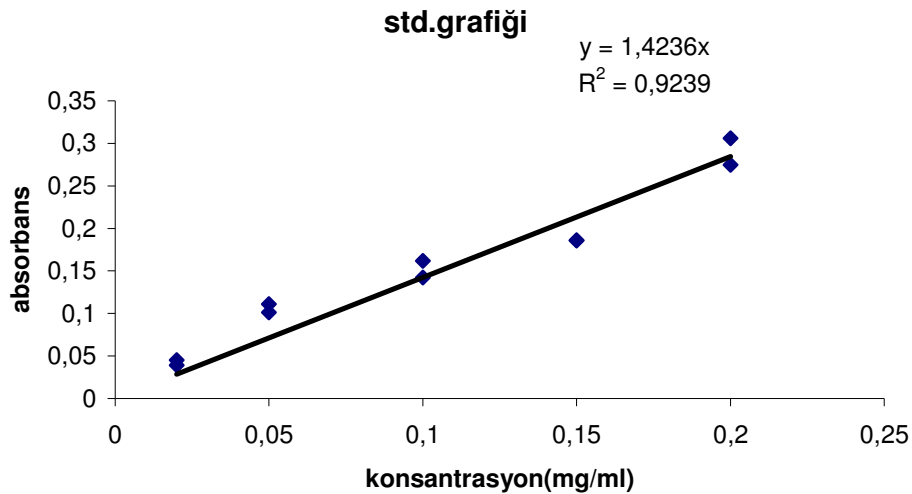
Folin reaktifi 1: 1 oranında seyreltilerek çalışmalar sırasında taze hazırlandı.

Albumin standartları: 10 mg albumin 50ml deiyonize suda çözülerek 0.2mg/ml albumin standardı hazırlandı. Bu çözeltiden 0,02; 0,05; 0,1 ve 0,15 mg/mL ‘ lik örnekler hazırlandı. Bu veriler doğrultusunda protein tayini standart grafiği çizildi(Şekil 4).

Tablo 6. Protein tayini standart numunelerinin miktarı ve eklenme sırası

	Kör	Standart	Numune
Distile su	400 µL	-	-
Standart	-	400 µL	-
Numune	-	-	400 µL
RB	400 µL	400 µL	400 µL
Karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi			
Folin reaktifi	200 µL	200 µL	200 µL

Folin reaktifi eklenen numuneler hemen vorteksle karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 660 nm’de absorbanslar okundu.



Şekil 2. Protein tayini standart grafiği

Çizilen standart grafiğinden yararlanarak ölçülen absorbans değerine göre Karbonik Anhidraz II (CA II)’nin konsantrasyonu 1 mg/mL olarak belirlendi.

3.4. Numunelerin Toplanması

Çalışmamızda kullanılan serumlar KTÜ Tıp Fakültesi kadın ve doğum hastalıkları polikliniğine başvuran ve endometriozis tanısı konulan hastalardan (n=8, yaş =30±5), fizik tedavi ve rehabilitasyon polikliniğine başvuran ve romatoid artrit tanısı konulan hastalardan (n=20, 15 bayan / 5 erkek, yaş = 43±10) ve kontrol grubu da gönüllü hastane çalışanlarından (n=22, 9 bayan / 13 erkek, yaş = 33±8) alınan kanlardan elde edildi. Alınan kanlar pıhtılaşmaları için 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar çalışma gerçekleştirilene kadar -20 °C de saklandı. Hemolizli kanlarda CA II seruma bol miktarda geçeceğinden dolayı numune toplanmasında bu hususa azami dikkat gösterilmiştir.

3.5. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Çalışma gruplarındaki bireylerin CA II otoantikor seviyelerini belirlemek için Hosoda ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELISA yöntemi küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı (38). Her bir numune için ölçümler iki kez tekrarlandı.

Deneyin Yapılışı

1. ELISA pleytindeki mikrotiter kuyucuklar kaplama tamponunda (pH: 9,6) seyreltilen ve konsantrasyonu 10 µg/mL olan CA II'nin 50 µL'si ile kaplandı ve 18 saat +4 °C'da inkübasyona bırakıldı (kaplama yapılırken her serum örneği için 4 kuyucuk ayrılır ve bu kuyucukların ikisi CA II ile kaplanır, ikisi kaplanmaz. Sonuçlar değerlendirilirken kaplı olan kuyucukların absorbans değerlerinden kaplanmamış olan kuyucukların absorbans değerleri çıkartılır).

2. Pleyt PBS tamponu (birinci yıkama çözeltisi) ile 5'er dakika arayla (bu aralarda pleytler çalkalayıcıda çalkalandı) 3 kez yıkandı. Yıkama işlemi şu şekilde yapıldı: Önce ELISA yıkayıcısında pleyt bir kez yıkandı ve ardından sekizli pipetle

200 µL yıkama tamponu kuyucuklara pipetlendi ve çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandı ve ardından ELISA yıkayıcısında yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

3. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara 200 µL bloklama tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

4. Bloklamanın ardından Pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile ikinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı.

5. Sonra hasta (20 romatoit artritli ve 8 endometriyozisli birey) ve kontrol (22 sağlıklı birey) serumları %1 BSA ihtiva eden seyreltme tamponunda 1/200 oranında seyreltildi ve her bir seyreltilmiş serum örneği 2 kuyucuk CA II kaplanmamış ve 2 kuyucuk CA II kaplanmış olmak üzere toplam 4 kuyucuğa ayrı ayrı 100 µL pipetlendi ve 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

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

7. Kuyucuklara 100 µL %1 BSA ihtiva eden seyreltme tamponuyla 1/2000 oranında seyreltilmiş antikor (rabit anti-human Ig G antibody conjugated with horseradish peroksidase) ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bekletildi.

8. Pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile kinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı

9. 100 µL substrat çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında 25 dakika karanlıkta bekletildi.

10. 2M H₂SO₄'in 100 µL'si bütün kuyucuklara pipetlenerek reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucusunda 485 nm'de renk okundu.

CA II kaplanmış kuyucuklardan okunan absorbanların ortalamasından CA II kaplanmamış kuyucukların ortalaması çıkarılarak sonuçlar elde edildi.

3.6. Western Blotting

ELISA ile elde ettiğimiz sonuçları teyit etmek ve metodun performans değerlendirmesi için kullanılacak örnekleri tespit etmek için endometriyozisli hastaların serumlarında western blotting analizi yapıldı.

3.6.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Çalışmamızda, Laemli tarafından geliştirilen yöntem değiştirilerek uygulandı. Buna göre % 5-12 kesikli SDS-PAGE yapıldı. Elektroforez cam plakaları önce saf su, daha sonra alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka birbiri üstüne konularak kışkaçlarla iyice tutturuldu ve jel hazırlama cihazına konuldu.

Ayırma jeli (% 12) için, 15 mL 1M Tris-HCl pH = 8,8, 13,2 mL (%30 akrilamid + %0.8 metilenbisakrilamid), 0,4 mL %10 SDS, 0,1 mL %5 TEMED ve 9,4 mL saf su karıştırıldı, son olarak üzerine taze hazırlanmış 0.8 mL %10'luk APS ilave edildi. Hazırlanan bu jel plakalar arasına enjektörle döküldü ve üst kısma 2-3 mm yükseklikte n-butanol ilave edilerek polimerizasyon için 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Cam plakalar arasındaki ayırma jelinin üst kısmındaki bütanol dökülerek deiyonize su ile birkaç kez yıkandı ve kurutma kağıtlarıyla iyice kurulandı.

Ayırma jeli katılaştıktan sonra uygun tarak (2 dişli, biri markır için dar, diğeri yaklaşık 10 diş genişliğinde numune uygulamak için) yerleştirilerek yığma jeli (%5) için, 1,24 mL Tris-HCl pH = 6.8; 1,0 mL (%30 akrilamid + %0.8 metilenbisakrilamid), 0,1 mL %10 SDS; 0,1 mL %5 TEMED ve 7,36 mL saf su karıştırıldı, son olarak üzerine taze hazırlanmış 0,2 mL %1,5 APS ilave edildi. Hazırlanan enjektör ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Tarağın üzerine nemli süzgeç kağıdı örtülerek bir gece bekletildi

Polimerizasyon için bir gece beklendikten sonra ertesi gün tarak dikkatlice çıkartılarak jelin üstü, önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı. Tankın alt ve üst kısmına elektroforez tamponu konularak elektroforeze hazır hale getirildi. Protein numunesi 20 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak

şekilde 1/1 oranında numune tamponu (0,65 g Tris-HCl pH: 6,8; 3 mL % 10 SDS, 1 mL % 100'lük gliserin ve 1 mL % 0.1'lik brom fenol mavisi karıştırılıp saf su ile 10 mL'ye tamamlanır. Kullanılmadan hemen önce 950 µL numune tamponuna 50 µL β-merkaptoetanol ilave edilir) katılarak numune ve markır hazırlandı ve 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra numune çözeltileri soğutularak oyuklara dikkatli bir şekilde ince bir enjektörle uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafı anod (+), üst tarafı katod (-) olacak şekilde bağlantı kuruldu. Örnekler yığma jelini geçene kadar 80 V, daha sonra akım 150 V doğru akım ile elektroforeze tabi tutuldu. İşaret boyası (bromphenol blue) jelin alt kısmına ulaştığında akım kesilerek jel çıkarıldı.

3.6.2. Western-Blot

SDS-PAGE'e tabi tutulan jel transfer tamponu içinde 30'ar dakika iki kez yavaşça çalkalanarak dengelendi. Blotlama esnasında kullanılacak pedler, whatman filtreleri ve nitroselluloz membran transfer tamponu içine konularak 15 dakika ıslatıldı.

Jel transfer tamponu içinden alınarak blot kasetinin içine yerleştirilmiş ped ve filtre kağıtları üzerine düzgünce yerleştirildi. Üzerine nitroseluloz membran koyulduğunda hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi. Membranın üzerine filtre kağıtları ve ped koyularak kaset kapatıldı ve tanka yerleştirildi. Tankın içine manyetik bar koyulup transfer tamponuyla dolduruldu. Bir gece boyuca manyetik karıştırıcı üzerinde 30-35 V elektrik akımında blotlama işlemi gerçekleştirildi.

Kaset açılarak membranın markır kısmı kesilip çıkarıldı ve amido black boya solüsyonu içerisinde 30 dakika boyandıktan sonra boya çıkarma(destaining) çözeltilisinde bırakıldı. Membranın diğer kısmı spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için bloklama tamponu içerisinde 2 saat yavaşça çalkalanarak bırakıldı. Daha sonra membran temiz bir cam üzerine alınarak şeritler(strip) halinde kesildi. Bloklama tamponu ile seyreltilmiş (1/50) numuneler her biri 3 mL hacimde olacak şekilde içinde şerit bulunun kuyucuklara uygulandı ve 1 saat çalkalanarak inkübe edildi. Şeritler 5'er dakika arayla 4 kez %0,25 tween-20 içeren PBS tamponuyla yıkandı. Üzerlerine 3 mL

konjugat ilave edilerek 1 saat daha çalkalanmaya bırakıldı. Stripler 5'er dakika arayla 3 kez PBS-Tween 20, 2 kez de tris (10 mM, pH = 8) tamponuyla yıkandı. Her bir şeridin üzerine 4-kloro-1-naftol boya çözeltisi koyularak 45 dakika karanlıkta bekletildi. Bantlar görülünce reaksiyon steril deiyonize su ile durduruldu ve resimleri çekildi.

3.7. İnhibisyon Testi

CA II otoantikorlarının bağlanma özgüllüğünü göstermek için inhibisyon testi yapıldı. Western blot ve ELISA yöntemi ile pozitifliği gösterilmiş bir hasta serumu 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 oranında seyreltildi ve her bir numune 100 µg/mL konsantrasyonda CA II enzimiyle 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ELISA işlemi gerçekleştirildi. Aynı işlem Western blot ve ELISA yöntemi ile negatifliği gösterilmiş kontrol serumu içinde uygulandı.

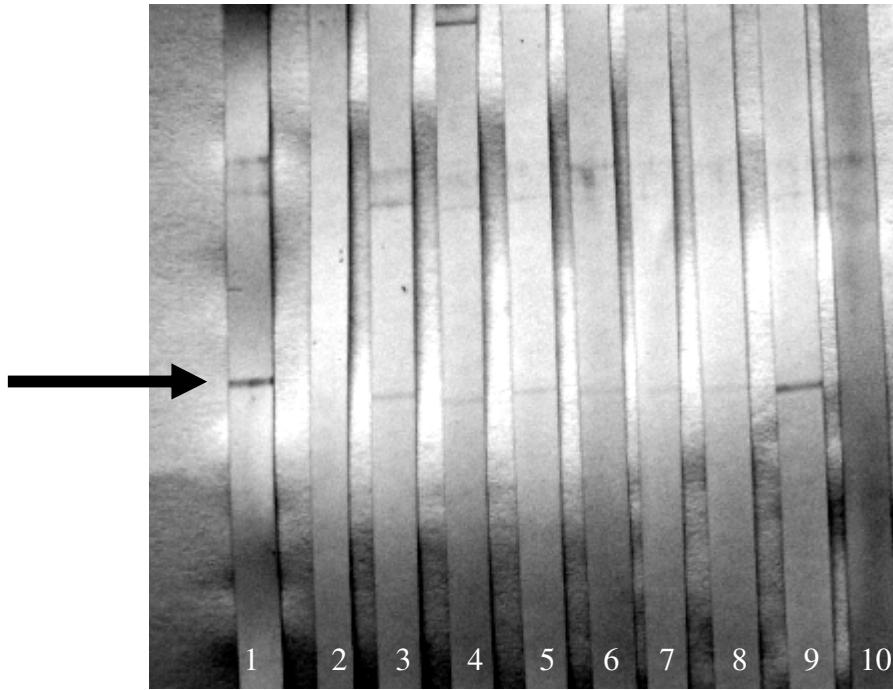
3.8. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler:

Hasta gruplarının ve kontrol grubunun ortalamaları $\bar{X}$ ve standart sapmaları SD hesaplandı. Gruplar arası ortalamaların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kullandığımız ELISA metodunun performansını değerlendirmek için varyans katsayısı (%CV) hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Western Blotting Sonuçları

Endometriyozisli 8 hasta ve 2 sağlıklı kontrolün serumlarında yapılan Western blotting sonuçları Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. CA II otoantikörlerinin Western-blot yöntemi ile değerlendirilmesi.

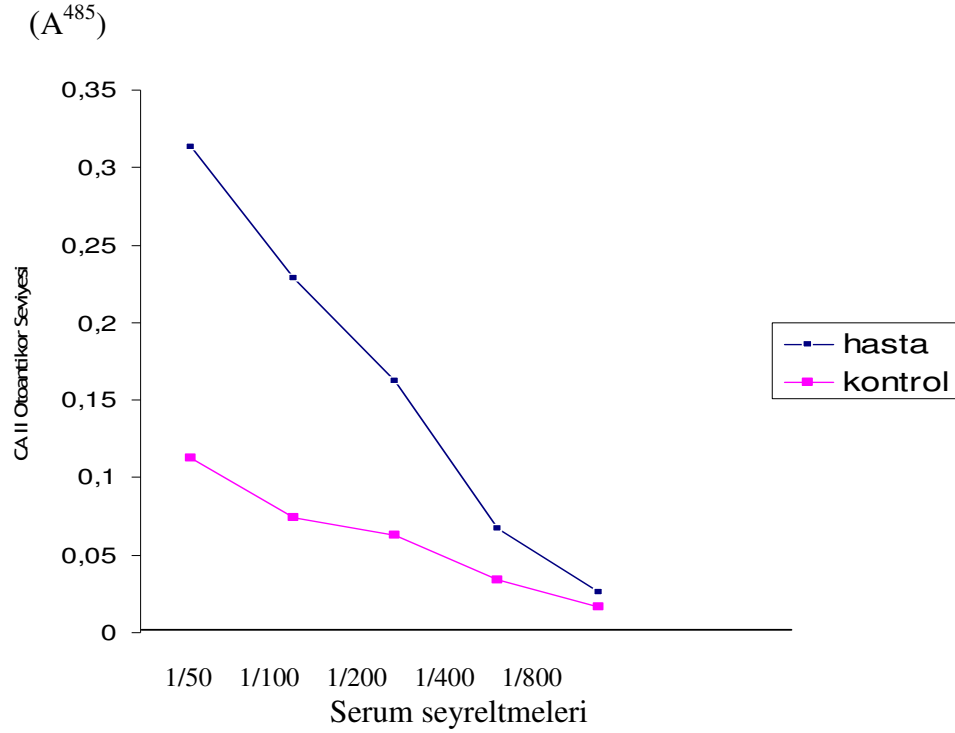
Şekilde görülen 1-8 nolu şeritler endometriyozisli hastaların serumlarının ilave edildiği, 9 ve 10 nolu şeritler ise kontrol olarak seçilmiş bireylerin serumlarının ilave edildiği şeritlerdir.

Buna göre 8 endometriyozis hastasının 6 tanesi, kontrollerden de 1 tanesi pozitif gözlenmektedir. Bu numunelerden 1 numaralı numune pozitif, 10 numaralı

numune negatif kontrol olarak ELISA yönteminin performans değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

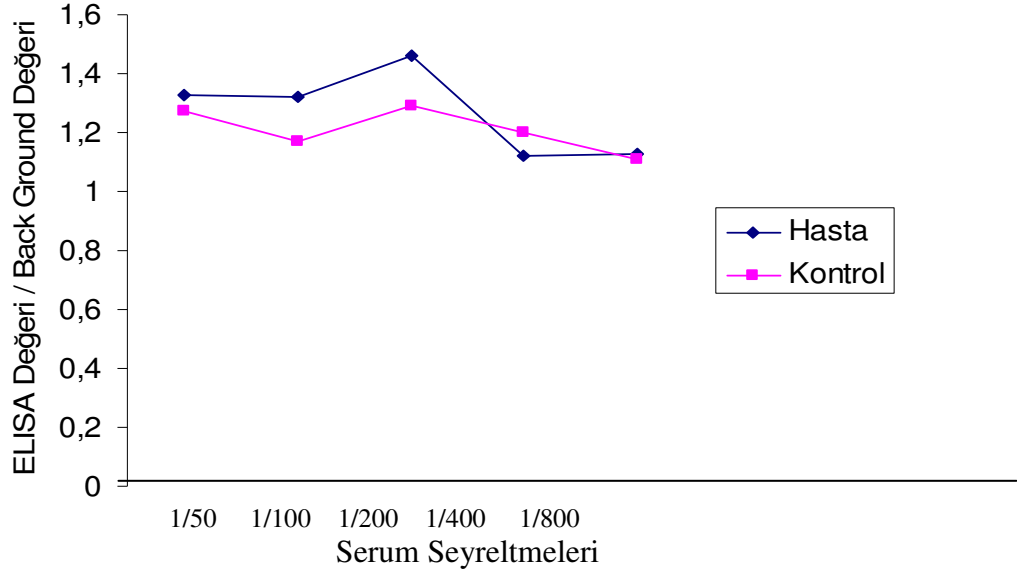
4.2. ELISA Yönteminin Performans Değerlendirilmesi

Ölçümlerde uygulanacak numune dilüsyonlarını belirlemek için konjuge antikor miktarı ve kuyucukları kaplamada kullanılan CA II miktarı sabit tutularak Western blotla pozitif ve negatif olarak değerlendirilen serumlar 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 oranında seyreltilerek ELISA ile ölçümler yapılmış, elde edilen sonuçlar Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Seyreltilen hasta ve kontrol serumlarının absorbans değişimi

Şekil 4'te serumlar seyreltildikçe absorbans değerlerinin azaldığı görülmektedir.

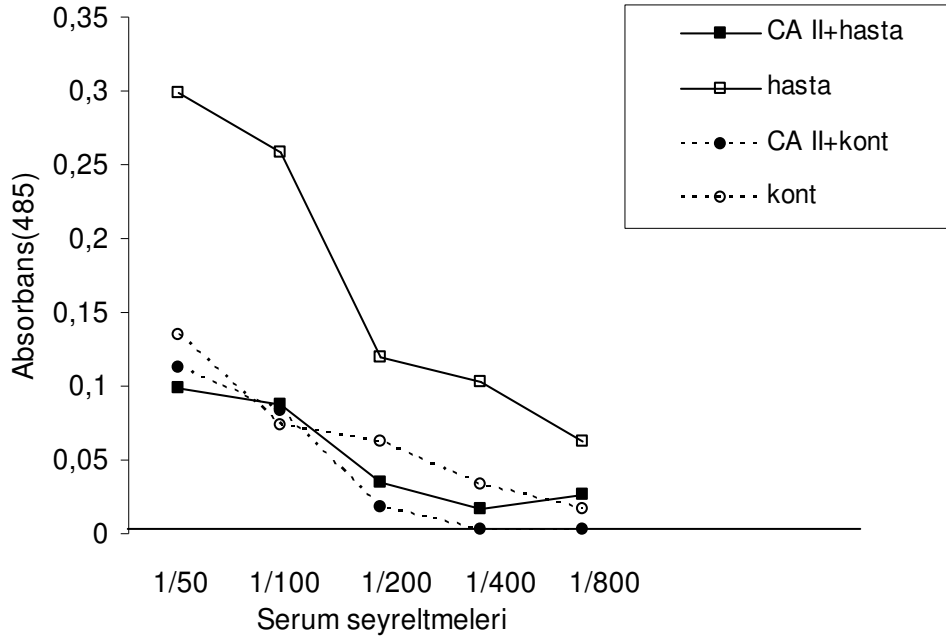


Şekil 5. Hasta ve kontrol serumlarında seyreltme ile ELISA değeri / back ground değeri oranının değişimi

Şekil 5’te gösterildiği gibi 1 / 200 oranında seyreltilen hasta ve kontrol serumlarında ELISA değeri / back ground değeri oranı en yüksek bulunmuştur. Bu sonuç bize spesifik olmayan bağlanmaların en az 1 / 200 oranında seyreltme yapılan serumlarda olacağını göstermektedir.

4.3. İnhibisyon Testi Sonuçları:

100 µg/mL human CA II ile 30 dakika inkübe edilen 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 oranında seyrelttiğimiz pozitif hasta ve negatif kontrole ait serum örnekleri ELISA ile ölçülmüş ve sonuçları Şekil 6’ da verilmiştir. Buradan, CA II ile inkübe edilen pozitif hasta serumunda CA II otoantikorlarının ciddi manada azaldığı gözlenirken, CA II ile inkübe edilen kontrol serumunda ise herhangi bir değişiklik olmadığı anlaşılmaktadır.



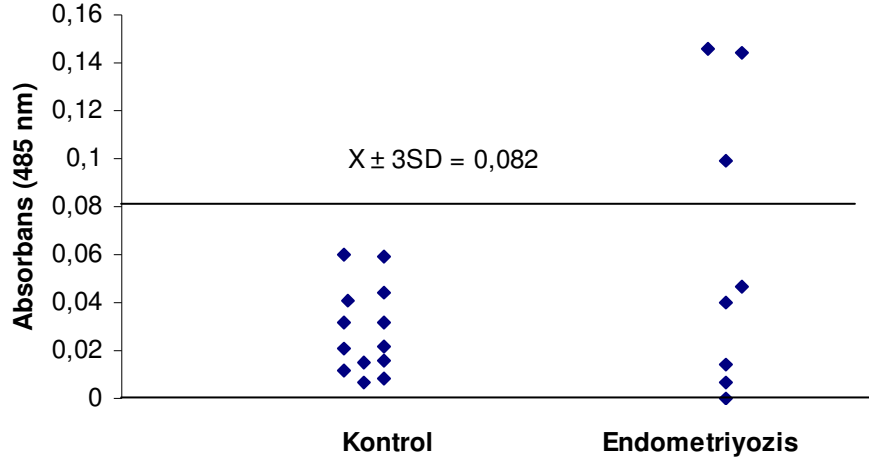
Şekil 6. İnhibisyon testi sonuçları

Kullanılan yöntemin hassasiyetini ortaya koymak için, 1/200 oranında seyreltilen pozitif hasta ve negatif kontrole ait serum örnekleri on kez ELISA ile ölçüldü. Bu ölçümler sonucu elde ettiğimiz % CV değerleri pozitif hasta için %3 ve negatif kontrol için % 9 bulunmuş, buradan da yöntemin hassasiyet yönünden gayet iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

4.4. Endometriyozisli Hastaların ELISA Sonuçları

ELISA metodu ile 13 sağlıklı (kontrol) ve 8 endometriyozisli hasta bireylere ait serumlar incelenmiş ve saf insan CA II'sine karşı CA II otoantikörlerinin aktivite gösterip göstermediğine bakılmıştır. Ortalama absorbans değeri $> 0,082$ olan serumların reaksiyonu pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu değer sağlıklı bireylere ait serumların ortalama absorbans değerine ($X=0,028$) 3 S.D değeri ($0,018$) eklenerek hesaplanmıştır. Serumlarında CA II otoantikörü içeren endometriyozisli ve sağlıklı bireylere ait serum absorbans değerleri Şekil 8'de gösterilmiştir. Endometriyozisli 8

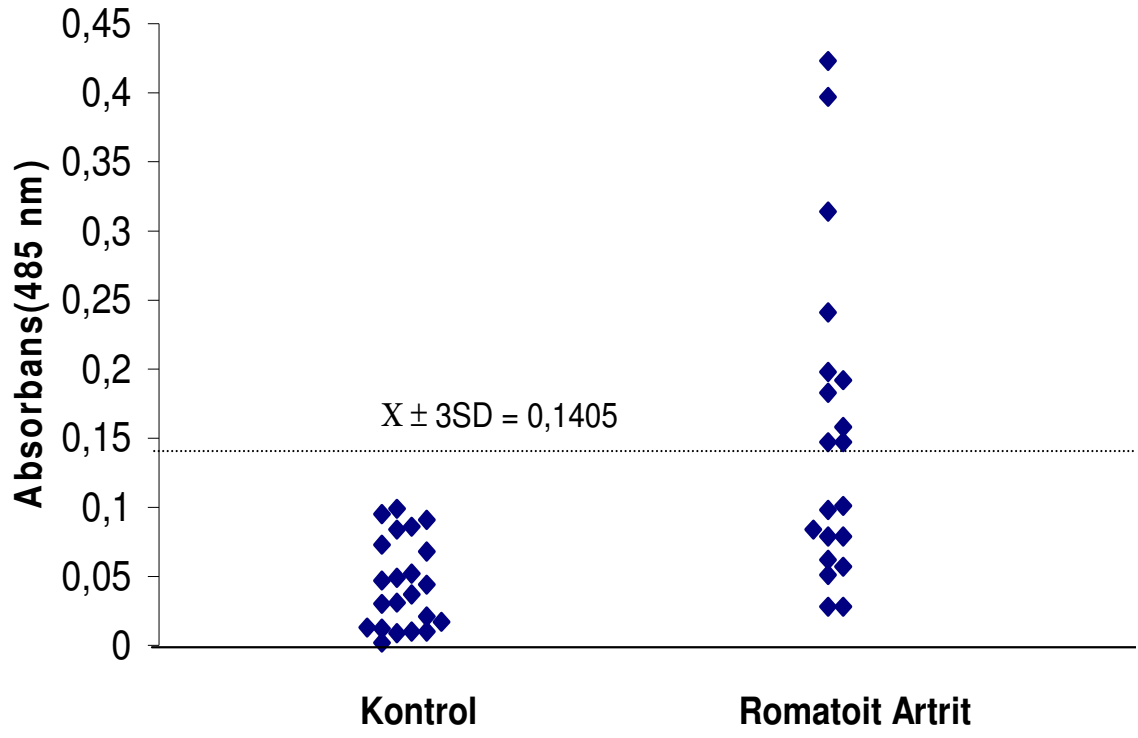
hastanın serumlarının 3'ünde (%37,5) pozitif sonuç elde edilirken, sağlıklı kontrollere ait serumlarda pozitif sonuç bulunmamıştır.



Şekil 7. Serumlarında CA II otoantikoru içeren endometriyozisli ve sağlıklı bireylere ait serum absorbans değerleri

4.5. Romatoid Artritli Hastaların ELISA Sonuçları

ELISA metodu ile 22 sağlıklı (kontrol) ve 20 romatoid artritli hasta bireylere ait serumlar incelenmiş ve saf insan CA II'sine karşı CA II otoantikorlarının aktivite gösterip göstermediğine bakılmıştır. Ortalama absorbans değeri > 0.1405 olan serumların reaksiyonu pozitif olarak kabul edilmiştir (cut off değeri= eşik değeri). Bu değer sağlıklı bireylere ait serumların ortalama absorbans değerine ($X=0.0445$) 3 S.D. (Standart Sapma=Deviation) değeri (0.032) eklenerek hesaplanmıştır. Serumlarında CA II otoantikoru içeren romatoid artritli ve sağlıklı bireylere ait serum absorbans değerleri Şekil 7'de gösterilmiştir. Romatoid artritli 20 hastanın serumlarının 10'unda (%50) pozitif sonuç elde edilirken, sağlıklı kontrollere ait serumlarda pozitif sonuç bulunmamıştır.



Şekil 8. Serumlarında CA II otoantikoru içeren romatoit artritli ve sağlıklı bireylere ait serum absorbans değerleri

5. TARTIŞMA

CA II memelilerde oldukça geniş doku dağılımına sahip bir metalloenzimdir. Fizyolojik rolü CO₂ hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizlemektir. Bu reaksiyon ve ürünleri aracılığıyla vücutta asit-baz dengesinin sağlanması, değişik enzimatik reaksiyonlar için gerekli bikarbonatın oluşturulması, kardiyovasküler tonusun regülasyonu ve hücre bölümleri arasındaki iyon değişiminin kontrolü gibi birçok fizyolojik ve biyokimyasal olay gerçekleştirilmektedir.

Kuru gland sendromu veya otoimmün ekzokrinopati adı verilen hastalık grubunda farklı organların duktal epitel hücrelerinde exprese edilen yaygın bir antijene karşı otoimmün bir cevabın varolabileceği ileri sürülmüş ve bu organlardan elde edilen ekstraktların çeşitli hayvan türlerine farklı adjuvantlarla immunizasyonu bazı immun hastalıklar oluşturulmuştur. Ancak bu ekstraktlardaki uyarıcı antijenin yapısı tanımlanamamıştır (33,34). İlk kez 1991 yılında Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus erithematos ve Sjögren sendrom'lu hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin varlığı gösterilmiştir(6). Nishimori ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada insan CA-II'yi PL/J ırkı farelere immunize ederek otoimmün sialoadenitis oluşturmayı başarmışlardır (24). Daha sonraki yıllarda, Ueno ve arkadaşları CA II immunizasyonu ile immün aracılıklı kolangitis oluşturarak CA II'nin antijenik özelliğini göstermişlerdir (25). Yapılan bu çalışmalarda CA II ye karşı immunolojik cevapta türler arasında farklılıklar gözlenmiş ve bu cevabın oluşumunda MHC (major histocompatibility complex) gibi genetik faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmüştür. Benzer şekilde insanlarda da ırklar arasında CA II otoantikörlerinin prevalansı arasında farklılıklar gözlenmiştir(15). Bu çalışmaları takiben, birçok otoimmün ve idiyopatik hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin varlığı gösterilmiştir. Özellikle, otoimmün

karaciğer hastalıklarında bu otoantikörlerin bir teşhis göstergesi olabileceği ve AIC ile antimitokondrial antijeni negatif PBC hastaların ayırımında kullanılabilceği ileri sürülmüştür (29).

Bulguları yukarıda verilen bu çalışmada, bölümümüzde yapılması planlanan CA II otoantikörleri ile ilgili araştırmalarda CA II otoantikör seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir ELISA yöntemi oluşturulmuş, yöntemin işlerliği daha önce çalışıldığı bildirilen endometriyozisli hasta serumlarıyla ve Western blotting metoduyla doğrulanarak, romatoid artritli hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin miktarı belirlenmiştir.

CA II otoantikörlerinin tayininde ELISA ve WB yöntemleri kullanılmıştır. Bazı otoimmün hastalıklarda bu iki farklı yöntemle elde edilen prevalans değerleri bir birinden oldukça farklı bulunmuştur (13). Bu uyumsuz sonuçların otoantikör tayinde kullanılan yöntemlerin hassasiyetlerinin farklılığından kaynaklandığı ifade edilmiştir (15). WB ile yapılan çalışmalar arasında da tutarsızlıklar gözlenmiş ve bu konu çeşitli araştırmacılar tarafında geniş bir şekilde tartışılarak, WB’da kullanılan serumların dilüsyon oranları, bloklama tamponu, konjuge antikör titresi, inkübasyon zamanlarının farklılığı ve WB yapan kişinin tecrübesi gibi faktörlerin sonuçların belirlenmesinde çok önemli olduğu bildirilmiştir (45). Ayrıca, ELISA ve WB gibi serum antikörlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerde, spesifik olmayan bağlanmaların neden olduğu ve kullanılan dilüsyon oranları, bloklama ajanları, ELISA pleyti ve WB membranı gibi faktörlerce farklı derecelerde etkilenen bir background oluşmaktadır. CA II gibi yapışma özelliği olan proteinlerin kullanıldığı çalışmalarda oluşan bu background değeri oldukça yüksek çıkmakta ve WB da bir eşik değerinin oluşturulması zorlaşmaktadır. Bu zorluk ELISA yönteminde daha kolay aşılmakta ve daha net eşik değerler oluşturulmaktadır(15). CA II otoantikörlerinin tayininde WB nin kullanılmasının yukarıda bahsedilen zorluklarından dolayı ve daha kolay uygulanması ve az zaman alması sebebiyle çalışmamızda ELISA yöntemi tercih edilmiştir. WB yönteminden ise ELISA metodunun performans değerlendirmesinin gerçekleştirilmesinde kullanılacak endometriyozisli hasta serum örneğini belirlemede yararlanılmıştır.

Endometriyozisli hastaların serumlarında CA II otoantikorlarının varlığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Kiechle ve arkadaşları WB yöntemi ile 23 endometriyozisli hastada yaptıkları çalışmada CA II otoantikorlarını %69,9 oranında pozitif bulmuşlardır (37). Yine aynı çalışmada 17 sağlıklı kontrolde %11,8 oranında CA II otoantikor pozitifliği gözlenmiştir. D'Cruz ve arkadaşları ELISA yöntemi ile 319 endometriyozisli hastada yaptıkları çalışmada %35,4 oranında CA II otoantikor pozitifliği olduğunu göstermiştir(44). Daha önceden tartıştığımız sebeplerden dolayı WB yöntemi ile endometriyozisli hastalarda CA II otoantikorları daha yüksek oranlarda bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da WB (Şekil 3) ile 8 endometriyozis hastasının 6'sında, ELISA yöntemi(Şekil 7) ile de 3'ünde pozitif sonuçlar bulunmuştur. Performans değerlendirmesinde ELISA ve WB ile en yüksek antikor titresine sahip olan serum pozitif kontrol, en düşük antikor titreli serum da negatif kontrol olarak seçilmiştir.

ELISA ile CA II otoantikorlarının ölçümünün yapıldığı çalışmalar incelendiğinde, ELISA pleytlerine kaplanan CA II konsantrasyonları, serum dilüsyonları, kullanılan bloklama tamponları, konjuge antikorun cinsi ve inkübasyon süreleri arasında ciddi farklılıklar gözlenmektedir (12, 14, 15, 37, 38, 40). Araştırmamızda Hosoda ve arkadaşları tarafından kullanılan ELISA yöntemi küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır(38). Bu çalışmadaki Tris-HCl tamponu yerine PBS kullanılmıştır. Ayrıca, +4 °C'de birer gece bekletilerek gerçekleştirilen bloklama ve numune uygulama işlemleri yerine oda sıcaklığında çalkalayıcıda 2 saat bekletilerek bloklama ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bekletilerek numune uygulanması yapılmıştır. Bunun dışında kaplamada kullanılan CA II'nin konsantrasyonuna, konjuge antikorun cinsi, miktarı ve dilüsyonuna, renk reaktifine ve inkübasyon sürelerine bağlı kalınmıştır. Uygun numune dilüsyonlarını bulmak için 10µg/mL konsantrasyonda ELISA kuyucukları kaplanmış ve 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 oranında seyretilmiş numuneler konulmuştur. Yöntem materyal ve metod kısmında anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Özellikle ELISA kuyucuklarının yıkanması işlemi sırasında, ELISA yıkayıcısında gerçekleştirilen seri yıkamalar CA II kaplanmamış kuyucuklarda hatalı sonuçlar veren yüksek background değerlerine

neden olmuştur. Bu yüzden, her bir yıkama basamağı arasında kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Böylece, CA II kaplanmamış kuyucuklardaki background değeri en aza indirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan en ideal ölçümün 1/200 oranındaki dilüsyondan gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4 ve 5).

Çeşitli çalışmalarda CA II otoantikoru ile CA II arasındaki etkileşim sonucu ölçülen otoantikör miktarındaki azalma kullanılan ELISA metodunun spesifikliğinin bir göstergesi olarak kullanılmıştır(10,42). Çalışmamızda, pozitif hasta serumunun 100 µg/mL CA II ile 30 dakika inkübasyonu ile negatif kontrol serumuna yakın değerler elde edilmiştir (Şekil 6). Bu sonuç, kullandığımız yöntemin spesifikliğini gösterdiği gibi, aynı zamanda, eritrositlerde bol bulunan CA II izoenziminin hemolizli serumlarda yanlış negatif sonuçlar verebileceğini de göstermektedir. Bundan dolayı CA II otoantikörleri ile ilgili çalışmalarda hemolizli serumlar kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca kullandığımız metodun % CV değerleri pozitif hasta için %3 ve negatif kontrol için % 9 bulunmuş, buradan da yöntemin hassasiyet yönünden gayet iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

ELISA metoduyla CA II otoantikörlerinin ölçülmesi yönteminin laboratuvarımızda başarı ile kurulmasından sonra, daha önce başka araştırmacılarca hiç çalışılmamış olan romatoid artritli hastaların serumlarında CA II otoantikörleri bu metodla incelenmiş ve %50 oranında pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Daha önceden belirtildiği gibi, bu antikörler birçok otoimmün ve idiyopatik hastalıkta pozitif olarak gözlenmiştir(35). CA II otoantikörlerinin otoimmün hastalıkların patolojisindeki kesin rolü bilinmemektedir. Enfeksiyonlar otoimmünitenin tetiklenmesinde önemli çevresel faktörlerdir. Virüsler veya mikrobiyal ajanların sebep olduğu doku yıkımlarına bağlı olarak spesifik enzimlere karşı moleküler taklit, çapraz bağlanmalar, otoreaktif T hücrelerinin aktivasyonu ve adjuvant etkisi gibi mekanizmalarla antikör oluşturulduğu bilinmektedir(38). Benzer mekanizmalarla romatoid artritli hastalarda CA II 'ye karşı antikör oluşturulmuş olabilir. İnsan CA II sinin humoral ve hücre aracılıklı immun reaksiyonlarını indükleyerek antijenik özellik gösterdiği çeşitli fare ırklarında otoimmün hastalıklar oluşturularak belirlenmiştir(24). Yapılan bu çalışmalardan anlaşıldığı gibi, CA II

otoantikörlerinin oluşumunda genetik faktörler de belirleyicidir. Uneo ve arkadaşları PBC li hastalarda yaptıkları çalışmalarda, CA II otoantikoru pozitif olan hastalardaki HLA(Human Leucocyte Antigen) tiplerinin diğer PBCli hastalardan farklı olduğunu göstermiştir. PBC’li hastalar genelde HLA DR3 geni ile ilişkili iken, CA II antikoru pozitif PBC’li hastalar HLA B51 geni ile ilişkilidir(39). Romatoid artrit ile HLA DR4 geni arasında çok sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Bu hastalarda %50 gibi yüksek bir değerde CA II otoantikörlerinin gözlenmesinde HLA tiplerinin de katkısı olabileceği göz ardı edilmemelidir

Itoh ve Reichlin hastalardan saflaştırdıkları anti-CA II antikörlerinin enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyona neden olduklarını göstermişlerdir(46). Ono ve arkadaşları kalsifikasyon ve renal tübüler asidoz gibi kalıtsal CA eksikliği sendromunda görülen belirtilerin CA II otoantikoru pozitif olan hastalarda da gözlemlendiğini ifade etmişlerdir(47). IgG, IgA ve IgM moleküllerinin reseptör aracılıklı transsitosis ile epitel hücre membranlarını geçerek doku hasarı oluşturdukları bilinmektedir(48). Benzer şekilde romatoid artritli hastalarda kemik “turnover”ında oldukça önemli bir enzim olan CA II ye karşı oluşmuş antikörler hücre içinde CA II’yi inhibe ederek eklem ve eklem çevresi dokularda zarara sebep olabilirler.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Konjuge antikor miktarı ve kuyucukları kaplamada kullanılan CA II miktarı sabit tutularak Western blotla pozitif ve negatif olarak değerlendirilen serumlar 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 oranında seyreltilerek ELISA ile ölçümler yapılmış serumlar seyreltildikçe absorbands değerlerinin de azaldığı görülmüştür.
2. ELISA değeri / back ground değeri oranı 1 / 200 oranında seyreltilen hasta ve kontrol serumlarında en yüksek bulunmuştur. Bu sonuç bize spesifik olmayan bağlanmaların en az 1 / 200 oranında seyreltme yapılan serumlarda olacağını göstermiştir.
3. CA II ile 1:1 oranında inkübe edilen pozitif hasta serumunda CA II otoantikorlarının ciddi manada azaldığı gözlenirken, CA II ile inkübe edilen kontrol serumunda ise herhangi bir değişiklik olmadığı anlaşılmıştır.
4. WB ile 8 endometriyozis hastasının 6'sında (%75), ELISA yöntemi ile 3'ünde (%37,5) CA II otoantikorları pozitif bulunmuştur.
5. ELISA yöntemi ile romatoid artritli 20 hastanın serumlarının 10'unda (%50) pozitif sonuç elde edilirken, sağlıklı kontrollere ait serumlarda pozitif sonuç bulunmamıştır.
6. CA II otoantikorlarının HLA doku tipleriyle ilişkisi incelenebilir.
7. Diğer otoimmün hastalıklarda da CA II otoantikorlarının analizi ELISA yöntemi ile belirlenebilir.
8. Otoimmün hastalıkların süreç tespitinde diğer antikorlarla CA II otoantikorlarının karşılaştırılmaları yapılabilir.

7. ÖZET

Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya bağılı olarak gelişen otoimmün hastalıklarda vücudun kendi proteinlerine karşı otoantikor oluşturduğu bilinmektedir. İlk kez 1991 yılında, Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus erithematos ve Sjögren sendrom'lu hastaların serumlarında CA-II otoantikorlarının varlığı gösterilmiştir. Bu tarihten sonra çeşitli otoimmün hastalıklarda CA II otoantikorları Western blot ve ELISA yöntemleri ile belirlenmiştir.

Bu çalışmada, bazı otoimmün hastalıklardaki CA II otoantikorlarının analizinde kullanılacak bir ELISA yönteminin kurulması amaçlanmıştır. Bu maksatla Western blotting yöntemi ile CA II otoantikorunun varlığı belirlenen endometriyozisli hasta serumu kullanılarak performans değerlendirilmesi yapılmış, 8 endometriyozisli ve 20 romatoit artritli hasta serumlarında, kurduğumuz bu ELISA yöntemiyle, CA II otoantikorlarının seviyeleri ölçülmüştür. 8 endometriyozis hastasının 3'ünde(%37,5) ve 20 romatoit artritli hasta serumlarının 10'unda (%50) CA II otoantikorları pozitif bulunmuştur

Sonuç olarak kullanılan ELISA yöntemiyle otoimmün hastalıklardaki CA II otoantikorlarının belirlenebileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Anti-CA II antikor, ELISA, romatoit artrit, endometriyozis

8. SUMMARY

Detection of Anti-CA II Antibodies in Autoimmune Diseases

Autoimmune diseases arise from the immune responses of the body to its own antigens. In 1991, the presence of anti-CA II antibody has been first reported by Inagaki and et al. in the serums of patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. After this year, anti-CA II antibodies were shown to exist in several autoimmune diseases by ELISA and Western blotting techniques.

Here, it has been intended to establish an ELISA method in our laboratories in order to be able to determine the anti-CA II antibodies for some autoimmune diseases. For this purpose, by using the serums of the patients with endometriosis in which the presence of anti-CA II antibody had been formerly detected by Western blotting, performance evaluation for the ELISA method has been made. In addition, anti-CA II antibody levels have been detected in the serums of 8 patients with endometriosis and 20 patients with. The presence of anti-CA II antibody. In the serums of 3 of 8 patients with endometriosis (37.5%) and 10 of 20 patients with rheumatoid arthritis (50%) have been shown the presence of anti-CA II antibody.

In conclusion, it has been seen that the presence of anti-CA II antibodies for autoimmune diseases could be detected by this ELISA technique

Keywords: Anti-CA II antibody, ELISA, rheumatoid arthritis, endometriosis

9. KAYNAKLAR

1. Karol, S., İnceoğlu, Ö., Ayvacı, C., Güler, A., Işık, K., Aysu, F., Gürpınar, N.: Modern Biyoloji, Türk Tarih Kurumu Basımevi, 1.cilt, Ankara, s. 242, 1987.
2. Maren, T.H.: Carbonic Anhydrase, Physiology and Inhibition, *Physiol*, 47: 595, 1967.
3. Kivela, A., Parkilla, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkilla, A., Waheed, A., Sly, W.S., Gruub, J.H., Türeci, Ö., Rajaniemi, H.: Expression of A novel transmembrane carbonic anhydrase isoenzyme XII normal human gut and colorectal tumors. *American journal of pathology*. 156:577-584, 2000.
4. Chiang, W-L., Chu, S-C., Lai, J-C., Yang, S-F., Chiou, H-L., Hsieh, Y-S.: Alterations in quantities and activities of erythrocyte cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient individuals. *Clinica Chimica Acta*. 314: 195-201, 2001.
5. Ian, R., Mackay, M.D., Fred, S., Rosen, M.D.: Autoimmun diseases. *N Engl J Med*, Vol. 345, No. 5, August 2, 2001.
6. Inagaki, Y., Jinno-Yoshida Y., Ueki H.: A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome, *J Dermatol Sci* ,2:147-54,1991.
7. Kiechle, F.L., Quattrocioni-Longe, T.M., Brinton, D.A.: Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am J Clin Pathol*;101:611-5, 1994.
8. Brinton, D.A., Quattrocioni-Longe, T.M., Kiechle, F.L.: Endometriosis: identification by carbonic anhydrase autoantibodies and clinical features. *Ann Clin Lab Sci*, 26:409-20, 1996.
9. Nishimori, I., Brattonova, T., Toshkov, I., Caffrey, T., Mogani, Y. , Shibata, Y., Et al.: Induction experimental autoimmune sialoadenitis by immunization of PL/J mice with carbonic anhydrase II. *J Immunol*, 154:4865-73, 1995.

10. Kino-Ohsaki, J., Nishimori, I., Momarita, M.: Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and sjögren syndrome. *Gastroenrology*, 110:1579-86, 1996.
11. Ito, T., Nakano, I., Koyanagi, S., Miyahara, T., Migita, Y., Ogoshi, K., et al.: Autoimmun pancreatitis as a new clinical entity. Tree cases of autoimmun pancreatitis with effective steroid thrapy. *Dig Dis Sci*, 42:1458-68, 1997.
12. Gordon, S.C., Quattrociocchi-Longe, T.M., Khan, B.A., Kodaaali, V.P., Chen, J., Silverman, A.M., et al. Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. *Gastroenterology* , 108:1802-9, 1995.
13. Nishimori, I., Akisawa, N., Miyaji, E., Kohsaki, T., Iwasaki, S., Onishi, S.: Serum antibody to carbonic anhydrase II in patients with chronic viral hepatitis: a review of its prevalence in liver diseases, *Hepatology Research*, Vol.30, 210-213, 2004.
14. Invernizzi, P., Battezzati, P. M., Crosignani, A., Zermiani, P., Bignotto, M., Del papa, N., Zuin, M., Podda, M.: Antibody to carbonic anhydrase II is present in primary biliary cirrhosis (PBS) irrespective of antimitochondrial antibody status. *Clin Exp Immunol*, 114:448-454, 1998.
15. Akisawa, N., Nishimori, I., Miyaji, E., Iwasaki, S., Maeda, T., Shimizu, H., Sato, N., Onishi, S.: The ability of anti-carbonic anhydrase II antibody to distinguish autoimmune cholangitis from primary biliary cirrhosis in japanese patients. *J Gastroenterol*, 34:366-371, 1999.
16. Lindskog, S.: Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase, *Pharmacol.Ther.*, Vol: 74, No:1:1-20, 1997.
17. Sly, S.W., Hu, Y.P.: Human Carbonic Anhydrase and Carbonic Anhydrase Deficiencies, *Annual Reviews*, 64: 375-401, 1995.
18. Pocker, Y.: Molecular Control of Carbonic Anhydrase Activity: Ionic Effectors, Differential Modifiers and Novel Inhibitors. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botre, F., Storey, B. T., Gros, G., (Eds.) Wienheim, VCH Pulishers, pp 75-85, 1991.
19. Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T.C.: Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects, Vol.119, No. 3: 199-229, 2004.
20. Robyt, J.F., White, B.J.: *Biochemical Techniques Theory and Practise*, Press Inc., s.95, 1990.

21. Maren, T.H., Jankowska, I., Sanyal, G., Edelhauser, H.F.: The Transcorneal Permeability of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Effect on Aqueous Humor Secretion, *Exp.Eye.Res*, 33: 457, 1983.
22. Epstein, D.L., Grant, W.M.: Carbonic Anhydrase Inhibitors Side Effects; Serum Chemical Analysis, *Arc.Ophthalmol*, 85:1387, 1977.
23. Kiechle, F.L., Quattrocioni-Longe, T.M., Brinton, D.A., Gordon, S.C., Sykes, E., Elkhaila, M.Y.: Autoantibodies to specific enzymes, a review [review], *Ann clin Lab Sci*, 26:195-207, 1996.
24. Nishimori, I., Brattonova, T., Toshkov, I., Caffrey, T., Mogaki, M., Shibata, Y., and A.Hollingsworth, M.: Induction of Experimental Autoimmune Sialoadenitis by Immunization of PL/J Mice With Carbonic Anhydrase II, *The journal of immunology*, 154:4865-4873, 1995.
25. Ueno, Y., Ishii M., Takahashi, T., Toyota, T., and Larusso, N.F.: Different Susceptibility of Mice to Immune-mediated Cholangitis Induced by Immunization with Carbonic Anhydrase II, *Lab Invest*, 78:629-637, 1995.
26. <http://www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=10&Article=256> (04.06.2005). Ortatatlı, M.: GATA Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı.
27. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. Nov ;193(1) :265-75, 1951.
28. <http://www.turkforum.net/printthread.php?t=4662> (04.06.2005). Türkforum.
29. Kita, H.: Are antibodies to carbonic anhydrase disease specific marker? (Editorial). *Hepatology Research* 30 , 238-239, 2004.
30. Nogradi, A.: The role of carbonic anhydrase in tumors. *American Journals of Pathology*, 153: 1-4, 1998.
31. Epstein, O., Chapman, R. W. G., Lake-Bakaar, G., Foo, A. Y., Rosalki, S. B., and Sherlock, S.: The pancreas in primary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 83:1177.
32. Strarand, V., and Talal, N.: Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bull. Rheum, Dis*. 30:1046, 1980.

33. Whaley, K., and MacSween, R. N. M.: Experimental induction of immune sialoadenitis in guinea pigs using different adjuvants. *Clin. Exp. Immunol*, 17: 681, 1974.
34. White, S. C., and Casarett, G. W.: Induction of experimental autoallergic sialoadenitis. *J. Immunol*, 112: 178, 1974.
35. Nishimori, I., Okazaki, K., Yamamoto, Y., Morita, M., Tamura, S., and Yamamoto, Y.: Identification of autoantibodies to a pancreatic antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *J. Clin. Immunol*, 13: 265, 1993.
36. Reimand, K., Talja, I., Metsküla, K., Kadastik, Ü., Matt, K., Uibo, R.: Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. *Journal of Reproductive Immunology*, 51:167-176, 2001.
37. Frederick, L., Kiechle, M. D., Therese, M., Quattrociocchi-Longe, M. S., David A. Brinton, M. D.: Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *Am J Clin Pathol*, 101: 611-615, 1994.
38. Hosoda, H., Okawa-Takatsuji, M., Tanaka, A., Uwatoko, S., Aotsuka, S., Hasimoto, N., et al.: Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions. *Clin Chim Acta*, 342: 71-81, 2004.
39. Ueno, Y., Ishii M., Igarashi, T., Mano, Y., Yahagi, K., Kisara, N., et al.: Primary biliary cirrhosis with antibody against carbonic anhydrase II associates with distinct immunological backgrounds. *Hepatol Res*, 20:18-27, 2001.
40. Comay, D., Cauch-Dudek, K., Hemphill, D., Diamandis, E., Wanless, I., Heathcote, E.J.: Are antibodies to carbonic anhydrase II specific for anti-mitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis? *Dig Dis Sci*, 45: 2018-21, 2000.
41. Muratori, P., Muratori, L., Lenzi, M., Bianchi, F.B.: Antibodies to carbonic anhydrase in autoimmune Cholangiopathy. *Gastroenterology*, 112:1053-1054, 1997.
42. Alessandri, C., Bombardieri, M., Scrivo, R., Viganego, F., Conti, F., De-Luca, N., Riccieri, V., Valesini, G.: Anti carbonic anhydrase II antibody in systemic sclerosis: Association with lung involvement. *Autoimmunity*, 36(2): 85-89, 2003.

43. Morikazu-Onji, M.D.: In what types of diseases does anti-carbonic anhydrase II antibody-positivity have clinical significance? (Editorial) *J Gastroenterol*, 34: 431-432, 1999.
44. D'cruz, O.J., Wild, R.A., Haas, G.G.Jr., Reichlin, M.: Antibodies carbonic anhydrase in endometriosis: prevalence, specificity relationship to clinical and laboratory parameters. *Fertil. Steril*, 66: 547-556, 1996.
45. Paolo-Muratori, M.D., : Antibodies to carbonic anhydrase in autoimmune cholangiopathy. *Gastroenterology*, 112:1053-1059, 1997.
46. Itoh, Y., Reichlin, M.: Antibodies carbonic anhydrase in systemic lupus erythematosus and other rheumatic disease. *Arthritis Rheum*, 35: 73-82.
47. Ono, M., Ono, M., Watanabe, K., Miyashita, Y., Inagaki, Y., Ueki, H.: A study of anti-carbonic anhydrase II antibodies in rheumatic autoimmune diseases. *Journal of Dermatological Science*, 21: 183-186, 1999.
48. Rojas, R., Apodaca, G.: Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 944-955, 2002.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Menteş, 11.10.1977 tarihinde Giresun'un Görele ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini 1982-1994 tarihleri arasında Görele'de tamamladı. 1995 yılında Fırat Üniversitesi TBMYO Bilgisayar Donanımı Bölümünü kazandı. 1997 yılında Bilgisayar Donanımı Bölümünden birincilikle mezun oldu. Kısa bir süre Siemens Nixdorf Bilgisayar Sistemleri A.Ş.'inde bilgisayar teknikeri olarak çalıştı. 1998 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2002 yılında Kimya Bölümünden ikincilikle mezun oldu. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk babası.