



**T.C.**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKİLOZAN SPONDİLİTLİ HASTALARDA**  
**İNTERLÖKİN-23 RESEPTÖR GENİ POLİMORFİZMİNİN**

**ARAŞTIRILMASI**

**TUBA ŞULE ÇANKAYA**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**DOÇ. DR. MÜJGAN ÖZDEMİR ERDOĞAN**

**TEZ NO:2014-16**  
**AFYONKARAHİSAR-2014**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKİLOZAN SPONDİLİTLİ HASTALARDA**  
**İNERLÖKİN-23 RESEPTÖR GENİ**  
**POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TUBA ŞULE ÇANKAYA**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**DOÇ. DR. MÜJGAN ÖZDEMİR ERDOĞAN**

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 13.SAĞ. BİL.03 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**TEZ NO: :2014-16**

**AFYONKARAHİSAR 2014**

**KABUL ve ONAY**

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Tıbbi Genetik Programı**

Çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:30.06.2014



Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Handan YILDIZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Alper Murat ULAŞLI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Tuba Şule ÇANKAYA'nın "Ankilozan Spondilitli Hastalarda Interlökin-23 Reseptör Geni Polimorfizmi Araştırılması" başlıklı tezi 02/07/2014 günü saat 16.00'da Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kağan ÜÇÖK

Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	i
ÖNSÖZ	ii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	iii
TABLolar ÇİZELGESİ	iv
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ	v
1. Giriş	1
1.1 Ankilozan Spondilitin Tanımı	3
1.2 Ankilozan Spondilitin Epidemiyolojisi	3
1.3 Ankilozan Spondilitin Tanı Kriterleri	4
1.3.1 Ankilozan Spondilit İçin Kriter Setleri	5
1.4 Ankilozan Spondilitin Klinik Özellikleri	7
1.4.1 Bel Ağrısı	8
1.4.2 Kalça ve Omuz Tutulumu	9
1.4.3 Periferik Artrit	9
1.4.5 Entezit	10
1.4.6 Üveit	10
1.4.7 Gastrointestinal Bulgular	10
1.4.8 Kardiyak Bulgular	11
1.4.9 Pulmoner Tutulum	11
1.4.10 Renal Bulgular	11
1.4.11 Nörolojik Bulgular	12
1.4.12 Yorgunluk	12
1.5 Ankilozan Spondilitin Patolojisi	12
1.6 Ankilozan Spondilitin Patogenezi	13
1.7 Ankilozan Spondilitte Laboratuvar Bulguları	14
1.8 Ankilozan Spondilitte Görüntüleme Yöntemleri	14

1.9.Ankilozan Spondilitin Genetiği	15
1.9. 1 HLA-B27 Dışındaki MHC Genleri	16
1.9.2 MHC Dışındaki Genler	17
1.10 HLA-B27 ve Ankilozan Spondilit İlişkisi	20
1.11 İnterlökin- 23 ve Ankilozan Spondilit İlişkisi	25
1.12 Polimorfizm	30
1.12.1 Tek Nükleotid Polimorfizmi	31
1.13 Mutasyon Analiz Yöntemleri	32
1.13.1 Eş Zamanlı PCR Yöntemi	34
1.13.1.1 LightCycler Sistemi	37
1.13.2 Ters Hibridizasyon Yöntemi	37
<b>2. Gereç ve Yöntem</b>	<b>40</b>
2.1 Gereçler	40
2.1.1 Materyal Seçimi	40
2.1.2 Kullanılan Kimyasallar	40
2.1.3 Kullanılan Cihazlar	42
2.2. Yöntemler	43
2.2.1.DNA İzolasyonu	43
2.2.2 DNA Miktar ve Saflık Tayini	44
2.2.3 <i>IL-23R</i> Geni rs11209032 Polimorfizminin Genotiplemesi	45
2.2.3.1 Reaksiyon Karışımının Hazırlanması ve Örneklerin LightCycler Cihazına Yüklenmesi	45
2.2.4 HLA-B27 Değerlendirilmesi	49
2.2.4.1 In Vitro Amplifikasyon (PCR)	49
2.2.4.2 Hibridizasyon	50
2.2.5 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	53
<b>3. Bulgular</b>	<b>54</b>
3.1 AS Tanılı Hastalarda HLA-B27 Aleli (+/-) Dağılımı	54
3.2 <i>IL-23R</i> Geni rs11209032 Polimorfizmi Genotip ve Alel Frekansı	55
4. Tartışma	59

4.1 HLA-B27 Aleli ve Ankilozan Spondilit Arasındaki İlişki	59
4.2 <i>IL-23R</i> Geni rs11209032 Polimorfizmi ve Ankilozan Spondilit Arasındaki İlişki	62
5. Sonuç ve Öneriler	66
Özet	67
Summary	68
Kaynaklar	69
Özgeçmiş	81

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan, tezimin planlanması ve yürütülmesinde benden destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerini daima bizlerle paylaşan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mustafa SOLAK'a, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak desteğini esirgemeyen, Sayın Yrd. Doç. Dr. Alper Murat ULAŞLI'ya ve Sayın Yrd. Doç. Dr. S. Handan YILDIZ'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim sürecinde birlikte çalıştığım Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı personeline, tez çalışmamda her konuda yardımcı olan Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Birimi personeline teşekkürlerimi sunarım

Bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

**Tuba Şule ÇANKAYA**  
**AFYONKARAHİSAR-2014**

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simge</b>	<b>Açıklama</b>
%	Yüzde
°C	Santigrad derece
µl	Mikrolitre
Kb	Kilobaz
bç	Baz çifti
dk	Dakika
sn	Saniye
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik Asit
AS	Ankilozan spondilit
SpA	Spondiloartrit
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HLA-B27	İnsan Lökosit Antijeni B27
MHC	Major Doku Uygunluk Kompleksi
<i>MICA</i>	MHC sınıf I zinciri ile ilişkili gen
<i>TAP</i>	Antijen Prosesi İle İlişkili Taşıyıcı Geni
<i>LMP</i>	Düşük Molekül Ağırlıklı Proteazom Geni
TNF- $\alpha$	Tümör Nekroz Faktör- A
HSP-70	Isı Şok Proteini-70
ER	Endoplazmik Retikulum
Ag	Antijen
IL-23	İnterlökin 23
IL-23R	İnterlökin -23 Reseptörü
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
T Lenfosit	Timusda Olgunlaşan Lenfosit
NK Hücre	Doğal Öldürücü Hücreler
DCs	Dendritik hücreler
CD4+	Yardımcı T lenfosit
CD8+	Sitotoksik T lenfosit
IBD	Inflamatuvar Bağırsak Hastalığı



IL	İnterlökin
TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis
JAK-2	Jak kinaz 2
Tyk-2	Tirozin kinaz 2
STAT-3	Transkripsiyon 3 aktivatörü
STAT-4	Transkripsiyon 4 aktivatörü
IFN- $\gamma$	Interferon gama
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
IL-12R $\beta$ 2	İnterlökin-12 Reseptörü beta 2 altünitesi
SİE	Sakroiliak Eklem
NSAİİ	Non -Steroid Anti İnflamatuar İlaç
AAÜ	Akut Anterior Üveit
IgA	İmmunglobulin A
ESH	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
CRP	C Reaktif Protein
RF	Romatoid Faktör
ANA	Antinükleer antikor
BT	Bilgisayarlı Tomografi
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
STR	Short Tandem Repeat

## TABLULAR ÇİZELGESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.9.2.1:</b> Ankilozan Spondilitle İlişkili Bazı Genler	19
<b>Tablo.1.13.1:</b> Mutasyon Analiz Yöntemleri	33
<b>Tablo 2.2.4.2.1:</b> Ters Hibridizasyonda Genotiplendirme	53
<b>Tablo 3.1.1:</b> Ailesinde AS öyküsü olan ve olmayan olgularda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı	55
<b>Tablo 3.2.1:</b> Kontrol ve olgu grubunda <i>IL-23R</i> geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı	55
<b>Tablo 3.2.2:</b> Kontrol ve olgu grubunda <i>IL-23R</i> geni rs11209032 polimorfizmi G ve A alel frekanslarının dağılımı	57
<b>Tablo 3.2.3:</b> Ailesinde AS öyküsü olan ve olmayan olgularda <i>IL-23R</i> geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı	58

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 1.9.1.1:</b> Ankilozan spondilitte yer alan HLA lokusları / alelleri	17
<b>Şekil 1.10.1:</b> HLA gen bölgesinin 6. kromozom üzerinde yerleşimi ve Sınıf I, II, III bölgeleri	20
<b>Şekil 1.10.2:</b> HLA-B27 molekülü	21
<b>Şekil 1.10.3:</b> Ankilozan spondilitte HLA-B27'nin patofizyolojik rolü	22
<b>Şekil 1.11.1:</b> İnterlökin 23 Sinyal Yolağı	26
<b>Şekil 1.11.2:</b> <i>IL-23R</i> geninin p kolundaki lokalizasyonu	27
<b>Şekil 1.11.3:</b> İnterlökin 23 Reseptör Sinyal Kompleksi	28
<b>Şekil 1.11.4:</b> İnflamasyonda IL-23'ün yardımcı T hücrelerinin Th17'ye Farklılaşmasındaki rolü	29
<b>Şekil 1.13.1.1:</b> Eş zamanlı PCR yönteminde yaygın kullanılan boya ve prob türleri a) SYBR Green boyası b) Hibridizasyon problemleri c) Hidroliz problemleri (TaqMan)	36
<b>Şekil 1.13.2.1:</b> Biotin işaretli primerler ile Multipleks PCR	38
<b>Şekil 1.13.2.2:</b> Ters hibridizasyon yöntemi	39
<b>Şekil 2.2.3.1.1:</b> <i>IL-23R</i> geni rs11209032 (G/A) polimorfizmine ilişkin genotiplerin erime eğrisi analizi.	49
<b>Şekil 2.2.4.2.1:</b> HLA-B27 StripAssay® Kollektörü ve Striplerin Değerlendirilmesi	52
<b>Şekil 2.2.4.2.2:</b> HLA-B27 Test Stripi	52
<b>Şekil 3.2.1:</b> Kontrol ve olgu grubunda <i>IL-23R</i> geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı	56
<b>Şekil 3.2.2:</b> Kontrol ve olgu grubunda <i>IL-23R</i> geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı	57
<b>Şekil 3.2.3:</b> Ailesinde AS öyküsü olan ve olmayan olgularda <i>IL-23R</i> geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı	58

## I.GİRİŞ

Ankilozan spondilit (AS) [MIM 106300], etiyojisi bilinmeyen, spinal eklemlerde ve komşu yapılar da belirgin inflamasyon ile karakterize, omurgada progresif ve asendan kemik füzyonuna yol açan inflamatuvar bir hastalıktır. Olgular da perifer al eklem tutulumu daha az olmasına karşın, kalça ve omuz eklem tutulumları mevcuttur. Göz ve kalp gibi ekstraartiküler organlar da inflamatuvar lezyonlar görülebilir. AS klinik, radyolojik, epidemiyolojik ve genetik özellikleri ile seronegatif spondiloartritler (SpA) grubunda yer alır (Arnett, 1997; Braun ve Sieper, 2002; OMIM, 2014)

AS'nin dünyada prevalansı %0.1-%1.4 olarak bilinmektedir ve erkek / kadın oranı 2/1'dir (Zambrano-Zaragoza ve ark, 2013). Ülkemizdeki prevalansı % 0.49'dur (Onen ve ark, 2008). Daha çok genç ve erişkin yaş grubunu ve erkekleri etkilemekte, önemli fonksiyon kaybı ve yaşam kalitesinde bozulmaya neden olmaktadır ( Bodur ve ark, 2011).

Patogenezinde genetik etmenlerin en fazla rol oynadığı romatizmal hastalık olan AS ile ilgili olarak çok sayıda insan lökosit antijenleri (HLA) ve MHC dışı genler araştırılmıştır. Etiyopatogenezde en önemli rolü olan kuşkusuz HLA-B27'dir. HLA-B27 aleli genetik riskin %20-30'una katkıda bulunur ve beyaz ırktan olan AS olgularının %90-95'inde pozitifdir (Maksymowych, 2003).

HLA-B27 aleli pozitif bireylerin birinci derece akrabalarındaki %10-20'lik AS' ye yatkınlığa karşı, normal popülasyondaki HLA-B27 aleli pozitif bireylerde %2-5 oranı belirlendiği gibi; tek yumurta ikizlerinde %75'e karşı dizigotik ikizlerde %27 oranında HLA-B27 aleli ile artmış hastalık birlikteliğinin saptanması, MHC dışı genlerin önemli katkılarının olduğunu göstermektedir (Calin ve ark, 2007) .

AS'nin moleküler temelinde rol oynadığı düşünülen MHC dışı genlerden biri olan interlökin 23 reseptör (*IL-23R*) geni (MIM 607562) 1p31.3 kromozom üzerinde

lokalizedir(OMIM,2014.) *IL-23R* geninin primer transkriptinin en az altı alternatif kırılması sonucu oluşan olgun mRNA molekülleri, reseptör proteinin izoformlarını oluşturmak üzere eksprese edilir (Zhang ve ark, 2006).

*IL-23R* geni; iki sitokin reseptör domaininden meydana gelen ve hematopoietin reseptör ailesinin bir üyesi olan *IL-23* reseptörünü kodlamaktadır. (Parham ve ark,2002) Bu protein immün sistem hücrelerinin (T hücreleri, NK hücreleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler) membranlarında bulunmaktadır. Bu hücreler yabancı bileşenleri tanımlamakta, vücudu enfeksiyon ve hastalıklara karşı savunmaktadırlar. Reseptörüne bağlanan *IL-23* sitokini, bakteri ve virüs gibi mikroorganizmalara karşı immün sistem yanıtının koordinasyonunda görev almaktadır (McKenzie ve ark, 2006; Lupardus ve Garcia, 2008).

Yapılan çalışmalarda *IL-23R* geni polimorfizmlerinin hem inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) hem de sedef hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tremelling ve ark, 2007; Capon ve ark, 2007).

IBD ve AS arasındaki klinik ve immünolojik yönden benzerlikler nedeniyle, AS gelişimine genetik faktörlerin etkisini araştıran bilimsel çalışmalar, *IL-23R* geni polimorfizmleriyle AS'nin ilişkisine yoğunlaşmıştır (Xinwei ve ark; 2010). Burton ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada AS hastalarında 14.436 nonsinonim SNP (tek nükleotid polimorfizmi) genotiplenmiş ve *IL-23R* polimorfizmleri ile AS arasında ilişki bulunmuştur (Burton ve ark, 2007). Bu polimorfizmlerden rs11209032 intergenik bölgede lokalize olup, aminoasit kodlamamaktadır. Diğer taraftan bu polimorfizmin, mRNA'nın kırılmasında ya da *IL-23R* ve bitişiginde yer alan *IL-12Rβ2* genleri arasındaki etkileşimde bilinmeyen bir mekanizmayla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Xinwei ve ark, 2010) .

Bu tez çalışmasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'na başvuran AS'li hastalardaki HLA-B27 aleli (+/-)

dağılımı ve *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi ile AS arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmış olup, rs11209032 polimorfizmi ve AS arasındaki ilişki ülkemiz popülasyonunda ilk kez çalışılmıştır. Bu nedenle elde edilen veriler söz konusu polimorfizm ile AS arasındaki ilişki açısından ülkemiz popülasyonuna ilişkin yeni bilgilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

### **1.3 Ankilozan Spondilitin Tanımı**

Ankilozan spondilit (AS), esas olarak aksiyel iskeleti (sakroiliak eklemler ve omurga) etkileyen, periferik eklemler ve eklem dışı yapıları da etkileyebilen, etiyolojisi bilinmeyen, kronik, sistemik, genetik ve radyolojik yönleri olan, inflamatuvar karakterde ilerleyici bir romatizmal hastalıktır (Gouveia ve ark, 2012).

Yunanca *ankylos* “eğilme, birleşme/kaynaşma” ve *spondylos* “omurga” anlamına gelir ve AS bu sözcüklerden türetilmiştir( Wikipedia, 2014). Tüm dünyada prevalansı %0.1 - %1.4 olarak bilinmektedir ve erkek kadın oranı 2:1 veya 3:1'dir. AS etiyolojisinde genetik faktörlerin, özellikle HLA-B27 alelinin bu hastalığa yatkınlıkta rol aldığı otoimmün bir hastalıktır (Huei–Huang ve Ji-Yih, 2013).

### **1.4 Ankilozan Spondilitin Epidemiyolojisi**

Ankilozan spondiliti de içeren spondiloartritlerin (SpA) gerçek etiyolojisi bilinmemektedir (Brown, 2008). 1973 yılında insan lökosit antijenlerine ait MHC Sınıf I molekülü olan HLA-B27 aleli ile AS arasındaki ilişki ortaya konduktan sonra epidemiyolojik veriler daha rahat söylenmektedir (Brown, 2008). Spondiloartritler içinde en kapsamlı çalışılan AS, SpA'ların bir prototipi ve en ciddi formu olup farklı popülasyonlarda prevalansı farklılık göstermektedir (Brown, 2008).

Genç bireyleri tutan AS, genellikle 26 yaş civarında bulunur. Hastaların %80'inde ilk semptom 30 yaş altında, %5'inden azında 45 yaş üzerinde başlar (Braun ve ark, 1998).

Beyaz ırkta AS'li hastaların %90-95'inde HLA-B27 aleli pozitif olduğu halde (Brown ve ark, 1998) Afrika kökenli AS'li hastalarda HLA-B27 aleli ile birliktelik gözlenmemiştir (Reveille ve ark, 2001). Afrika kökenli Amerikalılarda, ırkta karışıma bağlı olarak HLA-B27 aleli %2 fakat AS'li hastaların %50'sinde HLA-B27 aleli pozitif bulunmuştur. Buna paralel olarak Afrikalı Amerikalılar, beyaz Amerikalılardan daha az sıklıkta hastalıktan etkilenirler (Khan ve ark, 1984).

Beyaz ırkta sağlıklı kişilerin %1-2'sinde hastalıkla ilişkili HLA-B27 aleli alt tipleriyle AS oluşur (Olivieri ve ark,2002). Bununla birlikte pozitif aile hikayesi hastalık oluşmasında ciddi risk faktörüdür. HLA-B27 aleli pozitif AS'li hastaların, HLA-B27 aleli pozitif 1. derece akrabalarının %21'inde SpA belirtisi veya bulguları oluşurken, negatif olanlarda bu oran %1.3 bulunmuştur. Bu da riskin 16 kat arttığını göstermiştir (Van der linden ve ark, 1984).

Aile çalışmaları güçlü bir şekilde ek genetik faktörlerin, HLA-dışı genlerin AS geliştirme olasılığına katkıda bulunduğunu göstermiştir. AS'li ikiz çalışmalarından birinde monozigotlarda konkordans %67, dizigotlarda %12 olduğu gösterilmiştir (Brown ve Wordworth, 1997). Konkordansın oranı dizigotik ikizlerde %23'e kadar çıkmaktadır (Brown ve ark, 1989). Monozigotik ve HLA-B27 aleli pozitif dizigotik ikizler arasındaki bu fark, AS'ye yatkınlıkta HLA-dışı genetik etkilerin önemli rol aldığını göstermektedir.

### **1.3 Ankilozan Spondilitin Tanı Kriterleri**

Etiyolojinin tam açık olmadığı birçok diğer kronik hastalıklar gibi AS tanısı da klinik, laboratuvar ve görüntüleme özelliklerine göre konulur (Gouveia ve ark, 2012). Hastalığa eşlik eden başka hiçbir hastalık yoksa “*primer*” veya “*idiyopatik*”; sedef veya kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi eşlik eden bir hastalık varsa “*sekonder*” olarak tanımlanır.

AS'nin sınıflaması için sınıflama kriterleri ortaya atılmıştır. İlk ortaya atılan Roma (1961) ve New York (1966) tanı kriterlerinin duyarlılık ve özgünlüğünün düşük olması bu kriterlerin modifikasyonuna neden olmuştur (Van Der Linden ve ark, 1984). Tanı kriterlerinin hepsi klinik ve radyolojik bulguların önemini vurgulamaktadır (Gouveia ve ark, 2012).

### **1.3.1 Ankilozan Spondilit İçin Kriter Setleri**

#### **Roma AS Sınıflama Kriterleri, 1961** (Van Der Linden ve ark,1984)

##### **Klinik Kriterler**

1. Üç aydan fazla devam eden ve istirahatle düzelmeyen bel ağrısı ve sertlik
2. Torakal bölgede ağrı ve sertlik
3. Lomber omurga hareketlerinde kısıtlılık
4. Göğüs ekspansiyonunda azalma
5. Iritis öyküsü veya sekel varlığı

##### **Radyolojik Kriterler**

6. Radyolojik olarak bilateral AS'ye özgün sakroiliak eklem (SIE) değişikliklerinin olması ve bilateral osteoartrit dışlanması

##### **Kesin AS için, eğer**

7. Evre 3-4 bilateral sakroiliit ve en az bir klinik kriter
8. En az dört klinik kriter varsa

#### **New York AS Sınıflama Kriterleri, 1966** ( Van Der Linden ve ark, 1984)

##### **Klinik Kriterler**

1. Lomber omurganın 3 planda hareket kısıtlılığı: öne fleksiyon, lateral fleksiyon, ekstansiyon
2. Dorsolomber bileşke veya lomber omurgada ağrı veya ağrı öyküsü



3. Dördüncü interkostal aralıktan ölçülen göğüs ekspansiyonun 2,5 cm ve altında olması

### **Radyograflerin Evrelenmesi**

Normal, 0; Şüpheli, 1: Minimal sakroiliit, 2; Orta derecede sakroiliit, 3; Ankiloz, 4

### **Kesin AS için eğer**

1. Evre 3-4 bilateral sakroiliit ve en az bir klinik kriter
2. Evre 3-4 unilateral veya evre 2 bilateral sakroiliit ve ilk klinik kriter veya ikinci ve üçüncü klinik kriterler

### **Olası AS için,**

Evre 3-4 sakroiliit ve klinik kriterlerin yokluğu

AS sınıflama kriterlerinde ortak paydalardan en önemlileri inflamatuvar bel ağrısı ve radyolojik olarak tanınabilen sakroiliitin varlığıdır. Ancak lomber omurganın hareket kısıtlılığı ve göğüs ekspansiyonunun azalması, hastalık süresiyle ilgilidir ve genellikle erken dönemde gelişmez (Goei ve ark, 1985). Sakroiliitin radyografik olarak belirgin hale gelmesi de bir süreç gerektirmektedir. Bu özellikler hastalığın erken döneminde görülmemektedir. Bu yüzden, Modifiye New York Kriterleri erken AS tanısı için uygun görülmemektedir (Akgül ve Ozgocmen,2011)

### **Modifiye New York Tanı Kriterleri, 1984** ( Van Der Linden ve ark, 1984)

#### **Klinik Kriterler**

1. Üç aydan fazla süregelen, egzersizle düzelen, istirahatla düzelmeyen bel ağrısı veya tutukluğu
2. Lomber omurganın sagittal ve frontal planlarda hareketlerde limitasyon varlığı
3. Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinsiyete göre normal değerlerden az olması

### **Radyolojik Kriterler**

Sakroiliit evre >2 çift taraflı veya evre 3-4 sakroiliit tek taraflı

### **Kesin AS için, eğer**

Unilateral grade 3-4 veya bilateral grade 2-4 sakroiliit ve herhangi bir klinik kriter

### **Olası AS için,**

Üç klinik kriter varlığı veya radyolojik kriterlerin klinik kriterler olmaksızın varlığı

### **Modifiye New York Kriterleri, 2002**

#### **Klinik Kriterler**

1. En az üç aydır var olan, egzersizle düzeliyor istirahatle düzelmeyen bel ağrısı
2. Lomber omurganın sagittal ve frontal düzlemlerde hareket kısıtlılığı
3. Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinse göre normal değerlerin altında olması

#### **Radyolojik Kriterler**

Evre 2-4 bilateral sakroiliit veya Evre 3-4 unilateral sakroiliit

#### **Kesin AS, için**

Radyolojik kritere en az bir klinik kriter eşlik ederse AS olarak kabul edilir.

Modifiye New York Kriterleri halen altın değerinde olup, SpA'lar için daha geniş kriterler kullanılmaktadır (Akgül ve Ozgocmen, 2011)

### **1.4 Ankilozan Spondilitin Klinik Özellikleri**

AS'de en önemli bulgular radyografik sakroiliit ve sıklıkla spondilitle ilişkili olan inflamatuvar bel ağrısıdır. Aksiyel, entezeal ve periferik iskelet tutulumuna ek olarak sıklıkla üveit ve daha az sıklıkla kardiyak tutulumun görüldüğü ekstraartiküler

tutulmuş da yapabilir (Akgül ve Ozgocmen, 2011). Hastalık başlama yaşı gelişmiş ülkelerde 24-26 arasında değişmektedir ve 45 yaş sonrası başlaması “geç başlangıçlı AS” olarak tanımlanır ve nadirdir (Khan, 2002). Bu yaş ülkemizde 23.2-27.1 olarak bildirilmektedir (Bodur ve ark, 2008; Dincer ve ark, 2008).

#### **1.4.1 Bel Ağrısı**

AS'nin ilk semptomları genellikle adolesan ya da erken erişkinlik dönemlerinde ve genellikle 50 yaşından önce başlar. Tüm bel ağrısı nedenlerinin %15'ini oluşturan kronik inflamatuvar bel ağrısı (künt bel ağrısı şeklindedir), AS'nin en önde gelen semptomudur (Rudwaleit ve ark, 2004).

İnflamatuvar bel ağrısı, genellikle gluteal bölgede hissedilen, 3 aydan daha uzun süren, (Sieper ve ark, 2002) gece yarısı ve sabahın erken saatlerinde en fazla olan, en az 30 dakika ya da sıklıkla saatler süren sabah tutukluğu ile bağlantılı, egzersiz ya da aktivite ile azalmayan, istirahatle düzelmeyen ve non-steroid anti-inflamatuvar ilaç (NSAİİ) (Alamanos ve ark, 2004; Rudwaleit ve ark, 2004 ) tedavisi ile azalan ağrıdır.

İnflamatuvar bel ağrısı büyük olasılıkla inflame olmuş sakroiliak eklem ve çevre bağlarından köken alan künt, kolay lokalize edilemeyen ve dizin altına inmeyecek tarzda uyluk arka yüzüne yayılan şekilde görülür. Ağrı genellikle başlangıçta tek taraflı, (Sieper ve Rudwaleit, 2005) ve aralıklarla oluşurken hastalık ilerledikçe aylar içerisinde çift taraflı ve sürekli olma eğilimi taşır (Sieper ve ark, 2002). AS hastalarında genellikle inflamatuvar bel ağrısına ek olarak, pozitif aile öyküsü ve HLA-B27 aleli pozitifliği bulunmaktadır (Amor ve ark, 1990).

### **1.4.2 Kalça ve Omuz Tutulumu**

Kalça tutulumu AS'de özür lülüğü en fazla etkileyen ekstra-aksiyel tutulumlardandır. Kalça eklemi tutulumu jüvenil başlangıçlı hastalarda daha sıktır ve bu hastalarda ileri dönemlerde kalça artroplastisi gereksinimi erişkin çağda başlayan AS'li hastalara göre daha sıktır ( Baek ve ark, 2002). Kalça tutulumu diğ er eklem tutulumlarına göre daha sık iki taraflı olma eğ iliminde ve radyolojik olarak da inflamatuvar artritlerde oldu ğ u gibi simetrik konsantrik daralma şeklinde belirlemektedir (Resnick ve Niwayama,1995).

İlerlemiş kalça tutulumu tipik yürüme paternine ve birçok günlük yaşam aktivitesinde zorluklara ve fonksiyonel özür lülüğ e neden olabilmektedir. Omuz tutulumu her ne kadar ağ rı ve ılımlı fonksiyonel kısıtlılığ a neden olsa da skapulotorakal eklem yüzeyinin hareket yeteneğ i sayesinde ileri limitasyonlar nadirdir (Will ve Kennedy, 2000).

### **1.4.3 Periferik Artrit**

AS'de kalçalar ve omuz gibi kök eklemler dışında kalan periferik eklem tutulumu nadirdir, hastaların yaklaşık üçte birinde periferik eklemlerde etkilenme olabilmektedir (Ginsburg ve Cohen, 1983). Genellikle asimetrik, monoartiküler veya oligoartiküler tutulum söz konusudur. Dizler başta olmak üzere, el bileğ i, dirsek ve ayak eklemleri etkilenebilmektedir. Bu eklemlerdeki değ iş iklikler nadiren eroziv hasara yol açabilmekte ve birçok hastada geride belirgin deformite bırakmadan düzelebilmektedir (Khan,1992).

### **1.4.4 Göğüs Kafesi Tutulumu**

Göğüs kafesi ile omurga (kostovertebral ve kostotransvers eklemler) ve sternumu (kostosternal eklemler, manubriosternal ve sternoklavikular eklemler) birleştiren eklemlerde entezit ve eklem inflamasyonu göğüs ağ rısına neden olur. Öksürme, aksırma sırasında bazen plöritik olarak da tarif edilebilen ağ rılar da olabilir (Fournie ve ark,1997). Göğüs ön duvarında, kostokondral bileşkelerde palpasyonla hassasiyet olabilir ve bazen hastalarda solunum sırasında ş iddetli ağ rılara neden olabilir. HLA-

B27 aleli pozitif hasta yakınlarında radyografik sakroiliit olmadan da göğüs ön duvarı ağrısı görülebildiği bildirilmiştir ( Fournie ve ark, 1997).

#### **1.4.5 Entezit**

Entezis; tendon, bağ, eklem kapsülü ve fasiyanın kemiğe yapışma yeridir. Entezit; tendon, fasiya, bağlar veya eklem kapsülünün kemiğe yapışma yerlerinde inflamasyondur. AS başta olmak üzere tüm SpA'lerin belirgin ve ayırt edici bir özelliğidir (Francois ve ark, 2001). Entezit, juvenil başlangıçlı AS formlarında erişkin başlangıçlılara göre daha sıktır (Burgos-Vargas ve ark, 1997). Klinik olarak alt ekstremitelerde ve pelvik bölgede daha fazla görülür (D'Agostino ve Olivieri, 2006).

#### **Eklem Dışı Bulgular**

##### **1.4.6 Üveit**

Üveit veya üveal bölgenin inflamasyonu anterior (irit veya iridoksilit) veya posterior (koroidit veya retinokoroidit) şeklindedir (Banres ve ark, 1998). Akut anterior üveit AS klinik seyri sırasında hastalığın herhangi bir döneminde oluşabilmektedir. Üveit hem erişkin SpA formlarında hem de juvenil idiyopatik artitte sık rastlanılan eklem dışı tutulumun bir formudur (Wright ve Cron, 2007). Göreceli olarak HLA-B27 aleli pozitif AS'li hastalarda anterior üveit daha sıktır. Kuzey Amerika'da tüm akut anterior üveitli hastaların yaklaşık %50'sinde HLA-B27 aleli pozitifdir (Martin ve ark, 2002).

##### **1.4.7 Gastrointestinal Bulgular**

Ankilozan spondilitte gastrointestinal tutulum oldukça sıktır. Tüm sindirim sistemi mukozası çeşitli derecelerde tutulabilir. Belçika ve İskandinav çalışmalarında AS'li hastaların %50'den fazlasında ileum ve çekumda kolonoskopi ile makroskopik ve mikroskopik inflamasyonlar tespit edilmiştir (De Kayser ve ark, 2002). AS'deki bağırsak inflamasyonunun immunolojik mekanizmalarla ilişkili olduğu

düşünülmektedir. Kronik inflamatuvar ve bağırsak lezyonları olanların daha ciddi eroziv periferal ve kalça artritleri oluşturmaya meyillidir ( Mielants ve ark, 1991).

#### **1.4.8 Kardiyak Bulgular**

AS'de kardiyak tutulum genellikle hastalığın ileri dönemlerinde ortaya çıkmakta ancak nadiren hastalığa öncülük edebilmektedir. HLA-B27 aleli pozitif hastalarda kardiyak komplikasyonlar negatif hastalara göre daha sıklıkla olabilmektedir. Kardiyak tutulumlar sıklıkla aort kapağı, aort ve subaortik yapıları ilgilendirebilir. Ayrıca AS'li hastalarda miyokard ve ileti sistemi normal popülasyona göre daha fazla etkilenmekte ve sol ventrikül disfonksiyonları görülebilmektedir (Lautermann ve Braun, 2002).

#### **1.4.9 Pulmoner Tutulum**

Akciğer parankim tutulumu AS'nin nadir bir bulgusudur. AS'deki plevropulmoner tutulum görülme sıklığı yaklaşık %1'dir (Casserly ve ark, 1997).En çok rastlanan bulgular üst lob fibrozisi, miçetoma oluşumu ve plevral kalınlaşmadır.

Torakal omurgada kostovertebral eklemlerde inflamasyon ve ankiloz sonucu meydana gelen füzyon, solunum fonksiyon testlerinde restriktif akciğer hastalığı olarak kendini gösterir AS'de akciğer tutulumu genellikle asemptomatik olduğundan, bu gözlemlerin klinik önemi hala açıklığa kavuşturulamamıştır (Maghraouri ve ark, 2004).

#### **1.4.10 Renal Bulgular**

AS'de nadir olmakla birlikte IgA nefropatisi görülebilmektedir. Bu tutulum renal bozukluğu olan veya olmayan hastalarda hematüri ve proteinürisi olan hastalarda göz önünde tutulmalıdır. Bu hastalarda serum IgA düzeyleri yüksek bulunabilir (Lai ve ark,1989). Hastalar kronik bir şekilde NSAİİ kullandıklarından ötürü analjezik nefropatisi geliştirme riskleri vardır. Ayrıca hastalar nadir de olsa amiloidoz

geliştirebilir ve bu hastalarda abdominal subkutan yağ biyopsisi tanıda yararlı olabilmektedir (Gratacos ve ark, 1997).

#### **1.4.11 Nörolojik Bulgular**

AS'deki nörolojik tutulum en sık olarak omurga kırığı, atlantoaksiyel subluksasyon ya da kauda equina sendromu ile ilişkilidir. AS'deki kauda equina sendromu, yavaş ve sinsi progresyon gösteren ve yüksek oranda dural ektazi ile karakterizedir (Ahn ve ark, 2001) Kauda equina sendromu, sıklıkla hastalığın artık aktivitesini kaybettiği dönemde ortaya çıkar (Ginsburg ve ark, 1997). AS'li hastalarda multipl skleroz benzeri hastalık ve transvers miyelit vakaları bildirilmekte, aralarındaki ilişki ise araştırılmaktadır (Hanrahan ve ark,1988).

#### **1.4.12 Yorgunluk**

AS'de yorgunluk önemli bir semptomdur. Yorgunluk genellikle geceleri sertlik ve ağrıdan dolayı uyku düzeninde ve kalitesinde bozukluk ve dinlendirmeyen uyku sonucunda gün boyu süren uyku haliyle ilişkilidir. Bir araştırmada her 3 AS'li hastadan birinin ciddi derecede yorgunluk tarif ettiği gösterilmiştir (Dagfinhud ve ark, 2005)

### **1.5 Ankilozan Spondilitin Patolojisi**

Özellikle pelvis ve omurgada, ligamentlerin kemiğe yapışma yeri olan entezit bölgeleri AS'de primer patolojinin bulunduğu yerler olarak düşünülmektedir. Entezit komşu kemik iliğinde belirgin ödemin olduğu ve sıklıkla kemikleşme ile karakterize eroziv lezyonlarla sonuçlanır. Entezit ve sinovitin özelliklerine sahip olan sakroiliit, AS'nin en erken bulgularından biridir. Erken lezyonlar, subkondral granülasyon dokusu, ligamen ve periostta lenfosit ve makrofaj infiltratları ve subkondral kemik iliği ödeminden oluşmaktadır (Reveille ve Arnett,2005).

Sinovit bunu izlemekte ve yeni kemik oluşumu adacıkları ile pannus oluşumuna ilerleyebilmektedir. Hasar görmüş eklem kenarlarının yerini, fibrokartilaj

rejenerasyonu ve kemikleşme almaktadır. En sonunda eklem tamamen kapanabilmektedir. Vertebrada, erken dönemde annulus fibrozus ile vertebral kemiğin birleşim yerinde iltihabi granülasyon dokusu bulunmaktadır. Dış annuler lifler aşınmakta ve sonunda kemikleşmekte, sindesmofit başlangıcını oluşturmaktadır. Bu yapılar daha sonra devam eden enkondral kemik oluşumu ile büyümekte, sonunda ardışık vertebra cisimleri arasında köprüleşme oluşturmaktadır. Bu sürecin üst tarafa doğru ilerlemesi radyolojik olarak gözlenen bambu kamışı yapısına yol açmaktadır ( Reveille ve Arnett,2005).

Omurgadaki diğer lezyonlar, yaygın osteoporoz, vertebra cisimlerinin disk kenarlarında erozyonlar, vertebraların kareleşmesi ve disk-kemik sınırının iltihabi ve yıkımıdır. Apofizyal eklemlerin iltihabi artriti yaygın olup, kıkırdağın pannus tarafından erozyonunu sıklıkla kemik ankilozu takip eder. Hastalığın erken evresinde, anlamlı hareket kısıtlılığı gelişmeden önce vertebrada ve proksimal femurda kemik mineral dansitesinde önemli azalma olmaktadır. AS'deki periferik artritte sinoviyal hiperplazi, lenfoid infiltrasyon ve pannus oluşumu görülebilmekte fakat bu süreç romatoid artitte görülen aşırı miktarda sinoviyal villuslar, fibrin depolanmaları, ülserler ve plazma hücre toplanmasından yoksundur. Subkondral granülasyon dokusunun proliferasyonu ile oluşan merkezi kartilajenöz erozyonlar AS'de yaygındır. ( Reveille ve Arnett,2005).

## **1.6 Ankilozan Spondilitin Patogenezi**

SpA'ların en önemli örneğini oluşturan AS'nin patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Genetik faktörlerin çeşitli çevresel faktörlerle etkileşmesi sonucu ortaya çıkan inflamasyonun sinovyal membran, kemik, entezis bölgeleri, göz ve gastrointestinal mukoza gibi eklem dışı dokularda hasara neden olduğu düşünülmektedir (Coşan ve Gül, 2007).

AS'de en iyi bilinen genetik yatkınlık faktörü HLA-B27 olup, patogenezdaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte HLA-B27'nin AS patogenezinin katkısı, hastalığa özgü artritogenik bir peptidin immün sisteme sunulması, ağır zincir



homodimerlerinin immün sistemin diğer reseptörleri ile etkileşmesi ya da ağır zincirin hatalı katlanması sonucu endoplasmik retikulum stresinin uyarılması yoluyla olabilir. Gastrointestinal ya da genitoüriner sistemde infeksiyon yapan çeşitli mikroorganizmaların varlığı da inflamatuvar yanıtın oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Coşan ve Gül, 2007).

Oluşan inflamatuvar yanıt özellikle fibrokartilajenöz eklemlerde hasara neden olmakta ve doku hasarının encondral kemik oluşumu ve ankiloz ile iyileşmesinin inflamasyondan bağımsız bir süreç olarak patogeneizde yer aldığı düşünülmektedir (Coşan ve Gül, 2007).

### **1.7 Ankilozan Spondilitte Laboratuvar Bulguları**

AS için tanısal olan rutin biyokimyasal test yoktur. Birçok etnik grupta HLA-B27 aleli AS hastalarının yaklaşık %90'ında bulunmaktadır. Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve C-reaktif protein (CRP), her zaman olmamakla birlikte, sıklıkla artmıştır. Hafif anemi olabilir. Şiddetli hastalığı olanlarda alkalen fosfotaz seviyelerinde artış görülebilir (Taurog, 1997).

Serum IgA düzeylerinin AS hastalık aktivitesini yansıtabileceği bildirilmiştir. Beraberinde başka bir hastalık yoksa romatoid faktör (RF) ve antinükleer antikor (ANA) büyük ölçüde negatiftir. AS'de periferik eklemlerin sinoviyal sıvısının inflamasyonu nonspesifiktir. Göğüs kafesinde hareket kısıtlılığı olanlarda, vital kapasitede azalma, fonksiyonel rezidüel kapasitede artma sık görülmekte, fakat hava akımı ölçümleri normal olup, ventilasyon fonksiyonları genellikle iyi olarak sürdürülmektedir (Taurog, 1997).

### **1.8 Ankilozan Spondilitte Görüntüleme Yöntemleri**

AS, seronegatif SpA'nın bir üyesi olup; psöriyatik artrit, reaktif artrit ve enteropatik artritleri içeren inflamatuvar bir artrit grubudur. Ortak klinik, laboratuvar ve

radyografik özellikler paylaşırlar. Ortak radyografik ayırıcı özellikler, normal mineralizasyon ve erozyon, kemik proliferasyonu, spinal ve sakroiliak tutulum bulunmasıdır. Birbirlerinden erozyonların ve kemik proliferasyonunun derecesi ile birlikte, tutulumun dağılımı ve simetrisi ile ayrılırlar. Değerlendirilmeleri için çok sayıda görüntüleme yöntemi vardır. Bunlar arasında konvansiyonel radyografi, konvansiyonel tomografi, kemik sintigrafisi, bilgisayarlı tomografi (BT), ultrason ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yer alır. Tutulan eklemin doğru değerlendirilmesi için uygun görüntüleme yöntemi seçilmelidir (Salonen ve Brower, 2003)

### **1.9 Ankilozan Spondilitin Genetiği**

AS patogenezinde rol oynayan genetik faktörlerin hastalığa yatkınlığın %90'ından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Reveille, 2006). Genetik yatkınlık faktörlerinin başında sınıf I MHC molekülü olan HLA-B27 aleli gelmektedir (Khan ve ark, 2007).

HLA-B27 aleli ile AS arasındaki ilişki 1973 yılından beri bilinmesine rağmen, bu molekülün hastalık patogenezindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Tüm genom ilişkilendirme çalışmaları sayesinde HLA-dışı diğer genetik yatkınlık faktörlerinin tanımlanması da mümkün olabilmıştır (Coşan ve Gül, 2007).

AS hastalarının %90'ından fazlasının HLA-B27 aleli pozitif olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte farklı etnik gruplarda, sağlıklı toplumdaki HLA-B27 aleli sıklığı ve HLA-B27'nin AS'ye genetik yatkınlığına katkısı değişkenlik gösterebilmektedir (Sieper ve ark, 2006). Ülkemizde yapılan bir çalışmada AS hastalarının yaklaşık olarak %70'inin HLA-B27 aleli pozitif olduğu bildirilmiştir (Gunal ve ark, 2008). AS'ye yatkınlıkta rol oynayan diğer genetik faktörlerin birbirleri ve/veya çevresel faktörlerle etkileşimi ülkemizde yapılan bu çalışmadaki verinin nedenleri arasında yer alabilir (Cosan ve Gül, 2007).

İkizlerde yapılan iki çalışmada konkordans oranı, monozigotik ikizlerde %50-75, dizigotik ikizlerde %12.5-15, HLA-B27 aleli pozitif dizigotik ikizlerde %20-27 olarak bulunmuştur. Monozigot ve dizigot ikizlerdeki konkordansın bu kadar farklı

olması, hastalık patogenezinde HLA-B27 basta olmak üzere diğer genetik faktörlerin katkısını ortaya koymaktadır ( Brown ve ark, 2000).

Sağlıklı bireylerle yapılan çalışmalarda HLA-B27 aleli pozitif olanlarda AS gelişme riski %1.3 olarak bildirilmiştir. AS ile HLA-B27 aleli arasındaki ilişkiye rağmen, HLA-B27 aleli pozitif sağlıklı bireylerde hastalığın ortaya çıkma olasılığının bu kadar düşük olması, AS patogenezinde diğer genetik ve/veya çevresel faktörlerin rolünün önemini vurgulamaktadır (Breban, 2006) AS'nin genetik temelinde rol oynayan aday genler, HLA-B27 dışındaki MHC genleri ve MHC dışındaki genler olarak gruplandırılmaktadır

### 1.9.1 HLA-B27 Dışındaki MHC Genleri

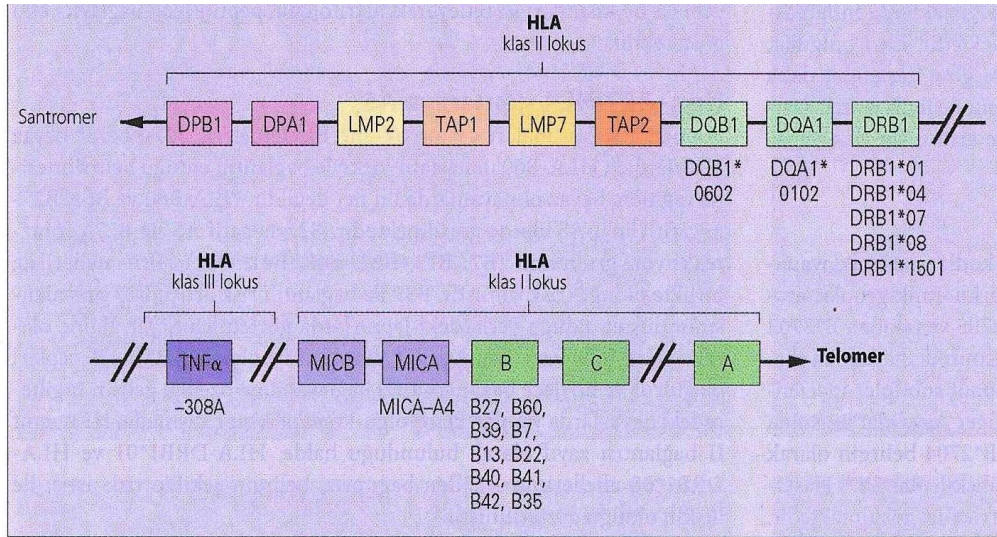
MHC genlerinin AS'ye genetik katkısı %50 olup, HLA-B27 bunun %16'sından sorumludur. HLA-B27 pozitif bireylerin sadece %5-8'inde AS gelişmesi ve AS'li beyaz ırkın %10'unun HLA-B27 negatif olması; HLA-B27 dışındaki genlerin de AS gelişimine yakınlık yaratabileceği düşüncesine neden olmuştur (Rahman, 2007)

HLA-B27 dışındaki MHC sınıf I genlerinden HLA-B60, HLA-B38, HLA-B39 ve HLA-B35'inde AS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rahman, 2007). Ancak HLA-B35 ile AS arasındaki ilişki tam olarak kanıtlanmamıştır. HLA-B60, Avrupa ve Tayvan'da HLA-B27 pozitif veya negatif olmasına rağmen AS gelişim riskinden sorumlu tutulan bir gen dir (Dakwar ve ark, 2008). HLA-B27 dışındaki bir MHC sınıf I geni de HLA-B27'ye yakın yerleşimli olan MHC sınıf I zinciri ile ilişkili gen (*MICA*) dir (Şekil 1.9.1.1) MICA proteinleri doğal öldürücü reseptör (NKG2D) aktivatörüdürler ( Reveille, 2006) .

MHC sınıf II genlerinden HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*04 ve HLA-DRB1\*08 alellerinin de AS ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Brown ve ark, 1997). Diğer MHC sınıf II genlerinden antijen prosesi ile ilişkili taşıyıcı (*TAP*) geni ve düşük molekül ağırlıklı proteazom (*LMP*) geni alelleri üzerinde de çalışılmış ve söz konusu genlerin de AS patogenezinde rolleri olduğu görülmüştür (Şekil 1.9.1.1)

(Reveille, 2006) Nitekim *LMP-2* aleli üveitin eşlik ettiği AS (Kanada) ve juvenil AS (Meksika, Norveç) olgularında, *LMP-7* aleli de İspanyol AS olgularında gösterilmiştir (Reveille, 2006).

MHC sınıf III genleri de AS gelişiminden sorumludur. Bunlardan tümör nekroz faktör-  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) ve ısı şok proteini-70 (*HSP-70*) genleri polimorfizmleri ile AS asosiyasyon gösterdiği belirtilmektedir (Şekil 1.9.1.1) (Reveille, 2006). Yapılan bazı çalışmalarda *TNF- $\alpha$*  -308(A/G) gen polimorfizmi ile AS arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Rahman, 2007).



Şekil 1.9.1.1: Ankilozan spondilitte yer alan HLA lokusları/alelleri (Walter, 2011)

## 1.9.2 MHC Dışındaki Genler

Genetik araştırmalar HLA-B27'nin toplam genetik yatkınlığa katkısının %30-40, HLA'nın da içinde bulunduğu MHC bölgesinin katkısının da %50 düzeyinde olduğunu göstermektedir (Reveille, 2006; Breban ve ark, 2006). İkizlerde yapılan iki çalışmada konkordans oranı, monozigotik ikizlerde %50-75, dizigotik ikizlerde %12.5-15, HLA-B27 pozitif dizigotik ikizlerde %20-27 olarak bulunmuştur. Monozigot ve dizigot ikizlerdeki konkordansın bu kadar farklı olması, hastalık

patogenezinde HLA-B27 aleli başta olmak üzere genetik faktörlerin katkısının önemini kanıtlamaktadır (Carter ve ark, 2007).

Hastalığa yatkınlık oluşturan diğer genleri tanımlamak amacıyla yapılan tüm genom bağlantı analizleri çok sayıda MHC dışı aday gen bölgesi tanımlamıştır (10q, 16q, 1q, 3q, 5q, 6q, 9q, 17q ve 19q) (Carter ve ark, 2007). AS ile birlikteliğe kuvvetli en önemli MHC dışı aday genler kromozom 2q üzerinde lokalize *IL-1* gen kümesidir ( Timms ve ark, 2004; Brown, 2006).

Bu bölge *IL-1A*, *IL-1B* ve *IL-1* reseptör antagonisti genlerini içermektedir ve büyük ölçekli ilişki çalışmalarında *IL-1* bölgesi polimorfizmleri ile AS arasındaki ilişki doğrulanmıştır (Timms, 2004; Brown ve ark, 2006). Yine yapılan bazı çalışmalarda AS'ye yatkınlıkta önemli risk faktörlerinden birinin kromozom 1q'da lokalize *IL-23R* geni olduğu bildirilmiştir (Reveille ve ark, 2007).

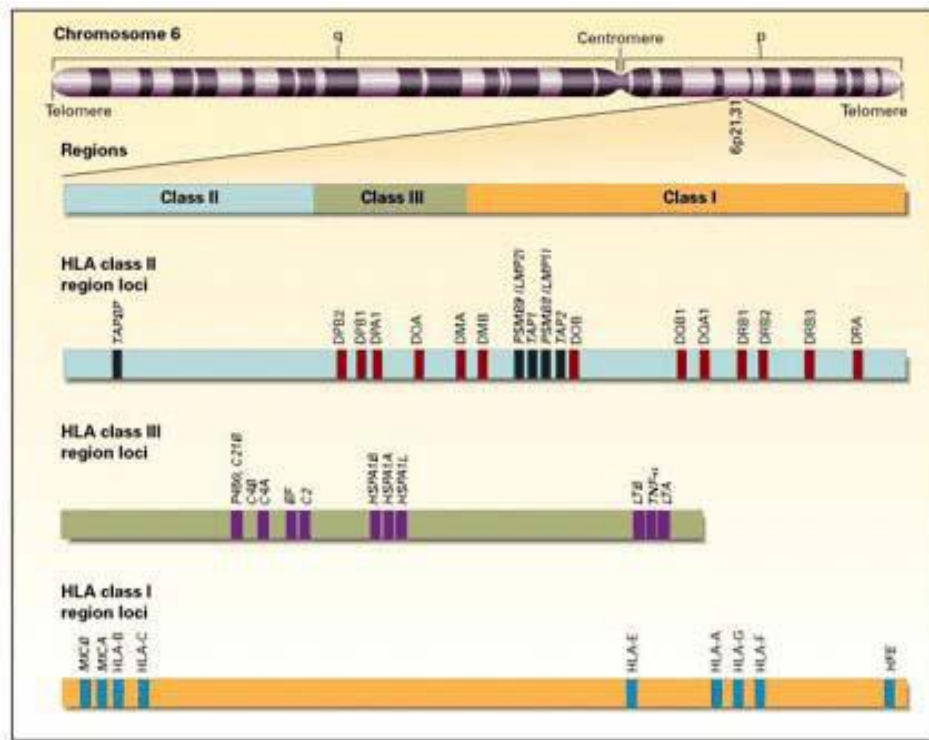
AS'de rol oynadığı düşünülen genlerden bazılarının, lokalizasyon ve fonksiyonları Tablo 1.9.2.1'de verilmektedir.

**Tablo 1.9.2.1:** Ankilozan Spondilitle İlişkili Bazı Genler (Reveille ve ark, 2007; Robinson, 2012)

<b>Gen</b>	<b>Kromozomal Lokalizasyonu</b>	<b>AS İle En Fazla İlişkilendirilen SNP</b>	<b>Fonksiyonu</b>
<i>HLA-B27</i>	6p21	rs4349859	Antijen Sunumu
<i>ERAP1</i>	5q15	rs30187	Antijen Sunumu
<i>IL-23R</i>	1p31	rs11209026	IL-23/Th17 Sinyal İletim Yolu
<i>IL-12B</i>	5q33	rs6556416	IL-23/Th17 Sinyal İletim Yolu
<i>TNFRSF1A</i>	12p13	rs11616188	TNF Sinyal İletim Yolu
<i>IL1R2</i>	2q12	rs2310173	Kazanılmış İmmün Yanıt
<i>ANTXR2</i>	4q21	rs4389526	İskelet Tutulumu
<i>RUNX3</i>	1p36	rs11249215	Antijen Sunumu
<i>CARD9</i>	9q34	rs10781500	Kazanılmış İmmün Yanıt
<i>PTGER4</i>	5p13.1	rs10440635	Kazanılmış İmmün Yanıt
<i>KIF21B</i>	1q32.1	rs2297909	NF- $\kappa$ B Sinyal İletim Yolu
<i>TBKBP1</i>	17q21.32	rs8070463	TNF Sinyal İletim Yolu
2p15	İntergenik Bölge	rs10865331	Bilinmiyor
21q22	İntergenik Bölge	rs378108	Bilinmiyor

## 1.10 HLA-B27 ve Ankilozan Spondilit İlişkisi

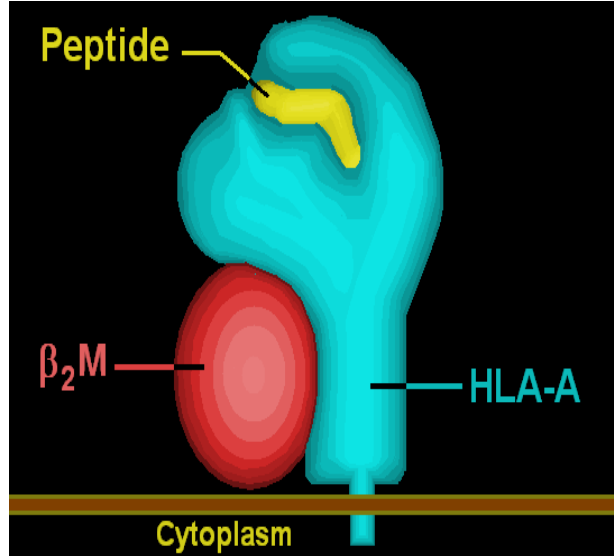
AS patogenezinde rol oynayan genetik yatkınlık faktörlerinin başında HLA-B27 gelmektedir (Khan ve ark,2007). İnsan lökosit antijeni (HLA)-B27, bir major doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf I molekülü olup, kromozom 6p'de kodlanmaktadır (Şekil 1.10.1) (Zambrano-Zaragoza, 2013). HLA-B27 heterodimeriktir ve non-kovalent bağla  $\beta_2$ -mikroglobuline ( $\beta_2m$ ) bağlanmış HLA-B alfa (ağır) zincirinden oluşur (Şekil 1.10.2) (Khan ve ark, 2007).



Şekil 1.10.1: HLA gen bölgesinin 6. kromozom üzerinde yerleşimi ve Sınıf I, II, III bölgeleri (Çevirgen , 2005)

HLA sınıf I moleküllerinin ana görevi, çoğunlukla endojen proteinlerin parçalanmasıyla açığa çıkan antijenik peptidleri bağlamak ve sitotoksik (CD8+) T lenfositler üzerindeki  $\alpha\beta$  T-hücresi reseptörlerine sunmaktır. Antijenik peptid, HLA-B27 yapısındaki ağır zincir ile birçok lokalizasyonda ilişki halindedir (Lopez, 2007).

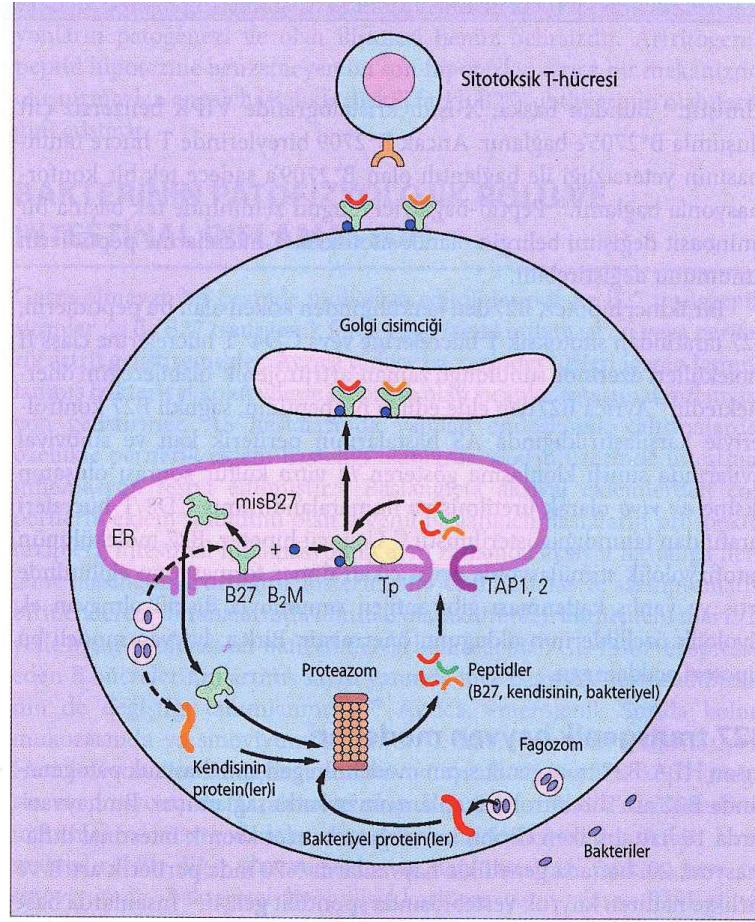
HLA-B27 translasyon ve üçüncül katlanma sonrası  $\beta_2m$ 'e bağlanır ve bir oligopeptid ile yüklenir. Peptidler, normalde organizmaya ait proteinlerden elde edilir(Smith ve ark, 2006). Ancak hücre içinde yaşayan mikroorganizmalar hücreyi enfekte ettiklerinde antijenik peptidler ortaya çıkabilir (Shamji ve ark, 2008). Bu kısa peptidler önce MHC sınıf I molekülü ile karşılaştıkları yer olan endoplazmik retikuluma (ER) taşınır (Smith ve ark, 2006). Bu trimoleküler kompleks (B-27,  $\beta_2m$ , peptid) golgi aparatı aracılığıyla antijenik peptidlerin CD8+ T lenfositlere veya NK hücrelerine sunulduğu yer olan hücre yüzeyine taşınır.



**Şekil 1.10.2:** HLA-B27 molekülü (Wikipedia, 2014)

Böylece, MHC molekülü antijenden (Ag) elde edilen peptidi CD8+ T lenfositlere sunar (Smith ve ark, 2008). MHC-peptid kompleksinin Ag-spesifik T lenfositinin reseptörünce tanınması ile Ag sunumu tamamlanır (Şekil 1.10.3) (Brown, 2008)





**Şekil 1.10.3:** Ankilozan spondilitte HLA-B27'nin patofizyolojik rolü (Walter, 2011)

HLA-B27'nin 106 alellik alt tipi vardır (hlab27, 2014). Tüm alt tipler AS ile ilişkili değildir. Coğrafi bölgelere göre HLA-B27 allel dağılımı değişkenlik gösterebilmekte ve sonuçta hastalarda saptanan HLA-B27 allelleri de değişebilmektedir (Khan ve ark, 2007). Yine AS hastalarının %90'ından fazlasının HLA-B27 aleli pozitif olduğu bilinmektedir. Fakat HLA-B27 aleli pozitif bireylerde hastalığın görülme riski yaklaşık %5 oranındadır (Rogers ve ark, 1985). Bu durumun olası nedenleri için aşağıdaki açıklamalar öne sürülmüştür. Bunlar:

1. HLA-B27'nin farklı alellerinin varlığına bağlanmaktadır (Shamji ve ark, 2008). T lenfosit repertuarının şekillenmesinde HLA Ag'i anahtar rol oynadığı için, HLA-B27 aleli pozitif bireylerin hastalığa duyarlılıklarının farklılığını, belli HLA-B27 aleli epitoplarına yanıt verme kapasitesi belirler (Careless ve Inman, 1995). En sık rastlanan B\*2705, AS gelişim riski ile en ilişkili olandır. Çünkü bağlanma

kapasitesini gösteren daha geniş bir peptid repertuvarına sahiptir (Careless ve Inman, 1995; Taurog, 2007, Shamji ve ark,2008 ).

2. Ag sunan hücrelerin sunum düzeyleri farklıdır. HLA-B27, HLA-B27 pozitif AS hastalarının periferik mononükleer hücrelerinde, sağlıklı HLA-B27 pozitif bireylere göre daha fazla sunulmaktadır. Ayrıca sunulan Ag miktarı B\*2705 taşıyan AS'li hastalarda, B\*2709 ve B\*2705 taşıyan sağlıklı bireylere göre daha fazladır (Shamji ve ark,2008).
3. B\*2709 ve B\*2706' nin hastalığa yatkınlık yaratmayışının bir nedeni belki de ek duyarlılık yaratan genlerin bu alellerle taşınamayışdır (Khan ve ark, 2007).

HLA-B27'nin AS patogenezindeki rolünü aydınlatmak için yapılan çalışmalar sonucunda altı adet hipotez öne sürülmüştür (Ataman, 2012) Bunlar:

### **1. Moleküler Benzerlik Teorisi**

1980 ve 1990'lı yıllarda oldukça benimsenmiş bu mekanizmaya göre, organizmaya ait ve yabancı peptid arasındaki benzerlik sitotoksik T lenfosit yanıtına ve sonuçta organizmaya ait dokularda otoimmün yıkıma yol açmaktadır (Khan ve ark, 2007). Bu teoriye göre, bakteriyel bir enfeksiyon sırasında yabancı Ag'lere karşı oluşan antikolar, HLA-B27 ile çapraz reaksiyon vermektedir. HLA-B27'nin peptid dizilimi Enterobakteriler, Klamidya ve sitokeratin ile benzerdir. Yani organizmanın kendinden olan bir proteine karşı olan toleransı bir enfeksiyonun immünolojik bozukluğu olarak otoimmüniteye dönüşmüştür (Careless ve Inman, 1995).

### **2. Aritrojenik Peptid Teorisi**

Artrit nedeni patojenlere ait ortak, immünolojik olarak baskın, artrite yol açan HLA-B27–spesifik antijenik peptidlerin varlığı ve bu peptidlerin otoantijenlerle çapraz reaksiyon reaksiyon göstermesidir (Smith ve Colbert, 2006). HLA-B27'nin bakteriyel veya organizmaya ait bir peptidi sitotoksik T lenfositlerine sunmasıyla

başlayan HLA-B27 ile sınırlı bir sitotoksik T hücresi yanıtının AS'e yol açtığı düşünülmektedir (Reveille, 2006). Dolayısıyla HLA-B27 aleli pozitif bir birey artrit nedeni bir patojenle enfekte olduğunda, eklemlerde HLA-B27 spesifik, sitotoksik T-hücresi aracılı bir otoimmün yanıt başlatılır (Shamji ve ark, 2008).

### **3. HLA-B27'nin Uygunsuz Kıvrımlanması Teorisi**

HLA-B27'nin normal koşullarda  $\beta_2m$  ile kovalent olmayan bağlantı yapan, heterodimerik yapıda, alfa ağır zincirinden oluşması beklenir (Khan ve ark, 2007) Ancak çeşitli çalışmalarda HLA-B27'nin hücre yüzeyinde aberan şekillerde ortaya çıkabildiği gösterilmiştir. HLA-B27,  $\beta_2m$  yokluğunda disülfid bağlantılı dimerler ya da monomerler oluşturabilir (Smith ve ark, 2006).

Stabil bir HLA molekülünün (ağır zincir-mikroglobulin-peptid kompleksi) hücre yüzeyine taşınmadan önce ER'da toplanması gereklidir.  $\beta_2m$  yokluğunda ağır zincirler yanlış kıvrımlanır ve parçalanır. Uygun olmayan kıvrımlanma, ağır zincirin anormal şekillenmesi olarak tanımlanır; uygun kıvrımlanmayan proteinlerin ER'da birikimi de aynı adı alır. Çünkü anormal yüzey ağır zincirlerinin varlığında da olağan dışı moleküller gelişir (Shamji ve ark, 2008).

### **4. HLA-B27'nin Oto-Antijenik Olarak Tanımlanması**

HLA-B27, HLA sınıf II (DR, DQ ve DP) heterodimerleri tarafından CD4+T hücrelerine bir otoantijen olarak sunulabilir. HLA-B27'nin otoantijenik olarak tanınması, moleküler benzerlik teorisinin bir parçasını oluşturur. Bu HLA-B27 molekülüne ait peptidler, bakteriyel kaynaklı olanlarla benzerlik taşıdığı zaman gözlenen bir durumdur, ancak primer bir mekanizma olarak kabul edilmemiştir. (Reveille, 2006)

## **5. Dimerize HLA-B27' nin CD4+T Hücrelerine Ag Sunması**

Kıvrımlanma hatası sonucunda dimerize yapı kazanmış HLA-B27'nin bir özelliği de CD4+T hücrelerini aktive edebilmesidir. CD4+T hücreleri arasında sınıf II MHC moleküllerini tanımasına rağmen,  $\beta_2m$  taşımayan homodimer yapısındaki sınıf I molekülü HLA-B27'yi tanıyabilmektedir. Dolayısıyla HLA-B27, CD4+T hücreleri tarafından da tanınmaktadır (Boyle ve ark, 2001).

## **6. Uzamış Hücre İçi Bakteri Varlığı**

Salmonella enteritidis'in, HLA-B27 sunan belli hücrelerde, yaşam süresinin uzaması söz konusudur. HLA-B27 enfeksiyöz etkenlerin eliminasyonunu etkileyebilir ve defektli bir immün yanıtı neden olabilir. HLA-B27 pozitif bireylerde bu bakterinin hücre içi lizisi azalmış, IL-10 ve bir dereceye kadar da TNF- $\alpha$  üretimi artmıştır. (Reveille, 2006) Bu modülatör etkileri, HLA-B27' nin yetersiz kıvrımlanması ve ER' da aşırı yüklenmeye yol açmasıyla ilgilidir ( Lopez, 2007).

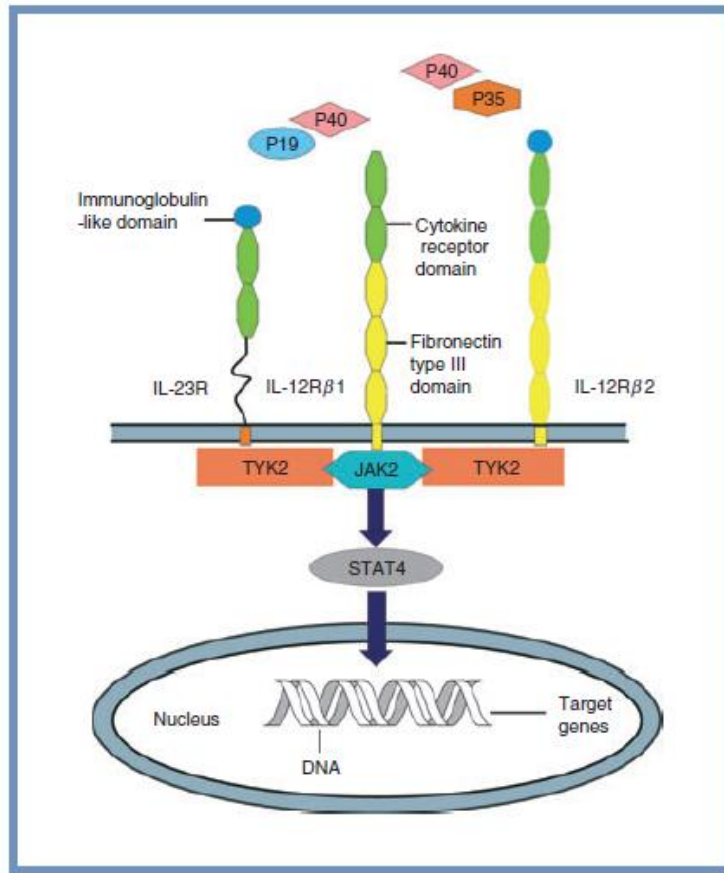
### **1.11 İnterlökin- 23 ve Ankilozan Spondilit İlişkisi**

İnterlökin-12 sitokin ailesinin bir üyesi olan İnterlökin-23 (IL-23), 19.000 moleküler ağırlıklı, 4 katlı helikal çekirdekli bir **a** alt ünitesi (IL-23p19; MIM 605580) ve disülfid bağlı ilave 40.000 moleküler ağırlıklı ayrı **b** alt ünitesi (IL-12p40; MIM 161561) olan bir heterodimerdir ( Kleinschek ve ark, 2006; OMIM,2014)

IL-23, p19 alt ünitesi 4 ekzon ve 3 introndan meydana gelmiştir ve 12q13.2. kromozom bölgesinde bulunmaktadır. p40 alt ünitesi 8 ekzondan ve 7 introndan oluşmaktadır ve 11q1.3 kromozom bölgesinde lokalize bir gen tarafından kodlanmaktadır. İnsan p19'u fare p19'u ile yapısal olarak % 70 oranında homoloji ve IL-12'nin p35 alt ünitesiyle homoloji göstermektedir. Hem p19 hem de p35 yapısal olarak en çok IL-6 ve granulosit koloni uyarıcı faktörle ilişkilidir. Bu durum her iki alt üniteyi uzun zincirli sitokinlerin gp130-sınıfı üyesi yapmaktadır (Lupardus ve

Garcia, 2008) Ayrıca p40 alt ünitesi D1, D2 ve D3 olarak tanımlanan 3 domainden meydana gelmektedir ( Yohn ve ark, 2000)

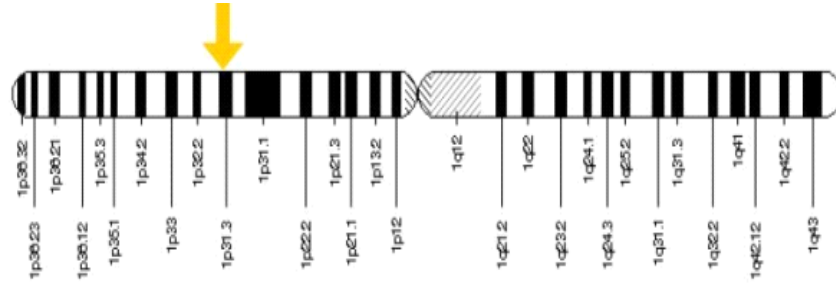
p19 ekspresyonu, antijen sunan hücreler, T lenfositler ve endotelial hücrelerde, p40 ekspresyonu ise başlıca monosit, makrofaj ve Dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerde yapılmaktadır. Biyolojik olarak aktif IL-23'ün formasyonu, aynı hücre içinde hem p40 hem de p19 alt ünitelerinin sentezini gerektirmektedir. Hem IL-12 hem de IL-23 T hücrelerinin ve NK hücrelerinin  $\beta 1$  reseptörüne ortak olan p40 alt üniteleri aracılığıyla bağlanmaktadır ( Langrish ve ark, 2005)



Şekil 1.11.1: İnterlökin 23 Sinyal Yolağı (Chang ve ark, 2010)

IL-23, IL-23 reseptörüne (IL-23R) ve IL-12R $\beta 1$ 'e bağlanır. IL-23p19'a bağlanan ve N terminal uçlu immünoglobulin benzeri bir ekstrasellüler domain ve 2 sitokin reseptör domaininden meydana gelen IL-23R, hematopoyetin reseptör ailesinin bir üyesidir (Şekil 1.11.1) (Parham ve ark, 2002). IL-23 reseptörünü kodlayan *IL-23R* geni insanda kromozom 1p31.3'de lokalize olup, 11 ekzon ve 10

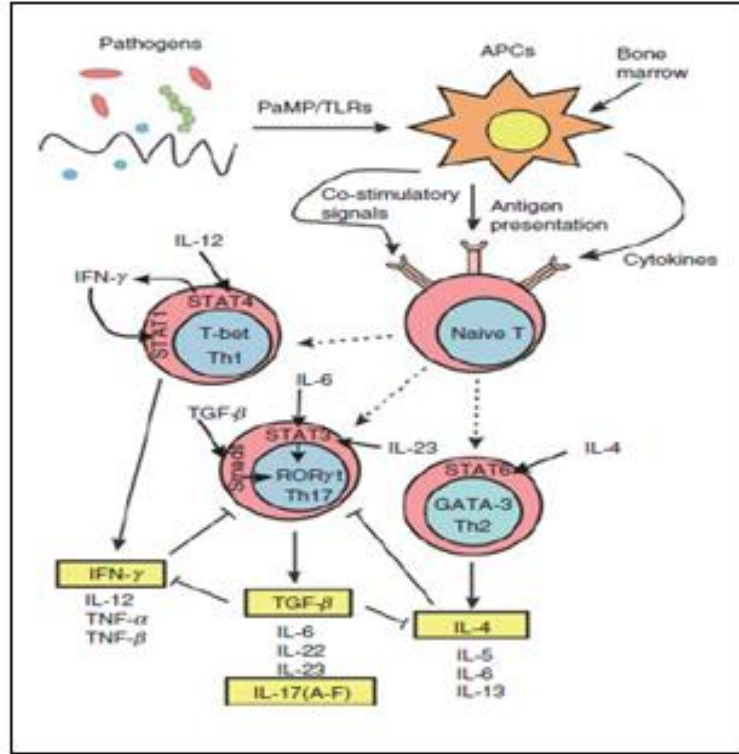
introndan oluşmaktadır (Şekil 1.11.2) (OMIM, 2014). IL-23R'nin çoğunlukla aktive olmuş T hafıza hücreleri, NK hücreleri, monosit/makrofajlar ve Dendritik hücreler (düşük seviyede) üzerinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Van de Vosse ve ark, 2003).



**Şekil 1.11.2:** *IL-23R* geninin p kolundaki lokalizasyonu

IL-23 için sinyal yolağı 2 reseptör zinciri ve sinyalleme proteinlerinden Jak kinaz 2 (Jak2), tirozin kinaz 2 (Tyk2), sinyal ileticisi ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) ve STAT4'den oluşur. IL-23, fosforilasyon için Jak kinazları (Jak2 ve Tyk2) kullanır ve STAT3-STAT4'ü aktive eder. Reseptör kompleksinin uyarılması, fosforilasyonu sağlayan Jak2 ve Tyk2'yi aktifler ve STAT proteinleri için bağlanma noktaları oluşturur. Daha sonra STAT'lar fosforillenir, dimerize olur, nükleusa transfer edilir ve hedef genleri aktive eder (Şekil 1.11.1) (McKenzie ve ark, 2006; Tato ve Cua, 2008)

STAT4'ün fosforilasyonu, artan IFN $\gamma$  üretimi ve Th1 hücrelerinin farklılaşmasını, STAT3 fosforilasyonu ise Th17 hücrelerinin gelişimini sağlar (Şekil 1.11.3) (Ghilardi ve ark, 2004; Kikly ve ark.2006). Bu proses, organizmada herhangi bir patojenik/antijenik karşılaşmada etkenin ortadan kaldırılmasında görev alacak immün sistem hücrelerinin aktivasyonunu sağlayacak sitokin kaskatını organize etmektedir (Mathur ve ark. 2007).

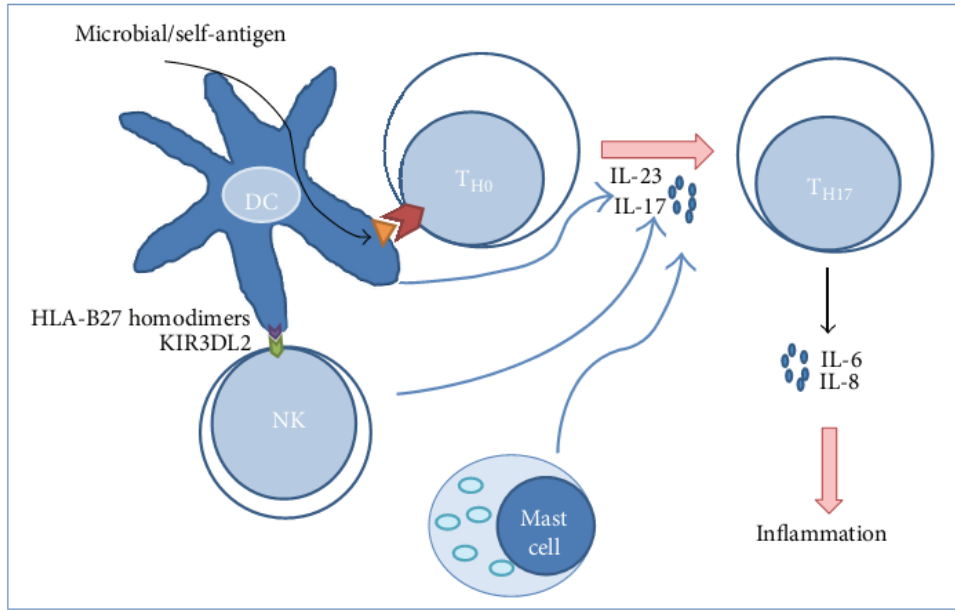


**Şekil 1.11.3:** İnterlökin 23 Reseptör Sinyal Kompleksi (Chang ve ark, 2010)

Naif CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin farklılaşmasında önemli olan IL-12'den farklı olarak IL-23, IL-17, tümör nekroz faktör ve IL-6'yı salgılayan salgılayan CD4<sup>+</sup> T hafıza hücrelerinin (Th17) çoğalmasını düzenler (Şekil 1.11.4) (McKenzie ve ark, 2006; Beadling 2006). IL-12 ise bazı koşullarda otoimmün yanıtlar üzerinde koruyucu etkileri olan Th1 hücre farklılaşmasını indüklemektedir (Vermeire ve ark, 1997).

Sonuç olarak, IL-23 bir IL-12 aile üyesi olmasına ve yapısal benzerliğine rağmen yardımcı T (Th) hücreleri üzerindeki etkisi oldukça farklıdır (Goriely ve ark, 2008). Hem IL-12 hem de IL-23'ün üretimi, nükleer faktör κB'yi (NF-κB) gerektirmesine karşın farklı sinyaller kullanılmaktadır. Sonuçta Th1 ya da Th17 hücre temelli immüniteye yol açan yanıtları tetiklemektedir (Chang ve ark, 2010).

IL-23 birkaç otoimmün inflamatuvar rahatsızlıktaki (kolit, gastrit, sedef ve artirt) rolü ve IL-12'ye yakın benzerliği sayesinde yeni bir pro-inflamatuvar sitokini olarak gösterilmiştir (Oppmann ve ark, 2000). IL-12'ye hem yapısal benzerliği hem de T hafıza hücrelerinin interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) üretim ve çoğalmasını destekleyici özelliğine rağmen IL-17'yi uyarabilme yeteneği IL-12 ile kıyaslandığında IL-23, otoimmün inflamasyonun sürdürülmesi ve ilerletilmesinde önemli bir role sahiptir (Oppmann B ve ark, 2000).



**Şekil 1.11.4:** İnflamasyonda IL-23'ün yardımcı T hücrelerinin Th17'ye farklılaşmasındaki rolü (Zambrano-Zaragoza, 2013)

Yapılan çalışmalar, IL-23'ün hem doğal hem de kazanılmış immün sistemde anahtar rol oynadığını göstermiştir Bazı hayvan modellerinde IL-23 tarafından uyarılan Th17 hücrelerinin otoimmün inflamasyonu yönlendirici merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Th17 hücrelerinden salınan IL-17, monositleri ve endotelial hücreleri proinflamatuvar araçları üretmek üzere uyarır ve böylece nötrofillerin inflamasyon bölgesine göçüne neden olur (McKenzie,2006).

IL-23p19 mRNA ekspresyonunun, hem Crohn hastalığından hem de ülseratif kolitteki inflamasyon bölgelerinden alınan psöriyatik lezyonlarda ve biyopsi



numunelerinde arttığı bulunmuştur (Lee ve ark, 2004; Schmidt ve ark,2005). TNF antagonistleri sedef ve Crohn hastalığının tedavisinde kullanım için onaylanmıştır (Ware, 2005) Bu bulgular IL-23 molekülünün kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (Xinwei ve ark, 2010).

Son zamanlarda farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarda *IL23R* gen polimorfizmleri ile inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) ve sedef hastalığı arasında güçlü bir ilişki olabileceği rapor edilmiştir ( Tremelling ve ark, 2007; Capon ve ark, 2007; Cargill ve ark, 2007)

IBD ve AS arasındaki klinik ve immünolojik yönden benzerlikler nedeniyle, AS gelişimine genetik faktörlerin etkisini araştıran bilimsel çalışmalar, *IL-23R* geni polimorfizmleriyle AS'nin ilişkisine yoğunlaşmıştır (Xinwei ve ark; 2010). Burton ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada AS hastalarında 14.436 nonsinonim SNP (tek nükleotid polimorfizmi) genotiplenmiş ve *IL-23R* polimorfizmleri ile AS arasında ilişki bulunmuştur ( Burton ve ark, 2007).

İngiltere ve Güney Amerika popülasyonlarında *IL-23R*'de bulunan rs11209026, rs1343151 ve rs11209032 polimorfizmleri ile AS'nin ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Burton ve ark, 2007). Bu SNP'lerden rs11209032 intergenik bölgede lokalize olup, aminoasit kodlamamaktadır. Diğer taraftan bu polimorfizmin, mRNA'nın kırılmasında ya da *IL-23R* ve bitişiğinde yer alan *IL-12Rβ2* genleri arasındaki etkileşimde bilinmeyen bir mekanizmayla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Xinwei ve ark, 2010) .

## **1.12 Polimorfizm**

İnsan genomundaki DNA, farklı tipte, kalıtılabilen değişiklikler gösterir. Belirli bir DNA dizisindeki herhangi bir değişikliğe mutasyon adı verilmekle birlikte, mutasyon terimi genellikle bir hastalığa yol açan dizi değişikliği anlamında kullanılmaktadır.

Alel değişikliği - alelik varyant terimi ise, bir hastalığın fenotipini etkileyebilmesine rağmen hastalığa neden olmayan farklılıklar olarak kabul edilir (Claustres, 2004).

DNA dizisindeki varyasyonlar populasyonun %1'inden fazlasında meydana geliyorsa polimorfizm adı verilir. İnsan Genom Projesi kapsamında yapılan DNA klonlama ve dizi analizi çalışmalarında her 100 bazdan birinde polimorfizm olduğu saptanmıştır (İnsan genomunda yer alan polimorfizm örnekleri genel olarak altı grupta değerlendirilir. Bunlar; (Claustres, 2004)

- a) Dizi Polimorfizmi
- b) RFLP Polimorfizmi ( Parça Uzunluk Kesim Polimorfizmi)
- c) Kopya Sayısı Polimorfizmi
- d) VNTR Polimorfizmi (Variable Number Tandem Repeat)
- e) STR Polimorfizmi (Short Tandem Repeat)
- f) Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) dir.

### **1.12.1 Tek Nükleotid Polimorfizmi**

DNA dizi varyantlarının en yaygın tipi tek nükleotid polimorfizmidir İnsan genomunda yaklaşık 27 milyon SNP bulunduğu bildirilmiştir. Canlı genomunda gizli kalmış bu farklılıklar, ilk basamakta canlının çevreye uyumu ve yaşamı için gerekli görünmese bile bir zaman sonra, canlıyı avantajlı duruma dönüştürecek preadaptasyon niteliğindeki varyasyonlardır (Claustres, 2004).

Polimorfizm örnekleri, DNA'nın kodlanmayan bölgeleri arasında bulunan, genler arası ve gen yapısında bulunan intronlarda bulunmasının yansı sıra promotor dizilerinde de bulunur. Bu nedenle gen ekspresyonunun doğru zamanda doğru yerde ve doğru miktarda olmasını sağlayan tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesi kanser, yaşlanma, tansiyon, obezite ve kalp gibi bazı poligenik hastalıkların takibi ve risk gruplarının belirlenmesinde önemli olmaktadır (Lüleyap, 2008).

Polimorfizmler populasyonda düşük sıklıkta olmasına karşın bazı durumlarda çok önemlidirler. Polimorfizimlerin yaklaşık %90'nını oluşturan ve insan genomunun yüksek çeşitliliğinin doğal etkeni olan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) belirli hastalıklara yatkınlığı artırabilir ya da azaltabilir. Bu etkilerini de, ilaç yanıtını değiştirmelerinde olduğu gibi, fizyolojik fonksiyonları düzenleyerek veya bozarak yaparlar. SNP genotipleme genetik haritalama, farmakogenetik çalışmalar, etken madde araştırmaları ve populasyon genetiğini de içine alan geniş bir yelpazedeki genetik çalışmalar için son yıllarda tercih edilen bir teknoloji haline gelmiştir. SNP'ler bu etkilerini ya ilaç yanıtını değiştirerek, ya da fizyolojik fonksiyonları düzenleyerek veya bozarak yapar (Solak ve ark, 2000).

Dünya üzerindeki tüm nükleotid varyasyonlarının aynı veri tabanında bulunması için, akademik ve endüstriyel birikimlerin ortaklığıyla bir konsorsiyum oluşturulmuştur. Bu veri tabanında (NCBI: National Center for Biotechnology Information-dbSNP) 12 milyondan fazla varyasyon (kısa ardı ardına tekrarlar, tek nükleotid polimorfizmleri, insersiyon/delesyonlar) bulunmaktadır. Bu site aracılığıyla şimdiye kadar belirlenmiş SNP'lerle ilgili bilgilere ulaşılabilir (Lüleyap, 2008).

### **1.13 Mutasyon Analiz Yöntemleri**

Mutasyon analizi, çeşitli doku ve hücrelerden elde edilen DNA ve RNA molekülleri üzerinde, genlerin yapısı ve genlere bağlı bozuklukların mutasyonlarla ilişkisini anlamak amacıyla yapılan moleküler uygulamaları kapsar. Mutasyon analizinin birinci aşamasında olan DNA izolasyonu için çok farklı teknikler geliştirilmiş olmakla birlikte genelde ucuz ve toksik kimyasallar içermemesi nedeniyle Miller'ın tuzla çöktürme yöntemi uygulanır (Claustres, 2004).

Mutasyon tespitinde kullanılacak yöntemin seçiminde, hastalık ile ilgili mutasyonun bilinmesi çok önemlidir. Bilinen mutasyonların yönteminde direkt analiz yöntemi uygulanır. Eğer hastalıkla ilgili gen biliniyor ve aynı hastalığın ortaya

çıkmasında değişik mutasyonlar rol oynuyorsa, mutasyon tarama yöntemleri uygulanır (Tablo 1.13.1).

**Tablo.1.13.1:** Mutasyon Analiz Yöntemleri (Claustres, 2004)

<b>Mutasyon Türü</b>	<b>Analiz Yöntemi</b>
<b>Bilinen Mutasyonlar</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Restriksiyon Fragment Analiz Yöntemi</li> <li>2. Alele Özgül Oligonükleotid Hibridizasyon Yöntemi</li> <li>3. Alele Özgül Amplifikasyon Yöntemi</li> <li>4. Tek Nükleotid Primer Uzaması veya Mini Dizi Analizi Yöntemi</li> <li>5. Alele Özgül Ligasyon Yöntemi</li> <li>6. Eş zamanlı PCR Sistemi</li> <li>7. Alele Özgül Nükleotid Birleşmesi Yöntemi</li> <li>8. Yüksek-dansiteli Oligonükleotid Dizilimleri <ul style="list-style-type: none"> <li>- DNA Çipleri</li> <li>- Hibridizasyon Çipleri</li> <li>- Mini Dizileme Çipleri</li> </ul> </li> <li>9. PCR Yöntemi Kullanılmadan Mutasyon Tayini <ul style="list-style-type: none"> <li>- Üçüncü Dalga Teknolojisi</li> </ul> </li> <li>10. Rolling Circle Amplifikasyon Yöntemi</li> <li>11. PNA ve LNA Probları ile Analiz</li> </ol>
<b>Bilinmeyen Mutasyonlar</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yapısal Değişiklikleri Saptayan Yöntemler <ul style="list-style-type: none"> <li>- Denatüre Edici Gradyent Jel Elektroforezi Yöntemi</li> <li>- Heterodubleks Analiz Yöntemi</li> <li>- Denatüre Edici Yüksek-Performans Sıvı Kromatografisi Yöntemi</li> <li>- Tek Sarmallı Yapısal Polimorfizm Yöntemler</li> </ul> </li> <li>2. Yanlış Baz Eşleşmesinin Tanınması Temelli Yöntemi <ul style="list-style-type: none"> <li>- Yanlış Eşleşmelerin Ribonükleaz Enzimiyle Kesimi Yöntemi</li> <li>- Yanlış Eşleşmelerin Kimyasal Yolla Kesimi Yöntemi</li> <li>- Yanlış Eşleşmelerin Enzimlerle Kesimi Yöntemi</li> <li>- Baz Çıkarma Dizi Taraması Yöntemi</li> <li>- Mismatch Bağlanan Proteinler(Muts ve Homologları)</li> </ul> </li> <li>3. Mutasyonların Peptid Seviyesinde Saptanması <ul style="list-style-type: none"> <li>- Protein Kesme Testi Yöntemi</li> </ul> </li> <li>4. DNA Dizi Analizi Yöntemleri <ul style="list-style-type: none"> <li>- Maxam- Gilbert Tekniği</li> <li>- Sanger Tekniği</li> <li>- Pyro-sequencing Tekniği</li> <li>- mRNA analizi</li> </ul> </li> </ol>

Hastalığa neden olan gen ve mutasyonların kesin olarak bilinmediği durumlarda ise, hastalığın görüldüğü aile bireylerine ait DNA örneklerinde, şüpheli aday gen içinde veya yakınında polimorfizm gösteren referans noktası / noktaları analiz edilerek hastalıktan sorumlu gen veya kromozom tespit edilmeye çalışılır. (Tablo 1.13.1).

### **1.13.1 Eş Zamanlı PCR Yöntemi**

Moleküler genetikte yaygın olarak kullanılan yöntemlerin çoğu, hedef molekülün polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltılması esasına dayanır. PCR yöntemi ile çoğalma süresince floresan ölçümler yapabilen eş zamanlı PCR cihazlarının gelişmesi ile kantitatif sonuçlar elde etmek ve tek tüpte farklı mutasyonları eş zamanlı olarak belirlemek mümkün hale gelmiştir.

Higuchi ve arkadaşları tarafından geliştirilen eş zamanlı PCR'nin temel amacı, çok düşük miktarda olsa bile bir örnekteki spesifik nükleik asit dizilerini kesin şekilde ayırmak ve ölçmektir. PCR'in, modern floresan kimyasallarla birleşmesi ve amplifikasyonun reaksiyon boyunca izlenmesi eş zamanlı PCR'in temelidir. Eş zamanlı PCR'da bir örnekteki spesifik bir hedef dizi amplifiye olur ve sonrasında floresan teknoloji ile amplifikasyonun ilerleyişi görüntülenir (Claustres, 2004)

Eş zamanlı PCR'nin avantajları, hız, kopyalama oranında artış, kontaminasyon riskinde azalma, otomasyon imkanı ve PCR reaksiyonunu eş-zamanlı olarak gözlemeye izin vermesidir. Ayrıca klasik yöntemlerdeki gibi, başlangıç materyalinin miktarını tam olarak ölçmeye de imkan verir. Direk olarak saptanan sinyal, biriken PCR miktarı ile ilişkilidir (Claustres, 2004).

Bu yöntemin geliştirilmesinden sonra, birçok farklı yöntem daha ortaya konmuş ve çok farklı şekillerde birçok eş zamanlı PCR cihazı giderek artan sayıda

üretilmiştir. Amplifikasyon sürecini göstermek için farklı boya ve problar kullanılmaktadır (Claustres, 2004). Bunlar:

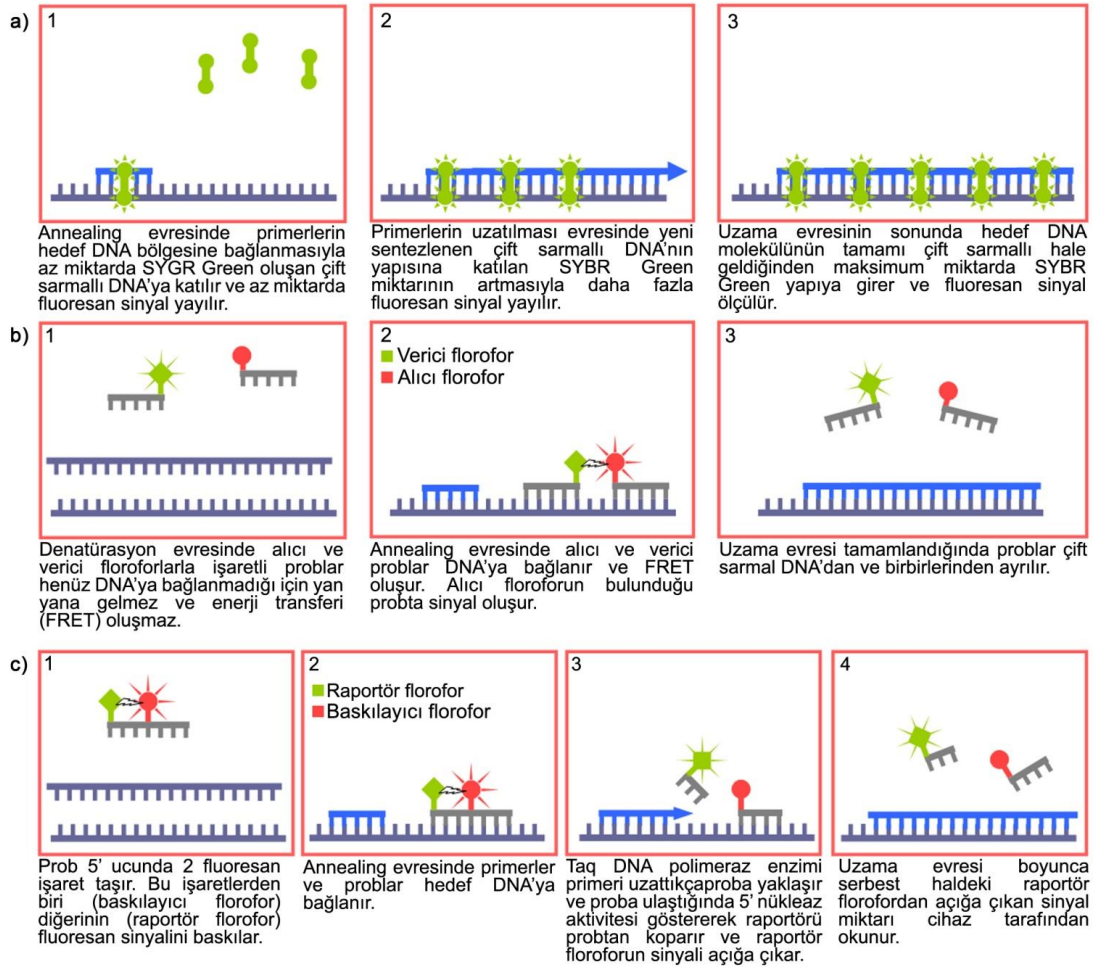
-Dizi spesifik olmayan floresan boyalar: Bu tür boyalar DNA molekülünün tamamına bağlanabilen boyalardır. Sıklıkla kullanılan SYBR Green boyası, çift sarmallı DNA'ya bağlanarak floresan sinyallerin artmasını sağlar ve genellikle gen dozajını belirlemek için kullanılır (Şekil 1.13.1.1a) (Claustres, 2004)

-Dizi spesifik floresan problar: Hedef diziyeye özgül ve floroforlarla işaretli problardır. Spesifik DNA dizisi mevcut ise reaksiyona katılırlar. Dizi spesifik problar hibridizasyon ve hidroliz problemlerini içerir (Claustres, 2004).

-Hibridizasyon problemleri: Fluorescence Resonance Energy Transfer "FRET" prensibi ile çalışırlar. FRET, 3' ucu floresan işaretli bir verici probdan yakındaki 5' ucu floresan işaretli alıcı proba enerji transfer etme işlemidir. Bu transfer işlemi sonucunda oluşan floresans sinyal miktarı ortamdaki hibridizasyonun dercesine diğer bir deyişle PCR siklusu süresince oluşan ürünlerin miktarına bağlı olarak artmaktadır. Eksitasyon ve emisyonları birbiri üzerine çakışan iki florofor, fiziksel olarak birbirine yakın ise, bir floroforun eksitasyonu ikinci floroforu uyararak floresan ışımaya neden olacaktır (Şekil 1.13.1.1b). Hibridizasyon problemleri genellikle erime eğrisi analizi ile tek nükleotid değişimlerinin saptanması için kullanılır (Claustres, ,2004)

-Hidroliz problemleri (TaqMan): Taq polimerazın 5'-3' nükleaz aktivitesinden yararlanan prob sistemidir. Mutasyon tayini, PCR amplifikasyonu sonrası iki alele özgül rapörtör boyanın sinyal yoğunluğunun ölçülmesiyle yapılır. Yöntemin esası, 5' ve 3' uçlarından florofor maddelerle işaretli prob kullanılmasına dayanır. Probun 5' ucunda rapörtör florofor, 3' ucunda ise baskılayıcı florofor bulunmaktadır. Prob – hedef DNA molekülü arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece rapörtör floroforun sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florofor tarafından engellenmektedir (Claustres, 2004).

-Primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasıyla başın primer uzaması, probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5' – 3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florofor serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde meydana gelen PCR ürünü miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artar (Şekil 1.13.1.1c)



**Şekil 1.13.1.1:** Eş zamanlı PCR yönteminde yaygın kullanılan boya ve prob türleri a) SYBR Green boyası b) Hibridizasyon probları c) Hidroliz probları (TaqMan) (Roche Applied Science, Technical Note, No. LC 18/2004)

### **1.13.1.1 LightCycler Sistemi**

LightCycler sisteminin özelliği PCR'ı floresan ölçüm sistemi ile birleştirerek, DNA amplifikasyonunun eş-zamanlı izlenmesini sağlamaktır. Sistemde, normal PCR'da kullanılan primerlere ek olarak, floresan işaretli iki prob kullanılmıştır. Problardan biri polimorfik bölgeye, diğeri yakınına spesifiktir. Bu yöntemde genotiplerin ayırt edilmesi erime eğrisi analizi ile gerçekleştirilmektedir. Erime eğrisi analizi için, DNA amplifikasyonun tamamlanmasından sonra, sıcaklık kademeli olarak yükseltilir ve her bir örnek için erime eğrisi elde edilir. Polimorfik dizi ile floresan işaretli prob arasında oluşan yanlış eşleşme sonucu oluşan heterodupleks, normal dizi ile prob arasında oluşan duplekse oranla daha az stabildir.

Bu durum, polimorfizm içeren dupleksin daha düşük bir erime noktasına sahip olmasına ve sıcaklık yükseltilmesi sırasında daha düşük bir sıcaklıkta ayrışmasına yol açmaktadır. Matematiksel bir dönüşüm kullanılarak erime eğrilerinden floresan değerinin negatif türevinin sıcaklığa göre değişimini veren profiller elde edilerek değişik allellere ait farklı erime sıcaklıkları gösteren eğriler izlenmektedir ( Lohmann ve ark;2004)

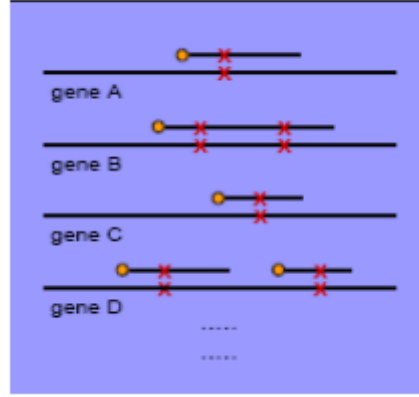
### **1.13.2 Ters Hibridizasyon Yöntemi**

Günümüzde çevresel etkenlerin birçok genetik faktörle etkileşimi sonucu meydana gelen multifaktöriyel hastalıklara yatkınlıkların tayin edilmesinde birçok polimorfizmin aynı anda belirlenebilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden biri ters hibridizasyon yöntemidir. Bu yöntem, hedef genlerin biyotin işaretli primerler ile multipleks PCR sonrasında nitroselüloz membranlar (stripler) üzerindeki tamamlayıcı problemleri ile hibridizasyonu ve konjugat-substrat reaksiyonu ile bu membranların (stripler) gösterilmesine dayanır (Kaynak, 2007)



Ters Hibridizasyon Yöntemi 3 aşamadan oluşmaktadır

1. Genomik DNA'nın İzolasyonu: Kan, doku ve serum gibi vücut sıvı ve doku örneklerinden genomik DNA izole edilir.
2. Multipleks PCR: Biotinle işaretli primerler kullanılarak aynı anda birden fazla gen bölgesi çoğaltılır (Şekil 1.13.2.1).
3. Ters Hibridizasyon: PCR ürünlerinin membran (strip) üzerine emdirilmiş komplementer oligonükleotit proplarla hibridizasyonudur (Şekil 1.13.2.2).

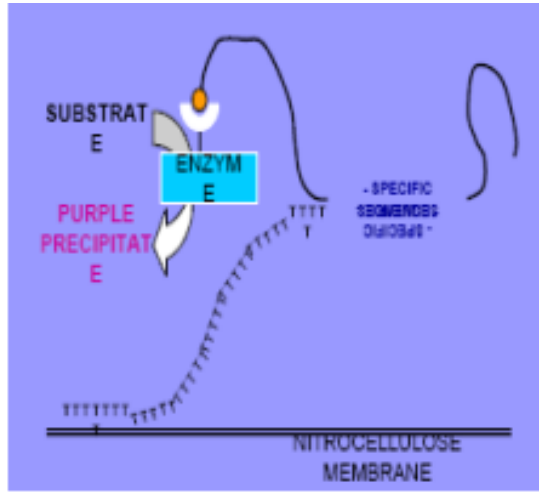


**Şekil 1.13.2.1:** Biotin işaretli primerler ile Multipleks PCR ( Kaynak, 2007)

Hibridizasyon işlemi 5 basamaktan oluşur (Kaynak, 2007):

1. Hibridizasyon: PCR ürünleri %1.6 NaOH içeren DNAT solüsyonu ile karıştırılarak denatüre edilirler. Uygun sıcaklıkta (örneğin 45<sup>0</sup>C'de) inkübe edilerek denatüre PCR ürünleri ve strip üzerindeki komplementer oligonükleotit propların hibridizasyonu sağlanır.
2. Sert Yıkama: Hibridizasyondan sonra yüksek sıcaklıkta ortamda bağlanmamış PCR ürünlerinin uzaklaştırılması sağlanır.
3. Konjugat: Streptavedin-peroksidaz ya da alkalin fosfataz içeren konjugat solüsyonu PCR aşamasında biotinle işaretli uçlara bağlanır ve biotin-strepteavidin kompleksleri oluşur.

4. Yumuşak Yıkama:  $\text{NaN}_3$  içeren bir solüsyon kullanılarak biotin-strepteavidin kompleksi oluşturmayan konjugat ortamdan uzaklaştırılır.
5. Substrat: NBT ve BCIP içeren substrat ile konjugat reaksiyona girer. Konjugat substratı katalizler ve strip üzerinde bantlar şeklinde renk oluşumunu sağlar.



Şekil 1.13.2.2: Ters Hibridizasyon ( Kaynak, 2007)

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Gereçler

#### 2.1.1 Materyal Seçimi

Çalışmamıza, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Polikliniği'ne başvuran dışlama kriterleri dikkate alınarak belirlenmiş AS tanısı almış ortalama  $38.91 \pm 10.00$  yaşında, 106 (18.kadın/89 erkek) olgu ve AS, romatoid artrit veya diğer SpA'lar dışında bir rahatsızlığı nedeni ile başvuran ortalama  $32.15 \pm 7.07$  yaşında sağlıklı 82 (12 kadın/70 erkek) birey dahil edildi.

AS olguları 2002 Modifiye New York Tanı Kriterleri dikkate alınarak belirlendi. Çalışmaya inflamatuvar veya malign hastalıkları olan olgular ve çalışmayı tamamlayacak yetiye sahip olmayanlar dahil edilmedi.

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait kan örnekleri Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıbbi Etik Kurulu kararlarına uygun olarak, gönüllü olur formlarının imzalanmasını takiben toplandı. Kan örnekleri pıhtılaşmayı engellemek için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere alındı ve DNA izolasyonu yapıncaya kadar  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. İzole edilen DNA'lar ise  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilerek çalışmaya hazır hale getirildi.

#### 2.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmanın DNA izolasyonu aşamasında High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics, Almanya) kiti kullanıldı. Olgu ve kontrol grubunda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotiplemesi için LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Almanya), ve LightSNIP *IL-23R* rs11209032 Reagent Mix (Tıbbi Molbiol, Almanya) kitleri kullanıldı. Olgu grubunda HLA-B27(+)/(-) dağılımı, HLA-B27 StripAssay® (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) kiti kullanılarak belirlendi.

### High Pure PCR Template Preparation Kiti İçeriği

Etiket	İçerik / zellik	Miktar	Kullanım Şekli
Tissue Lysis Buffer	4 M re	20 ml	
Binding Buffer	6 M guanidin HCl	20 ml	
Proteinaz K	Liyofilize halde, rekombinant		Bidistile H <sub>2</sub> O'da(4.5ml) zld, alikotlanarak kullanılmaya kadar - 20°C de bekletildi.
Inhibitor Removal Buffer		33 ml	Kullanmadan önce 20 ml absolü etanol eklendi
Wash Buffer		20 ml	Kullanmadan önce 80 ml absolü etanol eklendi
Elution Buffer	10 mM Tris Buffer, pH 8,5	40 ml	Kullanmadan nce 70°C'ye ıstıldı
High Pure Filtre Tüpleri		100 adet	
Toplama Tüpleri		400 adet	

### LightCycler  FastStart DNA Master HybProbe Kiti İçeriği

Solüsyon	İçerik	Miktar	Kullanım Şekli
LightCycler DNA Master HybProbe, 10x Konsantre	Taq DNA polimeraz, reaksiyon buffer,d NTP miks ve 10 mM MgCl <sub>2</sub> içerir.	60 l	PCR miksi için kullanıma hazır
25 Mm MgCl <sub>2</sub> Stok Solüsyon		1×1 ml	Kullanıma hazır
PCR Grade H <sub>2</sub> O		2×1 ml	Kullanıma hazır

### LightSNIP rs 11209032 Reagent Mix İçeriği

Solüsyon	İçerik	Kullanım Şekli
LightSNIP rs 11209032 IL-23R Reagent Mix	rs11209032 probu içerir	100 l 'lik PCR grade H <sub>2</sub> O ile sulandırılarak kullanıma hazır hale gelir

### HLA-B27 StripAssay  Kit İçeriği

<b>Solüsyon</b>	<b>Miktar</b>	<b>Kullanım Şekli</b>
Lizis Solüsyon	50 ml	Kullanıma hazır
GEN <sup>x</sup> TRACT Resin	5 ml	Kullanıma hazır
Amlifikasyon miski	500 µl	Kullanıma hazır
Taq Dilution Buffer	500 µl	Kullanıma hazır
DNAT	1.5 ml	Kullanıma hazır
Typing Trays	3	Kullanıma hazır
Teststripleri	20	Kullanıma hazır
Hibridizasyon Buffer	25 ml	Kullanıma hazır
Wash Solution A	25 ml	Kullanıma hazır
Konjugat Solüsyonu	25 ml	Kullanıma hazır
Wash Solüsyon B	80 ml	Kullanıma hazır
Color Developer	25 ml	Kullanıma hazır

### 2.1.3 Kullanılan Cihazlar

<b>Cihaz Adı</b>	<b>Marka-Model</b>
Eş Zamanlı PCR	LightCycler <sup>®</sup> 480 System, Roche Diag., Almanya
Auto-Lipa	Tecan ProfiBlot T48, Avusturya
Thermal Cycler	Eppendorf Mastercycler personal
Spektrofotometre	Nanodrop ND-1000
Santrifüj	IKA <sup>®</sup> VIBRAX VXR basic, himacCT15E
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu	Arçelik
Hot Plate	Nüve
Mikropipetler	Eppendorf, Thermo
Vorteks	Velp

## 2.2 Yöntemler

Bu çalışmada, AS tanılı olgular ve sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örneklerinden genomik DNA elde edildi. AS'li olgulara ait DNA örneklerinde HLA-B27(+)/(-) dağılımı ters hibridizasyon yöntemi ile belirlendi. Olgu ve kontrol grubuna ait DNA örneklerinde *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi eş zamanlı PCR yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Deneysel aşamaların uygulama sırası şöyledir:

### 2.2.1 DNA İzolasyonu

Olgu ve kontrollere ait kan örnekleri, pıhtılaşmayı engellemek için EDTA'lı tüplere alındı ve DNA izolasyonu yapıncaya kadar +4 °C'de saklandı. Toplanan periferik kan örneklerinden genomik DNA, High Pure PCR Template Preparation kiti ile aşağıda verilen işlem basamakları uygulanarak izole edildi.

1. Örneğin isim ve DNA numarası bilgileri eppendorf tüpe ve takip defterine yazılarak kayıt altına alındı.
2. 200 µl periferik kan eppendorf tüpe kondu.
3. Üzerine 200 µl Binding buffer ve 40 µl Proteinaz K eklendi ve pipetajla karıştırıldı.
4. 10 dakika 72°C'de inkübe edildi.
5. Üzerine 100 µl izopropanol ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı.
6. Karışım High Pure filtre tüpüne aktarıldı.
7. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Toplama tüpü değiştirildi.
9. High Pure filtre tüpüne 500 µl İnhibitör Removal Buffer kondu.
- 10.10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 11.Toplama tüpü değiştirildi.
- 12.High Pure filtre tüpüne 500 µl Wash Buffer kondu.
- 13.10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi
- 14.High Pure filtre tüpüne 500 µl Wash Buffer eklendi
- 15.Toplama tüpü değiştirildi.

- 16.10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi
- 17.13.000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi
- 18.High Pure filtre tüpü eppendorf tüpe aktarıldı
- 19.High Pure filtre tüpüne 40 µl 70°C'de bekleyen Elution Buffer kondu.
- 20.1 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 21.10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 22.High Pure filtre tüpüne su banyosunda 70°C'ye ısıtılan 40 µl Elution Buffer kondu.
- 23.Bir dakika oda sıcaklığında inkübasyonu takiben 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 24.İşlem basamakları sonunda 80 µl çözücü içinde çözülmüş genomik DNA elde edildi.
- 25.İzolasyon sonrası elde edilen her örnek için DNA miktar ve saflık tayini spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) kullanılarak ölçüldü.
- 26.DNA örnekleri etiketlenerek analize kadar -20 °C'de saklandı.

### 2.2.2 DNA Miktar ve Saflık Tayini

1. DNA miktar ve saflık tayini için spektrofotometre olarak Nanodrop ND-1000 kullanıldı.
2. Cihazın bağlantısının olduğu bilgisayar ekranında ana menüden Nükleik Asit Uygulama Modülü tıklandı.
3. Ölçülecek nükleik asit tipini seçmek için renkli anahtar kullanıldı. dsDNA için 'DNA -50' seçildi.
4. Örnekleme kolu açıkken 1,5 µl distile su örneği alt ölçüm tabanına pipetlendi, örnek kolu kapatıldı, blank tuşuna basıldı ve ölçüm yapıldı. Yumuşak bir laboratuvar sileceği ile örnekleme kolu silindi.
5. Sıfırlama solüsyonu (izolasyonda kullanılan tampon çözelti) yeni bir örnekmiş gibi analiz edildi. Bu işlem measure butonuna basılarak yapıldı.
6. Sırayla örnekler, örnekleme koluna yüklenerek ölçümleri yapıldı.
7. 260/280 nm ve 260/230 nm deki absorbanslarının oranları dikkate alınarak saflık değerlendirilmesi yapıldı. 260 ve 280 nm deki absorbanslarının oranı

örnek DNA'ların saflığını değerlendirmek için kullanıldı. ~1,8 DNA için saflık derecesi olarak kabul edildi.

### **2.2.3 *IL-23R* Geni rs11209032 Polimorfizminin Genotiplenmesi**

*IL-23R* geni rs11209032 polimorfizminin analizi LightCycler®FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Almanya) ve LightSNIP rs11209032 *IL-23R* Reagent Mix (TIB MOLBIOL, Almanya), kitleri kullanılarak yapıldı. *IL-23R* genindeki rs11209032 polimorfizmini içeren fragment amplifiye edildi. Amplikon, PCR döngülerinin annealing fazında hibridize olan spesifik probalar kullanılarak floresan ile belirlendi.

#### **2.2.3.1 Reaksiyon Karışımının Hazırlanması ve Örneklerin LightCycler Cihazına Yüklenmesi**

Reaksiyon karışımı hazırlanmadan önce LightCycler®480 cihazı açıldı ve cihazın self-test yapması sağlandı. Daha sonra sisteme önceden yüklenmiş olan *IL-23R* rs 11209032 polimorfizminin analizinde kullanılacak protokol seçildi. Hasta listesi girişi yapıldı ve sistem çalışma için hazır duruma getirildi. Reaksiyon karışımı için gerekli olan reaksiyon karışımı ve kontrol solüsyonu aşağıdaki işlem basamakları uygulanarak hazırlandı. Deneysel işlemler aşağıdaki verilen sırayla gerçekleştirildi:

1. Kit kullanılmaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Malzeme tekrar tekrar dondurup çözme işlemlerinden uzak tutuldu.
2. Kullanılan malzemeler (özellikle *IL-23R* Mutasyon Belirleme Karışımı (kırmızı renkli 1A'lı tüp) parlak ışıktan mümkün olduğunca korundu.
3. PCR Master karışımları hazırlanmaya başlanmadan önce Light Cycler®480 açıldı ve cihazın self-test yapması sağlandı. Pass raporu alındıktan sonra önceden yüklenmiş olan aşağıdaki protokol seçildi.
4. Hasta listesi girişi yapıldı ve sistem hazır duruma getirildi. 1,5 ml'lik reaksiyon tüpünde reaksiyon sayısına göre çizelgede verildiği şekilde reaksiyon miksi hazırlandı.



5. İçerisine master mixin bulunduğu 1B (beyaz renkli kapak) tüpünün tamamı içerisinde FastStart enzimin bulunduğu 1A (kırmızı renkli kapak) tüpüne aktarılır. Bu karışım hafif el hareketleriyle karıştırıldıktan sonra spin yapılır.
6. Reaksiyon miksi çalışılacak reaksiyon sayısına göre plate kuyucuklarına dağıtıldı.

#### Reaksiyon karışımının içeriği

Solüsyon	Miktar
H <sub>2</sub> O	13.4 l
Reagent Mix	1.0 l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.6 l
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 l
Total Reaksiyon Karışımı	18 l
rnek DNA / Pozitif Kontrol / Negatif Kontrol	2 l
Toplam	20 l

7. Platedeki her kuyucuğa 18 l reaksiyon karışımı dağıtıldı. Platedeki kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi. Hava kabarcığı oluşmuşsa plate uygulanan vibrasyon hareketiyle meydana gelen hava kabarcığı yok edildi.
8. Her çalışmada bir negatif ve bir pozitif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol için ilk kuyucuğa 2 l PCR grade su, pozitif kontrol için ise son kuyucuğa heterozigot genotipe sahip olduğu bilinen DNA örneğinden 2 l eklendi.
9. Diğer kuyucuklara analiz edilecek örnekler sırasıyla 2'şer l dağıtıldı.
10. Platedeki kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığı tekrar kontrol edildi. Hava kabarcığı oluşmuşsa plate uygulanan vibrasyon hareketiyle meydana gelen hava kabarcığı yok edildi.
11. Plate'in üzeri özel film tabakası ile hava almayacak şekilde kapatıldı.
12. Plate Light®Cycler 480 cihazına yerleştirilerek kapak dikkatlice kapatıldı ve program başlatıldı.
13. Analiz işlemi, 45 döngü sonunda Light Cycler®480'e ait 4.0 analiz programı kullanılarak yapıldı (şekil 2.2.3.1.1).
14. T<sub>m</sub> (melting temperature)'deki +/- 1,5°C'lik sapmalar kabul edildi.

15. Sonuçlar aşağıda verilen bilgilere göre değerlendirildi.

### **Denatürasyon**

<b>Döngü Program Verisi</b>	<b>Değer</b>
Analiz modu	Yok
Döngü sayısı	1
Segment	1
Hedef sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon süresi (hh:mm:ss)	00:10:00
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn) 96	4.4
Yakalama modu	Yok

### **Amplifikasyon**

<b>Döngü Program Verisi</b>	<b>Değer</b>		
Analiz modu	Quantification		
Döngü sayısı	45		
Sıcaklık hedefleri	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Hedef sıcaklık (°C)	95	60	72
İnkübasyon süresi (hh:mm:ss)	00:00:10	00:00:10	00:00:15
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn) 96	4.4	2.2	4.4
Yakalama modu	Yok	Tek	Yok

### **Erime Eğrisi Analizi**

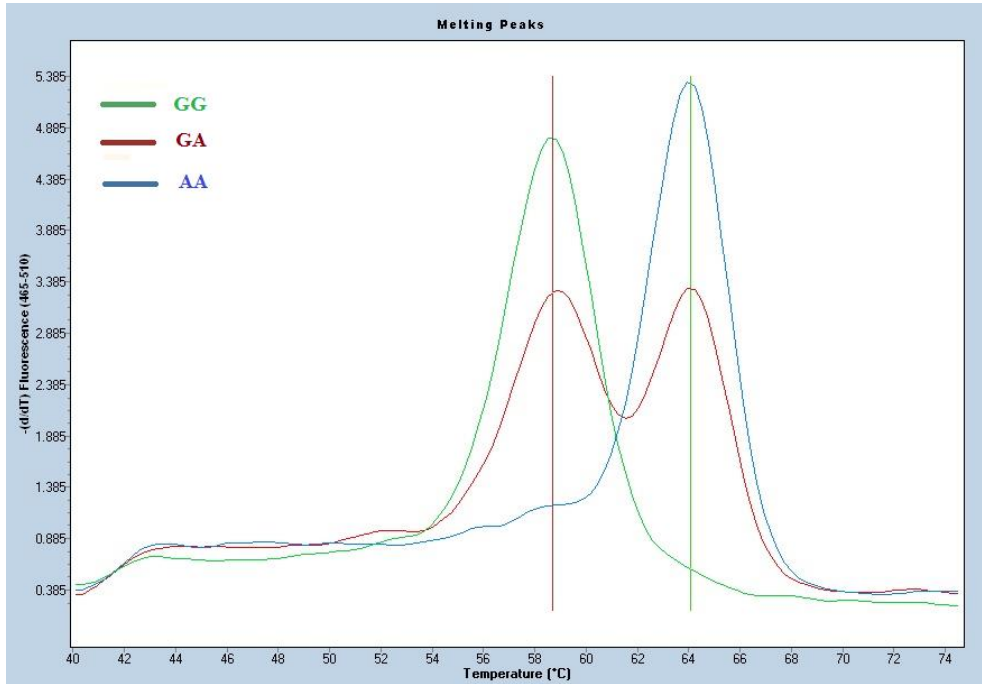
<b>Döngü Program Verisi</b>	<b>Değer</b>		
Analiz modu	Erime Eğrisi		
Döngü sayısı	1		
Sıcaklık hedefleri	1	2	3
Hedef sıcaklık (°C)	95	40	75
İnkübasyon süresi (hh:mm:ss)	00:00:30	00:02:00	00:00:00
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn) 96	4.4	20	0.2
Yakalama modu	Yok	Yok	Sürekli

## Soğutma

Döngü Program Verisi	Değer
Analiz modu	Yok
Döngü	1
Sıcaklık hedefleri	1
Hedef sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon süresi (hh:mm:ss)	00:00:30
Sıcaklık geçiş oranı (°C/sn) 96	1.5
Yakalama modu	Yok

## **IL-23R Geni rs11209032 (G/A) Polimorfizmine Ait Genotip İlişkisi**

	Erime Pik sayısı	Erime pikine ait Tm
<b>Homozigot Normal Genotip (GG)</b>	1	59,28
<b>Heterozigot Genotip (GA)</b>	2	59,28-64,60
<b>Homozigot Mutant Genotip (AA)</b>	1	64,60



**Şekil 2.2.3.1.1:** *IL-23R* geni rs11209032 (G/A) polimorfizmine ilişkin genotiplerin erime eğrisi analizi

## 2.2.4 HLA–B27 Değerlendirilmesi

AS'li olgulara ait DNA örneklerinde HLA-B27(+)(-) dağılımı HLA-B27 StripAssay® (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) kiti kullanılarak ters hibridizasyon yöntemi ile belirlendi. Kit, PCR ve ters hibridizasyon için gerekli tüm solüsyon ve primerleri içermektedir.

### 2.2.4.1 In Vitro Amplifikasyon (PCR)

Olgulardan elde edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu için her örnek için 25µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı.

#### Reaksiyon karışımının içeriği

Solüsyon	Miktar
Amplifikasyon miksi	15 µl
Taq DNA Polimeraz	0.2 µl
Taq Dilution Buffer	4.8 µl
DNA	5 µl (~100 ng)
Toplam	25 µl

HLA-B27 hedef bölgesinin çoğaltılması için seçilen primerlere göre PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dk	}
Denatürasyon aşaması	94 °C' de 15 sn	

Hibridizasyon aşaması	54 °C' de 30 sn	32 Döngü
Sentez (Uzama) aşaması	72 °C' de 30 sn	
Son sentez aşaması	72 °C' de 3 dk	

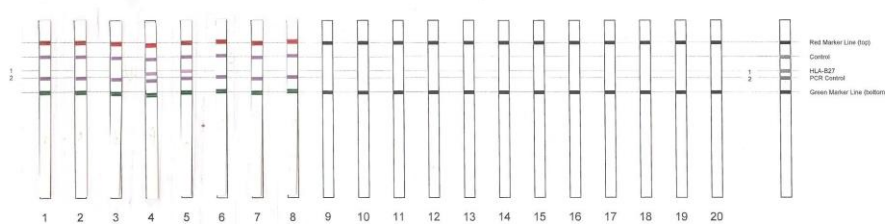
#### 2.2.4.2 Hibridizasyon

1. Çalışma öncesi auto-lipa cihazı hazırlandı.
2. Hibridizasyon ve wash A solüsyonunu ısı bloğu üzerine yerleştirildi. Diğer Solüsyonlar da uygun yerlere yerleştirildi ve içlerine kendi tüpleri kondu.
  - Tubing 1 (yeşil) :Hibridizasyon buffer (45<sup>0</sup>C)
  - Tubing 2 (mavi) :Wash solüsyonu A (45<sup>0</sup>C)
  - Tubing 3 (turuncu) :Wash solüsyon B
  - Tubing 4 (kırmızı) : Konjugat solüsyonu
  - Tubing 5 (beyaz) :dH<sub>2</sub>O
  - Tubing 6 (sarı) : Developer Solüsyonu
3. Cihazın ekranında Run program menüsünde VLAB seçildi.
4. Uygun program seçilerek cihaz 45<sup>0</sup>C'ye kadar ısıtıldı.
5. Daha sonra çalışılacak hasta sayısı kadar strip sayısı girildi.
6. Traydeki kuyucukların üst köşesine 10'ar µl DNAT ve PCR ürünleri sırasıyla konarak, pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek PCR ürünleri denatüre edildi.
7. Daha önceden numaralandırılmış stripler ürüne değmeyecek şekilde ve parlak yüzeyleri alta gelicek şekilde cam bölmenin altına doğru yerleştirildi.
8. Auto-lipa cihazında hibridizasyon programı başlatıldı.
9. Traydeki her bir kuyucuğa 1 ml hibridizasyon solüsyonu konuldu ve homojen renk elde edilene kadar 45<sup>0</sup>C' de 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi.
10. Hibridizasyon solüsyonu tamamen kuyucuklardan boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 45<sup>0</sup>C' de 1 ml wash solüsyonu A ilave edilerek 10 saniye inkübe edildi.
11. Kuyucuklardan wash solüsyon A boşaltıldı. 1 ml wash solüsyonu A tekrar ilave edilerek 15 dakika çalkalamalı inkübe edildi. Tekrar boşaltılarak 1ml

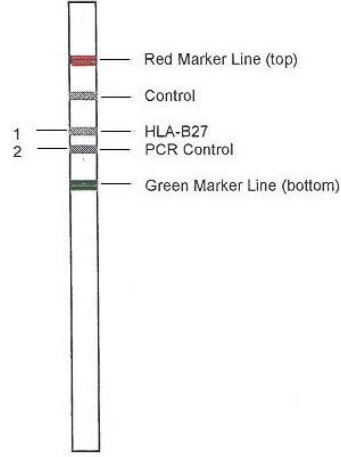
wash solüsyon A ilave edildi. 15 dakika 45°C’de çalkalanarak hibridize olmayan PCR ürünlerinin tamamen uzaklaştırılması sağlandı.

12. Wash solüsyon A kuyucuklardan tamamen boşaltıldı. Bu aşamadan sonra inkübasyon oda sıcaklığında (26°C) devam etti.
13. Her bir kuyucuktaki strip üzerine konjugat solüsyonu eklenerek 15 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Konjugat solüsyonu boşaltıldı.
14. Her bir kuyucuğa 1 ml wash solüsyonu B ilave edilerek 10 saniye inkübe edildi.
15. Kuyucuklardan wash solüsyon B boşaltıldı. 1 ml wash solüsyonu B tekrar ilave edilerek 5 dakika çalkalamalı inkübe edildi.
16. Tekrar boşaltılarak 1 ml wash solüsyon B ilave edildi. 5 dakika çalkalanarak konjugat solüsyonunun tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Kuyucuklar boşaltı.
17. Her bir strip üzerine 1 ml color developer solüsyonu eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında bantların oluşması için 15 dakika çalkalanarak inkübe edildi.
18. Color developer ortamdan tamamen uzaklaştırıldı. Üzerinde bantlar oluşan stripler 2 kez distile su ile yıkanarak kurutuldu.
19. Hibridizasyon sonrası, stripler kolektör kağıtlarına üstte kırmızı alta yeşil markerlar gelecek şekilde yapıştırılarak yorumlandı (Şekil 2.2.4.2.1).
20. Stripin en üst kırmızı markerının altındaki bant kontrol bantıdır ve bütün striplerde çıkması gerekir. Kontrol bantından sonra HLA-B27 ve PCR kontrol bantları gelmektedir (Şekil 2.2.4.2.2).

Collector™ for HLA-B27 StripAssay™							
REF 4-320	LOT						
	use by						
Sample ID	Positive Lines	Genotype	Date/Operator ID	Sample ID	Positive Lines	Genotype	Date/Operator ID
1				11			
2				12			
3				13			
4				14			
5				15			
6				16			
7				17			
8				18			
9				19			
10				20			



**Şekil 2.2.4.2.1:** HLA-B27 StripAssay® Kollektörü ve Striplerin Değerlendirilmesi



**Şekil 2.2.4.2.2:** HLA-B27 Test Stripi

21. Sonuçlar aşağıdaki tabloya göre değerlendirilmiştir (Tablo 2.2.4.2.1).

**Tablo 2.2.4.2.1:** Ters Hibridizasyonda Genotiplendirme

HLA-B27 Bandı	PCR Kontrol Bandı	Genotip
Pozitif	Pozitif	HLA-B27 Pozitif
Negatif	Pozitif	HLA-B27 Negatif
Negatif	Negatif	Çalışma tekrar edilmeli

### 2.2.5 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İstatistik analizleri, SPSS 18.0 programı kullanılarak yapıldı. Olgu ve kontrol gruplarında *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip ve alel frekansları  $\chi^2$  testi kullanılarak karşılaştırıldı. AS açısından aile öyküsü olan ve olmayan hastalarda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı ve *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip dağılımı  $\chi^2$  testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.  $p < 0.05$ 'in altındaki değerler anlamlı değerler olarak kabul edildi.



### 3. BULGULAR

Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'na başvuran ve Modifiye New York kriterlerine göre AS tanısı almış hastalarda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı incelendi. Ayrıca olgu ve kontrol gruplarında *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotiplendirilmesi yapıldı.

#### 3.1 AS Tanılı Hastalarda HLA-B27 Aleli (+/-) Dağılımı

AS tanılı olguların 69'unda (% 65.1) HLA-B27 pozitif, 37'sinde (% 34.9) HLA-B27 negatif olarak bulundu.

Ailesinde (birinci derece akrabalarında) AS öyküsü bulunan olgular ile ailesinde AS öyküsü bulunmayan olgularda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı  $\chi^2$  testi kullanılarak karşılaştırıldı. 106 olgudan 72'nin ailesinde AS öyküsü olup olmadığı bilgisi mevcuttu. Buna göre 72 olgunun 23'nün (%31.94) ailesinde AS öyküsü bulunurken, 49'nun (%68.06) ailesinde AS öyküsü yoktu. Ailesinde AS öyküsü olan grupta 18 (%78.3) bireyde HLA-B27 pozitif, 5 (% 21.7) bireyde HLA-B27 negatif olarak bulundu. Ailesinde AS öyküsü olmayan grupta 30 (%61.2) bireyde HLA-B27 pozitif, 19 (% 38.8) bireyde HLA-B27 negatif olarak bulundu (Tablo 3.1.1).

Ailesinde AS öyküsü olanlar ve olmayanlarda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı açısından fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

**Tablo 3.1.1:** Ailesinde AS öyküsü olan ve olmayan olgularda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı

HLA- B27 (+/-)	Ailesinde AS öyküsü olan olgular (n=23) (%)	Ailesinde AS öyküsü olmayan olgular (n=49) (%)	P
HLA -B27 (+)	18(%78,3)	30(%61.2)	
HLA -B27(-)	5 (%21,7)	19 (%38.8)	0,122

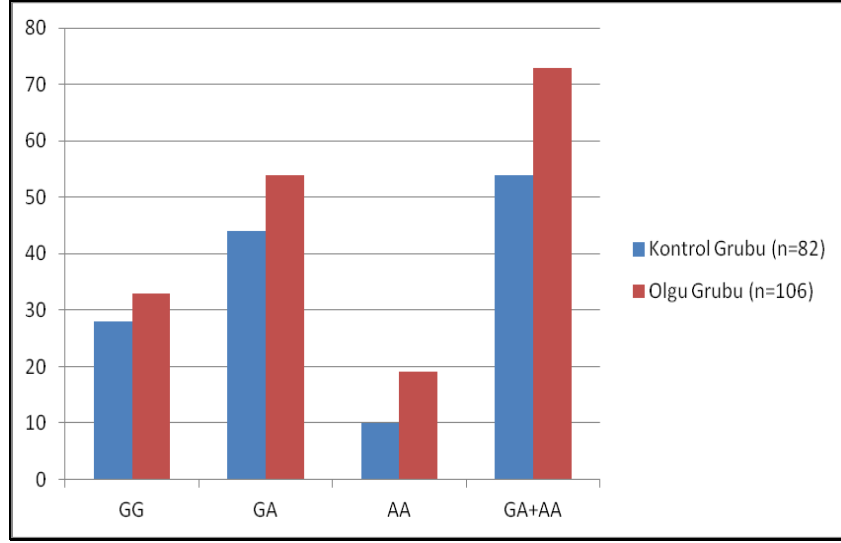
### 3.2 *IL-23R* Geni rs 11209032 Polimorfizmi Genotip ve Alel Frekansı

*IL-23R* geni rs 11209032 (G/A) polimorfizmi bireyde, AA, GG, AG olmak üzere üç farklı çeşit genotip halinde bulunmaktadır. Çalışmamızda *IL-23R* geninde yer alan rs11209032 polimorfizmi, AS tanısı almış 106 olgu ve 82 sağlıklı bireyde değerlendirildi.

Kontrol grubunda, GG genotipine sahip birey sayısı 28 (%34.1), GA genotipine sahip birey sayısı 44 (%53.7) ve AA genotipine sahip birey sayısı 10 (%12.2) olarak bulundu (Tablo 3.2.1, Şekil 3.2.1). AS'li olgu grubunda, GG genotipine sahip birey sayısı 33(%31.1), GA genotipine sahip birey sayısı 54 (%50.9) ve AA genotipine sahip birey sayısı 19 (%17.9) olarak bulundu (Tablo 3.2.1, Şekil 3.2.1).

**Tablo 3.2.1:** Kontrol ve olgu grubunda *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı

Genotip	Kontrol grubu (n=82) (%)	Olgu grubu (n=106) (%)	P
GG	28 (%34.1)	33 (%31.1)	
GA	44 (%53.7)	54 (%50.9)	0.555
AA	10 (%12.2)	19 (%17.9)	
GA+AA	54 (%65.9)	73 (%68.9)	0.754



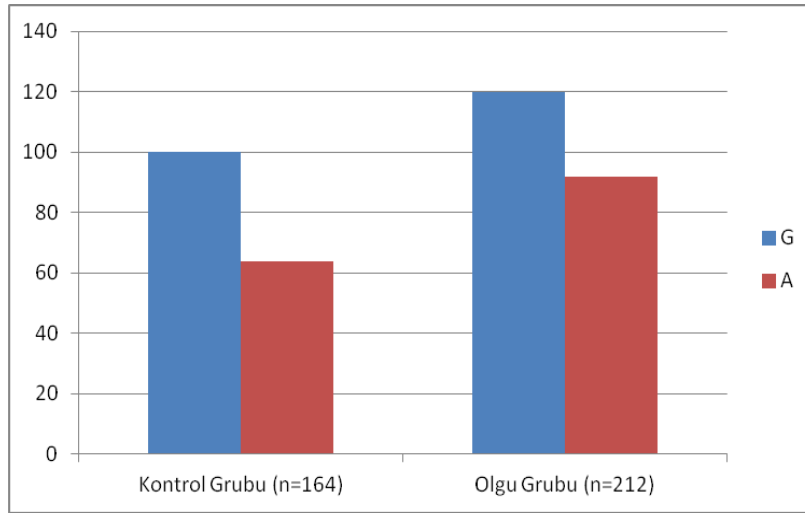
**Şekil 3.2.1:** Kontrol ve olgu grubunda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı

*IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekansları hasta ve kontrol grupları arasında  $\chi^2$  testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, AA, AG ve GG genotipleri açısından iki grup arasında fark bulunmadı (Tablo 3.2.1) ( $p>0,05$ ).

Kontrol grubunda G aleline sahip birey sayısı 100 (%60.98) ve A aleline sahip birey sayısı 64 (%39.02) olarak bulundu. Olgu grubunda G aleline sahip birey sayısı 120 (%56.6) ve A aleline sahip birey sayısı 92 (%43.4) olarak bulundu (Tablo 3.2.2, Şekil 3.2.2). *IL-23R* geni rs11209032 A ve G alel frekansları  $\chi^2$  testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol ve olgu grupları arasındaki fark önemsizdi (Tablo 3.2.2) ( $p>0,05$ ).

**Tablo 3.2.2:** Kontrol ve olgu grubunda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi G ve A alel frekanslarının dağılımı

Alel	Kontrol grubu (n=164) (%)	Olgu grubu (n=212) (%)	OR (% 95CI)	P
G	100 (%60.98)	120 (%56.6)	1.1979 (0.791-1.8141)	0.392
A	64 (%39.02)	92 (%43.4)		



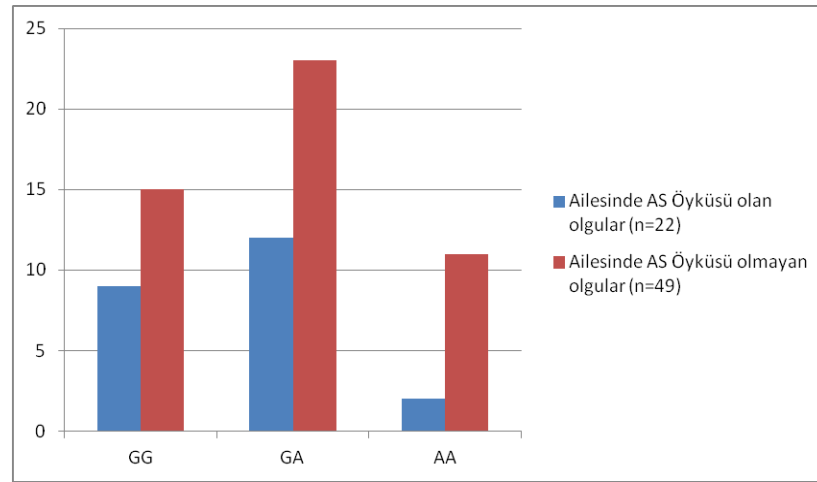
**Şekil 3.2.2:** Kontrol ve olgu grubunda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı

Ailesinde (birinci derece akrabalarında) AS öyküsü bulunan olgular ile ailesinde AS öyküsü bulunmayan olgularda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekansları  $\chi^2$  testi kullanılarak karşılaştırıldı. 106 olgudan 72'sinin ailesinde AS öyküsü olup olmadığı bilgisi mevcuttu. Buna göre 72 olgunun 23'nün (%31.94) ailesinde AS öyküsü bulunurken, 49'nun (%68.06) ailesinde AS öyküsü yoktu. Ailesinde AS öyküsü olan grupta GG genotipine sahip birey sayısı 9 (%39.1), GA genotipine sahip birey sayısı 12 (%52.2) ve AA genotipine sahip birey sayısı 2 (%8.7) olarak bulundu. Ailesinde AS öyküsü olmayan grupta GG genotipine sahip birey sayısı 15 (%30.6), GA genotipine sahip birey sayısı 23 (%46.9) ve AA genotipine

sahip birey sayısı 11 (%22.4) olarak bulundu (Tablo 3.2.3, Şekil 3.2.3). Ailesinde AS öyküsü olanlar ve olmayanlarda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekansları açısından fark bulunmadı (Tablo 3.2.3) ( $p>0,05$ ).

**Tablo 3.2.3:** Ailesinde AS öyküsü olan ve olmayan olgularda *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı

Genotip	Ailesinde AS öyküsü olan olgular (n=22) (%)	Ailesinde AS öyküsü olmayan olgular (n=49) (%)	P
GG	9(%39.1)	15(%30.6)	0.355
GA	12(%52.2)	23(%46.9)	
AA	2( %8.7)	11(%22.4)	



**Şekil 3.2.3:** Ailesinde AS öyküsü olan ve olmayan olgularda *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekanslarının dağılımı

## 4. TARTIŞMA

Ankilozan spondilit (AS) [MIM 106300], omurga ve sakroiliak eklemlerde inflamasyonla karakterize kronik, ilerleyici inflamatuvar bir hastalıktır (Duan ve ark, 2011) Ankilozan spondiliti de içeren spondiloartropatilerin (SpA) gerçek etiyojisi bilinmemekle birlikte patogenezlerinde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (Huang ve Chen, 2013; OMIM, 2014)

AS, %90'dan fazla oranda genetik olarak belirlenen, gelişim riskiyle büyük ölçüde kalıtsal olduğu bilinen bir seronegatif SpA öncül tipidir (Rahman, 2007; Brown, 2008). AS gelişimine MHC bölgesinin genetik katkısı %50'dir. AS'li olguların %90'ında HLA-B27 pozitif olduğu bilinmekle birlikte HLA-B27 AS gelişiminden sorumlu genetik risk faktörlerinin 1/3'den daha azını oluşturur. MHC bölgesine ait HLA-B27 dışında birçok genetik faktör AS gelişiminde rol oynadığı gibi hastalıktan sorumlu MHC bölgesi dışı genetik markerlar da bulunmaktadır (Rahman, 2008) Hastalık konkordansı monozigotik ikizlerde %75, dizigotik ikizlerde ise %15 olarak bildirilmektedir. HLA-B27 pozitif dizigotik ikizlerde konkordansın sadece %27 olması HLA-B27 dışı etkenlerin de genetik yatkınlığa neden olabileceğini düşündürmektedir (Timms ve ark, 2004). AS ile birlikteliği kuvvetli aday genler kromozom 2q üzerinde lokalize IL-1 gen kümesi ve kromozom 1q'da lokalize *IL23R* genidir (Timms ve ark, 2004)

*IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi ile AS arasındaki ilişki ülkemiz populasyonunda ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır.

### 4.1 HLA-B27 Aleli ve Ankilozan Spondilit Arasındaki İlişki

İnsan lökosit antijeni (HLA)-B27, bir major doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf I molekülü olup, kromozom 6p'de kodlanmaktadır (Zambrano-Zaragoza ve ark, 2013).

HLA-B27 aleli ile AS arasındaki ilişki 1973 yılından beri bilinmesine rağmen, bu molekülün hastalık patogenezindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Coşan ve Gül, 2007). AS hastalarının %90'ından fazlasının

HLA-B27 pozitif olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte farklı etnik gruplarda, sağlıklı toplumdaki HLA-B27 sıklığı ve HLA-B27'nin AS'ye genetik yatkınlığına katkısı değişkenlik gösterebilmektedir (Sieper J ve ark, 2006).

Çalışmamızda AS tanılı olguların 69'unda (%65.1) HLA-B27 aleli pozitif, 37'sinde (%34.9) HLA-B27 aleli negatif olarak bulundu. AS'li hastalardaki HLA-B27 aleli pozitiflik oranı açısından çalışma sonuçlarımız ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla uyumludur. Günal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada AS hastalarının yaklaşık olarak %70'inin HLA-B27 pozitif olduğu bildirilmiştir (Günal ve ark, 2008). İnanır ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, AS'li 91 bireyin %74.5'inde HLA-B27 aleli pozitif bulunmuştur (İnanır ve ark, 2012). Bodur ve arkadaşları tarafından Türkiye Romatizma Araştırma Savaş Derneği'ne kayıtlı AS'li hastalar üzerine yapılan bir çalışmada, 41 merkezden toplanan 1381 hasta bireyin 263'ünde (%73.7) HLA-B27 aleli pozitif olarak belirlenmiştir (Bodur ve ark, 2010).

Vojvodić ve arkadaşlarının Sırbistan'da yaptıkları bir çalışmada da bizim sonuçlarımıza benzer olarak 16 AS hastasının 10'nunda (%62.5) HLA-B27 aleli pozitif bulunmuştur (Vojvodic ve ark., 2012) Katarda Abdelrahman ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 119 AS hastasının 82'sinde (%69) HLA-B27 pozitif bulunmuştur (Abdelrahman ve ark, 2012). Hajjalilo ve arkadaşlarının İran'da yaptığı bir çalışmada; 60 AS tanılı hasta bireyin 43'ünde (%71.7) HLA-B27 aleli pozitif, 17'sinde (%29.3) negatif olarak rapor edilmiştir (Hajjalilo ve ark,2014). Yine Tunus (%62) ve İtalya'da (%68-76) yapılan bazı çalışmalarda da AS hastalarındaki HLA-B27 aleli pozitiflik oranı bizim bulgularımızla uyumlu bulunmuştur (Vojvodic ve ark, 2012).

Yapılan bazı çalışmalarda HLA-B27 aleli ve AS arasında güçlü bir ilişki olduğu ortaya konarken, bazı çalışmalarda bu ilişkinin zayıf olduğu belirtilmiştir. Örneğin; Roberts ve arkadaşlarının Yeni Zelanda popülasyonunda yaptıkları bir çalışmada 176 AS hastasından 164'ünde (%93.2) HLA-B27 alelinin pozitif olduğu rapor edilmiştir (Roberts ve ark, 2013). Yine Lin Yi ve arkadaşlarının Çin'de yaptıkları bir çalışmada 360 AS hastasının 336'sında (%93.3) HLA-B27 aleli pozitif

olarak belirlenmiştir (Wang ve ark, 2013) Çin'deki bir diğer çalışmada da Xiong ve arkadaşları tarafından, 386 AS'li bireyden 350'sinde (%90.7) HLA-B27 aleli pozitif, 36'sında (%9.3) negatif olarak bulunmuştur (Xiong ve ark,2014). Diğer taraftan, Sharma ve arkadaşları tarafından Hindistan'da yapılan bir çalışmada, AS'li 40 hastanın 12'sinde (%30) HLA-B27 aleli pozitif, 28'inde (%70) HLA-B27 aleli negatif olarak rapor edilmiştir (Sharma ve ark, 2013)

Çalışmamızda ailesinde (birinci derece akrabalarında) AS öyküsü bulunan olgular ile ailesinde AS öyküsü bulunmayan olgularda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı araştırılmış olup, ailesinde AS öyküsü olan grupta 18 (%78.3) bireyde HLA-B27 aleli pozitif, 5 (%21.7) bireyde negatif olarak bulunmuştur. Ailesinde AS öyküsü olmayan grupta 30 (%61.2) bireyde HLA-B27 pozitif, 19 (% 38.8) bireyde HLA-B27 negatif olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ailesinde (birinci derece akrabalarında) AS öyküsü olanlar ve olmayanlarda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı açısından fark bulunmamıştır.

Sonuç olarak; çalışmamızda ülkemizde ve diğer bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda olduğu gibi, HLA-B27 aleli ile AS arasında bir zayıf bir ilişki görülmüştür. Nitekim HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı ile AS arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Farklı etnik kökenli populasyonlarda yapılan çalışmalarda AS'li hastalardaki HLA-B27 (+/-) alel dağılımındaki çeşitliliğin nedeninin, AS'ye yatkınlıkta rol oynayan diğer genetik faktörlerin birbirleri ve/veya çevresel faktörlerle etkileşiminin katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde yapılan çalışmalarda AS ve HLA-B27 aleli arasındaki ilişki gösterilmiş olsa da bu ilişkinin moleküler mekanizmaları halen net olarak açıklanamamıştır. AS patogenezinin HLA-B27 alelinin katkısının hangi moleküler mekanizmalar ile olduğunu kesin olarak ortaya çıkartmak bundan sonraki çalışmaların amacı olmalıdır.



## 4.2 *IL-23R* Geni rs11209032 Polimorfizmi ve Ankilozan Spondilit Arasındaki İlişki

Interlökin-23 (IL-23), interlökin-12 sitokin ailesinin bir üyesi olup IL-12 p40 alt ünitesi (IL-12B; MIM 161561) ve p19 (IL23A; MIM 605580) alt ünitesinden oluşan heterodimerik bir sitokindir.(OMIM, 2014) IL-23, IL-12 ile ortak kullandığı IL12R $\beta$ 1 reseptör alt ünitesi ve IL-23R'ye bağlanarak sinyal kompleksi oluşturur (Hunter, 2005; OMIM, 2014)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar IL-23'ün hem doğal hem de kazanılmış immün sistemde anahtar rol oynadığını göstermiştir. IL-23 molekülü, çoğunlukla periferel dokularda (McKenzie,2006) (deri, intestinal mukoza, akciğerler) aktive olan dendritik hücrelerde (DCs) ve makrofajlardan salgılanır (Lupardus, 2008).

IL-23, CD4+ yardımcı T hücrelerini; IL-17, tümör nekroz faktör ve IL-6'yı salgılayan Th17 hücrelerine farklılaşması için uyarır. Bu hücreler bazı hayvan modellerinde otoimmün inflamasyonu yönlendirici merkezi bir rol oynarlar. IL-17 monositleri ve endotelial hücreleri proinflamatuvar araçları üretmek üzere uyarır ve böylece nötrofillerin inflamasyon bölgesine göçüne neden olur(McKenzie ve ark.) IL-23p19 mRNA ekspresyonunun, hem Crohn hastalığından hem de ülseratif kolitteki inflamasyon bölgelerinden alınan psöriyatik lezyonlarda ve biyopsi numunelerinde arttığı bulunmuştur (Lee ve ark, 2005, Schmidt ve ark.2005 ) TNF antagonistleri sedef ve Crohn hastalığının tedavisinde kullanım için onaylanmıştır (Ware, 2005) Bu bulgular IL-23R yolağının kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (Wang ve ark.,2010)

Son zamanlarda farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalarda *IL-23R* gen polimorfizmleri ile inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) ve sedef hastalığı arasında güçlü bir ilişki olabileceği rapor edilmiştir (Tremelling ve ark,2007 Capon ve ark., 2007; Cargill ve ark,2007)

Her ne kadar *IL-23R* geni polimorfizmleri IBD ve diğer otoimmün hastalıklara yatkınlıkta önemli bir rol oynasa da, İspanyol popülasyonunda romatoid

artrit veya sistemik lupus eritematozuslu hastalarla yapılan çalışmalarda bir ilişki bulunamamıştır (Orozco ve ark, 2007; Sanchez ve ark, 2007) IBD ve AS arasındaki klinik ve immünolojik yönden benzerlikler nedeniyle, AS gelişimine genetik faktörlerin etkisini araştıran bilimsel çalışmalar, *IL23R* geni polimorfizmleriyle AS'nin ilişkisine yoğunlaşmıştır (Wang ve ark, 2010). Bugüne kadar farklı populasyonlarda yapılan çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bu çalışmalarda *IL23R* geni polimorfizmlerinin AS için koruyucu ya da bir risk faktörü olup olmadığı açıkça belirtilmemiştir (Rueda ve ark, 2008; Davidson ve ark, 2009; Burton ve ark, 2007; Sung ve ark, 2009 )

AS ve *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması ile ülkemiz populasyonuna ilişkin yeni bilgilerin elde edilmesinin amaçlandığı bu çalışmada AS tanısı almış 106 olgu ve 82 sağlıklı bireyde rs11209032 polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları değerlendirildi.

Çalışmamızda *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekansı kontrol grubunda GG %34.1, GA %53.7 ve AA %12.2 olarak, AS'li hastalarda GG %31.1, GA %50.9 ve AA %17.9 olarak belirlendi. Olgu grubunda G aleline sahip birey sayısı 120 (%56.6) ve A aleline sahip birey sayısı 92 (%43.4) olarak, kontrol grubunda G aleline sahip birey sayısı 100 (%60.98) ve A aleline sahip birey sayısı 64 (%39.02) olarak bulundu.

Çalışmamızda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmine ilişkin alel ve genotip frekansları açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark bulunmadı.

Ayrıca çalışma grubumuzda ailesinde (birinci derece akrabalarında) AS öyküsü olanlar ve olmayanlarda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekansları açısından değerlendirildiğinde fark bulunmadı.

Dong ve arkadaşlarının Çin Han populasyonunda yaptığı bir çalışmada, *IL-23R* geni polimorfizmleri (rs7517847, rs11209032, rs17375018) ile AS arasındaki ilişki 291 AS hastası ve 312 sağlıklı bireyde araştırılmıştır. AS hastalarının genotip dağılımı; GG %18.2, AG %51.5 ve AA %30.3, kontrollerde GG %18.9, AG %53.5 ve AA %27.6 olarak bildirilmiştir. Hastalarda A aleline sahip toplam birey sayısı 326 (%56) ve G aleline sahip birey sayısı 256 (%44) dır. Kontrollerde A aleline sahip

birey sayısı 339 (%54.3) ve G aleline sahip birey sayısı 285 (%45.7) dir. Söz konusu çalışmada bizim sonuçlarımızda olduğu gibi genotip ve alel frekansları açısından hasta ve kontrol grupları arasında fark bulunmadığı belirtilmiştir (Hangtoa ve ark,2013).

Pimentel-Santos ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *ERAPI* ve *IL-23R*'nin AS ile ilişkisi araştırılmıştır. Portekiz ve İspanyol popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada 358 AS hastası ve 285 sağlıklı birey yer almıştır. *IL-23R*'de rs11209032 SNP bölgesinin de dahil olduğu 8 SNP bölgesinin genotipleme yapılmıştır. *IL-23R* rs11209032 polimorfizmi A alleli frekansı Portekizli hastalarda %35, kontrollerde %32 ve İspanyol hastalarda A alleli frekansı %32, kontrollerde %31 olarak belirlenmiştir. Çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi *IL-23R* rs11209032 polimorfizmi ile AS arasında, Portekiz ve İspanyol popülasyonlarında ilişki bulunmamıştır (Pimentel Santos ve ark, 2009).

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Çin Han popülasyonunda *IL-23R* geninde rs11209032 ile AS arasındaki ilişki 138 AS hastası ve 129 sağlıklı bireyde araştırılmıştır. AS hastalarının genotip dağılımı; GG %3, GA %92 ve AA %5, kontrollerde GG %13, GA %66 ve AA %21 olarak bildirilmiştir. Hastalarda A aleline sahip toplam birey sayısı 131 (%51) ve G aleline sahip birey sayısı 127 (%49) dır. Kontrollerde A aleline sahip birey sayısı 139 (%54) ve G aleline sahip birey sayısı 119 (%46) dir. Söz konusu çalışmada bizim sonuçlarımızda olduğu gibi alel frekansları açısından hasta ve kontrol grupları arasında fark bulunmadığı belirtilmiştir. Diğer taraftan bizim çalışmamıza zıt olarak bu çalışmada genotip frekansları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında fark bulunmuştur (Wang ve ark, 2010).

Karaderi ve arkadaşlarının İngilterede yapmış olduğu bir çalışmada 730 AS hastası ve 1331 sağlıklı birey incelenmiştir. rs11209032 polimorfizminin de yer aldığı 8 SNP bölgesinin genotiplemesinin iPLEX teknolojisi kullanılarak yapıldığı bu çalışmada, bizim sonuçlarımızdan farklı olarak rs11209032 polimorfizmi ile AS arasında anlamlı bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Karaderi ve ark,2009).

Yapılan meta analiz çalışmalarında da *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi ile AS arasında etnik kökenlere göre farklı sonuçlar bildirilmiştir. Örneğin; Duan ve arkadaşları tarafından yapılan bir meta analiz çalışmasında, *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizminin AS üzerine etkisine ilişkin 13 farklı populasyon içeren 11 çalışma değerlendirilmiştir. Buna göre AS hastalarındaki A aleli frekansının, kontrollere daha göre yüksek bulunduğu belirtilmiştir (Duan ve ark, 2012).

Yine Young Ho Lee ve arkadaşları, rs11209032 polimorfizminin AS üzerine etkisini Amerika, Çin, Portekiz, Macaristan, Kore, İngiltere, İspanya ve Kanada etnik kökenli olgulardan oluşan 12 farklı çalışmayı içeren bir meta analizle incelemiştir. Bu çalışmalardan Avrupa populasyonunda yapılanlarda AS ile rs11209032 polimorfizmi arasında ilişki bulunurken, Asya populasyonunda yapılanlarda ilişki bulunmadığı belirtilmiştir (Young Ho Lee ve ark,2009).

Sonuç olarak hasta ve kontrol grupları arasında alel ve genotip frekansları açısından fark bulunmamıştır. Literatür ile çalışma sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde, *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi ile AS asosiasyonu açısından farklı sonuçlar görülmektedir. Bu durumun nedenleri; etnik farklılıklar, polimorfizmlerin farklı ırk/gruplara göre değişebilmesi, yetersiz örneklem büyüklükleri, AS'nin karmaşık bir hastalık oluşu ve hastalığın patogenezinin kişiden kişiye değişebilmesi olabilir.

AS gibi kompleks ve multifaktöryel hastalıklarda hastalığın oluşumu ve gelişiminde etkisi olan birçok farklı gen ve polimorfizmin bir arada etkileşim halinde ve çevreyle birlikte sürece katılmaktadır. *IL-23R* geni polimorfizmleri ile AS arasındaki ilişkinin ortaya konması için farklı etnik kökenli populasyonlarda, daha yüksek sayıda örneklem ile MHC dışı aday gen polimorfizmlerinin birlikte değerlendirilerek araştırılması gerektiği kanısındayız.

## 5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, AS tanılı olgularda ve sağlıklı bireylerde multifaktöryel bir hastalık olan ankilozan spondilit ile *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi arasındaki ilişki ve olgu grubunda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı incelenmiştir.

Çalışma sonuçları şöyle özetlenebilir:

1. AS tanılı olguların 69'unda (% 65.1) HLA-B27 pozitif, 37'sinde (% 34.9) HLA-B27 negatif olarak bulundu.
2. Ailesinde (birinci derece akrabalarında) AS öyküsü bulunan olgular ile ailesinde AS öyküsü bulunmayan olgularda HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı açısından fark bulunmadı.
3. *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip ve alel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımı açısından fark bulunmadı.
4. Ailesinde (birinci derece akrabalarında) AS öyküsü olanlar ve olmayanlarda *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekansları açısından fark bulunmadı.

Olgulardaki HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı ve *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi ile AS arasındaki ilişkinin ortaya konması için daha geniş populasyon serileri ile aday gen ve polimorfizmin birlikte değerlendirilerek araştırılması gerektiği kanısındayız.

Ayrıca proinflamatuvar bir sitokin olan IL-23 ve reseptörünü içeren sinyal iletim yolları, AS tedavisi için yeni bir potansiyel terapötik hedef olabilir. Bu nedenle söz konusu sinyal iletim yolları ve IL23/IL23-R moleküllerine ilişkin yapılacak çalışmalarda, AS'nin moleküler temeline ilişkin elde edilecek bilgilerle farmasötik teknoloji birleştirilerek AS hastalarının tedavileri için faydalı sonuçlar elde edilebilir.

## ÖZET

Ankilozan spondilit (AS) [MIM 106300], omurga ve sakroiliak eklemlerde inflamasyonla karakterize kronik ve ilerleyeci inflamatuvar bir hastalıktır. AS'nin gerçek etiyojisi bilinmemekle birlikte patogenezinde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. AS'li hastaların %90'ında HLA-B27 pozitif olduğu bilinmekle birlikte, HLA-B27 AS gelişiminden sorumlu genetik risk faktörlerinin 1/3'den daha azını oluşturur. HLA-B27 dışında birçok genetik faktörün, AS gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'na başvuran AS'li hastalardaki HLA-B27 aleli (+/-) dağılımı ve *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi ile AS arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Çalışmamıza, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Polikliniği'ne başvuran ve 2002 Modifiye New York Kriterlerine göre AS tanısı almış 106 (18 kadın / 89 erkek) hasta ve sağlıklı 82 (12 kadın / 70 erkek) birey dahil edilmiştir. AS'li hastalardaki HLA-B27 aleli (+)/(-) dağılımı ters hibridizasyon yöntemi, hasta ve sağlıklı bireylerde *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotiplendirilmesi eş zamanlı PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmamızda AS'li hastaların 69'unda (%65.1) HLA-B27 aleli pozitif, 37'sinde (%34.9) HLA-B27 aleli negatif olarak bulundu. Çalışmamızda *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi genotip frekansı kontrol grubunda GG %34.1, GA %53.7 ve AA %12.2 olarak, AS'li hastalarda GG %31.1, GA %50.9 ve AA %17.9 olarak belirlendi. Olgu grubunda G alel frekansı %56.6 ve A alel frekansı %43.4 olarak, kontrol grubunda G alel frekansı %60.98 ve A alel frekansı %39.02 olarak bulundu. *IL23R* geni rs11209032 polimorfizmi alel ve genotip frekansları açısından kontrol ve hasta grubu arasında fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

Sonuç olarak; çalışma grubumuzda ankilozan spondilit hastalığı ile *IL-23R* geni rs11209032 polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığı belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Ankilozan spondilit (AS), HLA-B27, *IL-23R* geni, polimorfizm

## SUMMARY

Ankylosing spondilit (AS) [MIM 106300], is a chronic progressive inflammatory disease characterized by inflammation of sarcoiliac and spine joint. Although the exact pathogenesis and etiology of AS remains unknown, there are significant outcomes suggesting that genetic factors and certain environmental factors are involved in its development. HLA-B27 positive individuals constitute 90% of AS's while HLA-B27 only partly accounts for the genetic predisposition to this disease. It is also suggested that non-HLA genes may be involved in the development of AS.

In this study, distribution of HLA-B27 alleles (+/-) and *IL-23R* gene rs11209032 polymorphism were investigated among patients who applied to Afyon Kocatepe University, Faculty of Medicine, Department of Physical Therapy and Rehabilitation.

The study sample comprised 106 (18 women, 89 men) AS patients who diagnosed 2002 New York criteria's and 82 healthy controls (12 women, 70 men) admitted to Afyon Kocatepe University, Faculty of Medicine, Department of Physical Medicine and Rehabilitation. Distribution of HLAB27 alleles (+)/(-) in AS patients were observed by reverse hybridization technique and genotyping of *IL23R* rs11209032 polymorphism of AS patients and healty controls was performed by real time PCR.

According to obtained results, there were 69 AS patients with HLA-B27 positive (%65.1) and 37 patients with HLA-B27 negative (%34.9). Distribution of rs11209032 genotype frequencies in control group were 34,1% for GG, 53,7% for GA and 12,2% for AA and distribution of rs11209032 genotype frequencies in the AS group were 31,1% for GG, 50,9% for GA and 17,9 for AA. G and A allele frequencies in AS patients were 56,6% and 43,4% respectively, and G and A allele frequencies in controls 60,98% and 39,02% respectively. There were no significant differences between AS patients and controls in terms of genotype frequencies of *IL23R* gene rs11209032 polymorphism.

Consequently, there is no association between AS and *IL23R* rs11209032 polymorphism for this study group.

*Key words:* Ankylosing spondilit (AS), HLA-B27, *IL23R* gene, polymorphism

## KAYNAKLAR

- AKGUL O, OZGOCMEN S, 2011. Classification criteria of Spondyarthropathies. *World Journal of Orthopedics*. pp. 107-115
- ALAMANOS Y, PAPADOPOULOS NG, VOULGARİ PV, KARAKATSANİS A, SİOZOS C, DROSOS AA. (2004) Epidemiology of Ankylosing Spondylitis in Northwest Greece,1983-2002. *Rheumatology* pp. 615-618
- AMOR B, DOUGADOS M, MİJİYAWA M. (1990) Criteria of the classification of the spondylarthropathies. *Rev Rheum Mal Osteoartic*; p p.85-89),.
- ARNETT FC. (1997) Ankylosing spondylitis. in: Koopman WJ(ed). Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology. Baltimore: Williams and VVilkins; 1197-1208.
- AHN NU, AHN UM, NaLLAMSHETTY L, SPRINGER BD, BUCHOWSKI JM.(2001) Cauda equina syndrome in AS: meta-analysis of outcomes after medical and surgical treatments. *The Journal of Spinal Disorders* pp .427-433)
- BAEK HJ, SHİN KC, LEE YJ(2002). Juvenile onset ankylosing spondylitis (JAS) has less severe spinal disease course than adult onset ankylosing spondylitis (AAS): a clinical comparision between JAS and AAS in Korea. *The Journal of Rheumatology*. pp.1780-5
- BANRES A, HERNANDEZ–GARCÍA C, FERNANDEZ –GUTIERRAZ B, JOVER JA (1998). Eye involvement in the spondyloarthropathies. *Rheumatic Disease Clinics of North America* p p.771-84.
- BEADLİNG C, SLİFKA MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12,IL-23 ve IL-27. *Arch Immunol Ther exp (Warsz)* 2006; 54:15-24
- BODUR H, ATAMAN S, BUGDAYCI DS, REZVANİ A, NAS K, UZUNCA K.Description of the registry of patients with ankylosing spondylitis in



Turkey: TRASD-IP. Türkiye Romatizma Araştırma ve Savaş Derneği  
.10.1007/s00296-010-1599-7.

BODUR H, ATAMAN S, AKBULUT L .(2008) Characteristics and medical management of patients with RA and AS. *Clinical Rheumatology* . pp.1119-25

BOYLE LH, GOODALL JC, OPAT SS, GASTON JSH. (2001) The recognition of HLA-B27 by human CD4+T lymphocytes. *Journal Immunology* pp2619-24)

BRAUN J, BOLLOW M, REMLINGER G (1998). Prevalance of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheumatology*. pp:58-67.

BRAUN J,,SIEPER J. (2002) Building consensus on nomenclature and disease classification for ankylosing spondylitis: results and discussion of a questionnaire prepared for the International Workshop on New Treatment Strategies in Ankylosing Spondylitis, Berlin, Germany, 18–19 January . *Annals of the Rheumatic Diseases*. 61–67

BREBAN M. Genetics of spondyloarthritis.(2006) *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* pp.361-368.

BROWN MA, KENNEDY LG, MACGREGOR AJ. 1989. HLA-Bw60 increase susceptibility to AS in HLA-B27 (+) patients.. *Arthritis Rheumatology* pp 1135-1141)

BROWN M, WORDSWORTH P.(1997) Predisposing factors to spondyarthropathies. *Current Opinion in Rheumatology* pp.308-14)

BROWN MA, LAVAL SH, BROPHY S 2000. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Annals of Rheumatic Diseases* 2000;59:883-886

BROWN MA (2006). Non-major-histocompatibility-complex genetics of ankylosing spondylitis. *Best Practical Research Clinical Rheumatology*

BROWN MA. (2008) Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* pp: 132-7

BURGOS-VARGAS R, PACHECO–TENA C, VAZQUEZ–MELLADO J. (1997) Juvenile–onset spondyloarthropathies. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1997 p p569-98

- BURTON PR, CLAYTON DG, CARDON LR, CRADDOCK N, DELOUKAS P, DUNCANSON A. (2007). Association Scan of 14500 nonsynonymous SNPs in four Diseases Identifies Autoimmunity Variants. *Nature Genetics* pp.1329–1337
- CALIN A, MARDER A, BECKS E, BURNS T.(1983) Genetic differences between B27 positive patients with AS and B27 positive healthy controls *.Arthritis Rheumatology*.1460-1464
- CAPON F, DI MEGLIO P, SZAUB J, PRESCOTT NJ, DUNSTER C, BAUMBER L (2007). Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Human Genetics* pp.201–206
- CARELESS DJ, INMAN RD.(1995) Etiopathogenesis of reactive arthritis and AS. *Current Opinion in Rheumatology* pp.290-298
- CARTER KW, PLUZHNIKOV A, TIMMS AE (2007). Combined Analysis OF Three Whole Genome Linkage Scans FOR Ankylosing Spondylitis *Rheumatology*. 763-71).
- CARGILL M, SCHRODI SJ, CHANG M, GARCIA ve, BRANDON R, CALLIS KP et al (2007) A large-scale genetic association study con W rms IL12B and leads to the identi W cation of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 80:273–290).
- CASSERLY IP, FENLON HM, BREATNACH E, SANT SM.(1997) Lung findings on high-resolution computed tomography in idiopathic AS- correlation with clinical findings, pulmonary function testing and plain radiography. *British Journal J Rheumatology* pp.677-682
- COŞAN F. GÜL A.(2007). Ankilozan Spondilit Patogenezi, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* pp.13-9
- CHANG J, VOORHES TJ, LIU Y, ZHAO Y, CHANG CH. Interleukin -23 production drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation . *J Exp Med* 2005;201:233-40
- DAGFINRUD H, VOLLESTAD NK, LOGE JH, KVIEN TK, MENGSHOEL AM.(2005) Fatigue in patients with AS: A comparison with the general

- population and associations with clinical and self-reported measures. *Arthritis Rheumatology* pp.5-11)
- DAKWAR E, REDDY J, VALE FL, URIBE JS. (2008) A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Neurosurgical Focus* 2008; pp 24
- DAVIDSON SI, WU X, LIU Y, WEI M, DANOY PA, et al. (2009) Association of ERAP1, but not IL23R, with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population. *Arthritis Rheum* 60: 3263–3268.
- DE KAYSER F, BAETEN D, VAN DE BOSCH F (2002). Gut Inflammation and Spondyarthropathies. *Current Rheumatology Reports* pp.525-532)
- DINCER U, CAKAR E, KIRALP MZ, DURSUN H.(2008) Diagnosis delay in patients with AS: possible reasons and proposals for new diagnostic criteria.; *Clinical Rheumatology* . pp 457-62
- FOURNIE B, BOUTES A, DROMER C (1997) Prospective study of anterior chest wall involvement in AS and psoriatic arthritis. *Revue du Rhumatisme (English ed.)* pp:22-5
- FRANCOIS RJ, BRAUN J, KHAN MA.( 2001) Entheses and enthesitis: a histopathologic review and relevance to spondyloarthritides. *Current Opinion in Rheumatology* p p.255-264
- GINSBURG WW, COHEN MD, MILLER GM, BARTLESON JD.(1997) Posterior vertebral body erosion by arachnoid diverticula in cauda equina syndrome: an unusual manifestation of AS. *J The Journal of Rheumatology* pp. 1417-1420
- GOEI The HS, STEVEN MM, VAN DER LINDEN SM, 1985 Evaluation of diagnostic criteria for AS: a comparison of the Roma, New York and Modified New York criteria in patients with a positive clinical history screening test for AS. *British Journal of Rheumatology* pp242-9)
- GOUVEIA EB, ELMANN D, MORALES MS(2012).Ankylosing spondylitis and uveitis: overview. *The Brazilian Journal of Rheumatology*. pp742-56
- GHILARDI N, KLJAVIN N, CHEN Q, LUCAS S, GURNEY AL, DE SAUVAGE FJ. Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23 deficient mice. *J Immunol* 2004;172:2827-33
- GRATACOS J, ORELLANA C, SANMARTI R ( 1997) Secondary amyloidosis in AS. A systematic survey of 137 patients using abdominal fat aspiration. *The Journal of Rheumatology* pp. 912-915

- GUNAL EK, SARVAN FO, KAMALI S, GUL A, INANC M, CARIN M, KONICE M, ARAL O, OCAL L. (2008) .Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. *Joint Bone Spine*. pp .299-302
- H. ÜMİT LÜLEYAP, MOLEKÜLER GENETİĞİN Esasları. 1. BASIM
- HANRAHAN PS, RUSSEL AS, MCLEAN DR. (1988) AS and MS: an apparent association. *The Journal of Rheumatology* 1988; pp.1512-1514
- HANGTOA DONG, QIUMING li, YING ZHANG, WEI THAN, ZHENGXUAN Jiang) *IL-23R Gene Confers Susceptibility to Ankylosing Spondylitis Concomitant with Uveitis in a Han Chinese Population* Published: June 28, 2013.DOI: 10.1371/journal.pone.0067505  
hlab27, [ <http://www.hlab27.com/> ], 06.06.2014
- HUEI-HUANG HO, JI-YIH C (2013). Ankylosing Spondylitis: Chinese Perspective, Clinical Phenotypes, and Associated Extra-articular Systemic Features, *Current Rheumatology Reports* .344
- HUNTER CA (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27,cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 5:521–531.
- KAYNAK D. S., 2007, Ailesel Akdeniz Ateşi Ön Tanılı Hastalarda MEFV Gen Mutasyonları Ve Kardiyovasküler Hastalıklarla İlgili Bazı Genlerin Polimorfizmlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enst., 96s.
- KARADERİ T, HARVEY D, FARRAR C, APPLETON LH, STONE MA, STURROCK RD, Brown MA, Wordsworth P, Pointon JJ.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 Apr;48(4):386-9. doi: 10.1093/rheumatology/ken501. Epub 2009 Feb
- KHAN MA, BRAUN WE, KUSHNER I (1984) HLA-B27 in ankylosing spondylitis: Differences in frequency and relative risk in American Blacks and Caucasians. *The Journal of Rheumatology*. pp.788-93
- KHAN MA. (1992) An overview of clinical spectrum and heterogeneity of spondyloarthropathies. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1992 p p .1-10.

- KHAN M.A. 2002. Ankylosing spondylitis–The History of medical therapies. *Clinical and Experimental Rheumatology* .pp.3-5
- KHAN MA, MATHIEU A, SORRENTINO R, AKKOC N (2007) The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun Revue* pp. 183-189
- KIKLY K, LIU L, NA S, SEDGWICK JD. The IL-23/Th(17) axis : therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:670-5
- KLEINSCHEK MA, MULLER U, BRODIE SJ (2006). IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces cytokine pattern distinct from IL-12. *The Journal of Immunology* pp.1098-106)
- LAI KN, LI PK, HAWKINS B, LAI FM, (1989) IgA nephropathy associated with AS: occurrence in women as well as in men. *Annals of Rheumatic Diseases* pp 435-4337)
- LANGRISH CL, CHEN Y, BLUMENSCHNEIN WM (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces Autoimmune inflammation. *The Journal Of Experimental Medicine*. pp.233-40)
- LAUTERMANN D, BRAUN J. (2002) Ankylosing spondylitis–Cardiac manifestations. *Clinical and Experimental Rheumatology*. pp.11-15
- LEE E, TREPICCHIO WL, OESTREICHER JL, PITTMAN D, WANG F, CHAMIAN F ET AL (2004) Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* 199:125–130
- LOPEZ de C JA. (2007) HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthropathies. *Immunology Letters* pp. 27-33
- LOHMANN S., LEHMANN L., TABITI K., 2000, Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germany, Biochemica no 4; Pryor, R.J., Wittwer, C. T. , 2006, Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis, *Methods Mol Biol*, 336,19-32p.; Roche Applied Science, Technical Note, No. LC 18/2004).
- LUPARDUE PJ, GARCIA KC (2008). The structure of IL-23 reveals the molecular basis of p-40 subunit sharing with IL-12. *Journal of Molecular Biology*.pp 931-41

- MAGHRAOURI AE, CHAOUIR S, ABID A.(2004) Lung findings on thoracic high-resolution computed tomography in patients with AS. Correlations with disease duration, clinical findings and pulmonary function testing. *Clinical Rheumatology* pp 123-128)
- MAKSYMOWYCH WP.(2003) Spondyloarthropathies: Etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis. In: Ed. Hochberg M, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, *Rheumatology. 3 ed. Philadelphia: Elsevier Limited* p. 1183-92
- MARTIN TM, SMITH JR, ROSENBAUM JT.(2002) Anterior uveitis: current concepts of pathogenesis and interactions with the spondyloarthropathies. *Current Opinion in Rheumatology* pp 337-41
- MATHUR AN, CHANG HC, ZISOLIS DG ET AL. STAT 3 and STAT4 direct development of IL-17-Ssecreting Th cells. *J Immunol* 2007;178:4901-7
- MCKENZIE BS, KASTELEIN RA, CUA DJ (2006) Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27:17–23.]
- MIELANTS H, VEYS EM, GOEMAERE S, GOETHALS K, CUVELIER C, DE VOS M. (1991) Gut inflammation in the spondyloarthropathies: clinical, radiologic, biologic and genetic features in relation to the type of histology. A prospective study. *The Journal of Rheumatology* pp 1542-1551
- M. H. Abdelrahman, S.Mahdy, I. A. Khanjar, A.M. Siam, H. A.Malallah, S. A. Al-Emadi, H. A. Sarakbi, andM. Hammoudeh (Prevalence of HLA-B27 in Patients with Ankylosing Spondylitis in Qatar), *International Journal of Rheumatology* Volume 2012
- (NCBI: National Center for Biotechnology Information-dbSNP)
- OLIVIERI I, VAN TUBERGEN A, SALVARANI C (2002) Seronegative spondyloartritides. *Best Practical Research Clinical Rheumatology* p p723-39
- OMIM. [<http://omim.org/entry/106300>] 05.05.2014
- OMIM[<http://www.omim.org/entry/607562>]06.06.2014
- ÖNEN F,AKAR S, BİRLİK M, SARI İ, KHAN MA, GURLER O,ERGOR A, MANİSALI M,AKKOC N.(2008). Prevalence of ankylosing spondylitis and

- related spondyloarthritides in an urban area of Izmir. *The Journal of Rheumatology*. vol .35 no. 2 305-309
- OPPMAN B, LESLEY R, BLOM B ET AL. Novel p 19 protein engages IL-12P40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-25
- OROZCO G, RUEDA B, ROBLEDO G, GARCÍA A, MARTÍN J (2007) Investigation of the IL23R gene in a Spanish rheumatoid arthritis cohort. *Hum Immunol* 68:681–684.
- PARHAM C CHIRICA M, Timans J ( 2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rb1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *The Journal of Immunology* 2002; pp. 5699–708
- RAHMAN P. Genetics of ankylosing spondylitis: an update(2007). *Current Opinion in Rheumatology* 9 :383-9)
- RESNICK D, NIWAYAMA G.(1995) Ankylosing spondylitis. In: Resnick D, ed. *Diagnosis of Bone and Joint Disorders*.3rd. ed. Philadelphia: WB Saunders; pp .1008-74
- REVEILLE JD, BALL EJ, KHAN MA. (2001) HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyarthropathies. *Current Opinion in Rheumatology* pp.265-72
- REVEILLE JD, ARNETT FC (2005) Spondyloarthritis: Update on pathogenesis and management. *American Journal of Medicine* pp.592
- REVEILLE JD. (2006) Major histocompatibility genes and AS. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* pp .601-609)
- REVEILLE JD. (2006) The genetic basis of ankylosing spondylitis. *Current Opinion in Rheumatology*. pp.332-41
- REVEILLE JD, ZHOU X, BRADBURY LA (2007) IL-23R is a major determinant of ankylosing spondylitis risk the TASC study. *Annals of Rheumatic Diseases* pp.112
- ROBINSON P.C. (2012) The Genetics of AS and Axial Spondyloarthritis, *Rheumatic Disease Clinics of North America-The Clinics*).
- ROGERS J., WATT I., DIEPPE P.(1985), Palaeopathology of spinal osteophytosis, vertebral ankylosis, ankylosing spondylitis, and vertebral hyperostosis, *Annals of Rheumatic Diseases* pp. 13–120.

ROMATOLOJİ, ATAMAN Şebnem (2012)1.Baskı, Bölüm 9.3

RUEDA B, OROZCO G, RAYA E, FERNANDEZ-SUEIRO JL, MULERO J, et al. (2008) The IL-23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 67: 1451–1454.

RUDWALEIT M, VAN DER HD, KHAN MA, BRAUN J, SIEPER J. (2004)How to diagnose axial spondyloarthritis early. *Annals of Rheumatic Diseases* 2004; pp535-543

SANCHEZ E, Rueda B, Callejas JL, Sabio JM, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J et al (2007) Analysis of interleukin-23 receptor (IL23R) gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 70:233–237.

SALONEN DC, BROWER AC. (2003)Seronegative spondylarthropaties: imaging. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt MH, editors. *Rheumatology* 3rd ed. Edinburg: Mosby; . pp 1193-1203

SCHMIDT C, GIESE T, LUDWIG B, MUELLER-MOLAIAN I, MARTH T, ZEUZEM S ET AL (2005) Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23 p19 and interleukin-p27 p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. In *X amm Bowel Dis* 11:16–23.].

SIEPER J, BRAUN J, RUDWALEIT M, BOONEN A, ZINK A.(2002). Ankylosing spondylitis: an overview. *Annals of Rheumatic Diseases* p p.61)

SIEPER J, BRAUN J, RUDWALEIT M, BOONEN A, ZINK A (2002). Ankylosing spondylitis: an overview. *Annals of Rheumatic Diseases* 2002;61)

SIEPER J, RUDWALEIT M. (2005) Early referral recommendations for AS ( including preradiographic and radiographic forms) in primary care. *Annals of Rheumatic Diseases* pp.659-663

SOLAK, M. (ED.), ŞENGİL, A. Z., ÖZTAŞ, S., BAĞCI H., 2000, Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi (Temel bilgiler) Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı Yayınları, No: 5, Afyon)



- SMITH JA, MARKER- HERMANN E, COLBERT RA. (2006) Pathogenesis of AS: current concepts. *Best Practical Research Clinical Rheumatology* pp. 571-91
- SHAMJI MF, BAFAQUH M, TSAI E. The pathogenesis of AS. *Neurosurg Focus* 2008;24
- SUNG IH, KIM TH, BANG SY, KIM TJ, LEE B, et al. (2009) IL-23R polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis in Korea. *J Rheumatol* 36: 1003–1005.
- TAUROG JD. Seronegative spondyloarthropathies. Epidemiology, pathology and pathogenesis. in: Klippel JH(ed) *Primer on the Rheumatic Disease*, Atlanta. Arthritis Foundation pp. 180-183
- TAUROG JD. (2007) The mystery of HLA-B27: If it isn't one thing, it's another. *Arthritis Rheumatology* pp2478-81
- TATO CM, CUA DJ.(2008) Reconciling id, ego, and super ego within interleukin-23. *Immunology Review* pp. 103–11
- TIMMS AE, CRANE AM, SIMS AM, (2004) .The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *The American Journal of Human Genetics*. 587- 595
- TREMELLING M, CUMMINGS F, FISHER SA, MANSFIELD J, GWILLIAM R, KENIRY A, NIMMO ER, DRUMMOND H, ONNIE CM, PRESCOTT NJ, SANDERSON J, BREDIN, F, BERZUINI C, FORBES A, LEWIS, CM, CARDON L, DELOUKAS P, JEWELL D, MATHEW, CG, PARKES M.SATSANGI, ( 2007) , 'IL-23R Variation Determines Susceptibility but not Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease' *Gastroenterology*, pp 1657-1664.
- VAN DER LINDEN S, VALKENBURG HA, CATS A. Evaluation of diagnostic criteria for AS. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheumatology* p p. 361-368
- VAN DE VOSSE E, LICHTENAUER-KALIGIS EG, VAN DIÏSEL JT, OTTENHOFF TH (2003). Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (beta1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function". *Immunogenetics* pp. 817–29

VOJVODIĆ S, ADEMOVIĆ-SAZDANIĆ D, BUSARČEVIĆ I (Human Leukocyte Antigen-b27 and Disease Susceptibility in Vojvodina, Serbia *BJMG* 15/2 (2012) 55-60 10.2478/bjmg-2013-0007

ZAMBRANO-ZARAGOZA J F, AGRAZ-CIBRIAN J M , GONZÁLEZ-REYE C, DURÁN- AVELAR J, VÍBANCO-PÉREZ N. (2013) Ankylosing Spondylitis: From Cells to Genes. *International Journal of Inflammation*.

ZHENHUA DUAN · FAMING PAN · ZHEN ZENG · TIANCHEN ZHANG · SHENG WANG · GUIXING LI · Shengqian Xu · Jianhua Xu · Li Zhang Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis *Rheumatol Int* (2012) 32:1209–1214 DOI 10.1007/s00296-010-1769-7

ZHANG XY, ZHANG HJ, ZHANG Y, FU YJ, HE J, ZHU LP (2006) Identification and expression analysis of alternatively spliced isoforms of human interleukin-23 receptor gene in normal lymphoid cells and selected tumor cells. *Immunogenetics* p.934–943

XIONG J, CHEN J, TU J, YE W, ZHANG Z, LIU Q, ZHU XPak J Med Sci. 2014 Jan;30(1):22-7. doi: 10.12669/pjms.301.3896.Association of HLA-B27 status and gender with sacroiliitis in patients with ankylosing spondylitis.

Wang X(2010). Single-nucleotide polymorphisms and expression of IL23R in Chinese ankylosing spondylitis patients, *Rheumatology International* pp.955–959

Wang X, JINXIAN H, ZHIMING L, ZETAO L, CHAO L, QIUJING W, YINGJUAN J · LIKE Z · JIERUO G, (2010). SNPs and expression of IL-23R in Chinese Ankylosing Spondylitis Patients, *Rheumatology International* 955–959.

WALTER P M. (2011) Hochberg, Romatoloji. 4. Baskı. Bölüm 9 sy1124

WARE CF (2005) Network communications: lymphotoxins, Light, and TNF. *Annu Rev Immunol* 23.787–819

WIKIPEDIA,[[http://tr.wikipedia.org/wiki/Ankilozan\\_spondilit](http://tr.wikipedia.org/wiki/Ankilozan_spondilit)] 06.06.2014

WIKIPEDIA, [<http://en.wikipedia.org/wiki/HLA-B27>] , 06.06.2014

- WILL R, KENNEDY G, EISWOOD J .(2000) Ankylosing spondylitis and the shoulder: commonly involved but infrequently disabling. *The Journal of Rheumatology* pp 177-82
- WRIGHT T, CRON RQ. (2007) Pediatric Rheumatology for the Adult Rheumatologist II. Uveitis in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology* pp.205-10.
- YI L, WANG J, GUO X, ESPÍTIA MG, CHEN E, ASSASSI S, JIN L, ZOU H, REVEILLE JD, Zhou X *Open RheumatolJ*. 2013 Aug 19;7:51-4. doi: 10.2174/1874312920130628001. eCollection 2013. Profiling of hla-B alleles for association studies with ankylosing spondylitis in the Chinese population.

## ÖZGEÇMİŞ

Antalya' nın Kaş ilçesine bağlı Kalkan' da dünyaya geldim. İlkokulu Kalkan Mustafa Kocakaya İlköğretim Okulunda, ortaöğrenimime Antalya Merkez Anadolu Lisesi' nde devam ettim. Üniversite eğitimimi Antalya Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nda tamamladım. 2011 Ocak ayında Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na katılarak, yüksek lisans eğitimime başladım. İyi decede İngilizce ve orta derecede Almanca bilmekteyim.