

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**ANKİLOZAN SPONDİLİT İLE IL-17 GEN POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ  
İLİŞKİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Alper Han ÇEBİ

Trabzon – 2013

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım günden bugüne tım hayat tecrübelerini benimle paylaşan bilgi ve becerilerimin yanında hayat eğitimime katkısı yadsınamayacak düzeyde olan, tez çalışmama her tırlı katkıyı sağlayan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mevrit İKBAL'e; tez çalışmamda her zaman desteklerini hissettiğim Uzm. Dr. Muhammed Yunus ALP'e, Arş. Gör. Dr. Serhat SEYHAN'a, Arş. Gör. Dr. Hale ÖNDER'e, Biyolog Murat CENCİ'ye, Laborant Günay DİNÇ'e, Laborant Bediha....., Laborant GÜLLÜ..... teşekkür ederim. Asistanlık dönemim boyunca 6 aylık ve 3 aylık zaman dilimlerinde beni bölümlerinde misafir eden Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı ve Baylor College of Medical Genetics Departmanı hocalarına ve çalışanlarına da teőekkürü bir borç bilirim.

Bu tezimi doğduğum andan itibaren beni koruyup kollayan, desteklerini esirgemeyen, hayata tutunmamı sağlayan biricik anneme, babama, kardeşlerime ve ilk gördüğüm andan itibaren hayatımı paylaşacağıma inandığım biricik eşime, hayatımıza tat katan kızıma ithaf ediyorum.

Dr. Alper Han ÇEBİ

Trabzon-2013

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

Teşekkür.....	I
İçindekiler .....	II
Kısaltmalar .....	IV
Tablo Listesi .....	V
Şekil Listesi .....	V
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1. Temel Genetik Kavramlar.....	2
2.1.1. DNA, Gen ve Genom.....	5
2.1.2. Mutasyon ve Polimorfizm.....	8
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	9
2.3. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi.....	10
2.4. DNA Dizi Analizi İle Mutasyon Analizi.....	10
2.5. Ankilozan Spondilit.....	10
2.5.2. Tarihçe.....	11
2.5.3. Epidemiyoloji.....	11
2.5.4. Etyoloji ve Patogenezi.....	12
2.5.5. Ankilozan Spondilit Klinik Özellikleri.....	13
2.5.5.1. Kas-İskelet Sistemi Özellikleri.....	13
2.5.5.2. Kas-İskelet Sistemi Dışı Bulgular.....	14
2.5.5.2.1. Genel Belirtiler.....	14
2.5.5.2.2. Gastrointestinal Tutulum.....	15
2.5.5.2.3. Göz Tutulumu .....	15
2.5.5.2.4. Kardiyak Tutulum.....	17
2.5.5.2.5. Nörolojik Tutulum.....	20
2.5.5.2.6. Osteoporoz .....	21
2.5.5.2.7. Pulmoner Tutulum.....	21
2.5.5.2.8. Renal Tutulum.....	23

2.5.6.	Fizik Muayene Bulguları.....	24
2.5.7.	Laboratuvar Bulguları.....	25
2.5.8.	Radyolojik Bulgular.....	25
2.5.9.	Ayırıcı Tanı.....	25
2.5.10.	Hastalık Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	25
2.5.11.	Prognoz.....	25
2.5.12.	Tedavi.....	26
2.6.	Sitokinler.....	26
2.7.	IL-17 Sitokin Ailesi.....	27
3.	Materyal ve Yöntem.....	29
3.1.	Materyal.....	29
3.1.1.	Hastalar.....	29
3.1.2.	Kontrol Grubu.....	33
3.1.3.	Örneklerin Toplanması.....	35
3.1.4.	Kullanılan Aletler.....	36
3.1.5.	Kimyasala Malzemeler.....	37
3.1.6.	Yöntem Sırasında Kullanılacak Solüsyonlar.....	58
3.2.	Yöntem.....	72
3.3.	İstatistiksel Analiz.....	73
4.	Bulgular.....	74
5.	Tartışma.....	75
6.	Sonuç ve Öneriler.....	
7.	Özet.....	
8.	Summary.....	

## KISALTMALAR

A.....	Adenin
bç.....	Baz çifti
C.....	Sitozin
DNA.....	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP.....	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
G.....	Guanin
IL-10 .....	İnterlökin 10
IL-17A .....	İnterlökin 17A
IL-17F .....	İnterlökin 17F
TGFβ1.....	Transforming Growth Factor Beta 1
KLL.....	Kronik Lenfositler Lösemi
kb.....	Kilo baz
mM.....	Milimolar
MgCl <sub>2</sub> .....	Magnezyum klorür
µg.....	Mikrogram
µl.....	Mikrolitre
PZR.....	Polimeraz Zincir reaksiyonu
pmol .....	Pikomol
RFLP.....	Restriction fragment length polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)
SNP.....	Single nucleotide polymorphisms (tek nükleotit polimorfizmleri)
T.....	Timin
u.....	Ünite

## TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

<b>Tablo No</b>		<b>Sayfa No</b>
Tablo 1:	Modifiye New York sınıflama kriterleri .....	13
Tablo 2:	AS tedavisinde ASAS/EULAR 2010 güncellenmiş öneriler.....	30
Tablo 3:	Hedef bölgelerin amplifikasyonu için kullanılan primerler.....	34
Tablo 4:	Kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim rnleri.....	38
Tablo 5:	IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için genotip dağılımlı.....	40
Tablo 6:	IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için allel dağılımlı.....	43
Tablo 7:	IL-17A (-197A/G) polimorfizmi ile BASDAI skoru arasındaki ilişki.....	43
Tablo 8:	IL-17A (-197A/G) polimorfizmi ile Aile yks arasındaki ilişki.....	45
Tablo 9:	IL-17A (-197A/G) polimorfizmi ile HLA-B27 arasındaki ilişki..	45
Tablo 10:	IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için genotip dağılımlı.....	47
Tablo 11:	IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için allel dağılımlı.....	47
Tablo 12:	IL-17F (7383A/G) polimorfizmi ile BASDAI skoru arasındaki ilişki.....	49
Tablo 13:	IL-17F (7383A/G) polimorfizmi ile Aile yks arasındaki ilişki.....	49
Tablo 14:	IL-17F (7383A/G) polimorfizmi ile HLA-B27 arasındaki ilişki..	51
<b>Şekil No</b>		
Şekil 1:	IL-10 (-592A/C) gen polimorfizmi jel elektroforezi grntss.....	42
Şekil 2:	IL-17A (-197A/G) gen polimorfizmi jel elektroforezi görüntüsü.....	44
Şekil 3:	IL-17F (7383A/G) gen polimorfizmi jel elektroforezi görüntüsü.....	46
Şekil 4:	TGFβ1 (+915G/C) gen polimorfizmi jel elektroforezi görüntüsü.....	48

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ankilozan spondilit(AS) kronik inflamatuvar romatolojik bir hastalıktır[1]. Hastalık esas olarak aksiyel iskelet ve sakroiliak eklemleri etkiler. Omurganın kronik inflamasyonu zaman içinde ekstra kemik oluşumuna bağlı vertebra füzyonuna yol açar[2]. İnflamasyon ayrıca göz, deri, sindirim sistemi ve periferik eklemleri de içine alabilir[3]. Hastalığın patogenezinde genetik faktörlerin önemli yeri olduğu söylenmiştir[4]. Yapılan bir ikiz çalışmasında AS için %97'ye varan yatkınlık ortaya konmuştur[5]. Bunun yanında bazı sitokinlerin AS etyolojisinde rolü olduğu gösterilmiştir. Bunlardan bazıları IL 1, IL 17, IL23'tür[6, 7].

IL-17 yaklaşık yirmi yıl önce bulunan bir proinflamatuvar sitokindir[8]. Bugüne kadar IL-17 ailesine altı alt tip (IL17A,IL17B,IL17C,IL17D,IL17E(IL25),IL17F) ve beş reseptör (IL-17RA, IL-17RB/IL-25R, IL-17RC, IL-17RD/SEF ve IL-17RE) belirlenmiştir[9]. IL 17'nin esas hedef hücreleri mezenkimal ve myeloid hücrelerdir[8]. IL 17'nin hedef genleri hematopoetik sitokinleri, kemokinleri, proinflamatuvar sitokinleri, antimikrobial peptidleri içerir[8]. IL-17 ekspresyonu Romatoid Artrit(RA), Sistemik Lupus Eritematozus(SLE), Multiple Skleroz(MS) gibi otoimmün hastalıklarda serum ve dokularda görülebilir[10].

Literatüre baktığımızda bugüne kadar IL-17 polimorfizmleri ile otoimmün hastalıklar açısından yapılmış birçok çalışma vardır[11, 12]. Ancak AS' te IL-17' nin sadece serum düzeyleri araştırılmış olup herhangi bir polimorfizm çalışması yapılmamıştır[13, 14].

RA, SLE, MS gibi otoimmün hastalıklarda IL-17 gen polimorfizminin risk faktörü olduğu saptanmıştır[15-17]. Bu çalışmada IL-17 gen polimorfizmi ile Ankilosan Spondilit hastalığı arasındaki ilişkinin saptanması amaçlanmaktadır. Ankilosan Spondilit gelişiminde etkili moleküler ve biyolojik faktörler hakkında yeni bilgiler kazanılacaktır. Ankilosan Spondilit (AS) hastalığı için genetik risk faktörleri belirlenerek populasyonda riskli bireylerin tanımlanması kolaylaşacaktır. Tedavi için yeni moleküler hedefler belirlenebilecek, yeni ilaçların geliştirilmesine ışık tutulabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Temel Genetik Kavramlar

#### 2.1.1 DNA, Gen ve Genom

DNA beş karbonlu şeker, azot taşıyan bir baz ve bir fosfat grubunun oluşturduğu polimerik bir nükleik asit makromolekülüdür. DNA üzerinde pürin ve pirimidin denilen iki baz çeşidi yer alır. Pürin bazlarını Adenin ve Guanin oluştururken pirimidin bazlarını Sitozin ve Timin oluşturur[18].

Gen; fonksiyonel bir ürün oluşturmak için gerekli 5'-3' yönünde uzanan DNA dizisinin tamamıdır. Bir bireyin tüm fenotipine yansıyan bilgi kalıtsal molekülün tamamında yazılıdır. Organizmada bulunan genetik bilginin tamamına ise genom denir. Diploid yapıda olan insan genomu 23 çift toplamda 46 kromozomdan meydana gelmiştir. Haploid insan genomun ise 3 milyar baz çiftinden 6 milyar nükleotidden oluşur.

Ökaryotlarda var olan genler ekzon ve intron denen bölünmüş yapılardan oluşmuştur. Genler arasında intron ve ekzon sayısı ve boyutu arasında farklılıklar vardır. Genomun protein kodlayan kısmı %1-1.5'lük kısımken intronlar ise total genomun %25'ine yakını oluşturur. Ekzonlar mesajcı ribonükleik asitte(mRNA) vardır ve sekansları özdeştir. İtronlarsa olgun mRNA'da bulunmazlar, genin kodlayan kısımları arasında kalırlar ve DNA transkripsiyonu sonunda oluşan primer transkriptten kesilerek atılırlar. Fonksiyonları hakkında henüz tam olarak yeterli bilgiye sahip olamadığımız intronların primer transkriptten ayrılması RNA splicingle olmaktadır. İtronlar uzaklaştırıldıktan sonra ekzonlar birleştirilir ve işleme devam edilir. Bazı durumlarda aynı genden farklı proteinlerin sentezlenebilmesi için intronlar farklı kombinasyonlarda kesilir ve ekzonlar ona göre birleştirilir. Bunun yanında aynı gen içinde farklı promotor kullanılması da genin ekspresyonunda değişikliğe ve farklı protein sentezine neden olabilir. Bunun yanında bazı transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici bölgeler içeren intronlarda görülen değişimler genin ekspresyonu üzerine etkili olabilmektedir.

Genlerin yapısında ekzon ve intronların haricinde, genin ekspresyonunun düzenlenmesi için gerekli promotor, silencer ve enhancer gibi diziler de vardır. Promotor bölgesi genin 5' ucuna yakın bölgede 100-110 baz çifti(bç) mesafede yer alan spesifik baz dizilerine denir. CAAT, TATA ve GC dizileri RNA polimerazlara transkripsiyon başlaması için yardımcı olan bazı

transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı promotor dizilerindedir. Promotor bölgesinde ilk olarak TATA kutusu genelde genin 25-30 baz öncesinde yer alır. Genelde her iki yanında G ve C den zengin diziler yer almaktadır. CAAT kutusu ise başlama bölgesinden 70-80 baz yukarıda olup hem 5'-3' hem de 3'-5' yönünde işlev görür. GC kutusu ise yaklaşık 110 baz geride yer alan promotor bölgesindeki diğer önemli elementtir. Silencer dizilerinin gen ekspresyonu baskılanmasında görevli iken Enhancerlar ise transkripsiyonu dokuya göre aktive edebilmekte ya da promotörü aktif hale dönüştürebilmektedir. Enhancerların promotorlardan diğer bir farkı da farklı bölgelerde bulunabilmeleridir.

Genomda yukarıda saydığımız bölgeler dışında genomun daha büyük kısmını oluşturan tam olarak işlevleri ortaya konamamış bölgeler de vardır. Bunlardan tekrarlayıcı DNA dizileri ökaryotik genomun önemli bir kısmını oluşturur. Tekrar dizileri genom boyunca yerleşimlerine göre sınıflandırılırlar. Bunlardan ilki art arda dizilen genomun %10-15'ini oluşturan basit tekrar dizileridir. Yaklaşık 5-200 kısa DNA dizilerinin art arda binlerce kez gelmesiyle oluşur[19]. İnsan kromozomlarının sentromer bölgesinde yer alan alfa satellit dizileri, telomer bölgesindeki minisatellit dizileri Y kromozomunun sentromerik bölgesindeki beta satellit dizileri bunlara örnektir[20]. Diğer ikincisi ise genom boyunca aralıklı olarak serpiştirilmiş tekrar dizileridir. Bunlar da uzunluklarına göre kısa dizi tekrarları(SINE) ve uzun dizi tekrarları(LINE) diye ayrılırlar. SINE'ler 100-300 bp uzunluğundadır RNA'ya transkribe olurlar ama protein kodlamazlar. LINE'ler ise 6-8 kb uzunluğundadır, transkribe olurlar ve bazıları protein kodlarlar. DNA transpozonlar ise kopyalanır ve tekrar DNA içine girebilir.

Ökaryotik genomda birçok gen birbirine yakın yerleştikleri ve kodladıkları proteinlerin yapı ve fonksiyonları benzediği için Gen Aileleri olarak değerlendirilir. Belli durumlarda gen ailesinin farklı bireyleri gelişimin farklı döneminde veya farklı dokuda transkribe olabilir[19]. DNA dizileri içerisinde bilinen bazı genlere çok benzerlik gösteren fakat fonksiyonel olarak eksprese olmayan diziler vardır. Psödogen denilen bu genlerin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte geçirdikleri mutasyonlara bağlı olarak önceden aktif iken sonradan inaktif hale gelenlere Nonprocessed psödogen denilirken mRNA'dan ters transkripsiyonla oluşan DNA kopyalarının genom içi yerleşimiyle oluşanlara Processed psödogenler denir.

Bu yapıda aktif olarak protein kodlayan yaklaşık 25.000 adet gen olduğu tahmin edilmektedir. Bu genler ise tüm genomun sadece %1,5'ine denk gelmektedir (2).

### 2.1.2. Mutasyon ve Polimorfizm

İnsan genomunda DNA'nın baz diziliminde oluşan herhangi bir değişiklik, fenotipik etkisi olsun veya olmasın, mutasyon olarak tanımlanır[21]. Bu mutasyonlar tek bir bazı etkileyebileceği gibi kromozomun tamamını da etkileyebilir. Somatik mutasyonların bir sonraki nesle aktarılabilmesi için somatik mutasyonun germline hücrelerde de bulunması gerekir.

Mutasyonlar da kendi içinde farklı şekilde sınıflandırılabilirler. Bunlardan bir tanesi kromozom sayısının değişmesine yol açan mayoz bölünme esnasında ayrılamamaya bağlı kromozom sayısının değişmesidir. Bu mutasyonlar kromozomların yeniden düzenlenmesine bağlı oluşur. Kromozomlarda translokasyon, inversiyon, delesyon gibi yapısal değişikliğe yol açan mutasyonlardır ve 'kromozom mutasyonu' olarak adlandırılır.

Diğer bir mutasyon türü gen düzeyinde ortaya çıkan mutasyonlardır. Tek ya da birkaç bazlık delesyon ya da insersiyonlara bağlı ortaya çıkarlar. Bu ortaya çıkan mutasyonların DNA üzerinde buldukları bölgelere göre etkileri de değişir. Protein kodlayan bölgelerde ortaya çıkan mutasyonların oluşturduğu etki ile kodlamayan bölgelerde ortaya çıkan etki bir değildir.

Tek baz yer değişimi ile ortaya çıkan mutasyonlar eğer amino asit değişimine neden oluyorsa missense mutasyon olarak adlandırılır. Missense mutasyona bağlı ortaya çıkan en bilinen hastalık orak hücreli anemidir. GAG baz dizisinin oluşturduğu glutamik asit yerini GUG baz dizisinin oluşturduğu valine bırakmıştır. Anlamsız mutasyonlarda ise baz değişikliği stop kodon oluşumuna neden olur. Protein yapısı buna bağlı olarak değişir. Bu değişiklik protein yapıda bir farklılığa yol açarsa hastalık ortaya çıkar. Bir diğer durumda ise aynı amino asidi kodlayan birden fazla kodon olmasına bağlı olarak ortaya çıkan baz değişimi kodlanan amino asiti değiştirmez. Bu durumda herhangi bir değişiklik beklenmemektedir.

DNA dizisinde oluşan kayıplara delesyon denir ve bu delesyonlara bağlı da baz dizisinde kaymalar ve mutasyonlar ortaya çıkabilir. DNA dizisi içerisine dışarıdan baz eklenmesine de insersiyon denir. İnsersiyonlara bağlı olarak da DNA dizisinde değişimler oluşur ve buna bağlı mutasyonlar görülebilir.

İntron ve ekzonlar arası geçiş sağlayan belirli diziler vardır. Bu dizilere bağlı olarak ekzonların düzgü biçimde ekzonlardan ayrıştırılması sağlanır. Bu bölgelerde oluşabilecek mutasyonlar da olgun mRNA oluşumunu engelleyebilecek düzeyde olabilir. Bu mutasyonlar da RNA splicing mutasyon olarak tanımlanır[18].

Diğer bir mutasyon türü de dinamik mutasyon olarak adlandırılır. Normalde genomda her bireyde polimorfik olarak değerlendirilen üçlü tekrar dizileri mevcuttur. Gametogenez esnasında bu tekrar dizilerinde oluşabilecek belli bir düzeyin üzerindeki artış hastalık oluşumuna neden olabilir[22]. Buna örnek olarak myotonik distrofiyi verebiliriz. Normal popülasyonda bireylerde 5 ila 34 tekrar arasında değişim olurken hasta bireylerde bu sayı 100'ün üzerine çıkmaktadır.

Polimorfizm kavramı olarak organizmada aynı gen üzerinde birden fazla fenotip ve allel bulunmasıyla oluşan monogenik bir özelliktir[23]. DNA polimorfizmi denebilmesi için tekrarlayan mutasyonlarla desteklenmemesi ve toplumda %1 den daha fazla oranda görülmesi gerekmektedir[24]. Allel sıklıklarına baktığımızda az görülen allelin sıklığı genellikle %1'den fazladır. Genelde herhangi bir hastalığa yol açmadıkları düşünülse de üzerinde çalışmalar devam etmektedir[23]. DNA dizisinde görülen bu tek baz değişimi, insersiyon, delesyon, veya duplikasyona bağlı oluşabilir. Bu değişiklikler mutlaka protein yapısında bir değişikliğe yol açmaz[25]. Bir karşılaştırma yaptığımızda anne ve babadan gelen homolog iki kromozomda her 1000 bç'de bir farklılık gözlenmektedir. Bu oran protein kodlayan bölgelerde 2500 bç'de birdir[18]. Polimorfizmler ortaya çıktıkları bölgeye bağlı olarak protein yapısında değişikliğe kadar gidebilen düzenlemelere neden olabilirler. Promoter bölgedeki polimorfizmler ise daha çok proteinin aktivitesinin artması ya da azalması üzerinde etki gösterirler. En sık görülen polimorfizm tipi tek bir nükleotid değişim ile giden single nükleotid polimorfizmdir(SNP). İnsan genomunda günümüz itibarı ile 10 milyondan fazla SNP bilinmektedir.[24]. Polimorfizmlerin ortaya çıkması ile her bireyin genetik olarak kendine özgü bir yapıya sahip olduğu ve bu nedenle farmakolojiden çevreye, beslenmeye kadar kendine özgü sonuçlar doğuracağı ortaya çıkmaktadır. [26]. SNP'lerden farklı olarak genom içerisinde tekrar sayısına göre değişkenlik gösteren Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) polimorfizmleri bulunur. Bunlarda tekrar sayılarına göre; 2-15 nükleotid uzunluğunda ise mikrosatellit DNA polimorfizmi, 15-500 nükleotid uzunluğunda ise minisatellit DNA polimorfizmi olarak adlandırılır[27]. 1 kb veya üzeri olan bir DNA segmentinin kopya sayısı değişikliğine bağlı oluşan polimorfizmler de kopya sayısı varyantı (Copy Number Variant-CNV) polimorfizmleri olarak adlandırılır[28]. Gen ekspresyonu üzerine CNV polimorfizmleri etkilidir[29].

Kanser, alerji, otoimmün hastalık tarzı hastalıklarda sitokin gen polimorfizmleri ile sitokinlerin serum düzeyleri arasında hastalığın şiddetini öngörmede yardımcı çalışmalar

mevcuttur. Bazı çalışmalarda sitokin gen polimorfizmlerinin hem in vivo hem in vitro olarak serum sitokin seviyelerini ve gen ekspresyonlarını etkilediği görülmüştür[30].

## **2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

PZR, hedef DNA dizilerinin, DNA dizilerinin heterojen bulunduğu tüm genomik DNA'dan seçilerek in vitro şartlarda çok hızlı ve çok yönlü şekilde çoğaltılmasıdır[31]. İlk kez 1985'de bilim dünyasına sunulan PZR hem klinikte tanıda hem de araştırmalarda bir çığır açmıştır. PZR Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Bu buluştan dolayı 1993 yılında K. Mullis Nobel ödülüne hak kazanmıştır.

PZR'de iki primer arasında kalan bölge enzimatik yolla çoğaltılır. 18-24 bp uzunluğundaki primerlerden her biri DNA çift zincirinden bir tanesinde hedef bölgenin 5' ucuna komplementer gelir. Primerlerde bazların arasındaki dağılımı dengeli ve GC bazlarının oranı %40-60 arası olmalıdır. İki primer arasında baz içeriklerine göre hesap edilen erime dereceleri ( $T_m$ ) arasında fark 5°C'den fazla olmamalıdır. PZR'nin başarı olabilmesi için primer çiftinin istenen hedef bölgeye spesifik ve kuvvetli bağlanması gerekir. Bunun için primerin 3' ucundaki son 3 baz özellikle önemlidir. Primerler hedef bölge dışında bir yere ya da birbirlerine komplementer olursa PZR sonuçları net elde edilemez[32].

PZR temelde 3 aşamalı bir yöntemdir. PZR için gerekli malzemeler hedef diziyi taşıyan kalıp DNA, kalıp DNA ile eşleşebilen 2 tür oligonükleotid primeri, dört tür deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Termotabil DNA polimeraz enzimi, tampon ve  $MgCl_2$ 'dür. İlk olarak denatürasyon aşaması yer alır. Öncelikle işleme sokulan çift iplikli DNA yüksek ısı (95-100°C) ile denatüre edilir. DNA'yı bir arada tutan hidrojen bağları kırılır ve erir. Sonuçta; iki ayrı tek DNA iplikçisi oluşturulur. Daha sonra iki kısa oligonükleotid primeri 30-60°C'de hedef DNA'nın karşıt ipliğindeki komplementer sekanslara bağlanır. Bağlanmada hidrojen bağları yardımcı olur. Üçüncü aşama ise uzama aşamasıdır. Ortama katılan çok sayıdaki dNTP yine ortama katılan termotabil DNA polimeraz enzimi ile primerler DNA kalıplarına belli özgü sıcaklık derecesinde bağlanarak yeni bir DNA çift zincir formuna uzarlar. Daha sonra uzama dönemleri tekrarlanır. Ortalama 30-35 döngü kadar tekrar edilir. Yeni DNA ipliklerinin sayısı artar.

PZR'deki temel özellik, önceden sentezlenen bölgelerin her birinin, birbirini takip eden siklularda yeni primer uzama reaksiyonlarında rol oynamasındandır. Zincir reaksiyonu

dediğimiz bu reaksiyon DNA yapılarının geometrik olarak artması ile olur. Metodun esas başarı sırrı buradadır. Kısa ürünlerin miktarlarındaki geometrik artma ile olur.

### **2.3 Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

Restriksiyon enzimlerinin ilk keşfi bakteriyofajlarda 1960'lı yıllarda olmuştur[33]. Enzimlerin DNA üzerinde spesifik tanıma bölgeleri bulunur. DNA meydana gelen dizi değişimleri belli tanıma bölgelerinin var oluşumuna ya da yok oluşuna yol açar. Enzimlerce kesilen ve ortaya çıkan DNA parçalarının boyutu farklı olmaktadır. Jel elektroforezde görüntüleme ile bireyde genotip belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu metod daha çok tek nokta mutasyoları ya da tek nükleotid polimorfizmlerinin bulunmasında kullanılır. Restriksiyon enzimleri ile uygulanan bu yönteme Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) denir[20].

Restriksiyon enzimlerini üç grupta toplayabiliriz. Birinci gruptaki enzimler ilk keşfedilen enzimlerdir. Spesifik bir dizi tanırlar ancak tanıma bölgesinden uzakta spesifik olmayan rastgele bir diziyi keserler. İkinci gruptaki enzimler ise en fazla kullanılan ve basit enzim restriksiyon enzimleridir. Bu grup enzimlerin kesim bölgeleri ve tanıma dizileri spesifiktir. Tanıma dizileri 4-8 bç uzunlukta palindromik dizilerdir. Üçüncü gruptaki enzimler en küçük grubu oluşturur. Palindromik olmayan tanıma dizileri vardır[34, 35].

RFLP analizi için kullanılan tekniklerin başında southern blot, PZR ve modifikasyonları, tek zincir yapı polimorfizmi ve DNA dizi analizi gelmektedir[36].

### **2.4. DNA Dizi Analizi İle Mutasyon Analizi**

DNA'nın nükleotid dizilerinin belirlenmesine DNA dizi analizi denilmektedir. Daha çok mutasyonların ortaya konması amacıyla uygulanan DNA dizi analizleri genel manada ikiye ayrılır. Bunlardan ilki Maxam-Gilbert tarafından geliştirilen kimyasal ve ikincisi de Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen enzimatik metotlardır. Her iki metotta da analizi yapılacak DNA dizisinin hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç temel aşama bulunur. Günümüzde daha çok tercih edilen metod Sanger'in enzimatik yöntemidir. Kullanımı daha kolay ve daha sensitiftir. Sanger veya dideoksinükleotid yöntemi olarak da adlandırılır.

## **2.5 Ankilozan Spondilit**

### **2.5.1 Tanım**

Spondiloartropatiler(SpA), sinovit, entezit ve aksiyel iskelette oluşan inflamasyon ve periferik eklemlerin oligoartriti ile karakterizedir. SpA'ya özgü bazı özellikler vardır. Bunlar genetik, klinik, fizyopatolojik ve radyografik özelliklerdir. Bu grup romatizmal hastalıklar içerisinde genetik etkinin en yoğun olduğu, romatoid faktör(RF)'ün negatif olduğu bir grup kronik, inflamatuvar, romatizmal hastalıklardan oluşur[37, 38]. Reaktif artrit, juvenil spondiloartropati, inflamatuvar barsak hastalığı ile ilişkili SpA bunlardan bazılarıdır. Ankilosan Spondilit(AS), SpA'ların prototipi konumundadır.

AS, spinal eklemlerin ve birleşik yapıların inflamasyonu ile karakterize vertebranın asendan ve progresif kemik füzyonuna yol açabilen, tam olarak etyolojisi ortaya konamamış kronik inflamatuvar bir hastalıktır. [39].

### **2.5.2 Tarihçe**

AS; Yunanca ankylos(eğilmiş kaynamış anlamında) ve spondylos(vertebra diski) kelimelerinden köken alır[40]. İlk olarak 1600'lü yıllarda Bernard Connor tarafından AS tanımlanmıştır. Daha sonra sırasıyla 1850'de Sir Benjamin Brodie, Von Bechterev, Struempell ve Marie'nin olguları izlemiştir. X ışınlarının keşfedilmesinden sonra sakroilit ve tipik sindesmofitler tanımlanmıştır. 1961'de Roma ve daha sonra da 1966'da New York AS sınıflama kriterleri geliştirilmiştir. AS'nin HLA-B27 antijeni ile olan ilişkisi de 1973 yılında Brewerton ve Schlosstein tarafından ortaya konmuştur[41, 42].

### **2.5.3 Epidemiyoloji**

AS'de prevalans hesaplamaları daha çok beyaz ırkta yapılmıştır ve %0,5-1 arasındadır. Erkek kadın oranı 5/1 iken takiplerde kadınlarda hastalığın daha yavaş ilerlediği görülmüştür[43]. AS genellikle hayatın üçüncü dekatında ortaya çıkar. Semptomlar yaklaşık 80'inde 30 yaştan önce ortaya çıkar[44].

AS prevalansı ile HLA-B27 görülme sıklığı arasında yakınlık gözlenmiştir. AS hastalarının yaklaşık %90-95'inde HLA-B27 pozitifliği vardır[45]. HLA-B27 pozitifliği olan

hastalarda ekstraartiküler tutumlar daha sık görülmektedir. Ayrıca HLA-B27 pozitif bireylerin HLA-B27 pozitif birinci derece akrabalarında da hastalık görülme oranı %10-30 arasındadır[46].

#### **2 5.4 Etyoloji ve Patogenezi**

AS ile birlikte diğer SpA'ların nedeni henüz tam olarak ortaya konamamıştır. Bununla birlikte özellikle SpA'larda ve AS'de güçlü bir genetik etkiden söz edilebilir. Özellikle HLA-B27 ile olan ilişkisi genetik yatkınlığı olan bireylerde bireyin karşılaştığı çevresel faktörlere karşı oluşan immün yanıtın suçlanmasına neden olmaktadır[47]. Bunlardan bir tanesi artrojenik peptid hipotezidir. Bu hipotezde HLA-B27 CD8+T hücrelerine entezis ya da eklem kaynaklı artritogenik peptidleri sunar. Buna bağlı olarak konak kendi dokularına yönelir. Diğer bir görüşte HLA-B27'nin stabilitesinin bozularak yapısının bozulduğu ve bazı genleri aktive ederek proinflamatuvar sitokinleri aktive ettiğidir. Farklı bir hipotezde de bazı mikrobik antijenlerin HLA-B27 ile çapraz reaksiyon verdiği[48]. HLA-B27 hücre içi protein yıkımı ile oluşan peptidleri, üç moleküllü bir bileşik oluşturmak üzere  $\beta$ 2-mikroglobülin ile bağlar ve bunu sitotoksik T hücrelerine sunar[49]. Dizigotik ve monozigotik ikizler üzerinde yapılan araştırmalarda, HLA-B27'nin hastalıkta risk faktörünün %16 olduğu görülmüştür[50]. Bu durum HLA dışı genlerin de AS etyolojisinde rolünü ortaya koymuştur. Bunlara örnek olarak NHC sınıf 1 molekülü ile ilgili A geni(MICA) gösterilebilir[51].

AS, histopatolojik olarak kemik iliği inflamasyonu şeklinde ortaya çıkar. İnflamasyon periferik entezis ve sakroiliak eklem bölgelerinde görülür. Entezopati sıklıkla kemikleşme ile sonlanan komşu kemik iliğinde belirgin ödemin olduğu eroziv lezyonlarla karakteristiktir[52]. Hastalık döneminde kas iskelet sisteminde etkilenen birçok yapı mevcuttur. Kartilajinöz eklemler, ligamanların kemiğe tutunma noktaları, eklem kapsülleri, ligamentöz yapılar ve sinoviyal eklemler bunlardan bazılarıdır. İlk bulgular sakroiliak ekleme görülür. Genelde sakroiliit bilateral ve simetrik görülür. Bulgular ilerledikçe fibrozis, kalsifikasyon, interosseöz köprüleşme, ossifikasyon ve son olarak ankiloz gelişir. Sakroiliak eklem tutulumu sonrasında lomber bölgeden başlayıp yukarı doğru ilerleyen vertebra tutulumu izlenir. Osteit denilen diskovertebral bileşkenin anterior kısmının inflamasyonu ilk bulgudur. Aksiyel iskelette etkilenen kısım apofizyal, diskovertebral, kostovertebral eklemler ve paravertebral ligamanlardır. Bu bölgelerde ortaya çıkan değişiklikler sonucunda vertebral kolonun tam füzyonuyla bambu kamışı görünümü oluşur[53].

AS'li hastalarda ve inflamatuvar barsak hastası olanlarda Klebsiella pnömoni ve E. Coli'ye karşı oluşan immünglobülin A(IgA) ve immünglobülin G(IgG) antikor seviyelerinde sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında artış saptanmıştır[54]. AS'li hastalarda enterik bir patojeni düşündürülen nedenlerden biri de hastaların büyük bölümünde barsak inflamasyonunun olması ve hastaların sülfasalazinden fayda görmeleridir[38]. AS patogeneğinde normal barsak florasının tetikleyici faktör olabileceğini gösteren yayınlar vardır. Özellikle periferik artrit ile korelasyon gösteren semptomatik veya asemptomatik barsak inflamasyon bulgularının varlığı bunlardandır[55]. Bununla birlikte sülfasalazin alan ve almayan reaktif artrit olan hastaların 4-7 yıl sonraki değerlendirmelerinde tedavi almayan 11 hastada kronik artrit gelişirken tedavi alan 2 hastada reaktif artrit geliştiği görülmüştür. Buradan çıkan sonuca bakılınca akut fazda kullanılan antibiyotik tedavisinin klinik prognozu etkiliyor görülmesi, mikrobiyal ajanların kronik hastalık gelişimindeki rolünü üzerinde düşünülmesi gerektiğini göstermektedir[56].

AS etyopatogeneğinde sitokinlerin rolü üzerinde yoğun araştırmalar halen devam etmektedir. Bunlardan birisi aşırı Tümör Nekrozis Faktörü(TNF $\alpha$ ) ekspresyonu ile karakterize bir fare modelinde insana çok benzer bir spondilit gelişimi görülmüştür[57]. AS ile farklı bir çok sitokin birlikteliği gösterilmiştir.bunlardan bazıları IL-1, IL-12, IL-17, IL23 [6, 58, 59].

### **2.5.5 Ankilozan Spondilit Kinik Özellikleri**

AS genel olarak kas-iskelet sistemini etkileyen kas-iskelet sistemi bulguları ve genel bulgularla da seyredilen kronik romatizmal bir hastalıktır.

#### **2.5.5.1 Kas-İskelet Sistemi Bulguları**

AS'nin klinik belirtilerinin genelde geç adölesan dönem veya erken erişkinlik dönemde başladığı belirtilmiştir. AS'nin karakteristik bulguları spinal düzende bozukluk, spinal inflamasyon veya bunlara bağlı olarak gelişebilen spinal mobilite kısıtlılığıdır. Hastaların yaklaşık %75'inde ilk ortaya çıkan şikâyet bel ağrısı ya da bel tutukluluğudur. Bu şikâyetlerin özelliği yavaş yavaş başlaması ve zaman içerisinde artmasıdır. En az 3 ay boyunca süren şikâyetler istirahatle artmakta ve egzersiz ve hareket sonrası azalmaktadır[47]. Bel ağrısının özellikleri arasında gece yarısı uykudan uyandırması ve yer değiştiren gluteal ağrı olması vardır. Hastalığın erken evrelerinde ağrı daha şiddetli olabilir, sakroiliak eklemlere lokalizedir. Ağrı

farklı bölgelere yansıyabilir. Ağrı gelişimi genelde tek taraflı başlama eğilimi gösterirken belli bir süre sonra kalıcı ve iki taraflı hale gelir. Belde oluşan ani hareketler ağrıyı arttırabilir[60].

Omurgada meydana gelen değişiklikler osteoredüksiyona nispeten osteoproliferasyona bağlıdır. Radyografide görülen hastalığın ana özelliği sindezmozitler ve ankilozdur[49]. Sakroiliak eklemden başlayan ankiloz ilerleyerek fleksiyon ve ekstansiyon kısıtlılığına neden olmaktadır[61].

Hem sinovit hem de entezitis, AS'de gözlenen aksiyel ve periferik artrite katkı sağlar. Hastalığa bağlı ortaya çıkan ağrı, tutukluk ve spinal eklemlerin kısıtlılığından entezit sorumludur ve bu durum sakroiliak eklemlerin füzyonuyla sonuçlanabilir[62]. Entezit omurgadan farklı olarak aşil tendonu ve kalkaneusta plantar fasyayı da etkiler. Topukta ağrı ve hareket kısıtlılığına neden olur. Diğer yerleşim yerleri iskial tüberositalar, tibial tüberküller, pelvik addüktör kasların femura yapışma yerleri ve kostokondral bağlantı yerleridir[63].

AS'de sıklıkla effüzyon şeklinde gelişen diz eklemi tutulumu vardır. Hastaların %10 kadarında da temporamandibular eklemi tutulumu olabilir[47].

## **2.5.5.2 Kas-İskelet Sistemi Dışı Bulgular**

### **2.5.5.2.1 Genel Belirtiler**

Hafif ateş, yorgunluk, halsizlik, kilo kaybı gibi yapısal belirtiler sıklıkla eşlik eder[49]

### **2.5.5.2.2 Gastrointestinal Tutulum**

Genelde asemptomatik seyreder. İntestianl inflamasyon klinik ya da subklinik AS'li hastaların %60'ına yakınında görülür[64].

### **2.5.5.2.3 Göz Tutulumu**

AS'nin en yaygın görülen ekstraartiküler tutulumu akut anterior üveittir. %25-40 oranında hastalarda görülür[65].

### **2.5.5.2.4 Kardiyak Tutulum**

AS'de kardiyak tutulum aortit,aort rejurjitasyonu, ileti bozuklukları, perikardittir. Bunların içinde en sık görüleni atrioventriküler ve interventriküler ileti bozukluklarıdır. HLA-B27 kardiyak tutulum için en önemli risk faktörüdür ve genelde geç dönemde ortaya çıkar.

### **2.5.5.2.5 Nörolojik Tutulum**

Omurgada oluşan instabilite, inflamasyon, kırıklara bağlı nörolojik komplikasyonlar görülebilir. Küçük travmalara bağlı kırıklar oluşabilir. Kırıklar sıklıkla servikal bölgede gelişir ve

kuadriplejiye neden olabilir[47]. Atlantoaksiyal subluksasyon AS'li hastalarda görülebilir. Bir diğer ciddi geç dönem komplikasyonu kauda ekuina sendromudur[66].

#### **2.5.5.2.6 Osteoporoz**

Uzun süredir AS tanısı alan hastaların yarısından fazlasında osteopeni ya da osteoporoz bildirilmiştir. Osteoporoz nedeni olarak mobilite kısıtlanması yanında osteoblast/osteoklast aktivitesinde dengesizlik görülebilir[67].

#### **2.5.5.2.7 Pulmoner Tutulum**

Pulmoner tutulum AS'de görülen geç ve nadir bir bulgudur. En sık rastlanan bulgu akciğer üst loblarının fibrozisi ve plevral kalınlaşmadır[67].

#### **2.5.5.2.8 Renal Tutulum**

Sekonder amiloidoz AS'nin en yaygın renal bulgusudur. Nadir bir komplikasyon olarak görülmektedir. Bunun yanında IgA düzeyi artışına bağlı ortaya çıkan ve proteinürinin de eşlik ettiği IgA nefropatisi görülebilir. Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlara bağlı nefropati de görülebilir.[68]

### **2.5.6 Fizik Muayene Bulguları**

Erken tanı koyabilmek için özellikle omurga ve sakroiliak eklemleri içine alan ayrıntılı bir fizik muayene yapılmalıdır. İlk gözlemlenen patolojik fizik muayene bulgusu sakroiliak eklemlerde ortaya çıkan ağrı ve hassasiyettir. Eğer sakroiliak eklemden bir inflamasyon varsa hasta sırt üstü yataken kalça hareketleri ile de ağrı ortaya çıkabilir. Bel düzlemindeki hareketler incelenmelidir. Lateral fleksiyonda AS'de genelde anormal, lomber diskopatide ise normaldir. Özellikle kalça omuz eklem hareket genişliğine bakılmalıdır[38]. İncelemeyle lomber lordozun kaybolduğu görülebilir.

Maksimum ekspiryum ve inspiryum arasındaki fark ölçülür. Bu ölçüm hastanın elleri başının arkasında veya üstünde iken dördüncü interkostal aralıktan yapılır. Bu farkın cinsiyet ve yaşa bağlı faktörlere bağlı olarak 5 cm altında olması anlamlı sonuç verir[47, 69].

Servikal mobilite ve artmış kifozun belirlenmesi açısından oksiput duvar mesafesi ve tragus duvar mesafesi değerlidir. Ölçüm yapılırken pozisyonlamada hasta düz bir duvara sırtını yaslar, ayaklar arası mesafe uygun olur ve topuk mümkün olduğunca duvara yakındır. Çene nötral pozisyona alınıp gözler ufuk çizgisine baktırılır. Bu esnada oksiput ile duvar ve tragus ile duvar arası mesafe ölçülür[70].

İntermalleolar mesafe ölçümü yapılır. Hasta sırt üstü pozisyonda muayene masasına uzanır. Ölçüm kalçalar tam ekstansiyondayken mümkün olan en fazla abdüksiyon uygulanarak yapılır[47].

### **2.5.7 Laboratuvar Bulguları**

AS tanısı başlıca önemli iki laboratuvar bulgusu HLA-B27 ve CRP'dir[49]. Rutin biyokimyasal testler AS'de diğer kollajen doku hastalıkları veya vaskülitlerdeki kadar yardımcı olamayabilirler. Artmış C-reaktif protein(CRP) düzeyleri veya eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) düzeyleri genelde artmış olmakla birlikte normal ESH veya CRP düzeyleri hastalık varlığını dışlamaz[71, 72].

AS'de bazı hastalarda kemik kaynaklı alkalen fosfataz hafif yükselebilir. Bunların yanında kompleman düzeyleri ve immün kompleksler de hafif ve orta derecede yüksek bulunabilir[73].

### **2.5.8 Radyolojik Bulgular**

AS'nin tanı, takip ve sınıflaması yapılırken görüntüleme yöntemleri önemli yere sahiptir. Karakteristik radyografik bulguları sakroiliak eklemler ve omurga üzerindeki apofizer, diskovertebral, kostotransvers ve kostovertebral eklemlerde görülür[74]. Oluşan bulguların değerlendirilmesinde kemik sintigrafisi, konvansiyonel radyografi, ultrason, bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yer alır.

Altın standart kabul edilen konvansiyonel radyografilerde erken dönemde ortaya çıkan bulguların saptanması zor olmaktadır. Sakroileit de dâhil olmak üzere birçok radyolojik bulguların yavaş ortaya çıkıyor olması duyarlılığı daha yüksek testlere yöneltmiştir[49].

Sakroiliak eklem yapısı nedeni ile görüntülenmesi zor bir eklemdir. AS tanı ve takibinde birinci basamakta konvansiyonel radyografiler kullanılırken, erozyonları göstermede BT kullanılır. MRG ise son 10 yıldır değer kazanmıştır[67]. Eklem yüzeyinde ortaya çıkan bulanıklaşma ve keskinliğinde azalma direkt radyografide sakroileitin en erken bulgusu konumundadır. Daha sonra zamanla yüzeyel erozyonlar ve subkondral kemikte fokal sklerozda artışlar görülür. Eklem aralığında yalancı bir genişleme zamanla erozyonların ilerlemesi sonucu görülebilir. İlk dönemlerde bu eroziv görüntü varken daha ilerki dönemlerde proliferatif değişiklikler daha belirgin hale gelir ve eklemi çaprazlayan düzensiz kemik köprüler oluşmaya başlar. Zamanla da eklem aralığında tam bir ankilozla sonuçlanabilir[75-77]. Konvansiyonel radyografiye göre sakroiliit bulguları olan eklem mesafesi irregularitesi, fokal kortikal

erozyonlar ve subartiküler skleroz artığı BT’de daha erken görülebilir. MRG normal sakroiliak eklemi göstermede son derece değerlidir. Sinoviyal ve ligamentöz yapıları ayırt eder. MRG’de iki tip lezyon tanımlanmıştır. Tip 1 lezyonlar subkondral ödemi temsil etmekte ve inflamasyonun akut fazını göstermektedir. Tip 2 lezyonların ise fibröz ve kemiksi skleroz değişikliklerini temsil ettiği düşünülmektedir[67].

Omurlarda erozyon sonrası ortaya çıkan skleroz normalde konkav olan yüzeylerin kareleşmesine yol açarak AS’de omurlarda tipik radyolojik görünüm olan kare vertebra oluşumuna neden olur. Ortaya çıkan bu değişiklikler lomber omurgadan başlar ve yukarı doğru yayılır[74]. Anulus fibrozusun ve spinal ligamanların kalsifikasyonu ile sindesmofitler oluşur. AS’de sindesmofitler enteropatik spondilitteki gibi simetrik ve bilateraldir[78]. Ön arka torakolomber grafide bambu kamışı olarak adlandırılan çok seviyeli, simetrik sindesmofit oluşumu vardır. Diğer bir radyolojik görünüm ise üçlü ray belirtisi denilen apofizer eklemlerin sklerozu, eklem ligamanlarının ve interspinöz ligamanlarının kalsifikasyonudur[41]. Artık ankiloz gelişmiş omurgada diskovertebral bileşkede eroziv değişiklikler anderson lezyonları denilen steril spondilodiskite bağlı ortaya çıkabilir. Bu değişiklik çoğunlukla fraktüre sekonder gelişir ve bunun sonucunda psödoartroz oluşur. Klinikte şiddetli, yeni oluşan omurga ağrısında düşünülmelidir. Radyografide genelde disk aralığında daralma ve düzensiz dansite artışı görülür. Sintigrafide de lokal aktivite artışı saptanır. MRG ile diskite tanısı konur[41, 67].

AS’de omurga ve sakroiliak eklem sonrası en sık tutulum kalçada görülür. Kalçalar bilateral ve simetrik tutulur[74, 79]. Uzun zamandır AS tanısı alan hastalarda omuz tutulumu %30'lara yakındır. Omuz tutulumu bilateral ve simetriktir. Bunların dışında diz ekleminde, simfizis pubiste, sternomanibrual ekleminde, medial ve lateral malleolde, olekranonda, patella ön yüzünde, klavikula alt kenarında da tutulum olabilir.

### **2.5.9 Ayırıcı Tanı**

AS de tanı kriterlerinin tarihine baktığımızda ilk kez 1961’de Roma ’da sunulduğunu görüyoruz. Daha sonra bu kriterler 1966’da New York’ta düzenlenmiş ve en son gözden geçirilerek 1984’de Modifiye New York kriterleri olarak düzenlenmiştir(Tablo 1).

**Tablo 1. Modifiye New York sınıflama kriterleri**

---

#### **MODİFİYE NEW YORK KRİTERLERİ 1984**

1. En az 3 aydır var olan, egzersizle düzelen istirahatle azalmayan bel ağrısı

---

- 
2. Lomber omurganın sagittal ve frontal düzlemlerde hareket kısıtlılığı
  3. Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinse göre normal değerlerin altında olması
  4. a. Evre 3-4 unilateral sakroiliit
  - b. Evre 2-4 bilateral sakroiliit
- 

Modifiye New York kriterlerinden sonra Avrupa Çalışma Grubu (ESSG) kriterleri yayımlanmıştır.

AS'de tanı öncelikle öykü ve fizik muayeneye dayanır. Daha sonra radyolojik bulguların eklenmesi ile desteklenir. Ayırıcı tanıda toplumda sıklıkla görülen bel ağrıları nedenlerinin dışlanması gerekmektedir. Bunlardan omurgaya bağlı oluşan nedenler travmatik, yapısal, neoplaziye bağlı oluşan patolojiler, metabolik, enfektif nedenlerken omurga dışında oluşan nedenler damarsal, nörolojik ve psikolojik nedenlerdir[78]. Adölesan dönemde başlaması, aile öyküsü AS tanısına yakınlaştırır. Kesin tanı konulması klinik kriterlerin yanında radyolojik olarak sakroiliitin görülmesi ile olur. Radyolojik sakroiliit ayırıcı tanısında farklı hastalıkları da akla getirmek gerekir[80]. Bunlar arasında diğer spondiloartropatiler, enfeksiyonlar, hiperparatirodi, sarkoidoz ve parapleji sayılabilir.

#### **2.5.10. Hastalık Aktivitesinin Değerlendirilmesi**

Ankilozan spondiliti olan hastalarda; tedavi planı yapılabilmesi, hastanın takip edilebilmesi ve tedaviye cevabın değerlendirilebilmesi için hastalık aktivitesinin belirlenmesi çok önemlidir. AS'de ağrı ve yumuşak doku inflamasyonuna bağlı olarak fonksiyonel yetersizlik, aksiyel ve periferik eklemlerde lezyonlar meydana gelir. Hastalarda ortaya çıkan fonksiyonel yetersizliğe bağlı olarak hastaların yaşam kalitesi olumsuz etkilenmekte, iş gücü kayıpları olmakta, ayrıca tedavinin ekonomik maliyeti de artmaktadır [81]. Hastalık aktivitesinin değerlendirmesi için Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (Bath AS Hastalık Aktivite İndeksi- BASDAI), Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (Bath AS Fonksiyonel İndeksi - BASFI) ölçekleri hazırlanmıştır. BASDAI değeri 4 ve üzerinde olan bireylerde aktif hastalık olarak değerlendirilmektedir.

#### **2.5.11 Prognoz**

AS'de seyir hastadan hastaya değişir. Spontan remisyonlar ve alevlenmelerle seyreden hastalığın prognozu genelde iyi kabul edilmektedir. Hastalıkta süresi uzadıkça işlevsel kısıtlanmalar olur. Özellikle hastalığın ilk 10 yılında bu fonksiyon kayıpları ortaya çıkar. Ölüm

nedenleri spinal kırıklar ve amiloidozis gibi hastalık komplikasyonlarının yanı sıra gastrointestinal, renal veya kardiyovasküler hastalıklardır.

### **2.5.12 Tedavi**

Tedavide esas amaç ağrı, tutukluk, yorgunluğu giderebilmek düzgün postürü koruyabilmek, fiziksel ve psikososyal işlevselliği iyi düzeye getirmektir. Tedavideki temel prensipler Uluslararası Spondiloartrit Değerlendirme Topluluğu (ASAS) ve Avrupa Romatizma Savaş Derneği (EULAR) önerilerinde vardır[82].

#### **Tablo 2. AS Tedavisinde ASAS/EULAR 2010 Güncellenmiş Öneriler[83]**

1. Genel tedavi: AS'de tedavi hastalığın var olan bulgularına (aksiyel, periferik, entezial, eklem dışı semptom ve belirtiler), var olan semptomların düzeyine, hastadaki klinik bulgulara ve prognostik belirleyicilere, hastalık aktivitesine ve inflamasyona, ağrıya, fonksiyona, engelliliğe, yapısal olan hasara, kalça tutulumuna, spinal deformitelere, genel klinik duruma (yaş, cinsiyet, komorbidite, eş zamanlı tedavi, hastanın istekleri ve beklentileri) göre düzenlenmelidir.
2. Hastalığın takibi: AS'de hastalık takibi ASAS setinde var olduğu şekliyle tüm klinik tabloya göre hasta öyküsünü (örneğin anketler), klinik parametreleri, laboratuvar testlerini ve görüntüleme metotlarını kapsamalıdır.
3. Farmakolojik olmayan tedavi: AS'li hastalarda farmakolojik olmayan tedavide en önemli olan eğitim ve düzenli egzersizdir. Özellikle ev egzersizleri önemlidir. Ancak bireysel ya da grupla, su ya da zemin egzersizleriyle birlikte yapılan fizik tedavi evde yapılan egzersize göre daha etkindir. Hasta ve kişisel destek grupları faydalı olabilir.
4. Eklem dışı tutulum ve komorbidite: Psöriazis, üveit ve inflamatuvar barsak hastalığı (İBH) gibi birlikte gözlenen eklem dışı tutulumlar her biri kendi alanında uzman kişilerle işbirliği içinde tedavi edilmelidir. Romatolog kardiyovasküler hastalık ve osteoporoz risk artışını da unutmamalıdır.
5. Non-steroid antiinflamatuvar ilaç(NSAİİ): AS'li hastalarda ilk seçenek ilaç olarak tavsiye edilir. NSAİİ ile devamlı tedavi; sürekli aktif ve semptomatik hastalığı olan hastalarda tercih edilmelidir. NSAİİ reçete edildiğinde olası kardiyovasküler, gastrointestinal ve renal riskler göz önünde bulundurulmalıdır.
6. Ağrı kontrolü için parasetamol ve opioidlere NSAİİ'in faydasız olduğu, kontrendike

olduğu ve/veya zayıf tolere edildiği hastalarda başvurulabilir.

7. Muskuloskeletal inflamasyona bölgesel olarak direkt kortikosteroid enjeksiyonları düşünülebilir. Sistemik kortikosteroidlerin kullanımı ise aksiyel hastalıkta kanıtlanmamıştır.
8. Aksiyel hastalığın tedavisinde salazoprin ve metotreksat gibi hastalık modifiye edici ilaçların (HMEİ) faydasını gösteren kanıt yoktur. Salazoprin periferik artriti olan hastalarda düşünülebilir.
9. Anti-TNF tedavi: ASAS kriterlerine göre farklı tedavilerin başarısız olduğu ve hastalık aktivitesi yüksek olan hastalara verilmelidir. Anti-TNF aksiyel hastalığı olan kişilerde tedavi öncesinde veya tedaviye eş zamanlı HMEİ'lerin zorunlu kullanımı için kanıt yoktur. Eklem/entezit ve aksiyel tutulumda değişik TNF inhibitörü ile farklı etkinlik sağladığını destekleyen bir kanıt yoktur, fakat İBH varlığında tercih olarak gastrointestinal etkinliği olan kullanılmalıdır. Cevap alınamayan hastalarda ikinci TNF inhibitörüne geçiş yapmakta fayda olabilir. TNF inhibitöründen farklı bir biyolojik ajan kullanımını destekleyen kanıt AS'de gösterilmemiştir.
10. Cerrahi: Eklem replasmanı; refrakter ağrısı, dizabilitesi olan ve ileri evre kalça tutulumuna ait radyografik kanıtı olan hastalarda hasta genç olsa dahi göz önünde bulundurulmalıdır. Şiddetli sakatlığa yol açan deformitesi olan hastalarda spinal düzeltme osteotomisi uygulanabilir. Akut vertebral fraktür oluşan hastalar spinal cerraha yönlendirilebilir.
11. Hastalık seyrinde değişiklik: Hastalık seyrinde gözle görülür bir farklılık olduysa; inflamasyondan farklı sebepler düşünölmeli uygun değerlendirme yapılmalıdır.

## 2.6 SİTOKİNLER

Bağışıklık sisteminin üyesi olan veya olmayan farklı hücre tipleri tarafından üretilen ve salınan polipeptid yapıda bileşikler olan sitokinler, hematopoezde, immün yanıtta, hücreler arası ilişkilerde ve inflamatuvar yanıtta rol alan düzenleyici görevi olan sinyal proteinleridir[84]. Sitokinler üretildikleri hücreler ve etki mekanizmaları açısından farklı isimlendirilebilirler. Monosit kaynaklı olanlar monokin, lenfosit kaynaklı olanlar lenfokin, kemotaksis üzerine etki edenler kemokin ve tek lökosit tarafından üretilip diğer lökositler üzerinde rol oynayanlar ise

interlökin olarak adlandırılır. Üretildiği hücre üzerine etki eden sitokinler otokrin, komşu hücelere etki edenler parakrin, uzaktaki hücelere etki edenler endokrin etki gösterirler. Aynı sitokini salgılayan farklı hücre tipleri de vardır. Bir sitokin değişik hücre türleri üzerine pleotropik etki gösterebilir. Aynı görevi yapan farklı sitokinler de olabilir. Sitokinlerin salınımı birbirleri üzerinden de olmaktadır. Bir kısım sitoki agonistik etki gösterirken bir kısım antagonistik etki gösterir[85].

Sitokinler çok geniş bir protein grubudur. Genel olarak baktığımızda birçok ortak özellikleri vardır. Sitokinler doğal bağışıklığın efektör fazında üretilirler. Bağışıklık sisteminin oluşmasında ve inflamatuvar yanıtta rol alırlar. Doğal bağışıklıkta mikrobik ajanlar mononükleer fagositleri doğrudan uyararak kendi sitokinlerini salgılatırlar. Vücuda giren yabancı antijenlerin tanınması için T hücreleri tarafından üretilirler. Sitokinlerin salınımı kısa ve sınırlı bir durumdur. Genelde depolanmazlar ve sentezleri yeni transkripsiyonla başlar. Sitokinlerin etki ettiği birçok farklı hücre tipi vardır. Etki ettikleri aynı hücrede farklı birçok etki otaya koyabilirler. Bazı etkileri aynı anda oluşurken bazı etkileri günler sonra ortaya çıkabilir. Birbirleri üzerine de etkileri vardır. Bir sitokin başka bir sitokinin salınımını artırıp azaltabilir. Sitokinler hormonlarda olduğu gibi hedef hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak etki başlatırlar. Bu reseptörlerin ekspresyonunda özel sinyaller tarafından düzenlenme sağlanır. Sitokinler tarafından hedef hücrede oluşan değişimlerin çoğu yeni mRNA ve protein sentezini gerektirir[86].

## **2.7 IL-17 SİTOKİN AİLESİ**

IL-17, T hücre cevabı oluşumundan sorumlu sitokin ailesinin yeni bir üyesidir. IL-17A tanımlanmış ilk üyesidir. 2000 ile 2002 yılları arasında 5 yeni üye de IL-17 sitokin ailesine katılmıştır. Sırasıyla IL-17B, C, D, E ve F olarak adlandırılmıştır. IL-17'yi kodlayan gen 6. kromozom üzerinde yerleşmiştir[87]. Bunun yanında IL-17 ailesine ait 5 adet te reseptör tanımlanmıştır. Bunlar da IL-17RA, IL-17RB/IL-25R, IL-17RC, IL17-RD/SEF ve IL-17RE olarak isimlendirilmiştir[88, 89]. Reseptör kompleksi multimeriktir. En az iki IL-17RA alt ünitesi ve bir IL-17RC alt ünitesinin meydana getirdiği reseptör kompleksine IL-17'nin bağlandığı görülür. Fakat bağlanmanın ne oranda olduğu tam bilinmemektedir[90]. IL-17 reseptörü birçok hücrede eksprese edilmekte olup, birçok hücre de sitokine cevap vermektedir. IL-17 salgılanması esas olarak T hücrelerinden olmaktadır. Bunun yanında makrofajlardan, dentritik hücrelerden ve doğal öldürücü hücrelerden de salgılanabilir. Salgılanma sonucu IL-17

proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, hücre adezyon moleküllerinin ve büyüme faktörlerinin üretimini sağlar[88]. Bunun yanında IL-17 mikrobik ajana karşı savunma için gereklidir. Th17 bazı in vivo çalışmalarda otoimmün hastalıklarda patojenik rol oynamaktadır[88, 91]. Ek olarak doku-biçimlendirici faktörler ve B hücre regülasyonunda da rol alır[92]. Astım, inflamatuvar barsak hastalığı, sistemik lupus eritematozus gibi bazı otoimmün hastalıklarda yapılan çalışmalarda IL-17 ekspresyonunun arttığı görülmüştür[93-95]. IL-17 CD4+T yardımcı hücrelerinin yeni tanımlanan bir alt grubu olan Th17 tarafından üretilmektedir. TGF- $\beta$ , IL-6 ve IL-23 gibi doğal sitokinler IL-17 üreten T hücrelerinin devamlılığını sağlar ve farklılaşmasına katkıda bulunur. Bazı otoimmün hastalıkların fare modelinde IL-17'nin yıkıcı inflamasyondan sorumlu olduğu gösterilmiştir[96].

IL-17A biyolojik fonksiyonu doğal ve kazanılmış bağışıklık arasında köprü oluşturan dimerik glikoprotein bir yapıdır[97, 98]. 155 aminoasitten meydana gelen bir polipeptit zinciri sentezleyen IL-17A geni yaklaşık olarak 4,2 kb uzunluğundadır[98]. IL-17A esas olarak aktif CD4+T hücrelerinde eksprese olur. Dinlenme esnasında bu ekspresyon olmaz. Diğer IL-17A kaynakları nötrofiller, eosinofiller ve CD8+T hücreleridir[88]. IL-17A geninde yer alan yaklaşık 60'dan fazla SNP bulunur. Bunların çoğu introniktir[99]. IL-17A esas fonksiyonu sitokin ve kemokin indüksiyonuyla birlikte kemoatraktan aktivite göstermektedir[93].

IL-17F aynı zamanda ML-1 ya da IL-24 olarak da adlandırılır. IL-17F kodlayan gen 3 ekzona sahip olup 7742 baz içerir. 153 aminoasit içeren bir protein kodlar. IL-17F CD4+T hücreleri, bazofiller ve aktif mast hücrelerinden salgınır[100]. IL-17F geninde 100'den fazla SNP varlığı tespit edilmiştir [99]. IL-17F geninde 3. ekzonda bulunan 7383AG(rs2397084) polimorfizmi 126. kodonda Glutamat(E)-Glisin(G) aminoasit değişimini meydana getirir.

IL-17A ve IL-17F'in kodlandığı genler 6. kromozomun p12 bandında birbirlerine yakın yer alırlar[101]. IL-17A ve IL-17F genleri arasında %60'a yakın homoloji olmakla birlikte birbirlerine çok benzemektedir ve birlikte uyum içinde eksprese olurlar. Bu benzerlik ve uyum regülasyonlarının ve biyolojik aktivitelerinin benzerliğini göstermektedir[102, 103]. IL-17A ve IL-17F proinflamatuvar sitokinlerdir ve birlikte birçok proinflamatuvar sitokini (IL-6, granulocyte colony stimulating factor-GCSF, TNF-alpha), kemokini (CXCL1, CXCL2 vb.), akut faz reaktanlarını, komplemanları, defensin ve musin gibi antimikrobiyal proteinleri indüklerler[104].

IL-17'nin günümüze kadar RA, SLE, MS, psöriazis, inflamatuvar barsak hastalığı, tip 1 diyabet gibi otoimmün hastalıklara olan ilişkisi ortaya konmuştur[92]. AS'de de IL-17 serum düzeyleri ile ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur[13]. Bugüne kadar AS hastalarında IL-17 bölgesine ait yapılmış polimorfizm çalışması olmamakla birlikte bizde çalışmamızda IL-17A ve IL-17F bölgelerine ait polimorfizm çalışması planladık.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Hastalar**

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'na bağlı Romatoloji Polikliniği'nde takip edilen, Modifiye New York tanı kriterlerini karşılayan, 18-50 yaş arası, 89 AS hastasından alınan kanlar kullanılarak yapıldı. Çalışma, Fakültemiz bünyesinde bulunan Etik Kurul onayı alınarak gerçekleştirildi.

##### **3.1.2. Kontrol Grubu**

Hastanemiz poliklinik bünyesinde yapılan muayene ve tetkikler sonucu sağlıklı olduğu tespit edilen yaşları 24 ile 56 arasında değişen 89 birey kontrol grubu olarak çalışmaya dâhil edildi.

##### **3.1.3. Örneklerin Toplanması**

Çalışmaya katılan her hastadan ve kontrol grubuna katılan kişilerden 10 ml'lik EDTA'lı tüplere periferik venöz kan alındı.

##### **3.1.4. Kullanılan Aletler**

DNA izolasyon cihazı (FUJIFILM QuickGene), spektrofotometre (NanoDrop 2000 UV-Vis, Thermo Scientific), ABI PRISM® 310 genetic Analizör (Applied Biosystems Inc.), buzdolabı (Arçelik), derin dondurucu (Vestel), PZR Cihazı (NyxTechnik), Jel Görüntüleme Sistemi (Gel Logic 212PRO, Carestream), Hassas Terazisi (Ohaus-Pioneer), Mikropipet Seti (ependorf), Jel Elektroforezi Tankı ve Güç Kaynağı (NyxTechnik), Isıtıcı Blok (Dunn Labortechnik-Stuart), Mikrodalga fırın (Arçelik), Flash spindown (ViprΩ), Vorteks (Boeco)

##### **3.1.5. Kimyasal Malzemeler**

DNA izolasyon kiti (FUJIFILM QuickGene DNA whole blood kit S), dNTP seti (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Vivantis), Taq DNA polimeraz enzimi seti (Vivantis), 50xTAE (Vivantis), primerler (Metabion), agaroz (Vivantis), etidiyum bromid (Vivantis), VC 100bç Plus DNA ladder (Vivantis), 50bç DNA ladder (Norgen), 6x yükleme boyası (Vivantis), BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kiti (ABI), restriksiyon enzimleri: BstENI (Vivantis), AvaII (Vivantis), ExoSAP-IT (USB-Affymetrix Inc.)

### **3.1.6.Yöntem Sırasında Kullanılacak Solüsyonlar**

#### **IL-17A (-197A/G) (rs2275913) polimorfizmi için primerler:**

F:5' AAC AAG TAA GAA TGA AAA GAG GAC ATG GT 3' primeri liyofilize halde 26,1 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 261 µl steril distile su ile sulandırıldı. 1 saat dinlenmeye bırakıldıktan sonra 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi. Elde edilen seyreltilmiş primer ve ana primer -20°C de saklandı.

R:5' CCC CCA ATG AGG TCA TAG AAG AAT C 3' primeri liyofilize halde 31,9 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 319 µl steril nükleaz free water ile sulandırıldı. 1 saat dinlenmeye bırakıldıktan sonra 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi. Elde edilen seyreltilmiş primer ve ana primer -20°C de saklandı.

#### **IL-17F (7383A/G) (rs2397084) polimorfizmi için primerler:**

F: 5' GTG TAG GAA CTT GGG CTG CAT CAA T 3' primeri liyofilize halde 37,5 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 375 µl steril nükleaz free water ile sulandırıldı. 1 saat dinlenmeye bırakıldıktan sonra 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi. Elde edilen seyreltilmiş primer ve ana primer -20°C de saklandı.

R: 5' AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC 3' primeri liyofilize halde 32,9 nmol iken 100 pmol primer çözeltisi için 329 µl steril nükleaz free water ile sulandırıldı. 1 saat dinlenmeye bırakıldıktan sonra 100 pmol çözelti 10 kat sulandırılarak 10 pmol primer çözeltisi elde edildi. Elde edilen seyreltilmiş primer ve ana primer -20°C de saklandı.

#### **2mM dNTP karışımı hazırlanışı**

2mM dNTP karışımı hazırlamak için her biri 100 mM olan dATP, dTTP, dCTT, dGTT çözeltilerinden 20'şer µl alıp 920 µl steril distile su karışımı hazırlanır.

### **Restriksiyon enzimlerinin hazırlanışı**

**BstENI(Vivantis)** : 2 u/µl olarak elimize gelen enzimden 1 u/µl enzim çözeltisi elde edilebilmesi için 50 µl alınarak, 50 µl Dilüsyon A (Vivantis) solüsyonu ile karışım hazırlanır. PZR sonrası elde ettiğimiz ürünün kesimi için aşağıdaki karışım hazırlanır.

Pzr Ürünü	: 15 µl
dH <sub>2</sub> O	: 2,7 µl
Buffer (Vivantis)	: 2 µl
BstENI (1u/ul) (Vivantis)	: 0,3 µl

**AvaII (Vivantis):** 10 u/µl olarak elimize gelen enzimden 1 u/µl enzim çözeltisi elde etmek için 9 µl alınarak 90 µl Dilüsyon A (Vivantis) solüsyonu ile karıştırılır. Enzim reaksiyonu için aşağıda verilen karışım hazırlanır.

Pzr Ürünü	: 15 µl
dH <sub>2</sub> O	: 2,7 µl
Buffer (Vivantis)	: 2 µl
AvaII (1u/ul) (Vivantis)	: 0,3 µl

### **3.2. Yöntem**

Toplanan kan örneklerinde DNA izolasyonu Fujifilm QuickGene DNA izolasyon cihazı ve Fujifilm QuickGene tam kandan DNA ekstraksiyon kiti ile yapıldı. İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometrede (NanoDrop 2000-Thermo Scientific) 260/280 nm dalga boylarında ölçüldü. Daha sonra agaroz jelde yürütülerek DNA var olup olmadığı teyit edildi. Ensemble Genome Browser'da yapılan analizler ve literatür taraması sonucunda her bir hedef SNP noktasını içeren bölgeleri çoğaltacak primerler Tablo 3'de verildiği şekilde seçildi[105]. Uygun Magnezyum miktarı ve bağlanma (annealing) sıcaklıkları için Gradyent PZR'lar yapılarak optimum PZR koşulları sağlandı.

**Tablo 3: Hedef bölgelerin amplifikasyonu için kullanılan primerler**

Polimorfizm	Primerler	Ürün Büyüklüğü
IL-17A (-197A/G) (rs2275913)	F:5' AAC AAG TAA GAA TGA AAA GAG GAC ATG GT 3' R:5' CCC CCA ATG AGG TCA TAG AAG AAT C 3'	102 bç
IL-17F (7383A/G) (rs2397084)	F:5' GTG TAG GAA CTT GGG CTG CAT CAA T 3' R: 5' AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC 3'	470 bç

IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için 102 bç'lik PZR ürünü elde etmek amacı ile;

F:5' AAC AAG TAA GAA TGA AAA GAG GAC ATG GT 3',  
R:5' CCC CCA ATG AGG TCA TAG AAG AAT C 3'

IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için 470 bç'lik PZR ürünü elde etmek amacı ile;

F: 5' GTG TAG GAA CTT GGG CTG CAT CAA T 3'  
R: 5' AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC 3'

primer çiftleri kullanılarak hedef bölgeler PZR ile çoğaltıldı.

**PZR Miksi:** Her bir primer çiftiyle hedef bölgelerin çoğaltılabilmesi için gerekli PZR reaksiyon karışımına sırasıyla dH<sub>2</sub>O: 13,4 µl, Buffer A: 2,5 µl, MgCl<sub>2</sub> (50mM): 1,5 µl, dNTP (2mM-V): 2,5 µl, F (10pmol): 1 µl, R (10pmol): 1 µl, Taq (5u/ul): 0,1 µl, DNA: 3 µl konularak toplamda 25 µl hazırlanır.

### PZR Koşulları

#### IL-17A (-197A/G) için :

1. Aşama

Ön Denatürasyon : 94°C 5 dk

2. Aşama: 35 siklus olacak şekilde ayarlandı.

Denatürasyon : 94°C 30 sn

Bağlanma (Annealing)	:	61°C	30 sn
Sentez	:	72°C	30 sn
3. Aşama			
Son sentez	:	72°C	4 dk
PZR sonrası saklama koşulu	:	+4°C	

### **IL-17F (7383A/G) için :**

#### 1. Aşama

Ön Denatürasyon : 94°C 5 dk

2. Aşama: 35 siklus olacak şekilde ayarlandı.

Denatürasyon : 94°C 30 sn

Bağlanma (Annealing) : 65,8°C 30 sn

Sentez : 72°C 30 sn

#### 3. Aşama

Son sentez : 72°C 4 dk

PZR sonrası saklama koşulu : +4°C

### **Agaroz jel hazırlanması**

10 ml 50xTAE ile 990 ml distile su ile karıştırılarak 0.5xTAE hazırlanır. 1,5 gr agaroz 100 ml 0.5xTAE içine karıştırılır ve %1.5'luk agaroz jel elde edilir. Mikrodalga fırında 2 dk bekletilir. Hafif soğuduktan sonra içine 6 µl etidium bromür eklenir ve karıştırılır. Hazır olan karışım, önceden tarakları yerleştirilmiş jel tabağa dökülür. Karışımın soğuyup katılaşması beklenir. % 2.5'lik agaroz jel elde etmek için de 100ml 0.5xTAE ile 2.5 gr agaroz karıştırılır.

### **PZR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde değerlendirilmesi**

%1.5'lik agaroz jel hazırlandı. Jel, elektroforez kabına konulup kabın içi 0.5X TAE buffer ile jelin üstünü örtecek kadar dolduruldu. Her hasta için 2 µl PZR ürünü 3 µl distile su ve 1 µl yükleme boyası asetat üzerinde karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birine PZR ürünlerinin boyutlarını saptamak amacıyla 50 bç DNA Ladder yüklendi. Güç kaynakları elektroforez tankına bağlanıp 130V ile 15 dk çalıştırıldı. Süre bitiminde jel, elektroforez tankından alınıp Gel Logic (Carestream) jel görüntüleme cihazında değerlendirildi.

## RFLP

### Reaksiyonda Kullanılacak Restriksiyon enzimleri

IL-17A (-197A/G) genotipi tayini için BstENI (Vivantis) ,

IL-17F (7383A/G) genotipini tayin için AvaII (Vivantis), (Tablo 4).

BstENI enzimi CCTNNNNNAGG dizisini tanıyarak çift iplikli zinciri T bazından iki baz sonra(CCTNN/NNNAGG) kesmektedir. IL-17A -197 pozisyonunda G var ise (CCTNNNNNAGG) enzim PZR ürününü keser, 68 ve 34 bç'lik iki adet çift zincir ürün oluşur. Aynı pozisyonda A var ise (CCTNNNNNAGA) enzim PZR ürününü kesemez ve 102 bç'lik PZR ürünü tek parça olarak kalır.

AvaII enzimi GGWCC dizisini tanıyarak çift iplikli zinciri iki G nükleotidi arasından (G/GWCC) keser. IL-17F 7383 pozisyonunda G olduğunda (GGWCC) enzimin PZR ürününü kesmesiyle 395 ve 75 bç'lik iki adet kesim ürünü oluşur. Aynı pozisyonda A var ise (AGWCC) enzim kesim yapamaz ve PZR ürünü tek parça olarak kalır.

**Tablo 4: Kullanılan restriksiyon enzimleri ve kesim ürünleri**

Polimorfizm	Kesim Enzimi	Tanıma ve Kesme Dizisi	Genotip	Kesim Ürünleri
IL-17A (-197A/G)	BstENI	<b>CCTNN/NNNAGG</b>	GG	68, 34
			AG	102, 68, 34
			AA	102
IL-17F (7383A/G)	AvaII	<b>G/GWCC</b>	AA	470
			AG	470, 395, 75
			GG	395, 75

### **Restriksiyon enzimleri ile muamele**

Kesim enzimleri ile PZR ürünleri, hazırlanan reaksiyon karışımlarında AvaII enzimleri ile 37°C’de, BstENI enzimi ile 65°C’de 16 saat inkübe edildi. Kesim reaksiyonu sonrası ürünler %2,5’luk agaroz jelde elektroforez ile görüntülendi.

### **Kesim ürünlerinin değerlendirilmesi**

PZR ürünlerini restriksiyon enzimleri ile muamele ettikten sonra %2,’lik Agaroz jel hazırlanır. Enzim ile muamele edilmiş ürünlerden 5 µl alınır, 6 µl distile su ve 1 µl yükleme boyası ile karıştırılır ve jel kuyucuklarına yüklenir. Jel elektroforezi 130 V’da 15 dk çalıştırılır. Gel Logic 212PRO (Carestream) jel görüntüleme cihazında değerlendirme aşağıdaki şekilde yapılır:

#### **IL-17A (-197A/G) polimorfizmi:**

102 bç’lik tek bant AA,

68 ve 34 bç’lik iki bant GG,

102, 68 ve 34 bç’lik üç bant görülmesi AG genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi.

#### **IL-17F (7383A/G) polimorfizmi:**

470 bç’lik tek bant AA,

395 ve 75 bç’lik 2 bant GG,

470, 395 ve 75 bç’lik üç bant AG genotipi ile uyumlu olarak değerlendirildi.

### **DNA Dizi Analizi**

PZR-RFLP yönteminin konfirmasyonu amacıyla her bir polimorfik bölge için rastgele beş hastanın DNA’sı kullanılarak ilgili bölgeler amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası PZR ürünü %2.5’lik Agaroz Jel elektroforezi ile değerlendirildi. Uygun olan PZR ürünleri ExoSAP-IT ile saflaştırıldı.

### **ExoSAP-IT ile pürifikasyon**

4.5 ul PZR ürünü 6 µl distile su ve 1.5 ul EXOSAP karışımı hazırlandıktan sonra 37°C’de 15 dk inkübe edildi. 80°C’de 15 dk inkübasyon ile inaktivasyon yapıldı.

### **Sekans PZR reaksiyonu**

Big Dye Cycle Sequencing V3.1 Kit:	1 ul
5X sequencing Buffer	: 2 ul
F veya R Primer	: 2 ul
PZR Ürünü	: 2 ul
dH <sub>2</sub> O	: 3 ul

### **Sekans PZR koşulları**

#### 1. Aşama

Ön Denatürasyon : 96°C 1 dk

#### 2. Aşama: 25 siklus olacak şekilde dizayn edildi.

Denatürasyon : 96°C 10 sn

Bağlanma (Annealing) : 50°C 5 sn

Sentez (Extension) : 60°C 4 dk

PZR sonrası saklama koşulu : +4°C

PZR sonrası ürünler ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.) cihazına yüklendikten sonra Sequencing Analysis Software v5.3.1 cihazı ile analiz yapıldı.

### **3.3. İstatiksel Analiz**

Veriler SPSS 13.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol gruplarına ait kategorik değerlerin polimorfik bölgelere ait genotip ile ilişkisinin incelenmesinde Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi kullanıldı. Ayrıca genotip ile cinsiyet, HLA-B27, aile öyküsü ve BASDAI skorları arasındaki ilişkinin incelenmesinde de Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi kullanıldı. p değerinin 0.05’in üzerinde olması ( $p>0.05$ ) durumunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki olmadığı, p değerinin 0.05’in altında olması ( $p<0.05$ ) durumunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki var olduğu belirlenecek.

## **4. BULGULAR**

Ankilozan Spondilit ile IL-17 gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesi için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakóltesi Etik kurulunun 19.06.2012 tarih ve 2012/71 no'lu etik kurul onayı alındıktan sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakóltesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalında AS tanısı konulan yaşları 18 ila 50 arasında değişen, yaş ortalaması 35.4 (SD=8.1) olan 64 erkek 25 kadın toplamda 89 hasta ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakóltesi Polikliniklerinde muayene sonucu sağlıklı oldukları anlaşılan yaşları 19 ila 58 arasında değişen, yaş ortalaması 38.7(SD=9.4) 60 erkek 29 kadın toplamda 89 kontrol grubu çalışmaya dahil edildi. Kontrol ve hasta grupları arasında IL-17A geni -197AG ve IL-17F geni 7383AG polimorfizmlerine ait genotip dağılımları ve allel sıklıkları saptandı.

Bunun yanında IL-17A geni -197AG ve IL-17F geni 7383AG polimorfizmlerine ait genotip dağılımlarının klinik verilerine ulaşılabilen 77 hastada BASDAI skorları ve aile öyküsü ile ilişkisine bakıldı. HLA-B27 sonucu bulunan 70 hastanın da yine IL-17A geni -197AG ve IL-17F geni 7383AG polimorfizmlerine ait genotip dağılımları ile ilişkisi karşılaştırıldı.

BASDAI skoru 4 ve üzerinde olan hastalar aktif hasta olarak değerlendirildi.

#### **IL-17A (-197A/G) Polimorfizmi Hasta ve Kontrollerin Değerlendirilmesi:**

Yapılan analizler sonucunda agaroz jelde yürütölen ürünlerin bant görüntölemesinde 102 bç'lik tek bant olması AA, 68 ve 34 bç'lik iki bant olması GG 102, 68 ve 34 bç'lik üç bant olması AG genotipi ile ilgili değerlendirildi(Şekil1). Daha sonra seçilen bazı sonuçlar sekans analizi ile kontrol edildi(Şekil2). Yapılan analizler sonucunda hasta grubunun 30'unda (%33.7) AA genotipi, 59'unda (%66.3) AG genotipi mevcuttu. Kontrol grubunda ise 10 bireyde (11.2) AA genotipi, 38 bireyde (42.7) AG genotipi, 41 bireyde (46.1) ise GG genotipi mevcuttu. Hastalara ait 178 allelin 119'unda (66.8) A alleli 59'unda (33.2) G alleli mevcuttu. Kontrol grubunun ise 58'inde (32.5) A alleli, 120'sinde (67.5) ise G alleli mevcuttu.



Sonuçları değerlendirdiğimizde hem genotip açısından hem de allel açısından anlamlı ilişki saptandı(Tablo5-6).

**Tablo5: IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için genotip dağılımı**

Genotip	Hasta n(%)	Kontrol n(%)	P
AA	30(33.7)	10(11.2)	<b>p:0.000</b>
GG	-	38(42.7)	
AG	59(66.3)	41(46.1)	

**Tablo6: IL-17A (-197A/G) polimorfizmi için allel dağılımı**

Allel	Hasta n(%)	Kontrol n(%)	P
A	119(66.8)	58(32.5)	<b>p:0.000</b>
G	59(33,2)	120(67.5)	

Bunun yanında hastalarda bakılan IL-17A geni -197AG polimorfizmine ait genotip dağılımlarının klinik verilerine ulaşılabilen 77 hastada BASDAI skorları ve aile öyküsü ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı(Tablo7-8). HLA-B27 sonucu bakılan 70 hastanın ise genotip dağılımında istatistiksel bir ilişki saptandı(Tablo9).

**Tablo7: IL-17A (-197A/G) polimorfizmi ile BASDAI skoru arasındaki ilişki**

		IL17A-197A/G		Total	p: 0.392
		AA	AG		
BASDAI <4	Sayı	16	35	51	
	% BASDAI	31.4	68.6	100	
4 ve Üzeri	Sayı	10	16	26	
	% BASDAI	38.5	61.5	100	

**Tablo8: IL-17A (-197A/G) polimorfizmi ile Aile Öyküsü arasındaki ilişki**

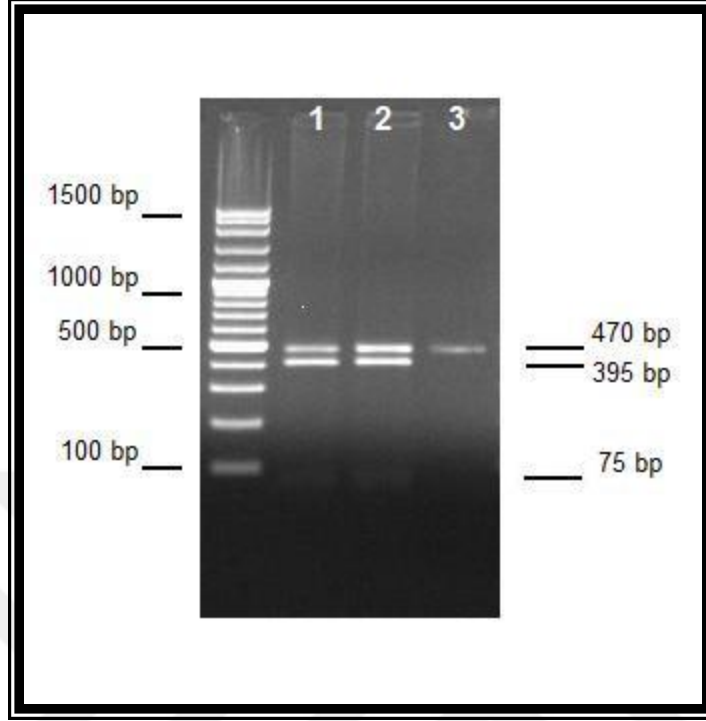
		IL17A-197A/G		Total	p: 0.794
		AA	AG		
Aile Öyküsü YOK	Sayı	18	37	55	
	% Aile Öyküsü	32.7	67.3	100	
Aile Öyküsü VAR	Sayı	8	14	22	
	% Aile Öyküsü	36.4	63.6	100	

**Tablo9: IL-17A (-197A/G) polimorfizmi ile HLA-B27 arasındaki ilişki**

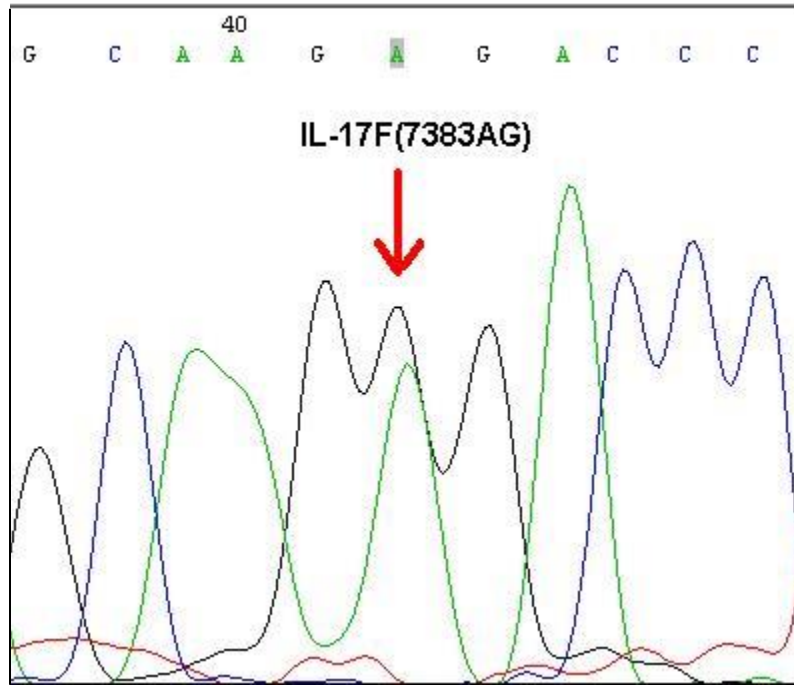
		IL17A-197A/G		Total	p: 0.037
		AA	AG		
HLA-B27 NEGATİF	Sayı	10	8	55	
	% HLA-B27	55.6	44.4	100	
HLA-B27 POZİTİF	Sayı	13	39	22	
	% HLA-B27	25	75	100	

**IL-17F (7383A/G) Polimorfizmi Hasta ve Kontrollerin Değerlendirilmesi:**

Yapılan analizler sonucunda agaroz jelde yürütülen ürünlerin bant görüntülemesinde 470 bç'lik tek bant olması AA, 395 ve 75 bç'lik iki bant olması GG 470, 395 ve 75 bç'lik üç bant olması AG genotipi ile ilgili değerlendirildi(Şekil 3). Daha sonra seçilen bazı sonuçlar sekans analizi ile kontrol edildi(Şekil4). Yapılan analizler sonucunda hasta grubunun 69'unda (%77.5) AA genotipi, 20'sinde (%22.5) AG genotipi mevcuttu. Kontrol grubunda ise aynı şekilde 69 bireyde (77.5) AA genotipi, 20 bireyde (22.5) AG genotipi saptandı. Hastalara ait 178 allelin 158'inde (88.7) A alleli 20'sinde (11.3) G alleli mevcuttu. Kontrol grubunda da yine 158'inde (88.7) A alleli, 20'sinde (11.3) ise G alleli mevcuttu. Hem hasta hem de kontrol grubunda GG genotipine rastlandı.



**Şekil 3:** İlk sırada 100 bç'lik DNA Ladder mevcuttur. 1 ve 2 nolu sıralarda 470, 395 ve 75 bç'lik üç bant görülmektedir ve AG genotipi ile uyumludur. 3 nolu sırada 470 bç'lik tek bant görülmesi AA genotipi ile uyumludur. Hastalarda ve kontrollerimizde GG genotipi saptayamadığımız için görüntülerde görülmemektedir.



**Şekil 4: IL-17F (7383A/G) genotiplerine ait sekans görüntüsü**

Sonuçları değerlendirdiğimizde hem genotip açısından hem de allel açısından anlamlı ilişki saptanmadı(Tablo10-11).

**Tablo10: IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için genotip dağılımı**

Genotip	Hasta n(%)	Kontrol n(%)	P
AA	69(77.5)	20(22.5)	p:1.000
GG	-	-	
AG	69(77.5)	20(22.5)	

**Tablo11: IL-17F (7383A/G) polimorfizmi için allel dağılımı**

Allel	Hasta n(%)	Kontrol n(%)	P
A	158(88.7)	158(88.7)	p:1.000
G	20(11.3)	20(11.3)	

Hastalarda bakılan IL-17F geni 7383A/G polimorfizmine ait genotip dağılımlarının klinik verilerine ulaşılabilen 77 hastada BASDAI skorları ve aile öyküsü ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı(Tablo12-13). HLA-B27 sonucu bakılan 70 hastanın genotip dağılımında da istatistiksel bir ilişki saptanmadı(Tablo14).

**Tablo12: IL-17F (7383A/G) polimorfizmi ile BASDAI skoru arasındaki ilişki**

		IL17A-197A/G		Total	p: 0.471
		AA	AG		
BASDAI <4	Sayı	38	13	51	
	% BASDAI	31.4	68.6	100	

4 ve Üzeri Sayı	22	4	26	
% BASDAI	38.5	61.5	100	

**Tablo13: IL-17F (7383A/G) polimorfizmi ile Aile Öyküsü arasındaki ilişki**

	IL17A-197A/G		Total	
	AA	AG		
Aile Öyküsü YOK Sayı	42	13	55	p: 0.764
% Aile Öyküsü	76.4	23.6	100	
Aile Öyküsü VAR Sayı	18	4	22	
% Aile Öyküsü	81.8	18.2	100	

**Tablo14: IL-17F (7383A/G) polimorfizmi ile HLA-B27 arasındaki ilişki**

	IL17A-197A/G		Total	
	AA	AG		
HLA-B27 NEGATİF Sayı	14	4	55	p: 1.000
% HLA-B27	77.8	22.2	100	
HLA-B27 POZİTİF Sayı	40	12	22	
% HLA-B27	76.9	23.1	100	

## 5.TARTIŞMA

AS, spinal mobilite kısıtlılığına ve spinal yapıda bozulmaya yol açan kronik seyreden inflamatuvar romatizmal bir hastalıktır. Öncelikli olarak aksiyal iskelet üzerine etki gösterir. Hastalık daha çok genç yaşlarda başlar. İlk bulguları genelde bel ve kalça ağrısıdır. Hastalığa bağlı olarak ortaya çıkan fonksiyonel kayıp genelde hastalığın ilk 10 yıllık döneminde ortaya çıkar [106]. Fonksiyonel kayıpların erken dönemde ortaya çıkması hastalığın erken dönemde tanınması gerekliliğini ve ona göre hastalık prognozunu etkileyen faktörleri belirlemeyi ve tedavinin planlanması gerekliliğini ortaya koymuştur. Farmakolojik ve non-farmakolojik tedaviler genelde planlamada birlikte kullanılır. Farmakolojik tedavide konvansiyonel yaklaşımda genelde NSAİİ'ler kullanılır. İnatçı aktif hastalığı olan hastalarda ise biyolojik tedaviler ön plandadır. Bunlar içinde de günümüzde genelde anti-TNF tedavisi kullanılır[107].

AS'in başlangıç dönemi genellikle hayatın ikinci ve üçüncü dekatlarıdır. Yapılan bir çalışmada AS'li hastalarda hastalık başlangıç yaşları sınıflandırılmıştır. Spondilitik belirtiler hastaların %5'inde 15 yaş öncesi iken, %90 hasta 15-40 yaş arası ve %5 hasta da 40 yaş sonrasında bulgu verir[64]. AS daha çok erkeklerde ortaya çıkan erkek kadın oranına baktığımızda 3-5/1 olarak değerlendirilen bir hastalıktır. Sıklığı erkeklerde fazla olması ile birlikte hastalığın başlangıcı, seyri ve klinik gidişi de cinsiyetler arasında farklılık gösterir[108, 109].

AS'le ilgili yapılmış ikiz çalışmaları hastalığın genetik açıdan önemini ortaya koymuştur. İkizler üzerinde yapılan bir çalışmada AS için %97'ye varan yatkınlık ortaya konmuştur[5]. Hastalık genelde HLA B-27 antijeni ile genetik yatkınlığı bulunan genç erkeklerde görülür[49]. HLA-B27 AS için en önemli predispozan genlerden birisidir. AS için risk faktörü HLA-B27 pozitif bulunan hastalarda %2-5 arasındadır[67]. HLA-B27'nin AS üzerindeki yüksek etkisi klinisyenleri hastalık prognozu ve klinik seyri üzerinde çalışmalar yapmaya itmiştir. HLA-B27 pozitifliği olan AS hastalarında belirtilerin daha erken başladığı ve seyrin daha agresif seyrettiği görülmüştür[110].

Günümüzde AS'nin patogenezi üzerine yapılan çalışmalar; hastalığı başlatan faktörlerin belirlenmesi, hastalık seyri sırasında ortaya çıkan olaylar, inflamasyon mediatörleri ve hastalık süreci düzenleyicilerine doğru yoğunlaşmıştır [47]. Son yıllarda bulunan yeni sitokinlerin

antiinflamatuvar etkinliklerinin ortaya konması, inflamasyon kaynaklı birçok hastalıkta bu ajanlar üzerinden hastalık etkisi ve bu ajanlara karşı tedavi uygulamalarını gündeme getirmiştir. Özellikle AS gibi nedeni henüz tam olarak ortaya konamamış hastalıklarda bu ajanların etkinlikleri ve hastalıklarda bunlara karşı uygulanacak tedaviler günümüzde üzerinde çalışılan en önemli konular haline gelmiştir.

Literatüre baktığımızda Ankilozan spondilit ve serum sitokinleri ile ilgili yapılmış çalışmalar görülmektedir. Çalışmalara baktığımızda birçok çalışmada SpA'da ve AS'de serum IL-1 düzeylerinde kontrol gruplarına oranla anlamlı olarak değerlendirilebilecek bir farklılık olmadığı görülmektedir[111-113].

Yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak Vazquez-Del Mercado ve arkadaşları AS'li hastaları sağlıklı kontrollerle kıyasladıklarında daha yüksek IL-1 $\beta$  seviyeleri olduğunu göstermişlerdir. IL-1 $\beta$  seviyeleri ile BASDAI arasında ise herhangi bir korelasyon belirleyememişlerdir[114].

AS immünopatogenezinde etkisinin öngörüldüğü IL-6 esas olarak mononükleer fagositler, aktive Th 2 hücreleri ve bunların dışında kalan sayısız hücre tarafından salgılanır[112]. IL-6'nın bakıldığı çalışmalarda AS'li hastaların genelinde dolaşımında bulunan IL-6 düzeyinin yükseldiğini göstermişlerdir[115].

AS hastalarında yapılan TNF- $\alpha$  ilgili çalışmalarda ise hastalığın özellikle erken aktif döneminde hastalarda sakroiliak eklemlerde TNF- $\alpha$  tespit edilmiştir. Bununla birlikte serum TNF- $\alpha$  düzeyleri değerlendirildiğinde ise hastalık aktivitesiyle ilişki tespit edilmiştir[111, 112]. Bu çalışmaların aksine TNF- $\alpha$  düzeylerinde klinik belirtilerin varlığı veya yokluğuna göre istatistiksel olarak bir fark saptanılmayan çalışmalar da vardır[116].

Başka bir çalışmada ise SpA'li grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında daha yüksek TNF- $\alpha$  düzeyleri elde edilmiş; ancak aktif ile inaktif kontrol grupları arasında farklılık saptanmamıştır[117].

AS ve diğer SpA'larda TNF- $\alpha$  düzeyinin artmış ekspresyonunun serumda ve sakroiliak eklemlerde ortaya konması sonucunda TNF- $\alpha$  inhibitörleri AS'de tedavi olarak verilmeye başlanmıştır[118].

IL-12 ve IL-23 yapısal olarak birbirine benzeyen inflamasyonda rol oynayan önemli mediatörlerdir. Yapısal benzerliklerine rağmen T hücre immünesi regülasyonu üzerine etkileri farklı yollarla olmaktadır. IL-12 T hücrelerinin, IFN- $\gamma$  üreten Th-1 hücreleri üzerine

dönüşümünü etkiler. IL-23 ise TGF- $\beta$  ve IL-6 ile birlikte prekürsör hücrelerin T hücrelerine dönüşümünü sağlar. Th17 fenotipinin kazanılması ve tam efektör etkinin sağlanmasındaki esas görev IL-23'ündür[119, 120]. İmmünohistolojik çalışmalarla yapılan analizlerde AS'li hastaların faset eklemlerinin kemik iliğindeki IL-23 pozitif hücrelerle osteoartrit ya da spinal hastalığı olan bireyler karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmış IL-23 düzeyi saptanmıştır. Bunun yanında IL-23 reseptör polimorfizmi ile AS ve IL-23 düzeyleri ile AS arasında yapılmış birçok çalışma da vardır[121-124].

Bunların yanında serum IL-33 düzeyinin ve ST2 reseptörünün artışına yönelik yapılmış yayınlar vardır[58].

IL-17 ilk kez 1993 yılında kemirgen bir T-hücre kütüphanesinde klonlanmıştır[125]. Daha sonraları T-hücreleri tarafından salınan bu sitokinin myeloid ve mezenkimal hücreleri uyararak granülosit koloni stimüle edici faktör(G-CSF), IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  ve çeşitli sitokinlerin salınımına yol açtığı ortaya çıkmıştır[126, 127]. Bunların dışında nitrik oksit sentaz(NOS) ve siklooksijenaz(COX), ve Prostoglandin-E2(PGE2) gibi proinflamatuvar ajanların salınımına yol açabilir[128, 129]. IL-17'nin ekspresyonu ve regülasyonunda etkili birçok faktör vardır. IL-23 IL-17'nin salınımını arttıran faktörlerden bir tanesidir. Bunun yanında IL-17'yi pozitif ve negatif yönde regüle eden farklı ajanlar da mevcuttur. STAT3, ROR $\gamma$ t, ROR $\alpha$  ve IF4 pozitif yönde regülasyon yapan ajanlardır. Foxp3, STAT5, IBP ise negatif yönde regülasyon yapan ajanlardır[130-135].

IL-17'nin ekspresyonu ve etkilerine bakıldığında IL-17RA'nın hematopoetik dokularda yüksek seviyede eksprese olduğu görülmüştür[126, 136]. Bunun yanında IL-17'den esas sorumlu olan yapıların epitel hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar hatta makrofajlar olduğu görülmüştür.[97, 102, 137, 138]. IL-17'nin etki ederek aktive ettiği birçok sinyal yolları vardır. Bunlar içinde mitojen-aktive protein kinaz(MAPKs), c-Jun N-terminal kinaz(JNK), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz(ERK) sayılabilir. Diğer bir etkisi de TNF tarafından uyarılan bazı inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin mRNA'larını stabilize etmektir[139-142].

2005 yılında Th17 hücrelerinin keşfi otoinflamatuvar hastalıkların anlaşılabilmesi açısından önemli bir avantaj teşkil etmiştir[143-145]. Bunun yanında IL-17A ile Th17 ilişkisinin ortaya konması da daha önce otoinflamatuvar hastalıklarla ilişkisi bilinen IL-17A'nın otoinflamatuvar hastalıklarda etkisinin güçlenmesine neden olmuştur[91, 146, 147]. IL-17A psöriazis, RA ve

psöriatik artrit gibi hastalıkların etyopatogenezinde rol alır[148]. Buna bağlı olarak IL-17A yolağına yönelik biyolojik ajanların üretilip tedavide kullanılması planlanmaktadır.

IL-17F yapı olarak IL17-A ile en fazla benzerlik gösteren IL-17 ailesi üyesidir. IL-17A ve IL17F arasında sekans yönünden de %50 ortaklık vardır ve genelde birlikte salınırlar[149].

Bugüne kadar IL-17 gen polimorfizmleri ile ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur. 2013 yılında yapılan bir çalışmada IL-17 G-152A tek nükleotid polimorfizmi ile pulmoner tüberküloz arasında ilişki saptanmıştır[150]. Gastro-duedonal hastalıklarla IL17A ve IL17F polimorfizmleri arasında ilişki saptayan yayınlar da vardır[151].

Yapılan bir çalışmada Behçet hastalığı ve Vogt-Koyanagi-Harada sendromu ile IL-17A (-197A/G) ve IL-17F 7488T/C polimorfizmlerinin etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda Behçet hastalığı ile IL-17 gen polimorfizmleri arasında kesin bir ilişki saptanamazken Vogt-Koyanagi-Harada sendromunda IL-17F 7488C allelinin anlamlı şekilde azaldığı, TT genotipinin ise anlamlı şekilde yükseldiği rapor edilmiştir[152].

IL17A ve IL-17F geni tek nükleotid polimorfizmleri ile otoimmün tiroid hastalıkları arasındaki ilişkiyi saptamak için yapılan bir çalışmada 508 otoimmün tiroid hastası(326'sı Graves Hastası, 182'si Hashimoto Tiroiditi) değerlendirilmiş. IL-17F/rs763780 genotip frekansları ile kontrol hastaları karşılaştırıldığında arada hem Graves Hastalığı hem de Hashimoto Tiroiditi arasında belirgin fark saptanmıştır. Aynı zamanda G allel frekansı sıklığı ile hasta ve kontrol grubu arasında da anlamlı fark saptanmıştır. IL-17A/rs2275913 ve rs8193037 genotip frekansları arasında da hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır[153].

Yapılan başka bir çalışmada Norveç popülasyonundan alınan 950, Yeni Zelanda popülasyonundan alınan 580 romatoid artritli hastada IL-17A'ya ait 5 polimorfizmi çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada aralarında bizim çalışmamızda da yer alan -197GA' da çalışılmıştır. IL-17A -197GA polimorfizmi için Norveç popülasyonundaki hasta grubunda homozigot G alleli taşıyıcılığı anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Aynı ilişki Yeni Zelanda popülasyonu deerlendirildiğinde gösterilememiştir. Sonuçta iki popülasyon birlikte değerlendirildiğinde GG genotipi yine artmış RA riski ile ilişkili saptanmıştır[11].

Başka bir çalışmada da IL-17A ve IL-17F tek nükleotid polimorfizmleri ile alerjik rinit ve komorbid astım riski arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonuçları alerjik rinit ve komorbid astım ile IL-17A ve IL-17F arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur[154].

Gen ekspresyonu üzerine IL-17A (-197A/G) ve IL-17F (7383A/G) polimorfizmlerinin etkilerini tam olarak açıklayan bir çalışma yapılmamıştır. IL-17A (-197A/G) polimorfizmi genin promotor bölgesinde yer alır. Promotor bölge polimorfizminin gen ekspresyonu üzerine etkisi yüksek ihtimaldir. IL-17F (7383A/G) polimorfizmi genin kodlayan bölgesinde yer almaktadır. Glutamat (E) aminoasitinin yerine Glisin (G) aminoasiti değişikliğine neden olur[105].

IL-17 ve ankilozan spondilit ilişkisini açıklamaya çalışan günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır. Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada serum ve kültüre edilmiş periferik kan mononükleer hücrelerinin süpernatantlarında artmış IL-17 seviyeleri saptanmıştır[13].

Yapılan başka bir çalışmada da 49 AS hastası ve 25 kontrol grubu arasında yapılan çalışmada serum IL-17 düzeyleri karşılaştırıldığında hasta grupta IL-17 seviyelerinde belirgin artış saptanmıştır[155]. Başka bir çalışmada da 50 AS hastası ve 43 gönüllü sağlıklı üzerinde yapılan çalışmada ELISA yöntemi kullanılarak serum IL-17 seviyeleri karşılaştırılmış ve AS hastalarında serum IL-17 seviyelerinde belirgin artış saptanmıştır[7].

HLA-B27 ve IL-17'nin birlikte AS üzerine etkisi araştırıldığında ilişki saptayan çalışmalar da mevcuttur. HLA-B27 ve IL-17 üretiminin arttığını gösteren çalışma yeni tedavi yöntemlerinin ortaya konması gerekliliğini göstermiştir.

IL-17'nin AS ve diğer otoimmün hastalıklarla olan ilişkisini ortaya koyan birçok çalışma halen devam etmektedir. Bu çalışmalar sonucunda IL-17A üzerine üretilen bir ajan olan secukinumabın otoimmün hastalıkların tedavisinde diğer ajanlara göre etkinliği ortaya konmuştur[156].

Çalışmamızın sonucunda AS hastalarında IL-17F 7383A/G polimorfizmi açısından kontrol grubuna göre hastalık riski ve klinik özellikler açısından belirli bir fark saptanmamıştır. IL-17A -197A/G polimorfizmi açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında A alleli oranında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. HLA-B27 düzeylerine bakılabilen 70 hastada HLA-B27 + olanlarda A allelinde belirgin artış mevcuttu.

## **6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER**

AS erken yaşta ortaya çıkan nedeni tam olarak ortaya konmamış erken yaşta ortaya çıkan ve hayatı olumsuz etkileyen bir hastalıktır. Günümüzde tedavisi tam olarak tamamlanamayan bu

hastalığın etyolojisini ortaya koymak ve nedene yönelik tedavi planlamak için çalışmalar halen devam etmektedir. Bizim çalışmamızda da hastalarımızın yaş ortalaması 35.4'tü. Son yıllarda ülkemizde de ortalama hayat süresinin uzadığını düşündüğümüzde AS için tanı yaşı gerçekten düşüktür.

IL-17 son yıllarda tanımlanmış ve özellikle otoimmün hastalıklarla ilişkisi araştırılan ve bazı çalışmalarla da otoimmün hastalıklarla ilişkisi ortaya konmuş önemli bir sitokindir.

Biz de çalışmamızda IL-17A (-197A/G) ve IL-17F (7488T/C) gen polimorfizmleri ile AS arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemeye çalıştık. Yapılan çalışmada IL-17F (7488T/C) gen polimorfizmi ile AS'li hastalar ve kontrol grubumuz arasında belirli bir fark saptamadık. IL-17A (-197A/G) gen polimorfizmi ile AS'li hastalar ve kontrol grubumuz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptadık. Ayrıca IL-17A (-197A/G) gen polimorfizmi ile HLA-B27 arasında da anlamlı bir ilişki saptadık. AS'li hastalarda son zamanlarda yapılan tedavi çalışmaları IL-17 üzerinde odaklanmaya devam etmektedir. Yukarıda da ortaya koyduğumuz gibi secukinumab IL-17 üzerine etki ederek AS tedavisinde kullanıma girmeye başlaması düşünülen bir ajandır.

Genin promotor bölgesinde yer alan bu polimorfizmin gen üzerinde etkisini ortaya koyacak ekspresyon analizi, çalışmamızda yapılmadı. Ekspresyon analizi ile gen üzerinde ortaya çıkan bir etki olup olmadığı araştırılarak çalışmamız daha etkin bir hale gelebilir.

Çalışmamızın sonuçlarından da anlaşıldığı gibi IL-17 ve AS ilişkisi üzerine çalışmaların yoğunlaşması AS tedavisi için gelecekte yeni bir alternatif oluşturabilir.

## 7.ÖZET

### ANKİLOZAN SPONDİLT İLE IL-17 GEN POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

**Giriş ve Amaç:** AS kronik inflamatuvar romatolojik bir hastalıktır. Hastalık esas olarak aksiyel iskelet ve sakroiliak eklemleri etkiler. Omurganın kronik inflamasyonu zaman içinde ekstra kemik oluşumuna bağlı vertebra füzyonuna yol açar. IL-17, T hücre cevabı oluşumundan sorumlu sitokin ailesinin yeni bir üyesidir. Çalışmamızın amacı AS ile IL-17 arasında bir ilişki olup olmadığının değerlendirilmesidir.

**Materyal ve Yöntem:** Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'na bağlı Romatoloji Polikliniği'nde takip edilen, Modifiye New York tanı kriterlerini karşılayan, 18-50 yaş arası, 89 AS hastası ve hastanemiz poliklinik bünyesinde yapılan muayene ve tetkikler sonucu sağlıklı olduğu tespit edilen yaşları 24 ile 56 arasında değişen 89 bireyden kan alınmıştır. Bu kanlardan DNA izole edilerek PCR-RFLP yöntemi ile ilgili genotipleri belirlenmiştir. Rastgele örneklerden yapılan DNA dizi analizi ile PCR-RFLP yöntemi kontrol edilmiştir.

**Bulgular:** IL-17F geni 7383A/G polimorfizmi için belirlenen genotip dağılımları ve allel sıklıkları açısından hastalarla kontrol grubu arasında belirli bir fark saptanmamıştır. Genotip dağılımları ile BASDAI skoru, aile öyküsü ve HLA-B27 sonuçları açısından da hastalarla kontrol grubu arasında belirgin bir fark saptanmadı. IL-17A geni -197A/G polimorfizmi için belirlenen genotip dağılımları ve allel sıklıkları açısından hastalarla kontrol grubu arasında belirli bir fark saptandı. BASDAI skorları ve aile öyküsü ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. HLA-B27 sonucu bakılan hastalarda ise genotip dağılımında istatistiksel bir ilişki saptandı.

**Tartışma:** Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre IL-17A geni -197A/G polimorfizminin AS ile ilişkili olabileceği ortaya konmuş olup tedavi açısından zaten yeni nesil ajanlarla üzerinde çalışılan IL-17A'

1. Jansen, J.P. and S.D. Taylor, *Cost-Effectiveness Evaluation of Etoricoxib versus Celecoxib and Nonselective NSAIDs in the Treatment of Ankylosing Spondylitis in Norway*. *Int J Rheumatol*, 2011. **2011**: p. 160326.
2. Szalay, B., et al., *Adaptive immunity in ankylosing spondylitis: phenotype and functional alterations of T-cells before and during infliximab therapy*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 808724.
3. Zeng, L., M.J. Lindstrom, and J.A. Smith, *Ankylosing spondylitis macrophage production of higher levels of interleukin-23 in response to lipopolysaccharide without induction of a significant unfolded protein response*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(12): p. 3807-17.
4. Wei, J.C., et al., *Association of ORA1 haplotypes with the risk of HLA-B27 positive ankylosing spondylitis*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e20426.
5. Brown, M.A., et al., *Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(10): p. 1823-8.
6. Guo, Z.S., et al., *Association of IL-1 gene complex members with ankylosing spondylitis in Chinese Han population*. *Int J Immunogenet*, 2010. **37**(1): p. 33-7.
7. Mei, Y., et al., *Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis*. *Clin Rheumatol*, 2011. **30**(2): p. 269-73.
8. Xu, S. and X. Cao, *Interleukin-17 and its expanding biological functions*. *Cell Mol Immunol*, 2010. **7**(3): p. 164-74.
9. Onishi, R.M. and S.L. Gaffen, *Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease*. *Immunology*, 2010. **129**(3): p. 311-21.
10. Lohr, J., et al., *Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells*. *Microbes Infect*, 2009. **11**(5): p. 589-93.
11. Nordang, G.B., et al., *Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand*. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(4): p. 367-70.
12. Arisawa, T., et al., *The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis*. *J Clin Immunol*, 2008. **28**(1): p. 44-9.
13. Wang, X., et al., *Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis*. *Rheumatol Int*, 2009. **29**(11): p. 1343-7.
14. Wendling, D., *IL-23 and IL-17 in ankylosing spondylitis*. *Rheumatol Int*, 2010. **30**(11): p. 1547.
15. Zhang, J., et al., *Epistatic Interaction between Genetic Variants in Susceptibility Gene ETS1 Correlates with IL-17 Levels in SLE Patients*. *Ann Hum Genet*, 2013.
16. Moon, Y.M., et al., *IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2012. **14**(6): p. R246.
17. Peelen, E., et al., *Fraction of IL-10+ and IL-17+ CD8 T cells is increased in MS patients in remission and during a relapse, but is not influenced by immune modulators*. *J Neuroimmunol*, 2013. **258**(1-2): p. 77-84.
18. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF: *Thompson and Thompson Genetics In Medicine*. 7th ed., Elsevier, Philadelphia. 2007.
19. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Molecular biology of the cell*. Garland Science. 2008.

20. *Strachan T: Human Molecular genetics. 3th ed., Garland Science/Taylor & Francis Group. 2003. pp.262-263 p.267 p.317p.10-11 pp.13-26, pp. 488-497.*
21. *Pasternak J: An Introduction of Human Molecular Genetics. 8th ed., John Wiley & Sons Inc., New Jersey. 2005. p 95-100.*
22. *Tamarin RH: Principles of Genetics. 7th ed., The McGraw–Hill Companies. 2001. pp.3-4, pp.178-198, pp. 316-338.*
23. *Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9. edt. 1996.*
24. *Lewin’s Genes Jocelyne E Krebs Elliott S. Goldstein Stephen T. Kilpatrick 2011. pp 101.*
25. *Franekova, M., et al., Gene polymorphisms in bladder cancer. Urol Oncol, 2008. 26(1): p. 1-8.*
26. *Sachidanandam, R., et al., A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature, 2001. 409(6822): p. 928-33.*
27. *Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG: Vogel and Motulsky’s Human Genetics 4th ed., Springer, New York. 2010.*
28. *Feuk, L., et al., Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. Hum Mol Genet, 2006. 15 Spec No 1: p. R57-66.*
29. *Li, Y., et al., Integrated copy number and gene expression analysis detects a CREB1 association with Alzheimer's disease. Transl Psychiatry, 2012. 2: p. e192.*
30. *Awad, M.R., et al., The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. J Heart Lung Transplant, 2001. 20(6): p. 625-30.*
31. *Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics, second edition 1999. p: 119.*
32. *McPherson MJ: PCR. 2nd ed., Taylor & Francis Group, New York. 2006. pp. 9-19.*
33. *Pingoud A: Restriction Endonucleases. Springer-Verlag, Berlin. 2004. p. 63.*
34. *Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR: Molecular Diagnostic PCR Handbook, 1st ed., Springer, Dordrecht. 2005. pp. 56-57.*
35. *Bickle TA, Krüger DH: Biology of DNA restriction. Microbiol Rev. 1993. 57: 434-50.*
36. *Hall H G. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analyses: Distinguishing African and European Honey Bees. Methods in Molecular Biology. 1995. pp: 333-366.*
37. *Sivrioğlu K. Türk Fiz Tıp Rehab Derg 2005;51(Özel Ek B):B44-B50.*
38. *Arasıl T: Ankilozan spondilit. Beyazova M, Gökçe K.Y: Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon, Cilt 2. Güneş Kitabevi, Ankara. 2000. pp: 1577-1591.*
39. *Davis JC. Ankylosing Spondylitis. In: Koopman WJ, Moreland LW(eds), Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology Lippincott Williams and Wilkins P. 2005. pp.1319-33.*
40. *Erken E. : Ankilozan Spondilit. Tuna N. (Editör). Romatizmal hastalıklar. 3. baskı. Hacettepe-TAŞ Kitapçılık, Ankara. 1994. pp: 371-86.*
41. *Beyazova M, Gökçe-Kutsal Y, editor. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon, Güneş Kitabevi, Ankara. 2011.*
42. *Weisman M H., van der Heijde D. Ankylosing Spondylitis and the Spondyloarthropathies çeviri ed:Ozgoçmen S. Ankilozan Spondilit ve Spondiloartropatiler, Veri medikal yayıncılık, Ankara. 2008.*
43. *Gran JT, Husby G: Epidemiology of ankylosing spondylitis. In: Hochberg MC, eds. Rheumatology. Mosby, Philadelphia. 2003. pp.1153-59.*
44. *Feldtkeller, E., J. Bruckel, and M.A. Khan, Scientific contributions of ankylosing spondylitis patient advocacy groups. Curr Opin Rheumatol, 2000. 12(4): p. 239-47.*
45. *Sieper, J., et al., Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006. 20(3): p. 401-17.*
46. *Taş N, K.D., Yılmaz S.: Ankilozan spondilitli hastaların klinik özellikleri ekstraartiküler bulguları ve HLA B-27 ilişkisi. Türk Fiz Tıp Rehab Derg, 3(1):. 2000. pp: 37-40.*
47. *Van der Linden S, Van der Heijde D, Braun J: Ankylosing Spondylitis. Arasıl T(ed): Kelley Romatoloji. 2006.*

48. Akkoç N, Khan MA. Ankilozan spondilitin ve ilişkili spondiloartropatilerin epidemiyolojisi. Özgöçmen S (ed): Ankilozan spondilit ve spondiloartropatiler: İstanbul: Veri Medikal. 2008. pp: 117-131.
49. Braun, J. and J. Sieper, *Ankylosing spondylitis*. Lancet, 2007. **369**(9570): p. 1379-90.
50. Brophy S, T.G., Blake D, et al, *The interrelationship between sex, susceptibility factors, and outcome in ankylosing spondylitis and its associated disorders including inflammatory bowel disease, psoriasis, and iritis*. J Rheumatol 2003. pp: 2054-2058.
51. Ricci-Vitiani, L., et al., *MICA gene triplet repeat polymorphism in patients with HLA-B27 positive and negative ankylosing spondylitis from Sardinia*. J Rheumatol, 2000. **27**(9): p. 2193-7.
52. Lipsky PE. Romatoid Artrit (Sayarlioğlu M. çev). Fauci A.S (ed). Harrison Romatoloji. Soy M. (çeviri ed). 16. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2007. pp: 85-104.
53. Salonen DC, Brower AC.: *Seronegative spondyloarthropathies: imaging*. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, eds. Rheumatology. Mosby, Philadelphia. 2003. pp.1193-1204.
54. Ahmadi, K., et al., *Antibodies to Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharide in patients with ankylosing spondylitis*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(12): p. 1330-3.
55. Mielants, H., et al., *Gut inflammation in the spondyloarthropathies: clinical, radiologic, biologic and genetic features in relation to the type of histology. A prospective study*. J Rheumatol, 1991. **18**(10): p. 1542-51.
56. Yli-Kerttula, T., et al., *Effect of a three month course of ciprofloxacin on the late prognosis of reactive arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 880-4.
57. Maksymowych WP. *Spondyloarthropathies: Etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis*. In: Hochberg M, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, eds. Rheumatology. Philadelphia: Elsevier Limited. 2003. pp: 1183-1192.
58. Li, G.X., et al., *Serum levels of IL-33 and its receptor ST2 are elevated in patients with ankylosing spondylitis*. Scand J Rheumatol, 2013. **42**(3): p. 226-31.
59. Appel, H., et al., *In situ analysis of interleukin-23- and interleukin-12-positive cells in the spine of patients with ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(6): p. 1522-9.
60. Rudwaleit, M., et al., *Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(2): p. 569-78.
61. Vergara ME. *The effects of Ankylosing Spondylitis on postural control and balance measures*. New York University, Toronto, Ontario. Master of Science. 2010.
62. Khan MA. *Clinical features of ankylosing spondylitis*. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (eds.): Rheumatology. Mosby, Philadelphia. 2003. pp: 1161-1181.
63. Klippel JH, Crofford LJ, Stone JH, Weyland CM. *Seronegative Spondyloarthropathies*. In: Klippel JH, ed. *Primer on the Rheumatic Dis. 12 th ed*. Atlanta, GA: Arthritis Foundation. 2001. pp: 251-252.
64. Sieper, J., et al., *Ankylosing spondylitis: an overview*. Ann Rheum Dis, 2002. **61 Suppl 3**: p. iii8-18.
65. Wakefield, D., A. Montanaro, and P. McCluskey, *Acute anterior uveitis and HLA-B27*. Surv Ophthalmol, 1991. **36**(3): p. 223-32.
66. Tyrrell, P.N., A.M. Davies, and N. Evans, *Neurological disturbances in ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis, 1994. **53**(11): p. 714-7.
67. Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH: Romatoloji. Dördüncü baskı. Rotatıp Kitabevi Ankara. s. 1110-1138.
68. Shen, F.H. and D. Samartzis, *Cervical spine fracture in the ankylosing spondylitis patient*. J Am Coll Surg, 2005. **200**(4): p. 632-3.

69. Moll, J.M. and V. Wright, *An objective clinical study of chest expansion*. Ann Rheum Dis, 1972. **31**(1): p. 1-8.
70. Sieper, J., et al., *The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis*. Ann Rheum Dis, 2009. **68 Suppl 2**: p. ii1-44.
71. Spoorenberg, A., et al., *Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis*. J Rheumatol, 1999. **26**(4): p. 980-4.
72. Dougados, M., et al., *Clinical relevance of C-reactive protein in axial involvement of ankylosing spondylitis*. J Rheumatol, 1999. **26**(4): p. 971-4.
73. Elyan, M. and M.A. Khan, *Diagnosing ankylosing spondylitis*. J Rheumatol Suppl, 2006. **78**: p. 12-23.
74. Kabasakal Y.: *Ankilozan spondilit*. Gümüüşdüş G, Doğanavşargil E (Editörler). Klinik Romatoloji. Deniz matbaası, İstanbul. 1999. s.445-453.
75. Resnick, D., G. Niwayama, and T.G. Goergen, *Comparison of radiographic abnormalities of the sacroiliac joint in degenerative disease and ankylosing spondylitis*. AJR Am J Roentgenol, 1977. **128**(2): p. 189-96.
76. Braun, J., M. Bollow, and J. Sieper, *Radiologic diagnosis and pathology of the spondyloarthropathies*. Rheum Dis Clin North Am, 1998. **24**(4): p. 697-735.
77. Resnick D, Kransdorf MJ. *Ankylosing spondylitis*. In: Resnick D, Kransdorf MJ, eds. *Bone and Joint Imaging*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company 2005. pp: 267-287.
78. Doğanavşargil E. : *Spondilartritler*. Karaaslan Y. (Editör) Klinik Romatoloji. Hekimler yayın birliği, Ankara. 1996. s.175-197.
79. Şenel K, Erdal A.: *Ankilozan Spondilit*. Göksoy T. (Editör) Romatizmal Hastalıkların tanı ve tedavisi, Yüce Dağıtım, İstanbul. 2002. s. 622-36.
80. Khan MA.: *Ankylosing Spondylitis: Clinical features*. In: Klippel JH, Dippe PA (eds) *Rheumatology 2 th edition*. Mosby, London. 1998. p.161-10.
81. Bal A, Depedibi R, Aydoğ E, Ekşioğlu E, Gürçay E: *Ankilozan Spondilitli Hastalarda Hastalık Aktivitesi ve Fonksiyonel Durumun Beş Yıllık Değişimi*. FTR Bil Der J PMR Sci. 3:80-3,. 2007.
82. Zochling, J., et al., *ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(4): p. 442-52.
83. Braun, J., et al., *2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2011. **70**(6): p. 896-904.
84. Habif S.: *İnflamatuar Yanıtta Akut Faz Proteinleri*, İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Derg.; 43 (2). 2005. s: 55-65.
85. Abbas A., Lichtman AH., Pober J.S.: *Cytokine In "Cellular and Molecular Immunology"*, WB Saunders Company Philadelphia. 2000. p: 235-269.
86. Güner İ., Özmen D., Bayındır O.: *Sitokinler*, T Klin J Med Sci.; 17. 1997.
87. Gaffen, S.L., *Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17--a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(6): p. 240-7.
88. Kawaguchi, M., et al., *IL-17 cytokine family*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(6): p. 1265-73; quiz 1274.
89. Yao, Z., et al., *Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5483-6.
90. Kramer, J.M., et al., *Evidence for ligand-independent multimerization of the IL-17 receptor*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 711-5.
91. Nakae, S., et al., *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.
92. Zhu, S. and Y. Qian, *IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(11): p. 487-511.

93. Kawaguchi, M., et al., *Role of interleukin-17F in asthma*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009. **8**(5): p. 383-9.
94. Crispin, J.C. and G.C. Tsokos, *IL-17 in systemic lupus erythematosus*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 943254.
95. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2003. **52**(1): p. 65-70.
96. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 821-52.
97. Gaffen, S.L., *Structure and signalling in the IL-17 receptor family*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(8): p. 556-67.
98. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 467-76.
99. [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Variation](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Variation).
100. Kawaguchi, M., et al., *Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma*. *J Immunol*, 2001. **167**(8): p. 4430-5.
101. Hizawa, N., et al., *Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease*. *Clin Exp Allergy*, 2006. **36**(9): p. 1109-14.
102. Hymowitz, S.G., et al., *IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding*. *EMBO J*, 2001. **20**(19): p. 5332-41.
103. Yang, X.O., et al., *Regulation of inflammatory responses by IL-17F*. *J Exp Med*, 2008. **205**(5): p. 1063-75.
104. Inozume, T., et al., *IL-17 secreted by tumor reactive T cells induces IL-8 release by human renal cancer cells*. *J Immunother*, 2009. **32**(2): p. 109-17.
105. Paradowska-Gorycka, A., et al., *Association between IL-17F Gene Polymorphisms and Susceptibility to and Severity of Rheumatoid Arthritis (RA)*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2010. **72**(2): p. 134-141.
106. Gran, J.T. and J.F. Skomsvoll, *The outcome of ankylosing spondylitis: a study of 100 patients*. *Br J Rheumatol*, 1997. **36**(7): p. 766-71.
107. Braun, J. and J. Sieper, *[Spondylarthritides]*. *Z Rheumatol*, 2006. **65**(7): p. 613-31; quiz 632.
108. Lee, W., et al., *Are there gender differences in severity of ankylosing spondylitis? Results from the PSOAS cohort*. *Ann Rheum Dis*, 2007. **66**(5): p. 633-8.
109. Roussou, E. and S. Sultana, *Spondyloarthritis in women: differences in disease onset, clinical presentation, and Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity and Functional indices (BASDAI and BASFI) between men and women with spondyloarthritides*. *Clin Rheumatol*, 2011. **30**(1): p. 121-7.
110. *Nicholas J. Sheehan: HLA-B27: what's new?* *Oxford Rheumatology*, 49:621–631. 2010.
111. Gratacos, J., et al., *Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity*. *Br J Rheumatol*, 1994. **33**(10): p. 927-31.
112. Bal, A., et al., *Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis*. *Clin Rheumatol*, 2007. **26**(2): p. 211-5.
113. Toussiro, E., et al., *Serum levels of interleukin 1-beta, tumor necrosis factor-alpha, soluble interleukin 2 receptor and soluble CD8 in seronegative spondylarthropathies*. *Rheumatol Int*, 1994. **13**(5): p. 175-80.
114. Vazquez-Del Mercado, M., et al., *Interleukin 1beta (IL-1beta), IL-10, tumor necrosis factor-alpha, and cellular proliferation index in peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis*. *J Rheumatol*, 2002. **29**(3): p. 522-6.

115. Tutuncu, Z.N., et al., *Interleukin-6, acute phase reactants and clinical status in ankylosing spondylitis*. *Ann Rheum Dis*, 1994. **53**(6): p. 425-6.
116. Claudepierre, P., et al., *A relationship between TGF-beta 1 or IL-6 plasma levels and clinical features of spondyloarthropathies*. *Br J Rheumatol*, 1997. **36**(3): p. 400-1.
117. Sonel, B., H. Tutkak, and N. Duzgun, *Serum levels of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8, and acute phase proteins in seronegative spondyloarthropathies*. *Joint Bone Spine*, 2002. **69**(5): p. 463-7.
118. De Keyser, F., F. Van den Bosch, and H. Mielants, *Anti-TNF-alpha therapy in ankylosing spondylitis*. *Cytokine*, 2006. **33**(5): p. 294-8.
119. Song, I.H. and D. Poddubnyy, *New treatment targets in ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides*. *Curr Opin Rheumatol*, 2011. **23**(4): p. 346-51.
120. Matsui, M., *Roles of the novel interleukin-12-associated cytokine, interleukin-23, in the regulation of T-cell-mediated immunity*. *Hepatol Res*, 2007. **37 Suppl 3**: p. S310-8.
121. Wellcome Trust Case Control, C., et al., *Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants*. *Nat Genet*, 2007. **39**(11): p. 1329-37.
122. Rueda, B., et al., *The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(10): p. 1451-4.
123. Rahman, P., et al., *Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(4): p. 1020-5.
124. Karaderi, T., et al., *Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series*. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. **48**(4): p. 386-9.
125. Rouvier, E., et al., *CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene*. *J Immunol*, 1993. **150**(12): p. 5445-56.
126. Yao, Z., et al., *Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor*. *Immunity*, 1995. **3**(6): p. 811-21.
127. Fossiez, F., et al., *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines*. *J Exp Med*, 1996. **183**(6): p. 2593-603.
128. Trajkovic, V., et al., *Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes*. *J Neuroimmunol*, 2001. **119**(2): p. 183-91.
129. LeGrand, A., et al., *Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(9): p. 2078-83.
130. Liang, S.C., et al., *An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment*. *J Immunol*, 2007. **179**(11): p. 7791-9.
131. Wei, L., et al., *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(48): p. 34605-10.
132. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. *J Exp Med*, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
133. Chen, Q., et al., *IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor*. *Immunity*, 2008. **29**(6): p. 899-911.
134. Yang, X.P., et al., *Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(3): p. 247-54.
135. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function*. *Nature*, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
136. Ishigame, H., et al., *Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses*. *Immunity*, 2009. **30**(1): p. 108-19.

137. Toy, D., et al., *Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 36-9.
138. Novatchkova, M., et al., *The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(5): p. 226-9.
139. Hartupee, J., et al., *IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 4135-41.
140. Sun, D., et al., *Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF)*. Nat Immunol, 2011. **12**(9): p. 853-60.
141. Bulek, K., et al., *The inducible kinase IKKi is required for IL-17-dependent signaling associated with neutrophilia and pulmonary inflammation*. Nat Immunol, 2011. **12**(9): p. 844-52.
142. Sonder, S.U., et al., *IL-17-induced NF-kappaB activation via CIKS/Act1: physiologic significance and signaling mechanisms*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 12881-90.
143. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
144. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
145. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
146. Lubberts, E., et al., *IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 1004-13.
147. Lubberts, E., et al., *Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 650-9.
148. Kirkham, B.W., A. Kavanaugh, and K. Reich, *IL-17A: A Unique Pathway in Immune-Mediated Diseases: Psoriasis, Psoriatic Arthritis, and Rheumatoid Arthritis*. Immunology, 2013.
149. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
150. Ocejo-Vinyals, J.G., et al., *The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain*. Cytokine, 2013.
151. Hayashi, R., et al., *Association of genetic polymorphisms in IL17A and IL17F with gastro-duodenal diseases*. J Gastrointest Liver Dis, 2012. **21**(3): p. 243-9.
152. Shu, Q., et al., *Interleukin-17 gene polymorphism is associated with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome but not with Behcet's disease in a Chinese Han population*. Hum Immunol, 2010. **71**(10): p. 988-91.
153. Yan, N., et al., *Association of interleukin-17A and -17F gene single-nucleotide polymorphisms with autoimmune thyroid diseases*. Autoimmunity, 2012. **45**(7): p. 533-9.
154. Wang, M., et al., *Association between polymorphisms in cytokine genes IL-17A and IL-17F and development of allergic rhinitis and comorbid asthma in Chinese subjects*. Hum Immunol, 2012. **73**(6): p. 647-53.
155. Chen, W.S., et al., *Association of serum interleukin-17 and interleukin-23 levels with disease activity in Chinese patients with ankylosing spondylitis*. J Chin Med Assoc, 2012. **75**(7): p. 303-8.
156. Patel, D.D., et al., *Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis, 2013. **72 Suppl 2**: p. ii116-23.