

Anti-Nötrofil Sitoplazma Antikor (ANCA) Testi İstenilen Hastaların Serumunda Anti-Midbody Otoantikor Pozitifliği

Zeki YUMUK(*), Şeyda ÇALIŞKAN(*), Sevgi ÇELİK(**), Ayşe WILLKE(***)

(*)Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

(**)Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane Merkez Seroloji Laboratuvarı, Kocaeli

(***)Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kocaeli

ÖZET

Anti-midbody otoantikoru, yapılan sınırlı sayıdaki çalışma sonucunda %2 oranında sistemik skleroz ve Raynaud sendromlu hastada pozitif bulunmuştur. Anti-midbody antikorun ilişkilendirildiği başka otoimmün hasta grubu literatürde bulunmamaktadır. Anti-nötrofil stoplazma antikorları (ANCA) istenilen hastalarda anti-midbody antikorlu %55,4 pozitif bulunmuştur. ANCA istenilen hasta grubunda anti-midbody otoantikorusunun araştırılmasının önemli olabileceği düşünülmektedir. Otoantikor testleri otoimmün hastalıkların teşhis ve tedavisinin takibinde önemli yer tutmaktadır. Otoantikorların ve ilişkili olduğu hastalık grubunun bilinmesi ve yeni ilişkilerin ortaya çıkartılmasının tanı ve izlem yönünden hasta sağlığına önemli katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Anti-midbody, otoantikor, anti-nötrofil sitoplazma antikor

SUMMARY

Anti-Midbody Autoantibody Positivity in Patients's Sera Sent for Anti-Neutrophil Cytoplasma Antibody Testing

Limited number of reports demonstrated that anti-midbody autoantibody might be related to systemic sclerosis and Raynaud's syndrome about 2% in rate. According to the literature research no other autoimmune disease related to anti-midbody were found. Anti-midbody was found to be positive in 55.4% of sera that were sent for anti-nötrofil stoplazma antikorları (ANCA) testing. Therefore, investigating anti-midbody in the ANCA requested sera might be important. Autoantibody testing is important in the diagnosis and follow-up of autoimmune diseases. The knowledge on autoantibodies and autoimmune disease, the relations between each other might have a valuable effect on patient's health.

Key words: Anti-midbody autoantibody, anti-neutrophil cytoplasmia antibody

GİRİŞ

Otoimmün hastalıkların teşhisinde ve takibinde otoantikor testleri önemli yer tutmaktadır (1). Anti-nükleer antikorlar (ANA) ve anti-nötrofil sitoplazma antikorları (ANCA), dokuda otoantikorların meydana getirdiği tahribatı belirlemede kullanılmaktadır (2). Ancak, ANA ve ANCA testlerinin tanıda kullanıldığı otoimmün hastalık grupları birbirinden farklıdır (1). Sistemik lupus eritematozus (SLE), sistemik skleroz, Raynaud sendromu, polidermatomyozit, Sjögren sendromu, miks bağ doku hastalıklarının teşhisinde ANA, Wegener granülomatozu, mikroskopik polianjiitis, Churg-Strauss sendromu gibi nek-

rotizan vaskülitlerin, primer sklerozan kolanjit ve primer biliyer sirozun teşhisinde ise ANCA otoantikor testi tercih edilmektedir (3). Anti-midbody antikorunun serumda belirlenmesi ANA test grubu içinde yer almaktadır ve %2 oranında sistemik skleroz ve Raynaud sendromunu gösterebileceği düşünülmektedir (4,5). Anti-midbody antikorunun nekrotizan vaskülit veya hepatit gibi diğer hastalık gruplarıyla bir ilişkisinin olduğunu gösteren bilgi bulunmamaktadır. Midbody adlı yapı, hücrede bölünme başladıktan ve yeni oluşan iki hücre birbirinden ayrılmadan önceki aşamasında, yeni hücrelerin birbirlerine temas ettiği bölümde gözlenmektedir.

Sistemik skleroz hastalığı ve Raynaud sendromu genellikle birbirleriyle ilişkili olarak gelişmektedir, teşhiste ANA testleri önemli yer tutmaktadır (3). ANA testleri, Hep-2 hücreleri, ANCA testleri ise indirekt immünflöresan tekniğinde (IIF) karışık insan lökositleri kullanılarak çalışılmaktadır. Genellikle ANCA istenen hastalardan aynı zamanda ANA testi de istenilmektedir.

Laboratuvarımıza, ANCA testi çalışılmak üzere gönderilen serumların bir kısmında anti-midbody antikorunun pozitif çıktığı izlenmiştir. Bu nedenle, iki aylık bir süre aralığı belirlenerek ANCA istenen hasta grubuyla anti-midbody antikoruna arasında teşhise yönelik muhtemel bir ilişkinin varlığı araştırılmıştır. Bu amaç için IIF ile anti-ENA test yöntemleri kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Mayıs- Haziran 2004 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi polikliniklerine başvuran, klinikler tarafından ANCA testi istenen hasta serumları dahil edilmiştir. Anti-midbody pozitif bulunan serumlara anti-ENA testi uygulanmıştır. Hastalara ait çalışılmış diğer rutin laboratuvar bilgileri kaydedilmiştir. Çalışılan serumlar kontrol için -20°C'de saklanmıştır.

IIF TESTİ

Çalışmada, Euroimmune (Almanya) firmasına ait IIF ANA ve ANCA kitleri kullanılmıştır. Kısaca test şu şekilde çalışılmıştır: Serum örnekleri fosfat tamponlu izotonik solüsyon (PBS) ile ANA için 1/100, ANCA için 1/10 oranında dilüe edilmiştir. Slayt üzerindeki her bir kuyucuğa 70 µl dilüe edilmiş serum damlatılmıştır. Otuz dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda slaytlar 5 dakika aralıklarla iki defa PBS ile yıkanmıştır. Flöresan işaretli anti-human immünoglobulin (konjugat) ile kuyucuklar tekrar doldurulmuş ve 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. PBS ile tekrar yıkanmıştır. Kuyucuklara mounting medium doldurularak lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan slaytlar 400x büyütmede flöresan mikroskopunda incelenmiştir. Sonuçlar, Olympus marka flöresan mikroskop kullanılarak değerlendirilmiştir. Bölünme aşmasında olmayan %40-50 Hep-2 hücresinde speckled patern gözlenmesi,

metafaz safhasındaki kromozomların güçlü bir şekilde flöresan vermesi ve sitogenezini tamamlamış hücrelerin midbody bölgesinde flöresan görülmesi anti-midbody pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Anti-ENA testi

Anti-ENA testi Euroimmune firmasına ait Euroline® kiti kullanılarak yapılmıştır, başka yöntem veya ticari kit çalışmada kullanılmamıştır. Bu kit immunblotting prensibine göre üretilmektedir. Testte kullanılan her bir strip, nRNP/Sm (U1-nRNP), Sm, SS-A, Recombinant Ro-52 (Ro-52, 52kDa), SS-B, DNA-Topoisomerase I (Scl-70), PM-Scl, Histidyl-tRNA Synthetase (Jo-1), Centromer protein B (CENP B), Double-stranded DNA (dsDNA), Nucleosomes, Histones, Pyruvate-dehydrogenase complex (AMA-2) antijenlerini içermektedir. Test üzerindeki antijenler, insanda IgG sınıfında bulunan otoantikorlarının kalitatif değerlendirmesini yapabilecek nitelikte bulunmuştur. İlk reaksiyon basamağında 1/100 oranında dilüe edilmiş hasta serumları immünblot stripleriyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon için firma tarafından sağlanan kuvvetler kullanılmıştır. Test üzerindeki herhangi bir antijene karşı varsa antikor (pozitiflik), spesifik immünglobulin G (Ig G) antikorları (Ig A ve Ig M dahil) karşılığı olan antijenik bölgeye bağlanmaktadır. Bağlı antikor saptamak için renk reaksiyonu oluşturma kapasitesi olan insan IgG (enzim konjugat) işaretli enzim ile ikinci bir inkübasyon yürütülmektedir. Sonuçlar çıplak gözle değerlendirilmiştir.

İstatiksel analiz

Anti-midbody pozitif ve negatif çıkan serumlara ait biyokimya ve hemogram sonuçları bağımsız gruplar için student's t-test kullanılarak karşılaştırılmıştır. P değeri 0,05'ten küçük değer istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

BULGULAR

Çalışma süresince, 65 hasta serumunda ANCA testi çalışılmıştır ve 36 (%55) serumda anti-midbody antikor pozitif bulunmuştur. Anti-midbody negatif 29 serumun ise iki tanesinde homojen patern (1/100 dilüsyonda) pozitiflik bulunmuştur, diğer otoantikor çeşitleri tespit edilmemiştir. Tablo 1'de anti-midbody antikor ile birlikte belirlenen diğer otoantikorlar gös-

terilmektedir. Sadece, üç serumda ANCA pozitif bulunmuştur. Hastaların %43'ünde otoimmün bir hastalık, %45'ünde kontrol amacıyla ve %23'ünde ise vaskülit düşünüldüğü için ANCA testi istenmiştir. Hasta grubunun ortalama yaşı 48,4±17,5; 32-65 (ortalama±SD; min, max); cinsiyet, kadın erkek oranı 2,33 olarak bulunmuştur. Hastaların %65'i dahiliye, %30 dermatoloji ve %5'i nöroloji, genel cerrahi, göğüs hastalıklarına başvurmuştur. Hastaların hiçbirisine daha önce otoimmün bir hastalık teşhisi konulmamıştır.

midbody negatif çıkan hasta grubunda ki aPTT ve sedimentasyon değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı dercede ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur.

Tablo 3'te hastalara ait biyokimya değerleri gösterilmiştir. Anti-midbody pozitif çıkan hasta grubunda AST, ALT ve alkalen fosfataz değerleri, anti-midbody negatif çıkan hasta grubunda ki AST, ALT ve alkalen fosfataz değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı dercede ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur. Anti-midbody pozitif ve negatif gruplara ait, Tablo 2 ve 3'te gösterilen diğer rutin laboratuvar sonuçları kar-

Tablo 1. Anti-midbody pozitif bulunan serumlarda ANA, ANCA, ASMA ve Anti-ENA test sonuçları

Hasta no.	ANA	ANCA	Anti-ENA	Ön tanı
1	Nükleer matrix	-	-	Otoimmün hs
2	Nükleer matrix	-	-	Otoimmün hs
3	Spindle	-	-	Otoimmün hs
4	Anti-mitekondirial antikor	-	-	Kontrol
6	Nükleer matriks	c-ANCA	-	Vaskülit
8	Homojen	-	-	Otoimmün hs
9	Anti-düz kas antikor (ASMA)	-	-	Kontrol
10	Homojen	-	Scl-70, Ro52	SLE
15	Homojen, ASMA	-	-	Otoimmün hs
21	ASMA	c-ANCA	-	Kolanjit
22	Homojen	-	-	Kontrol
23	Homojen	-	-	Otoimmün hs
25	Spindle	p-ANCA	-	Vaskülit
33	Sentromer	-	CENPB	Kr. Aktif Hep.
35	ASMA	-	-	Kontrol

Tablo 2. Anti-midbody pozitif bulunan hastalara ait hemogram değerleri

Test	Ortalama	Min	Max	SEM	CI%95	Normal aralık/ ortalama
Lökosit	10,5	2,7	76,6	2,6	5,23 - 5,96	4,6 - 10,2
Hemoglobin	13,1	8,9	16,2	0,3	12,11 - 14,63	12,2 - 18,1
Hematokrit	37,8	25,0	46,4	1,0	34,86 - 42,07	37,7 - 53,7
Trombosit	231,1	1,2	531,0	19,6	161,17-259,25	142,0-424,0
aPTT*	64,9	21,7	299,0	24,5	11,96-118,01	26,5 - 40,0
PTZ	13,9	11,7	22,2	0,6	12,42 - 15,49	11,5 - 15,5
Sedimentasyon	23,2	4,0	85,0	6,0	10,45 - 35,99	0,0 - 10,0

*Kontrol değerleriyle arasında fark istatistiksel olarak anlamlı dercede ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur.

Anti-midbody pozitif 36 hastaya ve anti-midbody negatif bulunan 29 hastaya ait hemogram ve rutin biyokimya sonuçları, bakılan parametrelerde farklılık olup olmadığını araştırmak amacıyla karşılaştırılmıştır. Tablo 2'de hastalara ait hemogram sonuçları gösterilmektedir. Anti-midbody pozitif çıkan hasta grubunda aPTT ve sedimentasyon değerleri, anti-

şılaştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunamamıştır.

TARTIŞMA

Anti-midbody antikor varlığının sistemik skleroz ve Raynoud sendromunda araştırılması önerilmektedir (3,4). Ancak anti-midbody otoantikor ve otoimmün

Tablo 3. Anti-midbody pozitif bulunan hastalara ait Biyokimya değerleri

Test	Ortalama	Min	Max	SEM	CI95	Normal Değer
AKT	86,2	40,0	100,0	4,6	76,25-96,32	70-110
TPROT	7,8	6,4	8,6	0,1	7,54-8,18	6,4-8,3
ALB	4,3	3,4	5,2	0,1	4,12-4,55	3,5-5,0
AST*	35,6	11,0	144,0	5,8	23,61-47,63	10,0-40,0
ALT*	50,9	2,0	271,0	10,7	28,80-73,10	10,0-35,0
CHOL	186,6	119,0	468,0	19,7	144,73-228,55	45-200
TG	200,0	39,0	1839,0	102,8	-18,02-418,14	75-154
LDH	220,2	118,0	533,0	26,2	164,65-275,81	125,0-243,0
GGT	31,4	2,9	146,0	8,4	13,44-49,35	9,0-64,0
ALP*	102,9	45,0	298,0	18,3	63,30-142,54	53,0-128,0
BUN	13,5	6,0	24,0	1,1	11,16-16,01	7,0-25,7
KRE	0,9	0,5	1,5	0,1	0,79-1,01	0,7-1,3
TBIL	0,8	0,2	3,3	0,1	0,47-1,27	0,2-1,0
DBIL	0,3	0,1	1,8	0,1	0,17-0,57	0,0-0,5
ÜRE	28,7	12,8	49,2	2,4	23,55-33,98	15,0-55,0

AKT; Açlık kan şekeri, TPROT; Total protein, ALB; Albümin, CHOL; kolesterol, TG; .Trigliserit, LDH; Laktat dehidrojenaz, GGT; Gama glutamil transferaz, ALP; Alkalen fosfataz, KRE; Kreatinin, TBIL; Total bilirubin, DBIL; Direkt bilirubin

*Kontrol değerleriyle arasında fark istatistiksel olarak anlamlı dercede ($p<0,05$) yüksel bulunmuştur.

hastalıkları konu alan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (4). Genellikle ANCA vaskülit veya kolanjit teşhisinde yardımcı bir laboratuvar testi olarak kullanılmaktadır, ve kullanımı bu alanda sınırlandırılmıştır (1). Otoantikör testleri otoimmün hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli yer tutmaktadır.

Hücre içi proteinlere ve nükleik asitlere karşı gelişen otoantikörler ölü hücrelerden açığa çıkan antijenlere bağlanarak dolaşan immün kompleksleri oluşturmakta, immün komplekslerin dokularda depolanması sonucu otoimmün hastalıklar oluşmaktadır. Ölü hücrelerden çıkan antijenler hakkındaki bilgilerimiz sınırlı olmasına rağmen, immün kompleksi oluşturan antikör tipinin IgG olduğu bilinmektedir (1,3,6). İmmün komplekslerin dokularda depolanması, kompleman (C3a ve C5a komponentleri aracılığıyla) aktivasyonuna neden olmaktadır. Kompleman aktivasyonu ile birlikte inflamatuvar mediatörlerin salınması, pıhtılaşma hücrelerinin aktivasyonu, reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi, hidrolitik enzimlerin ve sitokinlerin salınımı gerçekleşmekte, doku hasarı meydana gelmektedir. Meydana gelen hasar damar iltihabı, kalp zarı iltihabı, akciğer zarı iltihabı, deri lezyonları ve böbrek iltihabı ile sonuçlanmaktadır (3).

Bu çalışmada, ANCA istenilen ve anti-midbody pozitif bulunan hastaların hemogram ve biyokimyasal

değerlerinden hastaların karaciğer veya safra yollarına ilişkin bir hastalıklarının olabileceği görülmektedir. Otuz altı anti-midbody pozitif bulunan hastanın 14 tanesinde, beraberinde diğer otoantikörler de pozitif bulunmuştur. Bu, durumda, anti-midbody antikörünün bu hasta grubunda otoimmün hastalıkla birlikte bir karaciğer hastalığının olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, hastalarla daha sonra iletişim kurulamadığı için takipleri yapılamamıştır. Bu nedenle, teste ait pozitif prediktif değer bilinmemektedir.

Karaciğer veya safra yollarına ait hastalıkların tanısında bazı otoantikör testi tercih edilebilmektedir (6). snRNPs; kronik aktif hepatit, Lamins A, B, C; kronik otoimmün karaciğer hastalığı, ADP-ribose polimeraz ve CENP-F; karaciğer hastalıklarında, c ve p-ANCA primer kolanjitlerde otoantikör varlığı araştırılan antijenlerin bazılarını oluşturmaktadır (1).

Çalışmamız sonucunda, anti-midbody otoantikörünün karaciğer veya safra yollarına ait bir patolojiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu konunun netleşmesi için bu çalışmada kullanılan daha büyük bir hasta grubuyla çalışmak gerekmektedir. Son yıllarda kronik hepatitlerin otoimmün zeminden geliştiği konusunda değerli çalışmalar yapılmıştır. Kronik hepatit ve otoantikörler arasındaki ilişkinin daha fazla araştırılması bu nedenle önemli olmaktadır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmayla primer hepatokarsinomanın erken teşhisinde otoantikörlerin önemli olabileceği ve özellikle anti-midbody antikorunun değer taşıyabileceği bildirilmiştir (6).

Otoimmün hastalıkların teşhisi ve tedavisinin takibi zor olmaktadır. Klinisyene otoimmün hastalıkların teşhisinde en yararlı desteği otoantikör testleri vermektedir. Otoantikörlerin ve ilişkili olduğu hastalık grubunun bilinmesi ve yeni ilişkilerin ortaya çıkartılmasının hasta sağlığına katkıda bulunacağı bir gerçektir. Bu çalışmanın budan sonraki anti-midbody antikörle ilgili çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bradwell AR: Immunofluorescent antinuclear antibody tests. "Rose NR (ed.): Manual of Clinical Laboratory Immunology" 6 edn. Washington, DC: ASM Press; 922-32 (2002).
2. Leslie D, Lipsky P, Notkins AL: Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest* 108: 1417 (2001).
3. Fritzler MJ, Salazar M: Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Re* 4: 256 (1991).
4. Andrade LE, Chan EK, Peebles CL, Tan EM: Two major autoantigen-antibody systems of the mitotic spindle apparatus. *Arthritis Rheum* 39: 1643 (1996).
5. Fritzler MJ, Ayer LM, Gohill J, O'Connor C, Laxer RM, Humbel RL: An antigen in metaphase chromatin and the midbody of mammalian cells binds to scleroderma sera. *J Rheumatol* 14: 291 (1987).
6. Fang F, Wang HL, Ye P et al. Detection of autoantibodies in the serum of primary hepatocarcinoma patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 1: 94 (2002)