

**T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇHASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
ROMATOLOJİ BİLİM DALI**

**Major Histokompatibilite Antijen Bölgesini Temsil Ettiği  
Düşünülen (Tag) Single Nükleotid Polimorfizmlerinin HLA-B27' i  
Tanımlamadaki Geçerliliğinin Değerlendirilmesi**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Dr.MEHMET NEDİM TAŞ**

**İZMİR 2013**

**T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
DAHİLİYE ANABİLİM DALI  
ROMATOLOJİ BİLİM DALI**

**Major Histokompatibilite Antijen Bölgesini Temsil Ettiği  
Düşünülen (Tag) Single Nükleotid Polimorfizmlerinin HLA-B27' i  
Tanımlamadaki Geçerliliğinin Değerlendirilmesi**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Dr.MEHMET NEDİM TAŞ**

**Tez Danışmanı  
PROF.Dr.SERVET AKAR**

**İZMİR 2013**

## TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık Eğitimimiz boyunca bilgisi , zerafeti ve şefkatiyle bizleri ve Dokuz Eylül İç Hastalıkları Anabilim dalını daha güzel kılan Anabilim dalı başkanımız Prof Dr Fatoş ÖNEN' e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca desteğini ve hekimlik sanatını benden esirgemeyen ,tez süreci boyunca benden kat be kat daha çok emek harcayan tez danışman hocam Prof. Dr. Servet AKAR' a sonsuz kez teşekkür ederim.

Romatoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr İsmail SARI hocama ve şimdi bizden uzaklarda çalışan Dilek SOLMAZ ablama teşekkürler.

Bilgi ve tecrübelerini bizden esirgemeyen Dokuz Eylül İç Hastalıkları'nın tüm değerli öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Hayatı daha anlamlı kılan aileme ve arkadaşlarıma teşekkürler. İyi ki varsınız...

## İÇİNDEKİLER

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| TABLO LİSTESİ .....                                                   | 1   |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                                   | 11  |
| KISALTMALAR.....                                                      | 111 |
| ÖZET .....                                                            | 1   |
| SUMMARY.....                                                          | 2   |
| GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                    | 3   |
| GENEL BİLGİLER .....                                                  | 5   |
| 1)İSKELET TUTULUMU.....                                               | 5   |
| 1.1.AKSİYEL İSKELET TUTULUMU .....                                    | 5   |
| 1.2.ENTEZİT .....                                                     | 9   |
| 1.3. PERİFERİK EKLEM TUTULUMU .....                                   | 9   |
| 2.İSKELET-DIŞI TUTULUM .....                                          | 10  |
| 2.1. GÖZ TUTULUMU .....                                               | 10  |
| 2.2 İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIĞI .....                               | 10  |
| 2.3 DİĞER EKLEM DIŞI TUTULUMLAR.....                                  | 11  |
| B:HASTALIK PATOGENEZİ .....                                           | 11  |
| 3.1. ANKİLOZAN SPONDİLİTTE HEDEF DOKULAR.....                         | 11  |
| 3.1.1 ENTEZİT İNFLAMASYONU .....                                      | 12  |
| 3.1.2 SYNOVİAL İNFLAMASYON.....                                       | 12  |
| 3.1.3 KEMİK.....                                                      | 13  |
| 3.2. ANKİLOZAN SPONDİLİT PATOLOJİSİNDE GÖZLENEN<br>HÜCRE TİPLERİ..... | 14  |
| 3.3 ANKİLOZAN SPONDİLİT PATOLOJİSİNDE GENETİK FAKTÖRLER.....          | 14  |
| 3.3.1 HALA B27 EV ANKİLOZAN SPONDİLİTE YATKINLIK .....                | 15  |
| 3.3.1.HLAB27 ALT TİPLERİ.....                                         | 15  |
| 3.3.2 MHC BÖLGESİ DIŞI GENLER VE AS E YATKINLIK .....                 | 16  |
| C. HLA B27 DE KULLANILAN YÖNTEMLER.....                               | 17  |
| HLA TİPLENDİRME.....                                                  | 18  |
| YÖNTEM.....                                                           | 20  |
| SONUÇLAR .....                                                        | 21  |
| TARTIŞMA .....                                                        | 23  |
| KAYNAKÇA .....                                                        | 25  |
| EKLER.....                                                            | 34  |

## **TABLO LİSTESİ**

**Tablo 1:** İnflamatuvar Bel Ağrısı kriterleri

**Tablo 2:** İnflamatuvar Bel Ağrısı için İleri Sürülen Kriterlerin karşılaştırılması

**Tablo 3:** Ankilozan Spondilite yatkınlıkta rolü olduğu gösterilen bazı genler ve hastalık kalıtsallığına etkisi

**Tablo 4:** Çalışmaya Dahil Edilen AS Hastalar ve Sağlıklı Bireylerin Demografik ve Bazı Klinik verileri

**Tablo 5:** HLA-B27 pozitif (n=148) ve HLA-B27 negatif (n=91) bireylerde HLA tag SNP'ler (rs13202464 ve rs4349859) Genotip ve Allel sıklıkları

**Tablo 6:** HLA-B27 tag SNP'lerin Efekt Allellerinin Sensitivite ve Spesifisite değerleri, Mevcut Çalışma Verileri ve Daha Önce Yapılan Bildirimlerin Özeti.

## **ŞEKİL LİSTESİ**

**Şekil 1 :** AS Sakroiliak Eklem Tutulumun MRI de görünümü

**Şekil 2:** AS Sakroilik Eklem Tutulumun ve Bambu Kamışı X-RAY Görüntüsü

**Şekil 3:** Aşıl Tendon Enteziti, Spur

**Şekil 4:** Hipopiyon

**Şekil5:** Endokondral Kemik Oluşum Safhaları ve Olası Kontrol Mekanizmaları

**Şekil 6:** İnsan MHC Bölgesine Genel Bakış

**Şekil 7:** Çalışma Grubundaki Hastaların ve Kontrol Grubunun Dağılımı

## KISALTMALAR

|           |                                                                    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| AS:       | Ankilozan spondilit                                                |
| HLA:      | Human Leukocyte Antigen–İnsan Lökosit Antijeni                     |
| DNA:      | Deoksiribonükleik asit                                             |
| PCR:      | Polymerase chain reaction                                          |
| PCR-SSP:  | Polymerase chain reaction-sequence specific probe                  |
| MHC:      | Major histocompatibility complex                                   |
| SNP:      | Single nucleotide polymorphism                                     |
| IBA:      | İnflamatuvar bel ağrısı                                            |
| ASAS:     | Assesment of Spondyloarthritis International Society               |
| MRI:      | Manyetik rezonans görüntüleme                                      |
| RA:       | Romatoid artrit                                                    |
| AAU:      | Akut anterior uveit                                                |
| NSAİİ:    | Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar                                |
| SEK:      | Synovial entezal kompleks                                          |
| BMP       | Bone morfogenezik protein                                          |
| WNT:      | Wingless glikoprotein                                              |
| DKK1:     | Dickkopf ilişkili protein1                                         |
| TNF:      | Tümör nekrozis faktör                                              |
| IL-23R:   | İnterlökin 23 reseptörü                                            |
| UPR:      | Unfolded protein response                                          |
| KIR3DL2:  | Killer immunoglobulin benzeri reseptör                             |
| ERAP:     | Endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1                              |
| PCR-RFLP: | Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism |
| SSCP:     | Single strand conformation polymorphism                            |
| DGGE:     | Denature edici gradient gel elektroforezi                          |
| TGGE:     | Temperature gradient gel elektroforezi                             |
| SSO:      | Sekans spesifik oligonükleotid probe                               |
| En1a3:    | Endonükleaz 3                                                      |
| BASDAI:   | Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeks                  |
| BASFI:    | Bath Ankilozan Spondilit Fonksiyonel İndeks                        |
| BASMI:    | Bath Ankilozan Spondilit Metroloji İndeks                          |

## ÖZET

**Arkaplan:** Ankilozan spondilit (AS) HLA-B27 ile güçlü bir ilişki göstermektedir. Bu etkileşimin en iyi bilinen hastalık ilişkisi olması ve 1973'den beri biliniyor olmasına rağmen HLA-B27 tiplendirmesi teknik olarak bazı güçlükler göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda Avrupalı ve Asyalı AS'li hastalarda, rs4349859 ve rs13202464 no'lu tek nükleotid polimorfizmlerinin (*single nucleotide polymorphisms*; SNPs) major histokompatibilite kompleksi ile (MHC) tag olduğu ve HLA-B27 tespitinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı HLA-27 tespitinde daha önce bahsedilen SNP'lerin sensitivite ve spesifitesini değerlendirmektir.

**Yöntem:** Polimeraz zincir reaksiyonu restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (*polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism*; (PCR-RFLP) yöntemi kullanılarak iki SNP (rs13202464 and rs4349859) genotiplendirildi. Bu genotiplendirme için gerekli primerler primer-BLAST arayüzü kullanılarak Primer3 algoritması ile dizayn edildi. PCR ürünleri BmrI ve TaqOI restriksiyon enzimleri ile sindirime uğrattıldı. Genotiplerin kalite kontrolü için random seçilen bazı örnekler aynı zamanda ABI 3130 automated DNA sequencer cihazı kullanılarak sekanslandı. HLA-B27 analizi ticari olarak bulunan SSP-typing kit kullanılarak genotiplendirildi. SSP-tiplendirme sonuçları %2 agarose jel üzerinde gösterildi

**Sonuçlar:** Çalışmaya toplamda modifiye New York kriterlerine göre AS olarak izlenen 207 hasta (%72 erkek, ortalama yaş  $42.3 \pm 10.8$  ve 146 [%71] HLA-B27 pozitif) ve 32 sağlıklı kontrol (%78 erkek, ortalama yaş  $52.7 \pm 10.8$  ve 2 [%6] HLA-B27 pozitif) dahil edildi. rs4349859 no'lu SNP için efekt alleli (A) yüksek spesifiteye sahipti (1.000) ancak sensitivite değeri 0.469 idi. rs13202464 no'lu SNP için efekt alleli (G) için spesifite 0.967 ve sensitivite 0.530 olarak hesaplandı.

**Yorum:** Bu çalışmanın sonuçları daha önce HLA-B27 için oldukça güçlü tag olduğu bildirilen SNP'lerin, Türk popülasyonunda, klasik HLA-B27 tayin yöntemlerine göre avantajı olmadığını düşündürmektedir. Bizim toplumumuzda HLA-B27 ile daha güçlü ilişki gösteren SNP'lerin saptanabilmesi için başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## ABSTRACT

**Background:** Ankylosing spondylitis (AS) is strongly associated with HLA-B27. Although AS and HLA-B27 interaction is one of the best known disease association and has been recognized since 1973, accurate HLA-B27 typing is technically challenging. Previously major histocompatibility complex (MHC) tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs4349859 and rs13202464 were shown to be able to identify HLA-B27 in European and Asian AS patients.

**Objectives:** Therefore the objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of these SNPs in identifying HLA-B27 allele.

**Methods:** We genotyped two SNPs (rs13202464 and rs4349859) by using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The primers were designed using Primer3 algorithm via primer-BLAST interface. PCR products were digested by using BmrI, and TaqI restriction endonuclease enzymes. Some of the samples were also sequenced by using ABI 3130 automated DNA sequencer in order to prevent misleading results. HLA-B\*27 analysis for patient group was performed by using commercially used SSP-typing kit. SSP-typing results were visualized on 2% agarose gel electrophoresis.

**Results:** In total 207 patients (72% male, mean age  $42.3 \pm 10.8$  years and 146 [71%] was HLA-B27 positive) with AS according to the modified New York criteria and 32 healthy controls (78% male, mean age  $52.7 \pm 10.8$  years and 2 [6%] was HLA-B27 positive) were included in the study. The effect alleles of SNPs rs4349859 (A) showed a high specificity (1.000). However sensitivity figure for HLA-B27 were 0.469. The effect allele of SNP rs13202464 (G) has a specificity of 0.967 and a sensitivity of 0.530.

**Conclusion:** Our results suggest that the SNPs which previously reported as strongly tagged to HLA-B27 do not have any advantage over the HLA-B27 typing in Turkish population. Further research is needed to identify SNPs that may have stronger association with HLA-B27 in our population.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Ankilozan spondilit (AS), spondiloartritler (SpA) olarak bilinen bir grup hastalığın prototipini oluşturmaktadır. Bu grup hastalıklar bazı yönleriyle birbirlerinden belirgin farklılıklar gösterebilmekle birlikte, bazı ortak klinik, epidemiyolojik ve patogenetik özellikleri paylaşımları nedeniyle ortak bir çatı altında incelenmektedir. Bu hastalıkların en belirgin ortak klinik özellikleri iskelet sisteminde, özellikle sakroiliak eklem olmak üzere, omurgada inflamasyon yapmaları, entezit ve sinovit ile seyretmeleridir.

Uzun süredir hastalığın ailesel birikim gösterdiği bilinmektedir. Bu durum hastalığın gelişiminde genetik faktörlerin rolüne işaret etmektedir. Ailesel birikim yanında, hastalığın gelişmesinde genetik faktörlerin rolünü destekleyen diğer önemli bulgu ikizlerdeki birliktelik yani “konkordans”tır. Literatürde öteden beri monozygotik ikiz AS hastaları bildirilmektedir (1, 2). İki küçük çaplı, yeni çalışma hastalığın monozygotik ikizlerde, dizigotik olanlara göre 5 kat daha fazla birliktelik göstermiştir. Son olarak İngiltere’den bildirilen bir çalışma, genetik faktörlerin hastalığın oluşumundaki rolünün %97 olduğunu düşündürmüştür (3). İnsan Lökosit Antijeni-B27 (*Human Leucocyte Antigen*; HLA) ile AS arasındaki sıkı birliktelik yaklaşık 40 yıldır bilinmektedir (4-6). Öyle ki beyaz AS’li hastalarda HLA-B27 sıklığının % 88-96, kontrollerde % 4-8 olduğu bildirilmiştir. Populasyondaki HLA-B27 sıklığının % 2’nin altında olduğu Japonlarda (6), Hintlilerde (7) ve Iraklılarda (8) bile HLA-B27 ile AS arasındaki birliktelik güçlüdür.

Ankilozan spondilit ile HLA-B27 güçlü birliktelik göstermesine rağmen teknik olarak genotiplendirmede bazı zorluklar bulunmaktadır. Lenfositotoksiste ve akım sitometrisi (*flow cytometry*) yöntemlerinin başlıca dezavantajı taze kan örneğine ihtiyaç duyuyor olmalarıdır. Öte yandan aşağıda sayılan deoksi-ribonükleik asit (DNA) temelli yöntemler HLA-B27 genotiplendirmesinde başarı ile kullanılmaktadır ve çoğu ticari kitler şeklinde de mevcuttur. Bunlar arasında; polimeraz zincir reaksiyonu (*polymerase chain reaction*; PCR) sonrası restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (*restriction fragment length polymorphism*; RFLP), sekans spesifik primer (PCR-SSP) kullanımı, oligonucleotide probe kullanımı, ligasyon temelli tiplendirme ve sekans temelli tiplendirme (*sequence based typing*; PCR-SBT) sayılabilir (9, 10). Son zamanlarda *dublex real-time TaqMan* PCR yöntemi ile de güvenilir ve duyarlı şekilde HLA-B27 genotiplendirmesi yapılabileceği bildirilmiştir (9). Ancak bu testlerin hemen tamamı uzun süren testlerdir ve maliyetleri ile birlikte ele alındığında kitle taramaları için uygun olmayabilirler (11).

Yakın dönemde major histokompatibilite kompleks (*major histocompatibility complex*; MHC) ile birliktelik gösteren (MHC’yi temsil edebilecek; *tag*) tek nükleotid

polimorfizmleri (*single nucleotide polymorphisms*; SNPs) rs4349859 ve rs13202464'ün Avrupalı ve Asyalı AS hastalarında HLA-B27'yi saptamakta kullanılabileceği bildirilmiştir (11-13). Ayrıca söz konusu SNP'lerin kullanılmasının mevcut HLA-B27 genotiplendirme yöntemleri ile kıyaslandığında teknik ve maliyet açısından avantajlı olduğu belirtilmiştir (11). Bu nedenle bu çalışmada söz konusu tag SNP'lerin, Türk AS hastalarında HLA-B27 genotiplendirilmesi için duyarlılık ve özgüllüklerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### A. Klinik Bulgular

Ankilozan spondilit (AS), spondiloartritler (SpA) olarak bildiğimiz bir grup hastalığın prototipini oluşturmaktadır. Bu grup hastalıklar bazı yönleriyle birbirlerinden belirgin farklılıklar gösterebilmekle birlikte, bazı ortak klinik, epidemiyolojik ve patogenetik özellikleri paylaşımları nedeniyle ortak bir çatı altında incelenmektedir. Bu hastalıkların en belirgin ortak klinik özellikleri iskelet sisteminde, özellikle sakroiliit olmak üzere, omurgada inflamasyon yapmaları, entezit ve sinovit ile seyretmeleridir.

#### 1. İskelet tutulumu

##### 1.1. Aksiyal iskelet tutulumu

Hastalık daha çok erkeklerde görülmekte (E:K=2-3:1) ve ilk yakınma genel olarak yirmili yaşlarda başlamaktadır. Beklenildiği üzere hastaların en sık gözlenen başvuru yakınması bel ağrısıdır. Bel ağrısının 16 yaşından önce başlaması çok beklenmemektedir. Juvenil çağda SpA olguları çoğu kez öncelikle diz ve metatarsofalangeal eklemleri tutan oligoartrit şeklinde başlamakta ve sıklıkla entezit ve bazen üveit ile birliktelik göstermektedir(14).

Bel ağrısı, özellikle belin lomber bölgesini ilgilendiren, en sık rastlanılan kas-iskelet yakınmasıdır. Genel popülasyonun yaklaşık %80'nin hayatı boyunca en az bir kez akut bel ağrısı yaşadığı gösterilmiştir (15, 16). Ancak bu bireylerin büyük çoğunluğu hekime veya bir sağlık kuruluşuna başvurmaz ve %90'ında yakınmalar altı hafta içerisinde azalır veya kaybolur(17, 18). Bel ağrısı üç ayın üzerinde devam ettiğinde, artık kronik bel ağrısı olarak adlandırılmaktadır. Kronik bel ağrısı sıklığı yaş, cins, mekanik faktörler, çalışma koşulları gibi değişkenlere bağlı olmakla birlikte, akut bel ağrısından belirgin daha azdır.

Ankilozan spondilitte çoğu kez inflamasyon sakroiliak eklemlerde veya aşağı bel bölgesinde (lombar) başlar. Yakınmalar zaman içerisinde belin yukarı kesimlerini de (torakal ve servikal omurga) tutacak şekilde (asendan) seyir gösterir (19). AS ve SpA grubu hastalıkların, omurga tutulumuna bağlı yakınmalara genel olarak inflamatuvar bel ağrısı (IBA) denilmektedir.

İnflamatuvar bel ağrısı; terminolojik olarak tek bir yakınma olmayıp bir grup semptom kompleksini temsil eder ve aksiyal SpA hastalarındaki sakroiliak eklem ve omurganın diğer kesimlerindeki inflamasyona işaret eder (19). IBA'nın karakteristiklerine ilk olarak 1950'li yıllarda Hart ve arkadaşları (20) ile Wilkinson ve Bywaters (21) dikkat çekmişler ve bu hastaların yakınmalarının belirgin şekilde istirahatten sonra arttığını, ağrı ve katılığın özellikle sabah kalktıktan sonra en şiddetli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu hastaların bazen

geceleeri kalkıp dolaşmak zorunda kaldıklarını belirtmişlerdir. Ancak ilk defa bel ağrısı hastaları arasından olası AS ve İBA hastalarının tespit edilebilmesi amacı ile Calin ve arkadaşları tarafından bir kriter seti (Tablo 1) ileri sürülmüştür (22).

**Tablo 1. İnflamatuvar Bel Ağrısı Kriterleri**

|                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Calin Kriterleri (22)</b>                                                                              |
| 1. 40 yaş altı başlangıç                                                                                  |
| 2. Bel ağrısının >3ay sürmesi                                                                             |
| 3. Sinsi başlangıç                                                                                        |
| 4. Sabah katılığıının varlığı                                                                             |
| 5. Egzersizle düzelme                                                                                     |
| Bel ağrısının inflamatuvar bel ağrısı olarak sınıflanabilmesi için 5 özellikten 4'ünün varlığı gereklidir |
| <b>Berlin kriterleri (23)</b>                                                                             |
| Bel ağrısı 45 yaşın altında başlayan ve 3 aydan uzun süreli olan hastalarda                               |
| 1. >30 dakika sabah katılığı                                                                              |
| 2. Bel ağrısının istirahatle düzelmemesi, egzersizle düzelmesi                                            |
| 3. Gecenin ikinci yarısında bel ağrısı ile uyanma                                                         |
| 4. Alterne eden gluteal ağrı                                                                              |
| 4 kriterden 2'si olmalıdır                                                                                |
| <b>Uzmanlara göre İBA kriterleri (24)</b>                                                                 |
| 1. 40 yaş altı başlangıç                                                                                  |
| 2. Sinsi başlangıç                                                                                        |
| 3. Egzersizle düzelme                                                                                     |
| 4. İstirahatle düzelme                                                                                    |
| 5. Gece ağrı varlığı (kalkmakla iyileşen)                                                                 |
| 5 özellikten 4'ünün varlığı gereklidir                                                                    |

Takip eden dönemde bu kriter setinde bazı değişiklikler ile Rudwaleit (23) ve arkadaşlarınca yeni kriter seti (Berlin kriterleri) (Tablo 1) ileri sürülmüştür. Son olarak Uluslararası Spondiloartrit Değerlendirme Cemiyeti (*Assessment of SpondyloArthritis International Society*; ASAS) tarafından yapılan 20 hastanın, 13 uzmanca değerlendirildiği ve 109 uzman kararının verildiği bir çalışmada yeni, uzmanlara göre IBA kriterleri (Tablo 1) geliştirilmiştir (24). Aynı çalışmada gerek yeni kriterlerin gerekse mevcut kriterlerin 648 hastada duyarlılık ve özgüllükleri test edilmiştir (Tablo 2).

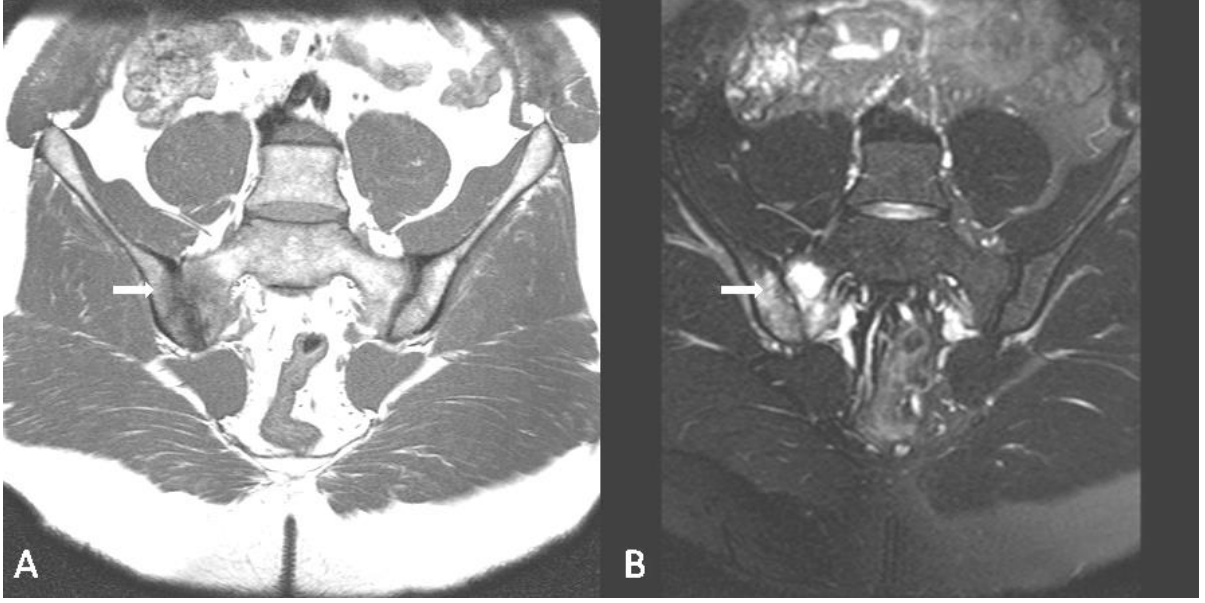
Tablo 2. İnflamatuvar bel ağrısı (IBA) için ileri sürülen kriterlerin karşılaştırılması (24)

|            | ASAS uzman<br>atolyesi (n=20) |        | ASAS geçerlilik<br>çalışması (n=648) |        |
|------------|-------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
|            | SE (%)                        | SP (%) | SE (%)                               | SP (%) |
| Uzman IBA  | 77                            | 92     | 80                                   | 72     |
| Calin IBA  | 82                            | 73     | 90                                   | 52.5   |
| Berlin IBA | 84                            | 62     | 70                                   | 81     |

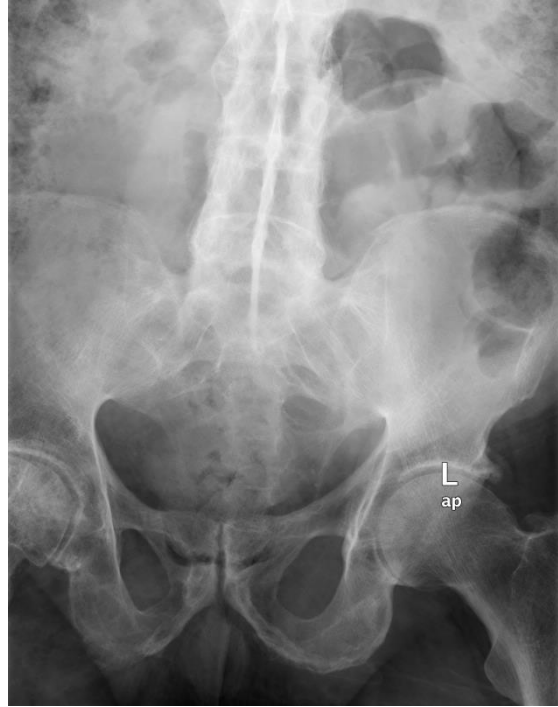
SE= duyarlılık veya sensitivite; SP=özgüllük veya spesifisite

Aksiyal SpA'li hastalarda çoğu kez sakroiliit başlangıç bulgusu olabilir ve bu durum genellikle gluteal bölgede ağrıya neden olur. Ağrının özellikle alterne ediyor olması (sağ ve sol gluteal bölgeler arasında yer değiştiriyor olması) hastalık için oldukça düşündürücüdür. Gluteal ağrı da spinal bölgedeki diğer ağrılar gibi yine istirahat sonrası en belirgin hale gelir ve aktivite ile iyileşir ve bazen ağır kaldırmakla da artabilir.

Sakroiliak inflamasyon, eklemin sinovyal özelliklere sahip alt ve ön kesimini ilgilendirir. Bu inflamasyon erken evrede magnetik rezonans görüntüleme (MRI); eklemi oluşturan komşu kemiklerde inflamasyona işaret eden kemik iliği ödemi veya kontrastlanma gösteren lezyonlar (osteit) şeklinde (şekil 1) görülür (25).



Şekil 1. Sakroiliak eklem magnetik rezonans görüntülemesinde sağ sakroiliak eklem iliak ve sakral kemiklerde eklem komşuluğunda kemik iliği ödemi ile uyumlu şekilde; T1 ağırlıklı kesitlerde (A) hipointens ve yağ baskılı kesitlerde (B) hiperintens lezyon.



Şekil 2. Ankilozan spondilitli bir hastada sakroiliak eklemlerde ankiloz ile lomber vertebralarda bambu kamışı görünümüne yol açan sindesmofit gelişimi ve posterior longitudinal ligaman ossifikasyonu.

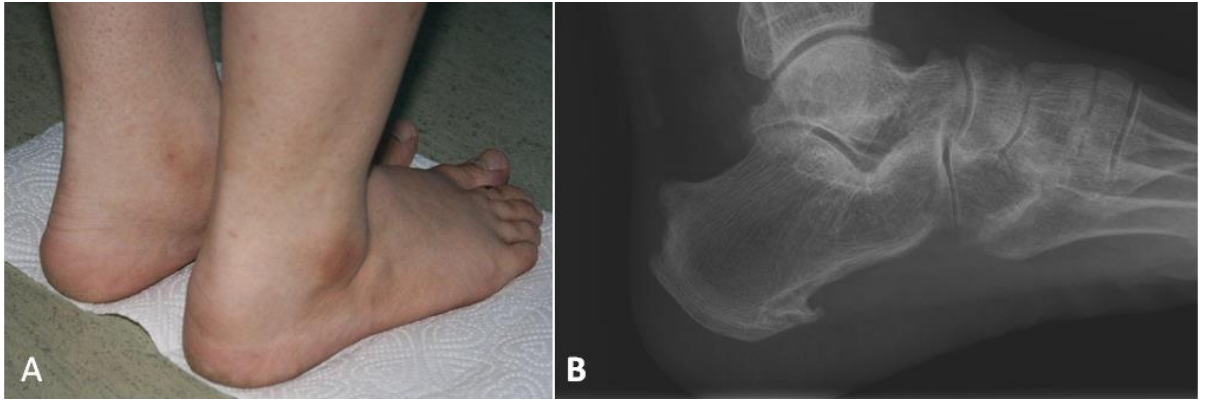
İlerleyen dönemde ise sakroiliak eklem inflamasyonu direk grafilerde dağınık skleroz artışı, erozyon gelişimi veya eklem yalancı genişlemesi ile endokondral ossifikasyon sonucu eklemlerde kısmi veya tamamen ankiloz görüntüsünün ortaya çıkmasına yol açar (şekil 2).

Yıllar içinde klinik olarak gluteal bölge ve belin aşağı kesimlerinde gözlenen inflamasyon yukarıya doğru yayılır ve progresif bir ağrı ve kısıtlılığa yol açabilir.

Ankilozan spondilitte ileri evrede osteoporoz olabileceği ve özellikle şiddetli kısıtlılık geliştiren hastalarda daha kolay gelişen, ancak bazen gözden kaçabilen kırıklara neden olabileceği de bildirilmiştir (26).

### 1.2. Entezit

Ankilozan spondilitin en önemli klinik bulgularından birisi de entezittir. Tendon, ligaman ve eklem kapsülü gibi yapıların kemiğe yapıştığı yeri ifade eden entezis bölgelerindeki inflamasyon olan entezit hemen her yerde görülebilmekle birlikte en çok Aşil tendonu ve plantar fasyanın kalkaneusa yapıştığı yerde görülür (şekil 3) . Genel olarak topuk ağrısı dejeneratif nedenlerle ortaya çıkan ağrıdan farklı olarak istirahat sonrası ve sabahları daha belirgindir ve aktivite yakınmaların kısmen azalmasına neden olur. Topuk enteziti yıllar içerisinde tipik radyografik “spur” görünümüne yol açmaktadır (şekil 3).



Şekil 3. Ankilozan spondilitli bir hastada sağ aşil üzerinde şişlik (A) ve lateral kalkaneus grafisinde (B) aşil yapışma bölgesinde erozyon ile plantar fasya yapışma bölgesinde spur formasyonu izlenmektedir.

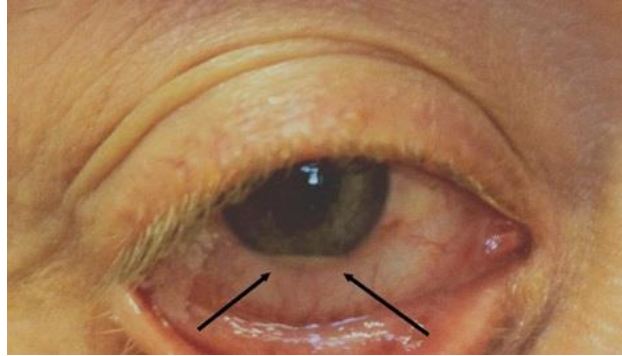
### 1.3.Periferik Eklem Tutulumu

Ankilozan spondilitte periferik eklem tutulumu romatoid artritten (RA) farklı bir patern izler. Aksiyal iskelet tutulumu öncesinde veya sonrasında ortaya çıkabilen periferik artrit genelde alt ekstremité büyük eklemlerini (diz, kalça ve ayak bilekleri gibi) asimetrik ve oligoartiküler paternde tutar. Reaktif artrit ve psöriatik artritli hastalarda gözlenen diğer bir iskelet lezyonu olan daktilit/sosis parmak çoğu kez AS’li hastalarda dikkat çekici bir bulgu değildir. Nadir de olsa temporomandibular eklemlerin de tutulabileceği hatırlanmalıdır.

## 2. İskelet-dışı tutulumu

### 2.1. Göz tutulumu

Akut ön üveit (akut anterior üveit; AAU) AS başta SpA'li hastalarda en sık gözlenen eklem-dışı tutulumudur. Yaklaşık 1/3-4 AS hastada AAU gelişir (27). İrit veya iridoksiklit olarak da bilinen AAU, gözün ön segmentinin akut inflamasyonudur, genel olarak ani başlangıçlıdır. Sıklıkla tekrarlayıcı nitelikte ve üç aydan kısa sürelidir. Çoğu kez hastalar gözde kızarıklık, hiperemi, ağrı, fotofobi, sulanma veya görmede bulanıklıktan yakınırırlar nadiren hipopiyon oluşumu gözlenebilir (şekil 4).



Şekil 4. Ankilozan spondilitli bir hastada sağ gözde ön kamarada hipopiyon varlığı.

Özellikle HLA-B27 pozitif hastalarda nadir de olsa AAU'in kronik seyir gösterdiği ve pupiller oklüzyon, görme keskinliğinde azalma, katarakt, sekonder glokom, kistik maküler ödem gibi komplikasyonlarla sonuçlanabildiği bildirilmiştir (27).

### 2.2. İnflamatuvar Barsak Hastalığı

Ankilozan spondilitli yaklaşık %60 hastada asemptomatik, ince ve kalın barsakta endoskopik mukozal lezyonların varlığı gösterilmiştir (28). Bu lezyonların patogenetik ve klinik anlamı henüz tam olarak bilinmese de çoğu hastada hiçbir zaman inflamatuvar barsak hastalığı ile uyumlu klinik görülmez. Nitekim yalnızca %10-15 hastada Crohn veya ülseratif kolit kliniği gözlemlendiği bildirilmiştir(29). Bunun yanında inflamatuvar barsak hastalığı olan hastalar arasında da dörtte bire varan oranlarda AS tablosu geliştiği de bilinmektedir. Bu nedenle AS hastalarında barsak alışkanlıkları değişikliği ya da karın ağrısı, ishal ( $\pm$  kan veya mukus) yakınmaları olduğunda inflamatuvar barsak hastalıklarının akılda tutulması gerekmektedir.

İnflamatuvar barsak hastalığı seyrinde gözlenen SpA tablosunda periferik artrit barsak hastalığı aktivitesi ile yakın ilişki gösterir ve özellikle ülseratif kolit hastalarında kolektomi sonrası artrit remisyona girebilir ancak spinal tutulumun barsak hastalığı aktivitesi ile ilişkisi yoktur.

### 2.3. Diğer eklem-dışı tutulumlar

Ankilozan spondilitli hastalarda, genel olarak ilerleyen hastalık döneminde, torakal vertebralar yanında kosto-vertebral, kosto-transversal, sterno-klaviküler veya sterno-manubriyal eklemlerin tutulumu ve artan dorsal kifoz sonucunda gelişen kısıtlılık ile ilişkili olduğu düşünülen restriktif tipte pulmoner fonksiyon gelişimi iyi bilinmektedir (30).

Uzun yıllardır nadir de olsa (<%1) AS'li hastalarda IgA nefropatisi olabileceği tanımlanmıştır. Bu durum genellikle hematüri ve/veya proteinüri ile birlikte patolojik olarak mezengial IgA birikimi ile karakterlidir, çoğu kez prognozu iyidir (31, 32). Bunun yanında bu hastalarda NSAII kullanımına bağlı interstisyel nefrit gelişebileceği de hatırlanmalıdır(31).

Uzun süreli inflamasyona sekonder geliştiği düşünülen renal amiloidozun günümüzde nadir görüldüğü düşünülmeyle birlikte İspanya'dan bildirilen ve abdominal yağ dokusunun incelenmesine dayalı bir çalışmada %7 amiloidoz varlığı gösterilmiştir (33). Ankilozan spondilit hastalarında %1'in altında ve çoğu kez atlantoaksiyal subluksasyon veya cauda equina sendromu şeklinde nörolojik bulgular tanımlanmıştır (34, 35). Yine uzun hastalık süresi olan hastalarda vertebral kırıklara bağlı, gecikmiş olabilecek, nörolojik komplikasyonlar ve hatta ölüm akılda tutulmalıdır (36).

## B. Hastalık patogenezi

Ankilozan Spondilit patofizyolojisi ile ilgili hipotezlerle birlikte hastalıkta görülen patolojik değişikliklerden bahsetmek uygun olacaktır. AS patolojisi konusundaki ilk tanımlamalardan birinde John Ball, hastalığın başlıca intervertebral disklerin anulus fibrozusu olmak üzere entezis bölgelerinde inflamasyon ve hasar oluşturmaya ile romatoid artrit (RA) ayrılması gerektiğini ileri sürmüştür (37). Seksenli yılların başında Mielants ve Veys yaklaşık % 60 kadar hastada gastrointestinal yakınmalardan bağımsız olarak kalın barsak ve/veya ileumda mikroskopik inflamasyon varlığını göstermişlerdir (38). Bu bulgular aslında AS başta olmak üzere SpA'ların çok farklı organ ve sistemlerde inflamasyona neden olabileceğinin ipuçlarını vermiş ve takip eden dönemde gerek sinovya, gerek entezis bölgelerinde, gerekse eklem-dışı organlardaki inflamasyonun natürünü anlamaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır.

### 3.1. Ankilozan Spondilitte hedef dokular

Romatoid artrit özellikle el ve ayak küçük eklemleri olmak üzere yaygın olarak periferik eklemlerde süregelen ve destrüktif inflamasyon nedeni olduğu bilinmekle birlikte AS'de doğrudan hedef dokuların tam olarak ortaya konulması zordur. Nitekim AS'li

hastalarda tipik olarak aksiyal iskelet ve periferik eklemler tutuldukları için sinovyumun hedef dokulardan birisi olduğu söylenebilirse de sinovyal eklemler etkilenmeden de aksiyal iskelette pek çok belirti ve bulgu görülebilmektedir. Bu nedenle iskelet sisteminde tutulan diğer iki yapı da; kemik ve entezis bölgeleri, hatırlanmalıdır (39).

#### *3.1.1. Entezis inflamasyonu*

Entezis tendon, ligaman veya eklem kapsülü gibi yapıların kemiğe tutunduğu bölgelerdir. Entezit konusunda yeterli çalışma olmayışının temel nedeni materyal elde etmenin göreceli zor olmasıdır. Ancak son zamanlarda görüntüleme tekniklerindeki ilerlemeler ile normal entezis dokusunun ayrıntılı histolojik incelemeleri bazı hipotezlere temel teşkil etmiştir. Sonuç olarak entezis ile yaygın inflamasyonun ilişkisini açıklamak üzere bir anatomik ünite şeklinde (komşuluğundaki sinovya ile kritik bağlantı gösteren entezis ilişkili fibrokartilajdan oluşan) sinovya-entezeal kompleks (SEK) teorisi ileri sürülmüştür (40). Bu konudaki çalışmalar göstermiştir ki SEK yalnızca klasik entezis yapışma bölgelerinde değil, yapışma alanı uzağında da birbiri ile bağlantılı bir yapı olarak dikkat çeker. Bu ünite sağlıklı kişilerde de yaşla birlikte mikro hasarlanmaya maruz kalır ve hatta bazen bu durum genç erişkinlerde de görülebilir. Oluşan mikrohasar; mikroskopik inflamasyon ile tamir edilmeye çalışıldığı ve şaşırtıcı şekilde bu duruma SEK bölgesinde asemptomatik sinovitin eşlik ettiği gösterilmiştir (41). Bu şekilde AS'de de mikro hasara sekonder inflamasyon geliştiği ve belirli durumlarda hastalık için tipik kronik inflamasyona ve sinovite yol açabileceği hipotezi ileri sürülmüştür (42).

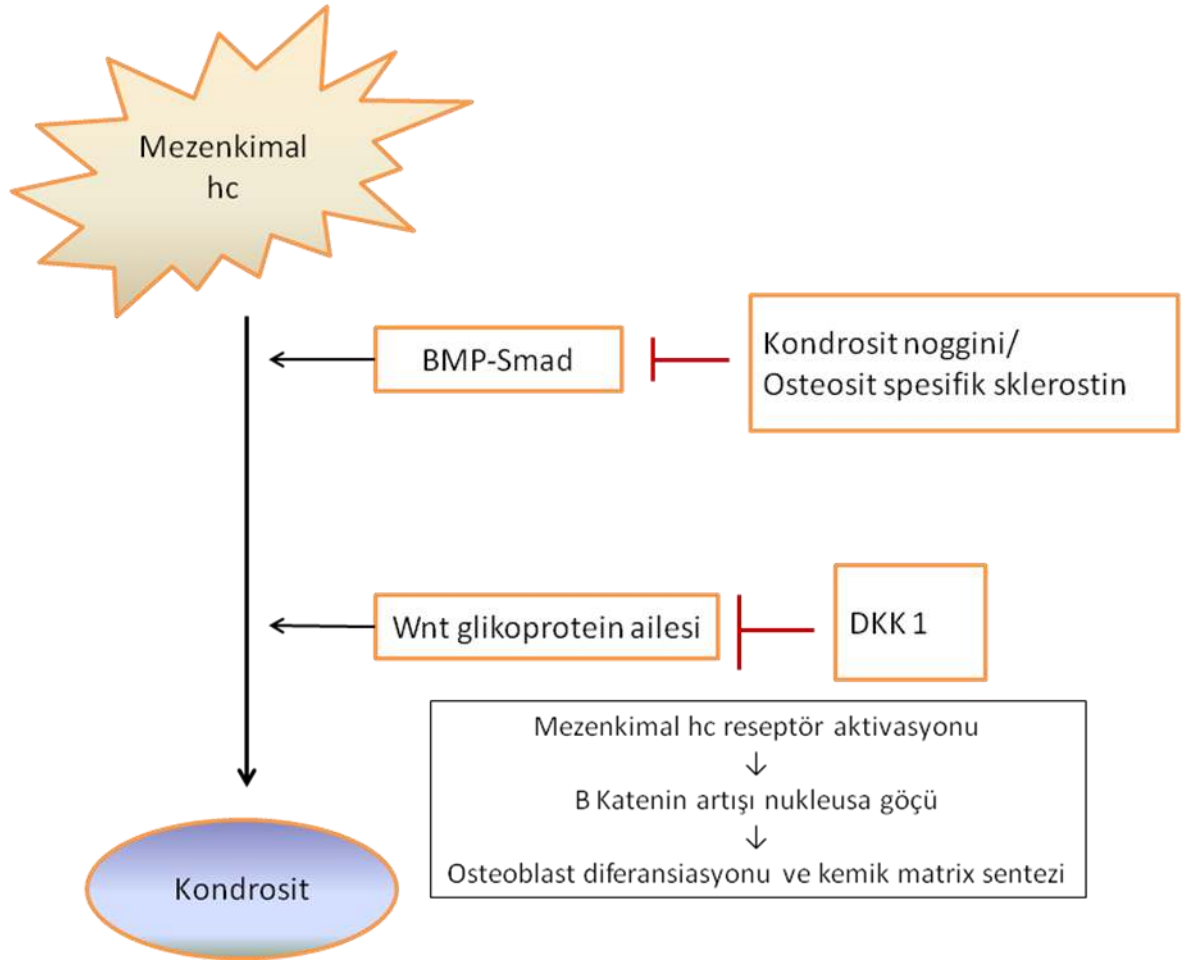
#### *2.1.2. Sinovyal inflamasyon*

Diz ve ayak bilekleri ile daha az oranda kalça eklemleri AS'de belli başlı etkilenen periferik eklemlerdir. RA'de otoimmün sürecin primer hedefinin sinovyal membran olması yanında, sinovyanın sekonder lenfoid organ gibi davrandığı da ileri sürülmektedir (39). Oysa AS sinovitinde adaptif immün yanıt ve otoimmünite bulguları göstermediği, inflamasyonda makrofaj, polimorf nüveli lökosit ve mast hücrelerinin baskın olduğu gösterilmiştir (43-46). Spesifik otoantikorların yokluğu ile birleştiğinde bu durum SpA'de inflamasyon mekanizması olarak otoimmüniteden çok mikrobial veya biyomekanik stres ile tetiklenen bir otoinflamatuvar süreci düşündürmektedir (39).

#### *3.1.3. Kemik*

RA'li hastalarda temel patoloji (tamir sürecinin minimal olduğu veya hiç görülmediği) eklem hasarı olmasına karşın; AS için sakroiliak ve apofizer eklemler ile entezis bölgelerinde yeni kıkırdak ve kemik oluşumu (entezofit ve sindezmozit) karakteristiktir (39).

Kemik oluşumu için bilinen başlıca iki embriyonik mekanizma vardır: İlkinde (endokondral kemik formasyonu) mezenkimal hücreler kondrositlere farklılaşır ve ardından kemik matriksi oluşur. İkinci mekanizmada (membranöz kemik formasyonu) ise mezenkimal hücreler doğrudan osteoblastlara farklılaşarak matriks ve mineral komponent üretimi beraberce gerçekleşir. Entezofitlerde en azından endokondral kemik oluşumunun varlığı gösterilmiştir (37, 39). Bu şekilde yeni kemik oluşumunun (Şekil 5) erken dönemi bir transforming growth faktör ailesi üyesi olan kemik morfojenik protein (*bone morfojenik protein*; BMP) ailesi kontrolündedir. Bu dönemde kondrositlerden salgılanan noggin veya osteoklastlara özgün sklerostin gibi moleküller süreçte endojen inhibitör olarak görev alırlar (47-49). Sürecin geç dönemi ise wingless (Wnt) glikoprotein ailesi kontrolündedir. Bu ailenin bazı üyeleri mezenkimal hücrelerin yüzeyindeki bir reseptör kompleksini aktive ederek, hücre-içi  $\beta$ -katenin artışı ve nükleusa göçü ile hücrenin osteoblast yönünde farklılaşmasına aracılık etmektedir. Wnt aracılı bu modelin günümüzde AS'de yeni kemik oluşumu için başlıca düzenleyici olduğuna inanılmaktadır. Bu yolağın da Dickkopf ilişkili protein 1 (DKK1) başta olmak üzere endojen inhibitörleri bulunmaktadır (49-51).



Şekil 5. Endokondral kemik oluşum safhaları ve olası kontrol mekanizmaları

AS'li hastalarda endokondral kemik oluşumunun işlevsel olduğu yönünde bazı bulgular elde edilmiştir. Nitekim bazı araştırmacılar Aşil entezitinde BMP aktivasyonunda artış olduğunu göstermiş (42, 47), bazıları da osteositlerde sklerostinin anlamlı şekilde azalmış, hatta sindezmozit geliştirmiş olanlarda en düşük seviyede olduğunu bildirmişlerdir (52). Öte yandan Wnt yolağı ile ilgili veriler çelişkilidir. İlk araştırmacı grubu serum DKK1 düzeylerini RA ve sağlıklılardan yüksek olduğunu ve anti-TNF tedavi ile anlamlı olarak arttığını bildirmişlerken (53), daha sonraki çalışmalarda serum DKK1 düzeylerinin AS'li hastalarda anlamlı şekilde düşük olduğu (54) ve sindezmozitli hastalarda daha düşük bulunduğu (55) bildirilmiştir.

### *3.2. Ankilozan spondilit patolojisinde gözlenen hücre tipleri*

Spontan olarak spondilit ve artrit geliştiren HLA-B27 transgenik sıçan modellerinde T hücreleri rol oynuyor olabilir. Nitekim atimik (timusu olmayan) hayvanlarda artrit gözlenmemektedir ve hücre transfer deneylerinde CD4+ T hücreleri dahil hemapoetik hücrelerle hastalık oluşmaktadır (56-59). Aynı hayvan modelinde dendritik hücrelerin de rolü olabileceğine dair bulgular mevcuttur.

### *3.3. Ankilozan Spondilit patofizyolojisinde genetik faktörler*

Uzun süredir hastalığın ailesel birikim gösterdiği bilinmektedir. Bu durum hastalığın gelişiminde genetik faktörlerin rolüne işaret etmektedir. Gerçekten çok sayıda çalışmada, AS'li olan hastaların akrabalarında ortalama % 4 (% 1 ile % 15) sıklığında AS ortaya çıktığı görülmüştür. Göreceli risk tahminleri de hastalıklı bireylerin akrabalarındaki AS sıklığının hastalıklı olmayan bireylerin akrabalarındaki AS sıklığından 23 (60) ile 35 (61) kat fazla olduğunu göstermektedir. İlk çalışmalarda %4 gibi saptanan sıklık son çalışmalarda saptanana (% 10) göre daha azdır. Ancak bu durum hastalık sıklığındaki değişimden çok günümüzde tanı yöntemlerin daha gelişmiş olması ve özellikle kadınlardaki AS'in de eskiye oranla daha fazla tanınıyor olması ile açıklanabilir. Bunu doğrular şekilde önceki çalışmalarda akrabalarda saptanan AS olgularındaki kadın/erkek oranı 2 (62) civarındayken, son gözlemler bu oranın eşitlendiğini göstermektedir (63).

Ailesel birikim yanında, hastalığın gelişmesinde genetik faktörlerin rolünü destekleyen diğer önemli bulgu ikizlerdeki birliktelik yani "konkordans"tır. Literatürde öteden beri monozygotik ikiz AS hastaları bildirilmektedir (1, 2). İki küçük çaplı, yeni çalışma hastalığın monozygotik ikizlerde, dizigotik olanlara göre 5 kat daha fazla birliktelik göstermiştir. Son olarak İngiltere'den bildirilen bir çalışma, genetik faktörlerin hastalığın oluşumundaki rolünün %97 olduğunu düşündürmüştür (3).

### 3.3.1. HLA-B27 ve ankilozan spondilite yatkınlık

HLA-B27 antijeni ile AS arasındaki sıkı birliktelik yaklaşık 40 yıldır bilinmektedir (4-6). Bu ilişkinin beyaz AS'li hastalarda HLA-B27 sıklığının % 88-96, kontrollerde % 4-8 olduğu bildirilmiştir. Populasyondaki HLA-B27 sıklığının % 2'nin altında olduğu Japonlarda (6), Hintlilerde (7) ve Irak'lılarda (8) bile HLA-B27 ile AS arasındaki birliktelik güçlüdür. Yüksek HLA-B27 sıklığı (%10'un üzerinde) olan Amerikan yerlileri ve kuzey Avrupalılarda, özellikle İskandinav hastalarda (64, 65) ise B27 antijeni hemen her zaman vardır. Ayrıca dünyadaki HLA-B27 dağılımı ile AS dağılımı çok benzerdir (66). Bu şekilde hastalık B27'nin sık olmadığı güney Amerika halkı, Avustralya yerlileri ve Afrika halkında seyrek olarak ortaya çıkar (67, 68).

HLA-B27 ile AS arasındaki ilişkinin keşfinden sonra AS epidemiyolojisi ile ilgili araştırmaların sayısında belirgin bir artış olmuştur. Son yıllarda genotiplendirme teknolojilerindeki gelişmeler de AS ve diğer SpA gruplarında HLA-B27 ve alt tipleri konusundaki araştırmalara hız kazandırmıştır.

#### 3.3.1.1. HLA-B27 alt tipleri

Günümüzde HLA-B27 allelinin elliden fazla alt tipi tanımlanmış (<http://hla.alleles.org/class1.html>) olup bu durum B27'yi en polimorfik allellerden biri haline getirmektedir. HLA-2705 gibi alt tiplerin AS ile daha fazla birliktelik gösterdikleri ve bu arada bazı alt tiplerin (HLA-B2706 ve \*2709 gibi) hastalıktan koruyucu rol oynayabileceği konusunda tartışmalar vardır. Örneğin Danimarkalı hastalarda yalnız \*2705 saptanmıştır (69). İtalyanlarda ise \*2709 allelinin hastalık gelişiminde rolü olmadığı bildirilmiştir (70). Bununla birlikte inandırıcı farklılıklar bulmayan çalışmalar da vardır (71).

Bu konudaki şüpheleri artıran bir diğer gelişme de daha önce \*2709 pozitif hasta bildirilmemiş iken son zamanlarda \*2709 taşıyan üç hasta tanımlanmış olmasıdır. Bunlardan biri ülseratif koliti olan pre-radyografik bir hasta, bir diğeri Sardinya'dan bir AS hastası ve üçüncüsü Tunuslu bir hastadır (25, 72, 73). Bu hastaların ikisinde IL23R ve HLA-B1403 gibi diğer yatkınlık faktörlerinin varlığı gösterilmiş olmakla birlikte alt tiplerin rolü konusundaki şüphelerimizi arttırmıştır. Ayrıca AS'in seyrek görüldüğü bazı populasyonlarda yatkınlık alleli olduğu düşünülen \*2705'i aynı şekilde yüksek sıklıkta taşıdıkları da gösterilmiştir (3). Etkilenen kişilerdeki baskın alt tip, olasılıkla basit bir şekilde toplumdaki baskın alt tipi yansıtır olabilir.

HLA-B27'nin hastalığa nasıl yatkınlık oluşturduğu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Başlangıçta HLA-B27'nin bir sınıf I molekülü olarak "artritogen antijeni" CD8 pozitif T hücrelerine sunduğu düşünülmüş ancak o dönemlerden beri böylesi

bir peptit gösterilememiştir. Ayrıca HLA-B27 transgenik farelerde hastalık gelişimi için CD8 pozitif T hücrelerinin gerekli olmadıkları da gösterilmiştir (74). HLA-B27 molekülü hakkında güncel hipotezlerden biri molekülün 67 pozisyonunda sistein varlığına dayanmaktadır. Nitekim bu aminoasit varlığında molekülün ağır zinciri hücre dışı  $\alpha 1$  bölgesinin yanlış katlanmasına ve homodimer oluşturmaya olanak sağlamaktadır. Bu şekilde HLA-B27 molekülünün homodimerizasyonu veya yanlış katlanması, endoplazmik retikulumda, proinflamatuvar nitelikte, katlanmamış protein yanıtını (*unfolded protein response*; UPR ) indüklemektedir (75).

HLA-B27 ile AS patofizyolojisi için ileri sürülen alternatif hipotez de, hücre yüzeyinde ekprese edildiği gösterilen HLA-B27 homodimerlerinin rolü olabileceği üzerinde inşa edilmiştir. Bu hipoteze göre endoplazmik retikulumda birikerek stres (katlanmamış protein yanıtı) oluşturan ve normalden farklı olarak  $\beta 2$  mikroglobulin (hafif zincir) içermeyen bu homodimerler, bazı immünoresptörler (*KIR3DL2* gibi killer immünooglobulin benzeri reseptörler; *killer immunoglobuline-like receptors*) aracılığı ile inflamatuvar yanıtı başlatabilir (76, 77). Nitekim HLA-B27 pozitif hastalarda doğal öldürücü hücreler ile *KIR3DL2* pozitif T hücre sayıları artmıştır (78). Son olarak HLA-B27 pozitif bireylerin *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Chlamydia* gibi hücre-içi patojenleri yeterince iyi temizleyemedikleri ileri sürülmüştür. Nitekim bu patojenlerin reaktif artrite neden oldukları uzun süredir bilinmektedir (79).

### 2.3.2. MHC bölgesi dışı genler ve ankilozan spondilite yatkınlık

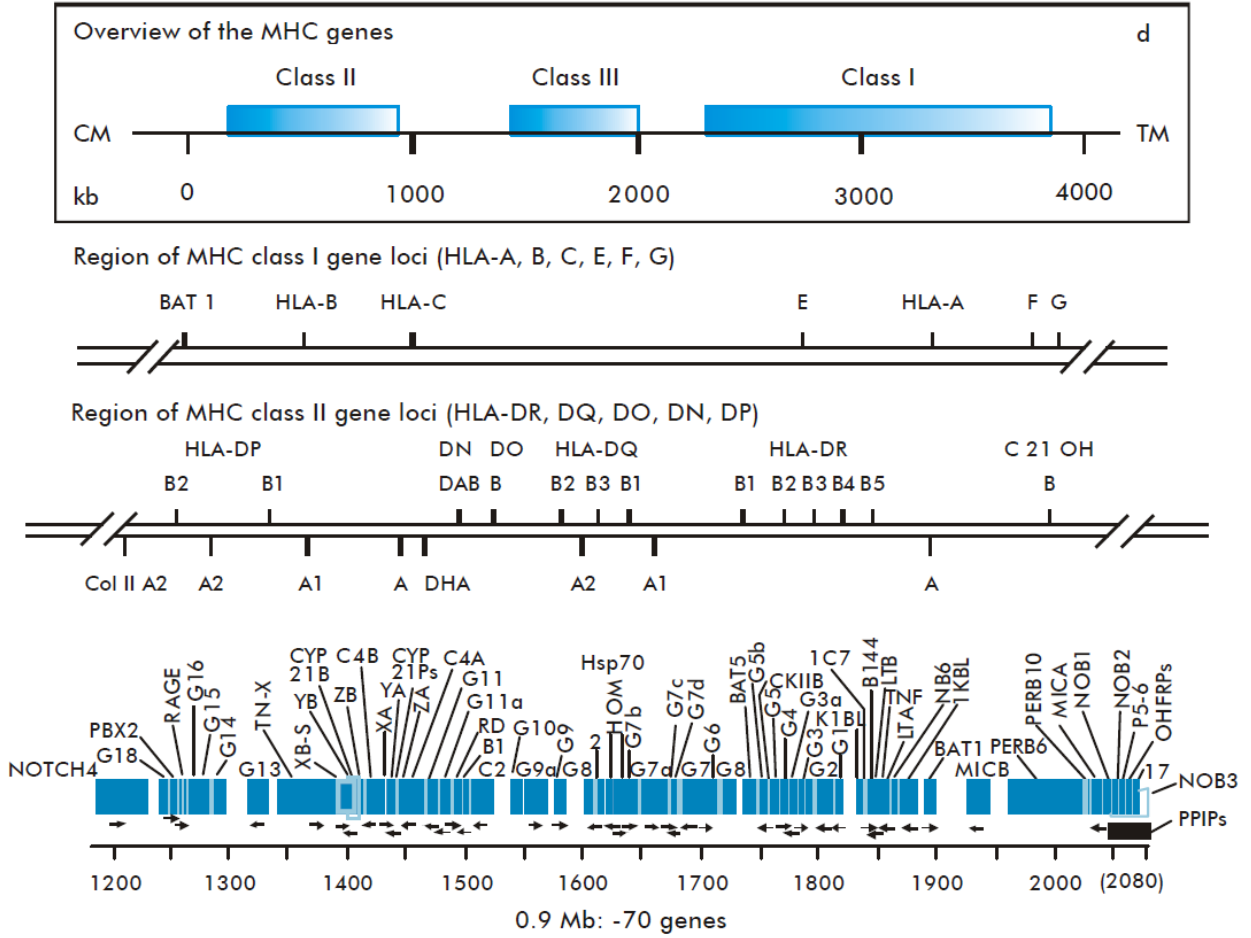
Bazı toplumlarda AS'li hastalarda HLA-B27'nin % 80-90 pozitif bulunması ve B27 transgenik farelerde spontan olarak SpA benzeri bir hastalığın görülmesi HLA-B27'nin, hastalık için doğrudan ve dominant etkisi olduğunu düşündürmekle birlikte genel toplumda HLA-B27 taşıyan bireylerin küçük bir oranında (<% 5) AS gelişmesi ve B27'nin genetik yatkınlığın ancak % 20-40'ını açıklıyor olması diğer genetik faktörlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir (74). Nitekim son yıllarda gerek tüm genom ilişki çalışmalarında gerekse aday gen çalışmalarında *Endoplazmik retikulum aminopeptidaz1 (ERAP1)* (80-87), *interlökin 23 reseptörü (IL23R)* (84, 88-91) ve gen çözü olarak bilinen bazı kromozomal bölgelerin de hastalığa yatkınlıkta rolü olabileceğine dair gözlemler elde edilmiştir.

Tablo 3. Ankilozan spondilite yatkınlıkta rolü olduğu gösterilen bazı genler ve hastalık kalıtsallığına etkileri

| Gen veya yerleştiği kromozomal bölge | Odds oranı | AS kalıtsallığına katkısı (%) (79) |
|--------------------------------------|------------|------------------------------------|
| HLA-B27                              | 90,4       | 23,3                               |
| <i>IL-23R</i>                        | 1,90       | 0,31                               |
| 2p15                                 | 1,36       | 0,54                               |
| <i>ERAP1</i>                         | 1,35       | 0,34                               |
| 21q22                                | 1,24       | 0,035                              |
| <i>ANTXR2</i>                        | 1,21       | 0,0054                             |
| <i>RUNX3</i>                         | 1,19       | 0,12                               |
| <i>IL12B</i>                         | 1,18       | 0,11                               |
| <i>IL1R2</i>                         | 1,18       | 0,12                               |
| <i>CARD9</i>                         | 1,18       | 0,034                              |
| <i>LTBR/TNFRSF1A</i>                 | 1,38       | 0,075                              |

#### C. HLA-B27 tayininde kullanılan yöntemler

Üretilen antijenin yapısı ve fonksiyonuna göre iki sınıf HLA antijeninden bahsedilir (92); HLA sınıf I ve sınıf II. MMHC kompleksi global olarak 3.5 milyon baz çifti içerir ve 6. kromozomda bulunur (şekil 6). HLA-B27 sınıf I HLA antijenleri arasında yer almaktadır. Hücre yüzeyinde eksprese edilen glikopeptid antijenler olan HLA-A, -B ve -C serisi sınıf I HLA antijenleri olarak isimlendirilmektedir. Bu antijenler çoğu çekirdekli hücrede eksprese edilmektedir. Ayrıca çözünür formda plazmada ve trombosit yüzeyinde de bulunabilmektedir. İmmünolojik çalışmalarda en anlamlı sınıf I loküsünün HLA-B olduğu (aynı zamanda en polimorfik olanıdır) ve ardından HLA-A geldiğine işaret edilmiştir (93). HLA Sınıf I antijenleri 3 bölgesi olan, 45 kilodalton (Kd) glikoprotein ağır zinciri içerir ve beta-2 glikoprotein ile non-kovalen olarak bağlanır.



Şekil 6. İnsan MHC bölgesine genel bakış (92)

### HLA tiplendirme

Geleneksel olarak HLA antijenleri ve HLA-B27 serolojik yöntemlerle tayin edilmiştir. Bu teknikler canlı lenfositlerin ve HLA antijenlerini tanıyacak uygun antiserum varlığını gerektirmektedir. Mikrolenfositotoksiste yönteminde monoklonal antikorlar ile kompleman kullanılarak, periferik kan lenfositlerinin lizise uğraması esastır. Burada yonteme göre değişen oranda hücrelerin belli bir kesiminin lizise uğraması testin pozitif olması şeklinde yorumlanır (94).

Flow sitometriye dayalı HLA-B27 tiplendirme yönteminde temelde canlı, bazı durumlarda dondurulmuş lenfositlerin yüzeyinde eksprese edilen B27 molekülünün değişik floresein ajanlarla işaretlenmiş monoklonal antikorlarla boyanması ve tanınır hale gelmesi esasına dayanmaktadır (95). Minumum örnek hazırlığı ve az sayıda manipülasyon ihtiyacı ile göreceli kolay bir yöntem olduğu düşünülmesine karşın flow sitometrik yöntemin belli başlı

dezavantajı HLA-B7 başta sık görülen HLA-B alleleri ile çapraz reaksiyon ve yanlış pozitif sonuç verebilme riskidir.

Polimeraz zincir reaksiyonu üzerine kurulu yöntemler kabaca üç sınıfa ayrılabilir;

1. PCR ile amplifiye edilen ürün polimorfizm içeren bir sekans olabilir ve ardından ikinci bir teknik ile ayırt edilir. Bunlar arasında sekans spesifik oligonukleotid probe (SSO), PCR-RFLP gibi yöntemler sayılabilir. Ayrıca altın standart olarak kullanılan PCR sonrası sekanslama da bunlar arasında sayılabilir.
2. Post amplifikasyon basamakları olmakla birlikte polimorfizm doğrudan PCR süreci esnasında tanınabilir. PCR-sekans spesifik primer yöntemi bunlar arasında sayılabilir.
3. Konformasyon analizi: Farklı polimorfizmler PCR'da spesifik konformasyonel değişikliklere sebep olarak tanınabilir ve bunlar arasında heteroduplex analizi, tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP), denature edici gradient jel elektroforezi (DGGE), temperature gradient jel elektroforezi (TGGE) sayılabilir. Tiplendirme laboratuvarlarında en sık kullanılan yöntemler arasında SSP ve SSO bulunmaktadır ve yöntemler düzenli aralıklarla yeni tanımlanan polimorfizmleri de içerecek şekilde güncellenmektedir (92).

## YÖNTEM

### *DNA izolasyonu*

Tüm hastalardan, steril EDTA'lı tüpler aracılığı ile periferik venöz kan örnekleri toplandı. Standard proteinaz K sindirim ve tuz-kloroform metodu ile genomic DNA elde edildi.

### *PCR-RFLP analizi*

Söz konusu 2 tek nükleotid polimorfizmi ve HLA-B\*27 alleli arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde PCR-RFLP metodu kullanıldı. Herbiri SNP'i (rs13202464 ve rs4349859) kateden bölgenin çoğaltılabilmesi için iki PCR primer seti kullanıldı. Primerler, NCBI BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) web sitesinde sunulan primer-BLAST ara yüzü aracılığı ile Primer3 algoritması kullanılarak dizayn edildi. PCR primer sekansları, ayrılma ısıları ve ürün boyutları aşağıdaki gibi idi; **rs13202464**: (forward) 5'-ACCCACAGAATGAGACGCTG-3' ve (reverse) 5'-TTGTGCTGGACAAAATGCGG-3', 58.5°C, 175 bp. **rs4349859**: (forward) 5'-CCACCCAAATCCAAGTTTACTACTAA-3', (reverse) 5'-AGTGACTCCAGAGACTGGGAT-3', 61.7°C, 557 bp. rs13202464 ve rs4349859 numaralı SNP'leri içeren PCR ürünleri; birer restriksiyon endonükleaz enzimi olan eNlaIII (NEB, Hitchin, UK, Catalog no: R0125S) ve TaqαI (NEB, Hitchin, UK, Catalog no: R0149S) kullanılarak sindirime tabi tutuldu. Restriksiyon fragmanları, PCR ürününün boyutuna göre %1 ile %3 arasında değişen konsantrasyonlarda agaroz jel üzerinde elektroforez ile ayrıldı. rs13202464 nolu SNP için; A alleli 117 ve 58 bp boyutlarında bant üretirken G alleli sindirilemiyordu ve 175 bp boyutunda tek bir bantta neden oluyordu. rs4349859 nolu SNP için; G alleli 360 ve 197 bp boyutlarında bant oluştururken A alleli sindirilmeksizin 557 bp bant gösteriyordu.

### *DNA sekanslaması*

Örneklerin doğrulanması amacı ile her bir polimorfizm için random seçilen örnekler, hem forward hem reverse primerler kullanılarak ABI 3130 automated DNA sequencer kullanılarak sekanslandı.

### *HLA-B\*27 tiplendirmesi*

HLA-B\*27 analizi SSP-typing kit (Olerup; *QIAGEN* Vetriebs GmbH, Wien, Austria) kullanılarak, üreticinin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. SSP-tiplendirme sonuçları %2 agaroz jel üzerinde gözlendi.

## SONUÇLAR

Çalışmaya modifiye New York kriterlerine (96) göre AS tanısı ile izlenen 207 hasta ve 32 sağlıklı gönüllü alındı. Hastalar ve kontrollerin bazı demografik ve klinik özellikleri tablo 4’de özetlenmiştir.

Tablo 4. Çalışmaya dahil edilen ankilozan spondilitli hastalar ve sağlıklı bireylerin demografik ve bazı klinik verileri

|                           | Ankilozan Spondilit<br>(n=207) | Kontrol<br>(n=32) |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------|
| Yaş, yıl                  | 42.3 ± 10.8                    | 52.7 ± 10.8       |
| Erkek cins, n (%)         | 148 (72)                       | 25 (78)           |
| Semptom süresi, yıl       | 16.2 ± 9.8                     |                   |
| BASDAI (0-10)             | 3.2 ± 2.2                      |                   |
| BASFI (0-10)              | 3.2 ± 2.5                      |                   |
| BASMI (0-10)              | 2.8 ± 2.4                      |                   |
| HLA-B27 pozitifliği n (%) | 146 (71)                       | 2 (6)             |

Aksi belirtilmedikçe tüm değerler (ortalama ± SD) olarak sunulmuştur

BASDAI: Bath ankilozan spondilit hastalık aktivite indeksi (*Bath ankylosing spondylitis disease activity index*); BASFI: Bath ankilozan spondilit fonksiyonel indeks *Bath ankylosing spondylitis functional index*); BASMI: Bath ankilozan spondilit metroloji indeksi (*Bath ankylosing spondylitis metrology index*)

HLA-B27 tag SNP’lerin (rs13202464 ve rs4349859) genotip ve allel frekansları tablo 5’de özetlenmiştir.

**Table 5.** HLA-B27 pozitif (n=148) ve HLA-B27 negatif (n=91) bireylerde HLA tag SNP’ler (rs13202464 ve rs4349859) genotip ve allel sıklıkları

|            | Genotipler % (n) |            |           | Alleller % (n) |                   |
|------------|------------------|------------|-----------|----------------|-------------------|
| rs13202464 | AA               | AG         | GG        | A              | G                 |
| HLA-B27 +  | 6.1 (9)          | 81.8 (121) | 12.2 (18) | 47.0 (139)     | <b>53.0 (157)</b> |
| HLA-B27 -  | 93.4 (85)        | 6.6 (6)    | ND        | 96.7 (176)     | <b>3.3 (6)</b>    |
| rs4349859  | GG               | GA         | AA        | G              | A                 |
| HLA-B27 +  | 11.5 (17)        | 83.1 (123) | 5.4 (8)   | 53.0 (157)     | <b>47.0 (139)</b> |
| HLA-B27 -  | 100 (91)         | ND         | ND        | 100 (182)      | <b>ND</b>         |

**ND: Saptanmadı**

**Table 6. HLA-B27 tag SNP'lerin efekt allellerinin sensitivite ve spesifisite değerleri, mevcut çalışma verileri ve daha once yapılan bildirimlerin zeti.**

| <b>SNP</b>        | <b>Populasyon</b>              | <b>Sensitivite</b> | <b>Spesifisite</b> | <b>Referans</b> |
|-------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| <b>rs13202464</b> | <b>İngiliz ve Avustralyalı</b> | 0.989              | 0.934              | (97)            |
|                   | <b>Çinli</b>                   | 0.989              | 0.917              | (97)            |
|                   | <b>Trk</b>                    | 0.530              | 0.967              | Bu alıřma      |
| <b>rs4349859</b>  | <b>İngiliz ve Avustralyalı</b> | 0.976              | 0.988              | (97)            |
|                   | <b>inli</b>                   | 0.234              | 1.000              | (97)            |
|                   | <b>Türk</b>                    | 0.469              | 1.000              | Bu alıřma      |

Görüleceęi üzere rs4349859 numaralı SNP'in efekt alleli (A) HLA-B27 negatif bireylerde saptanamamıştır. Bu durum söz konusu polimorfizmi HLA-B27 için oldukça spesifik hale getirmiş olmasına karşın sensitivite değerleri daha önce bildirimlerden farklı olarak oldukça düşük bulunmuştur (0.469 ve 0.530). HLA-B27 tag SNP ler için bu çalışmada saptanan ve daha önce bildirilen sensitivite ve spesifisite değerleri tablo 6'da sunulmuştur.

## TARTIŞMA

Ankilozan spondilit ile bilinen güçlü ilişkisine rağmen tayininde yaşanan bazı teknik güçlükler HLA-B27 saptanmasında alternatif yöntemlerin aranmasına yol açmıştır. Ankilozan spondilitli hastalarda daha önce yapılan tüm genom çalışması bulgularının doğrulanması ve ayrıntılı genotiplendirme ile yeni hastalık risk bölgelerinin tespit edilmeye çalışıldığı bir araştırmada MHC bölgesi için seçilen SNP'ler HLA-B27'yi temsil edebilirlik (tag SNP) rs4349859 numaralı SNP'in HLA-B27 ile %98 sensitivite ve %99 spesifisite ile tag olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada bahsi geçen polimorfizmin AS ile en güçlü ilişkiyi gösterdiği de gösterilmiştir (80). Yine aynı çalışmada rs13202464 nolu ikinci bir polimorfizmin hafifçe yüksek bir sensitivite (%98.7) ve oldukça yüksek bir spesifisiteye (%98) sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada rs4349859'in MICA bölgesine yakınlığı nedeni ile söz konusu SNP'in HLA-B27 ile bağıntı dengesizliğinden mi yoksa hastalık için yeni bir yatkınlık bölgesi mi olduğu düşüncesi ile HLA-B27 alt tipleri ile ilişkisi de gözden geçirilmiştir. Bu analizde rs4349859; HLA-B\*2702, HLA-B\*2705 ve HLA-B\*2708 gibi beyaz ırkta hastalık ile en sık ilişki gösteren alleler yanında hastalık ile ilişkili olmadığı düşünülen HLA-B\*2709 ile de tag olduğu saptanmıştır. Ancak rs4349859, Afrikalılar için AS ilişkili alt tip olan HLA-B\*2703 ve Asyalılarda saptanan hastalık alleli HLA-B\*2704, HLAB\*2706 veya HLA-B\*2707 ile efektif şekilde tag olmamıştır.

Diğer bir çalışmada Çinli AS hastalarında rs13202464 MHC bölgesi ile en anlamlı ilişki gösteren iki SNP'den birisi olarak bulunmuştur (OR 79.2) ancak HLA-B27'nin risk etkisini kontrol etmek için yapılan kondisyonel analiz ile OR 5.7'ye gerilemiştir (13). Bu durum MHC bölgesinde HLA-B27 dışında risk varyantlarının olabileceğini ve bunların rs13202464 ile temsil ediliyor olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Türkiye'de HLA-B27 alt tiplerinin araştırıldığı bir çalışmada (98) araştırmacılar gerek AS'li hastalarda gerekse kontrollerde en sık görülen HLA-B27 alt tiplerinin HLA-B\*2702, HLA-B\*2705 olmasına karşın %3 hasta ve %7 kontrolde HLA-B\*2707 varlığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda spesifikitenin yüksek bulunmasına karşın sensitivitenin yeterince iyi olmaması belki bizim çalışmamızda rs4349859 ile yeterince etkili tag olmayan HLA-B27 allelerinin zengin olması ile açıklanabilir.

Bu çalışmada HLA-B27 genotiplendirmesi sekans spesifik primerler kullanılarak kalitatif olarak yapılmıştır ve söz konusu yöntemde HLA-B27 allellinin homozigot veya heterozigot olarak saptanması mümkün olmamaktadır. Çalışmada hesaplanan sensitivite değerleri tüm hastaların homozigot olduğu varsayımı ile hesaplanmıştır ancak yine de elde edilen sensitivite değerleri beklenilenin altında kalmaktadır. Çalışmamızın diğer kısıtlılığı

ise, iki polimorfizmin tag olmamasını açıklayabilecek, HLA-B27 alt tipleri saptanmamış olmasıdır.

## **SONUÇLAR**

- Bu çalışmada rs4349859 ve rs13202464 no'lu iki polimorfizm HLA-B27 ile diğer toplumlardaki kadar güçlü ilişki göstermemiştir
- Bu durum söz konusu iki SNP'i genotiplendirmenin Türk popülasyonunda geleneksel HLA-B27 genotiplendirmesine bir avantajı olmadığını düşündürmektedir.
- Toplumumuzda HLA-B27 ile daha güçlü tag olabilecek başka SNP'ler söz konusu olabilir.

## KAYNAKÇA

1. **Eastmond CJ, Woodrow JC.** Discordance for ankylosing spondylitis in monozygotic twins. *Ann Rheum Dis.* 1977;36(4):360-4.
2. **Kuthan F, Navratil J.** [Ankylosing spondylarthritis in 2 pairs of homozygotic twins]. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1966;33(4):211-4.
3. **Brown MA, Jepson A, Young A, Whittle HC, Greenwood BM, Wordsworth BP.** Ankylosing spondylitis in West Africans--evidence for a non-HLA-B27 protective effect. *Ann Rheum Dis.* 1997;56(1):68-70.
4. **Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD.** Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet.* 1973;1(7809):904-7.
5. **Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM.** High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med.* 1973;288(14):704-6.
6. **Mitsui H, Juji T, Sonozaki H.** Juvenile ankylosing spondylitis, its clinical features and HLA-B27. *Arch Orthop Unfallchir.* 1977;87(1):31-7.
7. **Bale UM, Mehta MM, Contractor NM, Bhatia HM, Tilve GH.** HLA antigens in ankylosing spondylitis: the association of HLA-B27. *Indian J Med Res.* 1980;71:96-103.
8. **Al-Rawi ZS, Al-Shakarchi HA, Hasan F, Thewaini AJ.** Ankylosing spondylitis and its association with the histocompatibility antigen HL-A B27: an epidemiological and clinical study. *Rheumatol Rehabil.* 1978;17(2):72-5.
9. **Fan W, Huang L, Zhou Z, et al.** Rapid and reliable genotyping of HLA-B\*27 in the Chinese Han population using a duplex real-time TaqMan PCR assay. *Clin Biochem*;45(1-2):106-11.
10. **Nathalang O, Tantimavanich S, Nillakupt K, Arnutti P, Jaruchaimontree C.** HLA-B27 testing in Thai patients using the PCR-SSP technique. *Tissue Antigens.* 2006;67(3):233-6.
11. **Robinson PC, Brown MA.** The genetics of ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012;38(3):539-53.
12. **Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, et al.** Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet*;43(8):761-7.
13. **Lin Z, Bei JX, Shen M, et al.** A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis. *Nat Genet*;44(1):73-7.

14. **Burgos-Vargas R, Vazquez-Mellado J.** The early clinical recognition of juvenile-onset ankylosing spondylitis and its differentiation from juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(6):835-44.
15. **Walker BF.** The prevalence of low back pain: a systematic review of the literature from 1966 to 1998. *J Spinal Disord.* 2000;13(3):205-17.
16. **Walker BF, Muller R, Grant WD.** Low back pain in Australian adults: prevalence and associated disability. *J Manipulative Physiol Ther.* 2004;27(4):238-44.
17. **Deyo RA, Mirza SK, Martin BI.** Back pain prevalence and visit rates: estimates from U.S. national surveys, 2002. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(23):2724-7.
18. **Diamond S, Borenstein D.** Chronic low back pain in a working-age adult. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20(4):707-20.
19. **Burgos-Vargas R, Braun J.** Inflammatory back pain. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012;38(3):487-99.
20. **Hart FD, Robinson KC, et al.** Ankylosing spondylitis. *Q J Med.* 1949;18(71):217-34.
21. **Wilkinson M, Bywaters EG.** Clinical features and course of ankylosing spondylitis; as seen in a follow-up of 222 hospital referred cases. *Ann Rheum Dis.* 1958;17(2):209-28.
22. **Calin A, Porta J, Fries JF, Schurman DJ.** Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. *JAMA.* 1977;237(24):2613-4.
23. **Rudwaleit M, Metter A, Listing J, Sieper J, Braun J.** Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria. *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):569-78.
24. **Sieper J, van der Heijde D, Landewe R, et al.** New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). *Ann Rheum Dis.* 2009;68(6):784-8.
25. **Rudwaleit M, Haibel H, Baraliakos X, et al.** The early disease stage in axial spondylarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Arthritis Rheum.* 2009;60(3):717-27.
26. **Will R, Palmer R, Bhalla AK, Ring F, Calin A.** Osteoporosis in early ankylosing spondylitis: a primary pathological event? *Lancet.* 1989;2(8678-8679):1483-5.
27. **Gouveia EB, Elmann D, Morales MS.** Ankylosing spondylitis and uveitis: overview. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(5):742-56.

28. **Leirisalo-Repo M, Repo H.** Gut and spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am.* 1992;18(1):23-35.
29. **DÉSIRÉE VAN DER HEIJDE M, PHD.** Ankylosing Spondylitis Clinical Features. In: John H. Klippel M, ed. *Primer on the Rheumatic Diseases*; 2008:193-217.
30. **Fisher LR, Cawley MI, Holgate ST.** Relation between chest expansion, pulmonary function, and exercise tolerance in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1990;49(11):921-5.
31. **Rodrigues CE, Vieira WP, Bortoluzzo AB, et al.** Low prevalence of renal, cardiac, pulmonary, and neurological extra-articular clinical manifestations in spondyloarthritis: analysis of the Brazilian Registry of Spondyloarthritis. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(3):375-83.
32. **Strobel ES, Fritschka E.** Renal diseases in ankylosing spondylitis: review of the literature illustrated by case reports. *Clin Rheumatol.* 1998;17(6):524-30.
33. **Hunter T.** The spinal complications of ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum.* 1989;19(3):172-82.
34. **Ahn NU, Ahn UM, Nallamshetty L, et al.** Cauda equina syndrome in ankylosing spondylitis (the CES-AS syndrome): meta-analysis of outcomes after medical and surgical treatments. *J Spinal Disord.* 2001;14(5):427-33.
35. **Ramos-Remus C, Gomez-Vargas A, Hernandez-Chavez A, Gamez-Nava JI, Gonzalez-Lopez L, Russell AS.** Two year followup of anterior and vertical atlantoaxial subluxation in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 1997;24(3):507-10.
36. **Westerveld LA, Verlaan JJ, Oner FC.** Spinal fractures in patients with ankylosing spinal disorders: a systematic review of the literature on treatment, neurological status and complications. *Eur Spine J.* 2009;18(2):145-56.
37. **Tam LS, Gu J, Yu D.** Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(7):399-405.
38. **Jacques P, Elewaut D.** Joint expedition: linking gut inflammation to arthritis. *Mucosal Immunol.* 2008;1(5):364-71.
39. **Lories RJ, Baeten DL.** Differences in pathophysiology between rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27(4 Suppl 55):S10-4.
40. **McGonagle D, Aydin SZ, Tan AL.** The synovio-entheseal complex and its role in tendon and capsular associated inflammation. *J Rheumatol Suppl.* 2012;89:11-4.

41. **Benjamin M, McGonagle D.** Histopathologic changes at "synovio-entheseal complexes" suggesting a novel mechanism for synovitis in osteoarthritis and spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3601-9.
42. **Lories RJ, Luyten FP, de Vlam K.** Progress in spondylarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(2):221.
43. **Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, et al.** Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):966-75.
44. **Baeten D, Kruithof E, De Rycke L, et al.** Diagnostic classification of spondylarthropathy and rheumatoid arthritis by synovial histopathology: a prospective study in 154 consecutive patients. *Arthritis Rheum.* 2004;50(9):2931-41.
45. **Baeten D, Demetter P, Cuvelier C, et al.** Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(12):945-53.
46. **Baeten D, Kruithof E, De Rycke L, et al.** Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthropathy. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R359-69.
47. **Lories RJ, Luyten FP.** Bone morphogenetic protein signaling in joint homeostasis and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(3):287-98.
48. **Winkler DG, Yu C, Geoghegan JC, et al.** Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem.* 2004;279(35):36293-8.
49. **van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, et al.** Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004;199(6):805-14.
50. **Schett G, Zwerina J, David JP.** The role of Wnt proteins in arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(9):473-80.
51. **Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al.** Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13(2):156-63.
52. **Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, et al.** Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3257-62.
53. **Daoussis D, Liossis SN, Solomou EE, et al.** Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):150-8.

54. **Kwon SR, Lim MJ, Suh CH, et al.** Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy. *Rheumatol Int.* 2012;32(8):2523-7.
55. **Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, et al.** High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(4):572-4.
56. **Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD.** Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell.* 1990;63(5):1099-112.
57. **Taurog JD, Maika SD, Satumtira N, et al.** Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev.* 1999;169:209-23.
58. **Breban M, Fernandez-Sueiro JL, Richardson JA, et al.** T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol.* 1996;156(2):794-803.
59. **Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, et al.** Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum.* 2009;60(7):1977-84.
60. **de BJ, Polman A, de B-M.** Hereditary factors in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1961;20:215-20.
61. **Stecher RM.** Hereditary factors in arthritis. *Med Clin North Am.* 1955;12:499-508.
62. **Hersh AH, Stecher RM, Solomon WM, Wolpaw R, Hauser H.** Heredity in ankylosing spondylitis; a study of fifty families. *Am J Hum Genet.* 1950;2(4):391-408.
63. **Khan MA.** Spondyloarthropathies in non-Caucasian populations of the world. . *Adv Inflamm Res.* 1985;9:91-99.
64. **Gofton JP, Chalmers A, Price GE, Reeve CE.** HL-A27 and ankylosing spondylitis in B.C. Indians. *J Rheumatol.* 1975;2(3):314-8.
65. **Moller E, Olhagen B.** Studies on the major histocompatibility system in patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens.* 1975;6(4):237-46.
66. **Khan MA.** Epidemiology of HLA-B27 and Arthritis. *Clin Rheumatol.* 1996;15 Suppl 1:10-2.
67. **Nasution AR, Mardjuadi A, Suryadhana NG, Daud R, Muslichan S.** Higher relative risk of spondyloarthropathies among B27 positive Indonesian Chinese than native Indonesians. *J Rheumatol.* 1993;20(6):988-90.

68. **Rivera S, Hassanhi M, Marquez G, Fuenmayor A, Monzon J, Avila J.** [Relation of spondylarthropathies and HLA-B27 antigen in patients from the state of Zulia, Venezuela]. *Sangre (Barc)*. 1996;41(6):473-6.
69. **Baech J, Schmidt-Olsen S, Steffensen R, Varming K, Grunnet N, Jersild C.** Frequency of HLA-B27 subtypes in a Danish population and in Danish patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens*. 1997;49(5):499-502.
70. **D'Amato M, Fiorillo MT, Carcassi C, et al.** Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur J Immunol*. 1995;25(11):3199-201.
71. **Feltkamp TE.** Non-HLA-B27 genetic factors in HLA-B27 associated diseases. *Clin Rheumatol*. 1996;15 Suppl 1:40-3.
72. **Zou J, Rudwaleit M, Brandt J, Thiel A, Braun J, Sieper J.** Up regulation of the production of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma by T cells in ankylosing spondylitis during treatment with etanercept. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(6):561-4.
73. **Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, et al.** Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*. 1996;43(4):456-63.
74. **Dougados M, Baeten D.** Spondyloarthritis. *Lancet*. 2011;377(9783):2127-37.
75. **Reveille JD.** Genetics of spondyloarthritis--beyond the MHC. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(5):296-304.
76. **Kollnberger S, Bird L, Sun MY, et al.** Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum*. 2002;46(11):2972-82.
77. **Campbell EC, Fettke F, Bhat S, Morley KD, Powis SJ.** Expression of MHC class I dimers and ERAP1 in an ankylosing spondylitis patient cohort. *Immunology*. 2011;133(3):379-85.
78. **Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, Bowness P.** Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3586-95.
79. **Mathieu A, Paladini F, Vacca A, Cauli A, Fiorillo MT, Sorrentino R.** The interplay between the geographic distribution of HLA-B27 alleles and their role in infectious and autoimmune diseases: a unifying hypothesis. *Autoimmun Rev*. 2009;8(5):420-5.

80. **Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, et al.** Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet.* 2011;43(8):761-7.
81. **Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, et al.** Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet.* 2007;39(11):1329-37.
82. **Maksymowych WP, Inman RD, Gladman DD, Reeve JP, Pope A, Rahman P.** Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(5):1317-23.
83. **Tsui FW, Haroon N, Reveille JD, et al.** Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):733-6.
84. **Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M, et al.** Association of IL23R and ERAP1 genes with ankylosing spondylitis in a Portuguese population. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27(5):800-6.
85. **Pazar B, Safrany E, Gergely P, Szanto S, Szekanecz Z, Poor G.** Association of ARTS1 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in the Hungarian population: the rs27044 variant is associated with HLA-B\*2705 subtype in Hungarian patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2010;37(2):379-84.
86. **Davidson SI, Wu X, Liu Y, et al.** Association of ERAP1, but not IL23R, with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population. *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3263-8.
87. **Bang SY, Kim TH, Lee B, et al.** Genetic studies of ankylosing spondylitis in Koreans confirm associations with ERAP1 and 2p15 reported in white patients. *J Rheumatol.* 2011;38(2):322-4.
88. **Karaderi T, Harvey D, Farrar C, et al.** Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(4):386-9.
89. **Rahman P, Inman RD, Gladman DD, Reeve JP, Peddle L, Maksymowych WP.** Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(4):1020-5.
90. **Rueda B, Orozco G, Raya E, et al.** The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(10):1451-4.

91. **Safrany E, Hobor R, Jakab L, et al.** Interleukin-23 receptor gene variants in Hungarian systemic lupus erythematosus patients. *Inflamm Res*. 2010;59(2):159-64.
92. **Ferrer A, Fernandez ME, Nazabal M.** Overview on HLA and DNA typing methods. *Biotechnologia Aplicado*. 2005;22:91-101.
93. **Lotteau V.** [Assembly and intracellular transport of HLA molecule antigen presenters]. *Ann Rech Vet*. 1992;23(3):268-74.
94. **Frankenberger B, Breitkopf S, Albert E, et al.** Routine molecular genotyping of HLA-B27 in spondyloarthropathies overcome the obstacles of serological typing and reveals an increased B\*2702 frequency in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 1997 24(5):899-903.
95. **Darke C, Coates E.** One-tube HLA-B27/B2708 typing by flow cytometry using two "AnthLA-B27" monoklonal antibody reagents. *Cytometry*. 2010;78B:21-30.
96. **van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A.** Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984;27(4):361-8.
97. **Cortes A, Robinson P, International SGC, Brown MA.** Dense Genotyping of Candidate Genes Identifies 16 new Susceptibility Loci in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(10 (suppl)):1053-1054.
98. **Gunal EK, Sarvan FO, Kamali S, et al.** Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. *Joint Bone Spine*. 2008;75:299-302.

## EKLER

### DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 190

18.03.2013

Sayın Prof.Dr.Servet AKAR

Kurulumuz tarafından 14.03.2013 tarih ve 938-GOA protokol numaralı 2013/09-09 karar numarası ile görüşülen "Tag Single Nukleotid Polimorfizminin, HLA B27'yi Tanımlamadaki Geçerliliğinin Değerlendirilmesi" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

  
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL  
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE  
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

**ASLI GİBİDİR**

  
**Yunus KARSLI**  
Fakülte Sekreteri

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

|                            |                                                                                        |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ETİK KOMİSYONUN ADI</b> | <b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ</b><br><b>GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b> |
| <b>AÇIK ADRES</b>          | <b>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR</b>         |
| <b>TELEFON</b>             | <b>0 232 412 22 54-0 232 412 22 58</b>                                                 |
| <b>FAKS</b>                | <b>0 232 412 22 43</b>                                                                 |
| <b>E-POSTA</b>             | <b>etikkurul@deu.edu.tr</b>                                                            |

|                          |                                                         |                                                                                                 |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b> | DOSYA NO:                                               | 938-GOA                                                                                         |
|                          | ARAŞTIRMA                                               | UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>                 |
|                          | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                                   | Tag Single Nukleotid Polimorfizminin, HLA B27'yi Tanımlamadaki Geçerliliğinin Değerlendirilmesi |
|                          | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                                 | -                                                                                               |
|                          | SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI | Prof.Dr.Servet AKAR<br>Romatoloji B.D                                                           |
|                          | DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ                             | -                                                                                               |
|                          | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ              | -                                                                                               |
|                          | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER                           | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>            |

|                                 |                                     |               |                          |                                                                                                              |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b> | <b>Belge Adı</b>                    | <b>Tarihi</b> | <b>Versiyon Numarası</b> | <b>Dili</b>                                                                                                  |
|                                 | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                 | Mevcut        |                          | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                 | ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR      | Mevcut        |                          | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input checked="" type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                 | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | Mevcut        |                          | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                 | OLGU RAPOR FORMU                    | Mevcut        |                          | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |

**ASLI GİBİDİR**

**Yunus KARSLI**  
Fakülte Sekreteri

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                   |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No:2013/09-09                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Tarih: 14.03.2013 |
|                 | Prof.Dr.Servet AKAR'ın sorumlusu olduğu "Tag Single Nukleotid Polimorfizminin, HLA B27'yi Tanımlamadaki Geçerliliğinin Değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. |                   |

| ETİK KURUL BİLGİLERİ |                                                                                                                            |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ÇALIŞMA ESASI        | Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi<br>İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |
| ETİK KURUL ÜYELERİ   |                                                                                                                            |

| Unvanı/Adı/Soyadı                        | Uzmanlık Alanı                    | Kurumu                                                        | Cinsi yet | Araştırma ile ilişkili mi? |                                       | İmza      |
|------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------|----------------------------|---------------------------------------|-----------|
| Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)            | Tıbbi Biyokimya                   | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı               | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı) | Ph.D.Yüksek Hemşire               | DEU Hemşirelik Fakültesi                                      | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Prof.Dr.Kemal Kürşad GENÇ                | Fizyoloji                         | DEU Tıp Fakültesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu        | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılmadı |
| Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU                    | Halk Sağlığı                      | DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.                           | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU              | Kalp Damar Cerrahisi              | DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı          | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılmadı |
| Prof.Dr.Ece BÖBER                        | Pediyatrik Endokrinoloji          | DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Prof.Dr.Hüseyin BASKIN                   | Mikrobiyoloji                     | DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı                 | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK                    | Nöroloji                          | DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı                      | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Prof.Dr.Bilgin CÖMERT                    | İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D) | DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ                  | Tıbbi Farmakoloji                 | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı             | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK               | Mikrobiyoloji                     | DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı                 | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Doç.Dr.Nihal GELECEK                     | Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon    | DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu               | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Doç.Dr.İşıl TEKMEK                       | Histoloji ve Embriyoloji          | DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı      | Kadın     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN                  | Hukuk                             | DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D                                    | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> |           |
| İhsan ÇELİKDEMİR                         | Sağlık mensubu olmayan üye        | 75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.                      | Erkek     | E <input type="checkbox"/> | H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılmadı |

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

ASLI GİBİDİR

Yunus KARSLI  
Fakülte Sekreteri