

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOPLUMUMUZDA ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALIĞINA GENETİK
YATKINLIĞIN KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ İLE BELİRLENMESİ**

EKREM AKBULUT

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. DİLEK TURGUT BALIK**

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPLUMUMUZDA ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALIĞINA GENETİK
YATKINLIĞIN KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ İLE BELİRLENMESİ**

Ekrem AKBULUT tarafından hazırlanan tez çalışması **17/04/2015** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR
Balıkesir Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) tarafından sağlanan Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında yürütölen 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Bursu ile desteklenmiştir.

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2014-07-04-DOP01 numaralı doktora projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik eğitimim süresince ve tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşp, her konuda desteğini esirgemeyen değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK'a;

Bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek değerli fikirleri ile çalışmama katkıda bulunan tez izleme komitesi üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK ve Sayın Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU'na;

Tez çalışmasının yürütülmesine maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Tez çalışmamda kullanılan kan örneklerini sağlayan değerli hocam İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Romatoloji A.B.D. Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Metin ÖZGEN'e;

İstatiksel analizler konusundaki değerli katkıları için Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ, Sayın Doç. Dr. Yasemin BASKIN, Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya ve Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim elemanı Uzm. Dr. Ayşegül ERDEMİR'e ve İzmir Ekonomi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Matematik Bölümü Ar. Gör. Dr. Femin YALÇIN GÜLEÇ'e;

Tez çalışmam sırasında desteklerini hissettiğim Biyomühendislik Bölümü Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı grup arkadaşlarım Dr. Ebru ÖZKAN, Arş. Gör. Emrah SARIYER, Arş. Gör. Ebru ÇAYIR, Arş. Gör. Belma NURAL, Sinem YAKARSÖNMEZ, Zeynep Büşra BOLAT, İlke GÜNTAN, Osman UĞUREL, Erennur UĞUREL, Burcu ATA ve bölümdeki diğer yüksek lisans, doktora öğrencisi arkadaşlarıma;

Hayatımın tüm aşamasında bana her konuda destek olan aileme;

Tüm çalışmalarımda bana güç veren oğlum Ayberk ve eşim Gülçin'e;

Bu tez çalışması hayatımın tümünde örnek aldığım ve alacağım Babam'a ithaf edilmiştir.

Teşekkür ederim.

Nisan 2015,

Ekrem AKBULUT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Ankilozan Spondilit.....	1
1.1.2 Tarihçe.....	1
1.1.3 Epidemiyoloji.....	2
1.1.4 Etiyoloji ve Patogenez	3
1.1.5 Tanı Kriterleri.....	5
1.1.6 Klinik Özellikler	8
1.1.6.1 Sırt Ağrısı	8
1.1.6.2 Boyun Ağrısı	8
1.1.6.3 Entezit	9
1.1.6.4 Çevresel Eklem Bulguları	9
1.1.6.5 Eklem dışı Bulgular	10
1.1.6.6 Pulmoner Bulgular	11
1.1.6.7 Laboratuvar Bulguları.....	11
1.1.6.8 Radyolojik Bulgular	11
1.1.7 Ankilozan Spondilit Tanısında Karşılaşılan Sorunlar.....	12
1.1.8 Tedavi	13
1.1.9 Ankilozan Spondilit ile İlgili Genetik Çalışmalar	14
1.1.10 Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Ankilozan Spondilit ile İlişkisi	18

1.1.11	SNP Genotipleme Yöntemleri	20
1.2	Tezin Amacı	25
1.3	Hipotez	26
BÖLÜM 2		
MATERYAL VE YÖNTEM		27
2.1	Materyal.....	27
2.1.1	Çalışma Populasyonu	27
2.1.2	Kan Örneklerinin Alınması ve Arşivlenmesi	27
2.1.3	Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler	27
2.1.4	Cihazlar	28
2.2	Yöntem.....	29
2.2.1	Genomik DNA İzolasyonu.....	29
2.2.2	DNA Miktar ve Saflık Tayini	30
2.2.3	Kütle Spektroskopisi Temelli Deney Tasarımı	30
2.2.3.1	Deney Tasarımı.....	30
2.2.3.2	Primer ve Prob Tasarımı.....	30
2.2.3.3	Multiplex PCR Uygulaması	34
2.2.3.4	dNTP Nötralizasyonu (SAP Uygulaması)	34
2.2.3.5	Tek Baz Spesifik Uzama Reaksiyonu.....	35
2.2.3.6	Rezin Uygulaması	37
2.2.3.7	Ürünlerin Çipe Aktarılması	38
2.2.3.8	MALDI-TOF ile Genotipleme	38
2.2.4	İstatistik Analizler	38
2.2.4.1	Hardy-Weinberg Dengesi	39
2.2.4.2	Olasılıklar Oranı (Odds Ratio: OR) Testi	39
2.2.4.3	Klinik Değişkenlerin SNP'lerle İlişkisinin Belirlenmesi.....	40
2.2.4.4	Lojistik Regresyon Analizi	40
BÖLÜM 3		
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....		41
3.1	Ankilozan Spondilit Tanısının Konulması ve Çalışma Populasyonunun Tanıtılması.....	41
3.2	DNA'ların Saflık ve Miktar Analizi	45
3.3	SNP, Primer ve Probların Genom Dizisi Üzerindeki Konumları.....	52
3.4	Genotipleme Sonuçları	54
3.5	İstatistik Analizler	58
3.5.1	Hardy-Weinberg Dengesi Testi Sonuçları	58
3.5.2	Ankilozan Spondilit ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi	59
3.5.2.1	Ankilozan Spondilit ile SNP Genotiplerinin İlişkilendirilmesi	60
3.5.2.2	Ankilozan Spondilit ile SNP Allellerinin İlişkilendirilmesi	63
3.5.3	Lojistik Regresyon Analizi	69
3.5.3.1	Ankilozan Spondilit ile Klinik ve Demografik Değişkenlerin İlişkilendirilmesi	71

3.5.3.2	Ankilozan Spondilit Hastalarında SNP Genotiplerinin Klinik Değişkenlerle İlişkilendirilmesi	73
3.5.3.3	AS Hastalık Riski için Lojistik Regresyon Modeli	77
BÖLÜM 4		
SONUÇ VE ÖNERİLER		82
4.1	Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi.....	82
4.2	Öneriler	85
KAYNAKLAR.....		86
EK-A		
ETİK KURUL ONAYI		101
EK-B		
BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU		102
EK-C		
HASTA BİLGİ FORMU.....		104
ÖZGEÇMİŞ.....		105

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
Da	Dalton
K ⁺	Potasyum
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mg ⁺²	Magnezyum
Na ⁺	Sodyum
ng	Nanogram
nl	Nanolitre
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Derece Santigrat

KISALTMA LİSTESİ

A	Allel
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AS	Ankilozan spondilit
AVR	Avrupa
bç	Baz çifti
BT	Bilgisayarlı tomografi
CRP	C-reaktif protein
ddNTP	Dideoksiribonükleozid trifosfat
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNDP	Deoksiribonükleozid difosfat
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
eSNP	Ekson SNP
ESR	Eritrosit sedimantasyon oranı
G	Genotip
GA	Güven aralığı
GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HLA	İnsan lökosit antijeni
IBH	İnflamatuar bağırsak hastalığı
IgA	İmmünoglobulin A
IGAS	Uluslararası ankilozan spondilit genetik konsorsiyumu
IL	İnterlökin
İNG	İngiltere
iSNP	İntron SNP
İSPN	İspanya
K	Ki-kare
KFKS	Kafkas
KND	Kanada
L	Lojistik regresyon
MAF	Minör allel frekansı
MALDI	Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon
MCR	Macaristan

MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
mNY	Modifiye New York kriterleri
MR	Manyetik rezonans
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MS	Kütle spektrometrisi
nsSNP	Sinonim olmayan SNP
NY	New York kriterleri
OR	Olasılıklar oranı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PsA	Psöriatik artrit
pSNP	Promotor SNP
R	Regresyon
RA	Romatoid artrit
RF	Romatoid faktör
RFLP	Restriksiyon parça uzuluk polimorfizmi
rSNP	Düzenleyici SNP
SAP	Shrimp alkalen fosfotaz
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SSCPs	Tek zincir yapısal polimorfizmi
sSNP	Sinonim SNP
TNF	Tümör nekrozis faktör
TOF	Uçuş zamanlı
TR	Türkiye
TYVN	Tayvan
U	Ünite
UEP	Uzamayan primerler
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Ultraviyole görünür bölge
V	Varyans analizi
W	Web tabanlı ilişkilendirme yazılımları
WTCCC	Wellcome Trust Vak'a Kontrol Konsorsiyumu

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1 Omurganın ankilozu	2
Şekil 1. 2 Sakroiliit	10
Şekil 1. 3 Tek nükleotid değişiminde transversiyon ve transisyonlar	19
Şekil 1. 4 SNP analiz yöntemlerinin sınıflandırılması	21
Şekil 1. 5 MassArray Platformu şematik gösterimi	23
Şekil 1. 6 Tek baz uzama reaksiyonunun şematik gösterimi	24
Şekil 1. 7 MALDI-TOF MS platformunun şematik gösterimi	25
Şekil 2. 1 Dört aşamalı uzama probu ayarlama metoduna göre primerlerin sınıflandırılması	36
Şekil 3. 1 Çalışma grubundaki bireylerin yaş dağılım grafiği	42
Şekil 3. 2 Çalışma grubunda yer alan bireylerin cinsiyet dağılım grafiği	42
Şekil 3. 3 Cinsiyete bağlı tanı gecikme süresi grafiği	43
Şekil 3. 4 Hastalık tanısının konulduğu birimlerin yüzde dağılım grafiği	43
Şekil 3. 5 AS tanısında başarı oranı grafiği	44
Şekil 3. 6 Hatalı tanı alan hastaların dağılım grafiği	44
Şekil 3. 7 Ailesel seronegatif spondiloartropati öyküsü yüzde dağılım grafiği	45
Şekil 3. 8 Multiplex PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin 384 kuyulu plate görüntüsü	55
Şekil 3. 9 Nanodispenser cihazı iç görünüm	55
Şekil 3. 10 rs10050860 için MassArray Typer 4.0 genotipleme sonucu	57
Şekil 3. 11 rs10050860'a ait spektrum görüntüsü	57

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1. 1	Kıta ve ülke ölçeğinde AS prevalansı 4
Çizelge 1. 2	Roma Kriterleri (1961) 6
Çizelge 1. 3	New York Kriterleri (1966) 7
Çizelge 1. 4	Modifiye New York Kriterleri (1984) 8
Çizelge 1. 5	SNP analizinde kullanılan ticari ürünlerin performans değerlendirmesi 22
Çizelge 2. 1	Multiplex reaksiyonlarda yer alan SNP'ler 31
Çizelge 2. 2	SNP allelleri arasındaki kütle farklılıkları 31
Çizelge 2. 3	SNP'ler ve genotipleme primerleri 33
Çizelge 2. 4	Multiplex PCR karışımı 34
Çizelge 2. 5	SAP reaksiyonu bileşenleri 35
Çizelge 2. 6	Tek baz spesifik uzama reaksiyonu bileşenleri 37
Çizelge 2. 7	Tek baz spesifik uzama reaksiyonu koşulları 37
Çizelge 3. 1	Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini 45
Çizelge 3. 2	SNP'lerin genomdaki konumu ve allel bilgileri 53
Çizelge 3. 3	rs27037 no'lu SNP'nin bulunduğu DNA dizisi 54
Çizelge 3. 4	Hardy Weinberg Dengesi testi sonuçları 58
Çizelge 3. 5	Ankilozan spondilit ile SNP genotiplerinin ilişkilendirilmesi 61
Çizelge 3. 6	Ankilozan spondilit ile SNP allellerinin ilişkilendirilmesi 64
Çizelge 3. 7	Ankilozan spondilit – SNP ilişkilendirme çalışması yapılan toplumlar ... 70
Çizelge 3. 8	Ankilozan spondilit ve cinsiyet ilişkisi 71
Çizelge 3. 9	Ankilozan spondilit ve ailede romatizmal hastalık öyküsü ilişkisi 72
Çizelge 3. 10	Ankilozan spondilit ve ailede bel fıtığı hastalık öyküsü ilişkisi 73

Çizelge 3. 11	Ankilozan spondilit ve ailede ankilozan spondilit hastalık öyküsü ilişkisi	73
Çizelge 3. 12	AS'li Hastalarda SNP Genotiplerinin Klinik Değişkenlerle İlişkisi	74
Çizelge 3. 13	Ailede romatizmal hastalık öyküsü ile rs868213 polimorfizmi ilişkisi	75
Çizelge 3. 14	Ailede bel fıtığı öyküsü ile rs1004819 polimorfizmi ilişkisi	76
Çizelge 3. 15	Ailede bel fıtığı öyküsü ile rs10889677 polimorfizmi ilişkisi	76
Çizelge 3. 16	Ailede bel fıtığı öyküsü ile rs11465804 polimorfizmi ilişkisi	77
Çizelge 3. 17	Lojistik regresyon analiz sonuçları	78
Çizelge 4. 1	Analiz edilen klinik değişkenler ile ilişkilendirilen SNP'ler	84

**TOPLUMUMUZDA ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALIĞINA GENETİK
YATKINLIĞIN KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ İLE BELİRLENMESİ**

Ekrem AKBULUT

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Ankilozan spondilit (AS), omurga ve periferik eklemlerin tutulduğu özellikle aksiyal eklemlerde hareket kısıtlılığına neden olan sistemik, kronik ve inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın gelişiminde genetik, çevresel ve immünolojik birçok faktör rol almaktadır. Hastalarda işgücü kaybına ve yaşam kalitesinde azalmaya neden olan AS'nin prevalansı %0,15 - 0,49'dur. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) insan genomunda yüksek sıklıkta görülen tek baz değişimleri olup; hastalığa yatkınlık, hastalığın gelişimi, ilaç yanıtı ve hastalıkların tanısında yararlanılan önemli moleküler belirteçlerdir. Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda hastalık riski ve bazı SNP'ler ilişkilendirilmiştir. Bu SNP'lerin çalışılması, hastalık tanısının erken dönemde ve omurga deformasyonu gerçekleşmeden konulmasına katkı sunacaktır. Yapılan bu çalışmada farklı toplumlarda AS ile ilişkilendirilen 7 farklı gen bölgesi ve 3 genler arası bölgede olmak üzere toplam 21 SNP'nin AS hastalık riski ile ilişkisi genotip ve allel düzeyinde araştırılmıştır. 101 kontrol ve AS'li 100 hasta ile gerçekleştirilen çalışmada tespit edilen 21 SNP'nin genotiplenmesinde iPLEX® yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen veriler Ki-kare, Fischer'in kesinlik testi ve lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir ($p \leq 0.5$, $OR > 1$). Bu tez çalışması ile toplumumuzda ilk defa 6. Kromozom üzerinde *HLA-S* ve *DHFR2* psödogen bölgeleri arasında yer alan rs7743761 polimorfizminin allel (A alleli için

p=0.002, OR=1.90 %95GA=1.26-2.87) ve genotip (CA genotipi için p<0.0001, OR=4.93 %95GA=2.437-9.986) düzeyinde AS hastalık riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışma ile bazı klinik ve demografik değişkenlerin hastalık durumuna katkıları ki-kare ve Fischer'in kesinlik testi ile analiz edilmiş; ailede romatizmal hastalık öyküsü (p=0.003), ailede AS hastalık olgusu (p<0.001), ailede bel fıtığı hastalık öyküsü (p<0.001) ve cinsiyet (p=0.001) değişkenlerinin AS hastası olma durumu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada aynı zamanda klinik değişkenler ile SNP'lere ait genotipler ki-kare ve Fischer'in kesinlik testi ile hastalık riski açısından analiz edildiğinde; ailede romatizmal hastalık öyküsü ile rs868213 (p=0.037), ailede bel fıtığı olgusu ile rs1004819 (p=0.032), rs10889677 (p=0.017) ve rs11465804 (p=0.043) polimorfizmlerinin hastalık riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Lojistik regresyon analizi ile SNP genotipleri ve klinik-demografik değişkenler hastalık riski açısından analiz edildiğinde; rs7743761 (p=0.003, OR=3.493 %95GA=1.534-7.955), ailede bel fıtığı olgusu (p<0.001, OR=4.710 %95GA=2.047-10.834), ailede AS olgusu (p<0.001, OR=53.752 %95GA=6.916-417.767) ve cinsiyet (p=0.007, OR=2.671 %95GA=1.309-5.451) değişkenlerinin hastalık riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; toplumumuzda ilk defa rs7743761 polimorfizmi hastalık riski ile ilişkilendirilmiş, cinsiyet, ailede bel fıtığı ve ailede AS olgularının hastalık riskine etkileri gösterilmiş ve elde edilen bilgilerin biyomarkır olarak geliştirilme potansiyelinin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ankilozan spondilit, tek nükleotid polimorfizmi (SNP), kütle spektroskopisi, multiplex PCR, biyomarkır

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENETIC SUSCEPTIBILITY TO ANKYLOSING SPONDYLITIS DISEASE BY MASS SPECTROSCOPY IN OUR SOCIETY

Ekrem AKBULUT

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Ankylosing spondylitis (AS) is a systemic, chronic and inflammatory disease in which the spine and peripheral joints are sore and causes restriction of movement particularly in axial joints. Many genetic, environmental and immunological factors have roles in the development of the disease. Prevalence of AS, which causes work force loss and decreases in life quality, is %0,15 - 0,49. Single nucleotide polymorphisms (SNP) are single base changes frequently observed in human genome and they are important molecular indicators used for disease susceptibility, development of disease, medicine response and disease diagnosis. In studies carried out on different societies, disease risk and some SNPs are associated. Research on these SNPs will make contributions to early diagnosis of the disease before the spine deformation occurs. In this study, association of a total of 21 SNPs with AS disease risk were evaluated at genotype and allele level. Target SNPs were located at 7 different gene loci and 3 intergenic loci and all were associated with AS in different populations. Study was conducted on 101 controls and 100 patients using iPLEX® method. Data obtained in the study were evaluated using Chi-square, Fischer's exact test and logistic regression analysis ($p \leq 0.5$, $OR > 1$). For the first time in our population, it was demonstrated that the rs7743761 polymorphism located between *HLA-S* and *DHFR2* pseudogene loci on 6th chromosome was associated with AS

disease risk at the allele ($p=0.002$, $OR=1.90$ %95CI=1.26-2.87 for A allele) and genotype ($p<0.0001$, $OR=4.93$ %95CI=2.437-9.986 for CA genotype) levels. Contributions of certain clinical and demographic variants to the disease status were also analyzed in the study using chi-square and Fischer's exact test; it was determined that rheumatic disease history ($p=0.003$), AS disease case ($p<0.001$), lumbar disc herniation disease history in the family ($p<0.001$) and gender ($p=0.001$) variants were associated with AS. It was also determined that; rheumatic disease history in family was associated with rs868213 polymorphism ($p=0.037$) and lumbar disc herniation disease history in family was associated with rs1004819 ($p=0.032$), rs10889677 ($p=0.017$) and rs11465804 ($p=0.043$) polymorphisms. When SNP genotypes and clinical-demographic variants were analyzed in terms of disease risk using logistic regression analysis; it was demonstrated that rs7743761 polymorphism ($p=0.003$, $OR=3.493$ %95CI=1.534-7.955), lumbar disc herniation disease story in family ($p<0.001$, $OR=4.710$ %95CI=2.047-10.834) and AS disease case in family ($p<0.001$, $OR=53.752$ %95CI=6.916-417.767) and gender ($p=0.007$, $OR=2.671$ %95CI=1.309-5.451) variants were associated with the disease risk. As a result; for the first time in our population, rs7743761 polymorphism was found to be associated with the disease risk. Contributions of gender, lumbar disc herniation and AS events in the family to the disease risk were demonstrated. It was determined that there is a potential to use all these informations to develop biomarkers.

Keywords: Ankylosing spondylitis, single nucleotide polymorphism (SNP), mass spectroscopy, multiplex PCR, biomarker

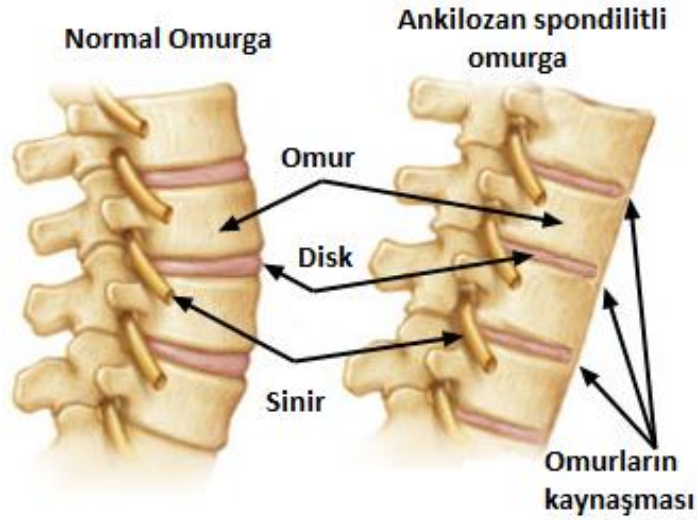
1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Ankilozan Spondilit

Ankilozan Spondilit (AS) omurga, sakroiliak ve periferik eklemleri etkileyen kronik inflamatuvar bir hastalıktır [1], [2]. AS, sınıflandırmada seronegatif spondiloartropatik hastalıklar grubunda değerlendirilmektedir [3]. Hastalık klinik olarak omurga ve pelvisin inflamasyonu, ağrı ve hareket kısıtlılığı ile karakterizedir. Başlangıçta geçici sertlik ve ağrı ile ortaya çıkan hastalık, ilerleyen dönemde geri dönüşümsüz sertlik ve omurga deformasyonuna neden olmaktadır (Şekil 1.1) [4]. Hastalıkta kalça tutulumu ve osteoporoz yaygın olarak görülmektedir [5], [6]. İnflamasyon zamanla üvea, tendon ve proximal aort gibi ekstra artiküler bölgeleri etkileyebilmektedir. Nadir de olsa karaciğer ve böbrek gibi iç organ tutulumları görülmektedir [7]. AS ile birlikte yaygın olarak periferik artrit (%25-50), üveit (%25-40), inflamatuvar bağırsak hastalığı-IBH (%26) ve psöriazis (%10) görülmektedir [8]. Hastalığın erkeklerde kadınlardan yaklaşık olarak 3.5 kat daha sık görüldüğü bildirilmiştir [9]. Hastalığın gelişimine neden olan faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır [10], [11].

1.1.2 Tarihçe

Hastalığın tarih öncesi dönemlerden bugüne insan ve hayvanlarda görüldüğü bilinmektedir. Firavun mumyaları üzerinde yapılan radyolojik çalışmalar M.Ö. 18. ve 19. yüzyıllarda yaşamış olan II. Amenhotep, II. Muhteşem Ramses ve onun oğlu Mereptah'ın AS olduğu izlenimini uyandırmaktadır [12].



Şekil 1. 1 Omurganın ankilozu [4]

Hastalığın tanısında birçok faktörün rol alması nedeni ile özellikle son iki yüzyılda hastalık 20 farklı isimle adlandırılmıştır [13]. Hastalık, klinik ve anatomik olarak 1691 yılında İrlandalı doktor Bernard Connor tarafından tanımlanmıştır. 1897 yılında Struempell ve 1898 yılında Marie'nin olgu sunumları hastalığın klinik olarak tanımlanmasına önemli katkılar sunmuştur. Bu nedenle hastalığın Fransız literatüründeki adı Marie-Struempell hastalığı olarak da bilinmektedir [14]. 20. Yüzyılın ortalarında radyografik tekniklerin gelişimi ile Alman radyolog Krebs tarafından bugün de hastalığın tanısı için büyük önem taşıyan radyolojik sakroileit tanımlanmıştır. Hastalığın sınıflandırılmasına yönelik ilk çalışma 1961 Roma konferansında yapılmıştır. Bu nedenle de Roma kriterleri olarak adlandırılmıştır. Tanıya yönelik elde edilen veriler ve gelişmeler ışığında 1966'da New York kriterleri ve 1984'te Modifiye New York kriterleri tanımlanmıştır [15], [16]. Sırt ağrısı olan hastalarda manyetik rezonans (MR) görüntüleme tekniğinin kullanılması ile hastalıkla ilgili vertebral inflamasyonun görüntülenmesi mümkün olmuştur [17].

1.1.3 Epidemiyoloji

AS genellikle 20-30 yaş arasında ortaya çıkar, hastalığın 45 yaşından sonra nadir olarak görüldüğü bilinmektedir [18]. Hastalığın prevalansının düşük sosyoekonomik statüde olanlarda daha yüksek olabileceği ve sonuçlarının daha dramatik olacağı bildirilmiştir [19]. AS'nin prevalansı coğrafik ve etnik olarak değişim göstermektedir [3]. Hastalık Afrika hariç tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir [5]. Epidemiyolojik çalışmalar

hastalığın prevalansının Alaskalı Eskimolarda %0.4, Norveçlilerde %1.4 olduğunu göstermiştir [20]. Hastalığın prevalansının, hastalık için risk alleli olarak tanımlanan HLA (Human Leukocyte Antigen)-B27'nin prevalansı ile paralellik gösterdiği bilinmektedir [9]. Yapılan çalışmalar hastaların %80-95'inin HLA-B27 allelini taşıdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte HLA-B27 pozitif bireylerin yalnızca %1-5'inde hastalık görülmektedir. HLA-B27 alleli Kuzey Avrupalılarda yaygın olarak görülmektedir. Beyaz Avrupalılarda %8, Çinlilerde %5, Avusturalya Aborjinleri ve Afrikalılarda ise nadir olarak görülmektedir [5], [7].

Aynı toplum üzerine yapılan prevalans çalışmalarında elde edilen verilerin çalışmanın yapıldığı grubada bağlı olarak çok çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Dean ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışma ile AS'nin prevalansına yönelik önemli veriler elde edilmiştir (Çizelge 1.1) [9]. AS'nin prevalansına yönelik sistematik literatür araştırması ile 36 çalışma değerlendirilmiş ve hastalığın ortalama prevalansı Avrupada %0.24, Asyada %0.17, Latin Amerikada %0.1, Kuzey Amerikada %0.32 ve Afrikada %0.07 olarak belirlenmiştir. Bu veriler ışığında Avrupa kıtasında 1.30–1.56 milyon, Asta kıtasında ise 4.63–4.98 milyon AS hastasının bulunduğu tahmin edilmektedir [9]. Ülkemizde hastalığın prevalansına yönelik çalışmalar nadir olmakla birlikte; Doğu Karadeniz Bölgesi'nde %0.25 [21], İç Anadolu Bölgesi'nde %0.14 [22], Ege Bölgesi'nde ve ülke genelinde prevalansı ise %0.49 olarak bildirilmiştir [23], [24].

AS'nin güçlü ailesel yatkınlık gösterdiği bilinmektedir. Hastalığın birinci derece akrabalarda görülme riskinin bağımsız vakalardan 52 kattan daha fazla olduğu bildirilmiştir [25]. Hastalığın tek yumurta ikizlerinde nüks etme olasılığı %63, birinci derece akrabalarda %8,2, ikinci derece akrabalarda %1'dir. Hastalığın ebeveyn-çocukta nüks etme olasılığı %7,9, kardeş kardeş arasında görülme olasılığı %8,2'dir [25].

1.1.4 Etiyoloji ve Patogenez

Her ne kadar etiyolojisi bilinmese de hastalığın gelişiminde genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin rol oynadığını düşündüren kanıtlar vardır. Baskın genetik faktör insan lökosit antijeni olarak da adlandırılan HLA-B27'dir [3], [26], [27]. HLA-B27; 6. Kromozomun kısa kolu üzerindeki 3,6 megabazlık bir DNA zincirinde konumlanmış multipl genlerden oluşan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I olarak

Çizelge 1. 1 Kıta ve ÷lke ölçeğinde AS prevalansı [9]

Kıta	÷lke	Tanı Yöntemi	Prevalans (10.000 kişide)
Avrupa	Fransa	Klinik	14,9
	Finlandiya	Klinik	15,0
	Yunanistan	Klinik	29,3
		mNY	24,0
	Macaristan	NY	23,2
	İtalya	mNY	37,0
	Litvanya	Klinik	9,4
	Türkiye	mNY	49,0
		Roma	11,9
Asya	Bangladeş	Klinik	5,8
	Filipinler	ACR	3,0
	Pakistan	Klinik	4,7
	Hindistan	Klinik	7,0
		Klinik	9,8
	Malezya	Klinik	24,3
	Vietnam	Klinik	4,7
	Çin	mNY	19,6
		mNY	11,0
		Klinik	26,0
		-	26,0
		mNY	25,3
		NY	37,1
	İran	Klinik	11,7
	Tayvan	NY	33,7
Amerika	Küba	Klinik	19,0
	Meksika	mNY	15,0
		mNY	2,6
		mNY	4,2
	ABD	Klinik	31,9
Afrika	Güney Afrika	Klinik	7,4

mNY : Modifiye New York Kriterleri, NY: New York Kriterleri

adlandırılan bölgede yer almaktadır. MHC, immün sistemde rol alan 260 gen içermektedir [28]. MHC genlerinin temel görevi peptid bağlanması ve bunların T lenfositlere sunulmasıdır. Otoimmünite dışında MHC genlerinin diğer hücre yüzey reseptörleri ve hormon reseptörleriyle iletişim ve sinyal iletiminde rol aldığı bilinmektedir. Serolojik olarak farklılık gösteren çok sayıda HLA sınıf ve alleli tanımlanmıştır [5], [29]. Hastalık ile direkt olarak ilişkilendirilen HLA-B27'nin 130 alt tipi olduğu bildirilmiştir [2]. Bu yönü ile de insan genomunun en çok polimorfizm gösteren geni olduğu kabul edilmektedir (HLA-B'nin toplam 675 alleli olduğu bildirilmiştir). Fakat tek başına HLA B27'nin varlığı hastalığın gelişimi için yeterli değildir. HLA-B27 ile AS'nin ilişkisini açıklayan 2 temel hipotez vardır. Bunlardan reseptör teorisi belirli T hücre reseptörlerinin MHC'nin kendi peptidlerini yabancı molekül olarak algıladığı ve hücrenin savunma sistemini harekete geçirdiği düşüncesini ileri sürmektedir. Moleküler benzerlik (molecular mimicry) hipotezinde ise Klebsiella ve Yersinia gibi mikroorganizmalara ait antijenik karakterde bazı moleküllerin HLA ile karşılıklı reaksiyona girdiği ve immün yanıtın oluştuğu düşüncesini ileri sürmektedir [30], [31], [32], [33].

Son birkaç yılda yapılan çalışmalar MHC genleri dışında genlerin endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1 (*ERAP 1*), interlökin-23 reseptör (*IL23R*), Anthrax toxin reseptör 2 (*ANTXR2*) gibi genler ve 2p15 ile 21q22 genler arası bölgelerin AS ile ilişkili olduğu göstermektedir [7], [34]. Farklı kökenlere sahip toplumlarda yapılan çok sayıda replikasyon ve haplotip çalışması *ERAP1* ve *IL23R*'nin MHC genleri dışında AS'den sorumlu en güçlü iki aday gen olduğunu doğrulamıştır [35].

1.1.5 Tanı Kriterleri

Diğer romatolojik hastalıklarda olduğu gibi AS tanısında da geçerli bir altın standart bulunmamaktadır. Doğru tanı radyolojik bulgulara ek olarak büyük ölçüde klinik semptom ve bulguların doğru analiz edilmesine bağlıdır [36]. Hastalığın tanısı için ilk olarak 1961 Roma Kriterleri (Çizelge 1.2) kullanılmıştır [37].

Roma kriterleri içerisinde yer alan göğüs ağrısı ve üveit gibi bulguların düşük özgüllük ve duyarlılıkta olması nedeni ile bu iki bulgu tanı kriterlerinden çıkarılmış ve bunun sonucunda hastalığın tanısı için 1966 yılında New York Kriterleri (Çizelge 1.3)

kullanılmaya başlanmıştır [38]. 1977 yılında Calin ve arkadaşları tarafından bugünde halen tanı da büyük önem taşıyan inflamatuvar sırt ağrısını diğer kronik sırt ağrılarından

Çizelge 1. 2 Roma Kriterleri (1961) [37]

Radyolojik Kriterler
Sakroiliak eklemlerde AS'ye karakteristik 3. veya 4. evre sklerotik görünüm
Klinik Kriterler
Üç aydan uzun süreli ve istirahat ile düzelmeyen inflamatuvar sırt ağrısı ve tutukluk
Torakal bölgede ağrı ve tutukluk
Lomber omurgada hareket kısıtlılığı
Göğüs ekspansiyonunda kısıtlılık
Üveit ya da üveit sekeli bulgusu
Radyolojik kriter + en az 1 klinik kriter varlığı ya da en az 4 klinik kriterin varlığı Kesin AS tanısı için gereklidir.

ayırt etmede yararlanılacak kriterler önerilmiştir [39]. Öneriler doğrultusunda mevcut tanı kriterleri revize edilerek 1984 yılında Modifiye New York kriterleri (Çizelge 1.4) kullanılmaya başlanmıştır [15]. Klinik değerlendirmede; belkemiğinin öne esnemesini ölçmek için modifiye Schober testi ve lumbosakral omurganın bir yöne bükülmesi olarak tanımlanan lateral omurga hareketinin ölçümü için oksiput-duvar testi kullanılmaktadır. 4. intercostal (kaburgalararası) boşluktan göğüs ekspansiyonu ölçülür. Sakroiliak eklemlere dokunma veya vurma ağrıya yol açabilir fakat bu sakroiliit varlığına işaret etmez. Sakroiliak eklemler üzerine çevirerek, esneterek ve bükerek uygulanacak stres ve Gaenslen testi sakroiliak eklemlerdeki fonksiyon kaybını ve aynı zamanda ağrıyı ortaya çıkaracaktır. Gözlerin, kardiyovasküler ve pulmoner sistem muayenesi ve tetkikleri eklemdışı bulguları destekleyebilir [40]. Klinik değerlendirmede kullanılan;

Oksiput-duvar mesafesi testinde; sırt ve topuklar duvara bitişik bir pozisyonda dik durulur. Duvar ile oksiput arasındaki mesafe ölçülür. Ölçüm değerinin 0,1 cm'den büyük olması patolojik bulgu olarak değerlendirilir [41].

Schober testinde; hasta dik pozisyonda iken krsta iliak posterior superiorları birleştiren çizgi orta hatta bir kalem ile işaretlenir. Tespit edilen noktanın 10 cm yukarısı tekrar işaretlenir ve hastanın dizlerini bükmeden ayak parmak uçlarına değmesi istenir. Tespit edilen iki noktanın arasının ölçümü yapılır. Elde edilen ölçüm değerin 5 cm'den küçük olması patolojik bulgu olarak değerlendirilir [42].

Göğüs ekspansiyon testinde; hasta ayakta dururken 4. interkostal aralıktan mezura aracılığı ile derin soluk alıp verme esnasında göğüs çevresi ölçülür. Aradaki fark 2,5 cm'den küçük ise patolojik bulgu olarak değerlendirilir [41].

Çizelge 1. 3 New York Kriterleri (1966) [38]

Radyolojik Evreleme
Evre 0 : Normal sakroiliak eklemler
Evre 1: Şüpheli sakroiliit
Evre 2: Minimal sakroiliit
Evre 3: Orta derecede sakroiliit
Evre 4: Sakroiliak eklemelerde tam ankiloz
Klinik Kriterler
Lomber omurgaların hareketlerinin her üç düzlemde de (anterior, lateral ve Lomber veya dorso-lomber ağrı,
Dördüncü interkostal aralıktan yapılan göğüs ekspansiyon ölçümünün 2,5 cm'den daha az olması,
Kesin Tanı için; a) radyolojik evre 3 veya 4 + en az bir klinik b) radyolojik evre 3 veya 4 + 1. Klinik kriter ya da 2. ve 3. Klinik kriterin birlikte bulunması, gereklidir.
Şüpheli tanı için; klinik kriter varlığı sorgulanmadan 3 veya 4 bilateral sakroiliit varlığı, gereklidir.

Çizelge 1. 4 Modifiye New York Kriterleri (1984) [15]

Radyolojik Kriterler
2 ya da daha yüksek evrede bilateral sakroiliit
3 veya 4. evre unilateral sakroiliit
Klinik Kriterler
İstirahat ile geçmeyen, egzersiz ile geçen 3 ay veya daha uzun süreli sırt ağrısı ve tutukluk
Lomber omurganın frontal ve sagittal düzlemde hareket kısıtlılığı
Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinsiyete bağlı olarak düzeltilmiş normal değerlerin altında olması
Kesin AS tanısı için; bir radyolojik kriter + klinik kriterlerden biri, gereklidir.
Şüpheli AS tanısı için; tek başına 3 klinik kriter veya tek başına bir radyolojik kriterin varlığı gereklidir.

1.1.6 Klinik Özellikler

AS'nin klinik tanısının konulmasında birçok klinik parametre dikkate alınmaktadır.

1.1.6.1 Sırt Ağrısı

AS için en karakteristik klinik bulgu inflamatuvar sırt ağrısıdır [43]. Hastaların, inflamatuvar nedenlerle gelişen sırt ağrısı ile normal sırt ağrılarının biri birinden ayırması pek mümkün değildir. İnflamatuvar sırt ağrısı uzun süreli dinlenme sonrası ve sabahları görülen ağrı, sertlik ve tutukluk ile karakterize olup; egzersiz ile düzelmektedir. Hastalar genellikle uyku ve dinlenme halinde ortaya çıkan kalça ve sırt ağrılarından şikâyetçidirler [44], [45]. İnflamatuvar sırt ağrısının spesifik bir özelliği olan kalça ağrısı daha çok sakroiliak tutulumu temsil etmektedir [26].

1.1.6.2 Boyun Ağrısı

Bazı durumlarda, göğüs ve boyun bölgelerinde görülen ağrı ve tutukluk hastalığın başlangıç belirtisi olabilir [45]. Bu duruma genellikle bayanlarda daha sık rastlanmaktadır

[26]. Yaklaşık olarak hastaların %70'i boyun ağrısından şikâyetçidir. 571 AS'li hasta ile yapılan bir çalışmada hastaların yarısından fazlasında servikal (boyun) omurga tutulumuna ait radyolojik kanıtlar ortaya konmuştur [46]. Servikal omurga tutulum riskinin hastalık süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. 5 yıldan sonra hastaların %20'sinde, 20 yıldan sonra da hastaların %70'inde tutulum görülmüştür. Boyun bölgesindeki tutukluk nedeni ile baş hafif öne eğik pozisyonda bulunur ve hastalar boyunlarını dik tutmakta zorlanırlar [40].

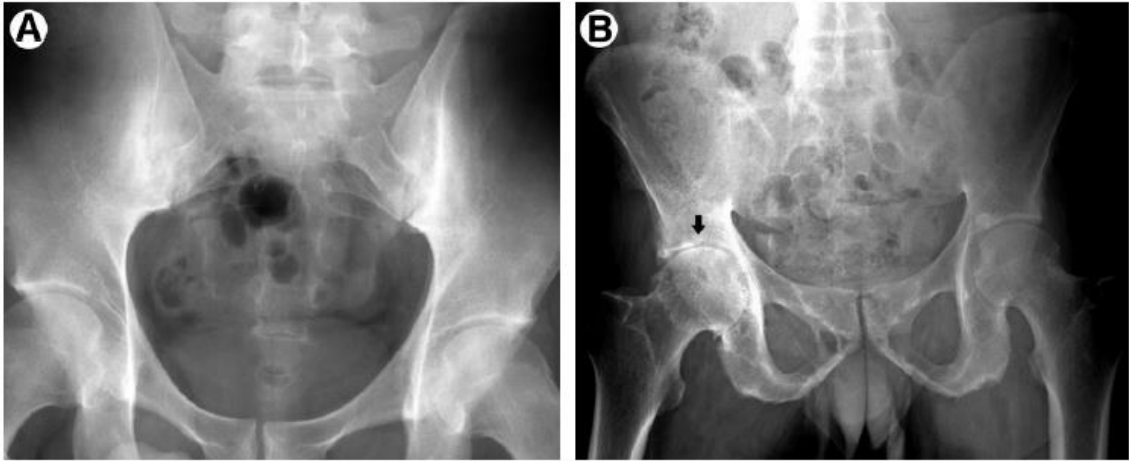
1.1.6.3 Entezit

AS'de inflamatuvar sürece önemli düzeyde katkı sağlayan diğer bir unsur entezittir [47]. Tendonların kemiğe yapışma bölgelerinin (entezis) inflamasyonu olan entezit, topuk gibi eklem dışı kemik yapılarda hassasiyete neden olmaktadır. AS'li hastaların inflamasyonlu sinoviyal eklemlerinde ektrakapsüler değişiklikler ve yaygın entezit olduğu manyetik rezonans görüntüleme (MRI) tekniği kullanılarak doğrulanmıştır [48]. Entezit, omurga boyunca vertebral eklemlerin yanı sıra kapsüler ve ligamentöz bağlantı noktalarında da oluşur [49]. Sakroiliak eklemlerin füzyonuyla sonuçlanabilecek ağrı, tutukluk ve spinal eklem tutulumlarına entezisin inflamasyonu neden olmaktadır. Aksiyel omur tutulumu ile hareket kısıtlılığı gelişebilmektedir. İlerleyen dönemlerde; eklemlerdeki ankiloz (kaynaşma) ve ligamanlardaki kalsifikasyon tüm omur hareketlerini kısıtlar, lomber lordoz azalır, kamburluk artar, karın dışı doğru çıkar. Son dönemlerde ise boyun omurları tutulur ve boyun hareketleri kısıtlanır. Tüm bu veriler hastalığın tanısının konulmasında ve ilerleyişinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır [41], [50], [51].

1.1.6.4 Çevresel Eklem Bulguları

AS'li hastaların önemli bir bölümünde (%20) periferik artrit (çevresel eklemlerde görülen iltihaplanma) hastalığın tanısı için en erken bulgu olabilir [52], [53] ve hastalığın seyri esnasında belirli bir noktada gelişir [54]. Genellikle asimetric tek veya çoklu eklem bulguları gösteren durum hastaların yalnızca yarısında kalıcılık arz etmektedir. Dirsek, el bileği ve el tutulumu görülse de daha çok kalça (Şekil 1.2) [40] ve omuz alt üyelerinin büyük eklemleri etkilenmektedir [52], [53]. Etkilenen eklemlerin radyografik ve MR görüntüleri eklem mesafesinde daralma, erozyona bağlı yeni kemik oluşumu ve sinovit

(kemik zarı iltihabı) bulgularını ortaya koymaktadır [55], [56], [57]. Çevresel eklem tutulumu, artmış hastalık aktivitesi ve yaşam kalitesinde azalma ile ilişkilidir [58], [59]. AS'li hastalarda görülen kemik ankilozu sadece kalçada hareket kısıtlılığı ve tam fonksiyon kaybına [60] neden olmaz aynı zamanda omuz ve diz eklemlerinde de benzer belirtiler gösterir [61]. Hareket kısıtlılığı ve fonksiyon kaybı nedeni ile uzun süreli izlemde AS'li hastaların %8-15'ine tüm eklem protezi uygulamasının bir zorunluluk arz ettiği bildirilmiştir [62], [63].



Şekil 1. 2 Sakroiliit (A) 32 yaşında AS'li bir hastanın pelvis bölgesinin röntgeninde bilateral sakroiliit gösterilmiştir. (B) 50 yaşında AS'li hastada her iki sakroiliak eklem kaynaşmıştır. Sağ kalçada inflamatuvar artrit gelişmiştir (Ok ile gösterilmiştir) [40]

1.1.6.5 Eklem dışı Bulgular

Akut anterior üveitin (iritis olarak da bilinir) hastalık ile ilişkisi çok iyi bilinmektedir. AS'li hastaların %20-40'ında bir veya daha fazla üveit atağı görülebilmektedir [20], [64]. Tipik olarak aniden ortaya çıkan göz ağrısı, kızarıklık, görmeye bulanıklık ve fotofobi (ışıktan kaçınma eğilimi) tipi belirtiler verir. Bazı vakalar kronik olabilir ve kalıcı görme hasarına neden olabilir [49]. Bununla birlikte AS'li hastalarda yaygın olarak inflamatuvar bağırsak hastalığı-IBH (%26) ve psöriazis (%10) görülmektedir [8]. Hastalıkla bağlantılı bu rahatsızlıkların birlikte görünme durumunun hastalığın şiddeti ve hareket kısıtlılığının düzeyi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [65]. Hastalığın aynı zamanda aort yetmezliği, kan iletim sistemi bozuklukları ve kalp krizi görülme riskinde artış gibi kardiyovasküler sistem bulguları da vardır [49], [66]. AS'li hastalar ilerleyen osteoporoz, omurga sertliği (hareketsizliği) ve kambur nedeni ile omurga kırılması riski altındadırlar. Minnesota'da

yapılan popölasyon tabanlı bir çalışmada AS'li hastalarda oluşan omurga kırıklarının normalden 7.6 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir [67]. Yapılan bir diğer çalışmada ise omurga kırıklı AS'li hastaların %47'sinde; bir bacakta gő kaybından karıncalanma ve uyuşmaya kadar çeşitli nőrolojik komplikasyonların gőrőldőėü ortaya konulmuştur [68].

1.1.6.6 Pulmoner Bulgular

AS'li hastalarda akciğer tutulumu hem mekanik hem de fibrotik değişikliklere bağlıdır. Gőėüs genişlemesinde azalma ve sekonder kifoz (kambur) gelişimi azalmış toplam akciğer kapasitesini dőřündürmelidir. 17 AS'li hasta ile yapılan bir çalışmada yőksek özőnőrlőklő bilgisayar tomografisi sonuçları; hastaların 14'őnde (%82) solunum yolu hastalıkları, 11'inde (%65) intersitisyel (dokular arası) anormallikler ve 6'sında (%35) amfizem olduğunu ortaya koymuştur [69]. 10 yılın altında hastalık őykőső olan çok sayıda AS'li hastada benzer bulguların varlığı bildirilmiştir [70].

1.1.6.7 Laboratuvar Bulguları

AS tanısı için spesifik bir test olmamasına karşın, HLA-B27 pozitifliği hastalığın tanısı için őnemlidir [32]. Aktif hastalık halinde eritrosit sedimentasyon oranı (ESR) ve C reaktif protein (CRP) değerinde artış tespit edilmiştir [10], [71]. Bununla birlikte bu akut faz reaktanlarının őlőlmesi hastalığın tanısı için sınırlı da olsa bir őneme sahiptir. alışmalar hastalık aktivitesinin klinik işaretleri (ağrı, sertlik, tutukluk ve uyku huzursuzluğu) ile akut faz reaktanları (ESR ve CRP) arasında korelasyonun eksikliğini göstermiştir [72], [73], [74]. Hafif dőzeyde normokromik normositik dőzeyde anemi tespit edilebilir. Yőksek alkalın fosfataz dőzeyi hastalığın şiddeti hakkında bilgi verebilir. Etkilenen bacaklardaki sinoviyal akışkan herhangi bir inflamatuvar eklem hastalığındakinden farklı bulgu vermez. Gőėüs duvarı hareketi kısıtlı olan hastalarda solunum őlőmleri ve fonksiyonu normal kalır. Fakat vital kapasite azalır, fonksiyonel rezidőel kapasite artar [75]. İmmőnoglobulin A (IgA) dőzeyinde artış tespit edilmiştir [76].

1.1.6.8 Radyolojik Bulgular

Hastalık sőrecini yansıtan radyolojik değişikliklerden olan radyografik sakroiliit genellikle hastalığın gelişimi aşamasında belirli bir noktada belirgin hale gelir. Hastalığın tanısı için

önemli bir kanıt olan sakroiliitin gelişimi genellikle hastalığın ilerleyen bir döneminde olmaktadır. Sakroiliak eklemlerdeki en erken görülebilen değişiklikler kıkırdak altı kemiğin kortikal marjlarında bulanıklık, erozyon ve skleroz (doku sertleşmesi)'dir. Erozyon ilerledikçe eklem aralığı daha geniş görünür ve fibröz ve kemik doku yok olur. Hastalığın seyri esnasında eklem değişiklikleri simetrik hale gelir [75].

Bilgisayarlı tomografi (BT) ve MRI AS'ye bağlı lezyonların tespitinde geleneksel radyografik görüntüleme modellerine göre daha hassastır [74], [77], [78]. Klinik olarak AS bulgularına sahip hastalarda röntgen bulguları negatif sonuç verirken MR görüntüleme ile sakroiliit başlangıcı tespit edilebilmektedir [77], [78]. 44 hasta ile yapılan bir çalışmada 3 farklı görüntüleme tekniğinin sakroiliitin tespitine yönelik duyarlılıkları değerlendirilmiş ve MR görüntülemenin duyarlılığı %95, röntgen'in duyarlılığı %19 ve kantitatif sakroiliak sintigrafisinin duyarlılığı ise %48 bulunmuştur [78]. Bu bulgular MR görüntüleme tekniğinin röntgene göre %75 daha fazla vaka tespitini sağlayacağını işaret etmektedir. Bilgisayarlı tomografi ve MR aynı zamanda sakroiliak eklem sklerozunun ilerlemesinin görüntülenmesi aşamasında da yararlı araçlar olabilirler. Bununla birlikte hastalık aktivitesi ve radyografik bulgular arasında iyi düzeyde bir korelasyon bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada ağrı, sertlik ve tutukluk BT ile tespit edilen artan sakroiliak eklem sklerozu ile pozitif korelasyon tespit edilirken, artan ankiloz ile negatif korelasyon tespit edilmiştir [74].

1.1.7 Ankilozan Spondilit Tanısında Karşılaşılan Sorunlar

Hastalığın tanısının net bir şekilde konulamaması kesin tanı konuluncaya kadar geçen sürede hastada yaşam kalitesini önemli düzeyde etkileyen postür ve omurga bozukluklarının olması ve bunların çoğunun geriye döndürülememesi AS hastalarının karşı karşıya olduğu en önemli sorunlardır. Her ne kadar hastalığın başlangıç semptomları 20 ve 30'lu yaşlarda görülsede hastalığın kesin teşhisi 5-10 yıl gecikmektedir [79], [80], [81], [82]. Tanının gecikmesinde birçok etkenin rolü olabilir. Bunlar; inflamatuvar bel ağrısının hastalık ile ilişkilendirilememesi (birçok hastalık için ortak belirtidir), patojenitenin tespitine yönelik klinik ve laboratuvar testlerinin yetersizliği, fiziksel muayene teşhis kriterlerinin yetersiz olması, AS tanısı için değerli bir

veri olan ve radyolojik tetkikler neticesinde görüntülenebilen sakroiliit'in hastalığın ortaya çıkışından yıllar sonra oluşmasıdır [83], [84].

Teşhis aşamasında doktorların büyük bir çoğunluğu tarafından karşılaşılan zorluk AS'nin bel fıtığı (lumbar disc herniation-LDH) ile benzer radyolojik görünüm sergilemesidir. Bu nedenle AS hastalarının büyük bir bölümüne başlangıçta bel fıtığı tanısı konulmakta hatta önemli bir bölümü bel fıtığı tanısı ile cerrahi müdahale görmektedir [85]. Klinik belirtilerin tek başına tanı için yeterli olmaması, serolojik ve radyolojik bulgularında iyi analiz edilmesi tanı için şarttır. Fakat yine de kesin tanı için yeterli değildir. Modifiye New York kriterlerine göre kesin tanı için gerekli olan "sakroiliit'in oluşumu" hastalığın ileri bir safhası olması ve geri dönüşümsüz birçok zararın ortaya çıkmış olmasından dolayı AS'deki en önemli sorunlardan biridir [80].

Hastalığın tedavisine yönelik yapılan son çalışmalarda elde edilen veriler ve bulunan anti-tumor necrosis factor gibi yeni tedavi edici ajanlar, omurga deformasyonu gerçekleşmeden hastalığın doğru ve erken teşhisinin önemini daha da arttırmaktadır [84], [86].

1.1.8 Tedavi

Hastalığın tedavisinde farmakolojik, fiziksel tedavi ve nadir de olsa cerrahi uygulamalar birlikte kullanılmaktadır. Uygulanan tedavi, ağrı ve inflamasyon gibi temel belirtilerin giderilmesi ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatıcı yöndedir. Farmakolojik uygulamalar altında steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar, hastalığı modifiye edici ilaçlar (sulfasalazin, metotreksat, kortikosteroidler, tümör nekrozis faktör (TNF) α inhibitörleri) yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavide kullanılan steroid olmayan inflamasyon giderici ilaçlar ağrı ve inflamasyonu etkileyici şekilde kısa süre içerisinde gidermesine karşın hastalığın ilerlemesini ve omurga deformasyonunu önlemeye yönelik etkileri henüz kanıtlanamamıştır [87]. Son yıllarda yaygın kullanılan TNF α inhibitörlerinden etanercept [88], adalimumab [89] ve infliximab'ın [90] hastalık belirtilerini önemli ölçüde iyileştirdiği, omurga ve sakroiliak eklemlerdeki inflamasyonu giderdiği bildirilmiştir [91]. Farmakolojik tedavi ile birlikte uygulanan fiziksel tedavi ve egzersizlerle de hastanın dik postürünün ve eklem hareket açıklığının korunması amaçlanmaktadır [92], [93].

1.1.9 Ankilozan Spondilit ile İlgili Genetik Çalışmalar

Her ne kadar etiyojisi bilinmese de hastalığın gelişiminde genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin rol oynadığını düşündüren kanıtlar vardır [3], [26], [27]. Gelişen teknoloji hastalığın gelişiminde rol oynayan önemli genetik mekanizmaların aydınlatılmasına da katkı sunmuştur.

AS'nin birinci derece akrabalarda normalden 52 kat daha fazla görüldüğü uzun yıllardır bilinmektedir [25]. 1970'lerin başında HLA-B27 alleli ile hastalık ilişkilendirilinceye kadar bu ailesel yatkınlığın çevresel mi yoksa genetik faktörlerden mi kaynaklandığı bilinmemektedir [94], [95]. Heterozigot HLA-B27 taşıyan biri için odds ratio (OR) 50 iken homozigot'da bu oran 100'dür [96], [97], [98]. Hastalığın nüks etme olasılığının monozygotik ikizlerde %63, birinci derece akrabalarda %8.2 ve ikinci derece akrabalarda %1'dir. Ebeveyn-çocuk tekrarlama riski %7.9 iken kardeş-kardeş tekrarlama riski %8.2 olarak bildirilmiştir [25].

HLA-B27 ile AS arasında genetik ilişkiye ait çok güçlü kanıtlar olmakla birlikte moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Dünya genelinde yapılan popülasyon çalışmaları ile de bu durum doğrulanmıştır. HLA-B27'nin 130 alt tipi olduğu bildirilmiştir [99]. AS'nin oluşumunda B-2702 [100], B-2703 [101], B-2704 [102], B-2705 [100], B-2706 [103], B-2707 ve B-2708 [104], B-2710 [105], B-2714 ve B-2715 [106] ve B-2719 [107] alt tiplerinin rol oynadığı bildirilmiştir. Bunlardan HLA-B-2702-5, B-2707, B-2708 ve B-2710'un hastalık riskini açık bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir. HLA-B2706 ve HLA-B2709 allellerinin hastalık ile ilişkili olmadığı fakat bu allelleri taşımanın hastalık açısından bir koruyuculukda sağlamadığı bildirilmiştir [108], [109]. Aynı zamanda HLA-B27 dışındaki MHC allellerinin de hastalık ile ilişkili olduğu yönünde şüpheler bulunmaktadır. Bu yönde ilk çalışma Robinson ve arkadaşları tarafından yapılmış ve HLA-B60'ın hastalık ile ilişkisi gösterilmiştir [110]. Bunu takip eden Beyaz Avrupa ve Asya ırklarında yürütülen iki çalışma ile de Robinson'un verileri doğrulanmıştır [111], [112].

MHC gen bölgesinde bulunmayan genlerin AS ile ilişkisine yönelik güçlü epidemiyolojik kanıtlar elde edilmiş ve bu yönde bazı gen bölgeleri tanımlanmıştır. AS'li hastaların HLA-B27 taşıyan birinci derece akrabalarında hastalığın görülme riski normal popülasyonda HLA-27 taşıyanlara göre 5,6-16 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [113], [114]. Tek

yumurta ikizlerinde AS görölme riski (%60-75) çift yumurta ikizlerinden (%24) daha fazladır [115], [116].

Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), AS ile MHC olmayan gen bölgelerinin ilişkilendirilmesinde hızlı bir ilerleme kaydedilmesine katkı sağlamıştır. Elde edilen bulgular doğal bağışıklığın uyarılması, hücreler arası etkileşim ve yerleşik mikrobiyal organizmaların içsel dengesinde rol alan, *IL-23* metabolik yolu gibi bir seri önemli metabolik yolun AS'nin patogeneğinde rol oynadığına işaret etmiştir [2].

AS ile ilgili önemli çalışmalardan biri de ubiquitinasyona yönelik yapılanlardır. Ubikütinasyon protein üzerine ubiquitin grupları ekleme işlemidir. Bu işlem ile proteinler ya alt hücresel bölmeye ya da degradasyon için multi katalitik kompleks olarak adlandırılan proteozoma yönlendirilir [117]. Proteinlerin degradasyonu ile oluşan ürünler veya peptidler ya geri dönüştürülür ya da hücre yüzeyinde bulunan MHC Class I moleküllerine sunulur. Ubikütinasyon antijenlerin immün sisteme sunulmasının tanımlanmasında önemli bir rol oynar. Ubikütinasyonda rol alan sırasıyla Ubch9 ve Ubch7 enzimlerinin sentezinde rol alan *UBE2E3* ve *UBE2L3* gen bölgelerinin AS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [96]. *UBE2L3* ve varyantları inflamatuvar birçok hastalığın patojenik sinyal yolağı ile ilişkilendirilmiştir [118].

5p15 ve 17q21 kromozom bölgelerinde yer alan 4 aminopeptidazı kodlayan gen bölgelerinin AS'nin gelişimine neden olduğundan şüphelenilmektedir. Bunlar 5p15 üzerinde yer alan *ERAP1*, *ERAP2* ve insülin regüle eden aminopeptidaz (*IRAP*)'tır [96]. 17q21 kromozom bölgesinde yer alan ve puromisin duyarlı aminopeptidazı kodlayan gen (*NPEPPS*) bölgesinin de AS gelişiminde rol oynadığından şüphelenilmektedir. *ERAP1*'in AS dışında diğer bir seronegatif spondiloartropati olan psoriasis ile de ilişkisi gösterilmiştir. *ERAP2*'de AS ile birlikte psoriasis ve inflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilişkilendirilmiştir [119].

Reveille ve arkadaşları tarafından Avrupa toplumunda yapılan bir çalışmada 4 genetik bölgenin AS ile ilişkisi tanımlanmış ve sitokin metabolik yolunda rol alan *IL23R* (rs11209026) ve *IL1R2* (rs2310173) gen bölgelerinin hastalık gelişimindeki temel rolleri tanımlanmıştır [7]. Bu çalışmada; 2p15 (rs10865331) ve 21q22 (rs2242944) kromozom bölgelerinde yer alan ve herhangi bir ürün kodlamayan genler arası bölgenin AS ile ilişkili

olduğu gösterilmiştir. 21. Kromozomda ilgili bölgeye en yakın gen 82 kb uzakta yer alan *PSMG1* geni olup hasta ve kontrol grupları arasında gen ürününün ekspresyonunda herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir [7].

Szabo ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan ve seronegatif spondiloartropatik 3 hastalığın (AS, romatoid artrit ve Crohn) genetik olarak ilişkilendirilmesine yönelik bir çalışmada; *IL23R* gen bölgesinde tanımlanan 6 SNP'nin (rs1004819, rs7517847, rs7530511, rs2201841, rs1343151 ve rs10889677) hastalık riski ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada regresyon analiz modeli kullanılmış rs1004819, rs2201841 ve rs10889677 SNP'lerinin AS ve Crohn's hastalıkları için risk allelleri olduğu tanımlanırken rs1343151'in ise her iki hastalık açısından koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [120].

730 hasta ve 2879 kontrol ile yapılan bir replike çalışmada 16q22.1 kromozom bölgesi üzerinde bulunan *EXOC3L* (rs9939768) ve *RLTPR* (rs6979) gen bölgelerinde yer alan ve daha önce hastalık ile ilişkisi tanımlanan 2 sinonim olmayan SNP'nin AS ile ilişkisi araştırılmıştır. Genotipleme çalışması ile her iki SNP'nin de AS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Pointon ve arkadaşları tarafından yine aynı çalışma kapsamında yapılan farklı bir araştırmada *TRADD* gen bölgesinde yer alan rs9033 ve rs868213 SNP'lerinin hastalık ile ilişkili olabileceğini ve *TRADD* gen bölgesinin hastalık ile ilişkilendirme çalışmalarında aday gen olarak çalışılabileceğini bildirmişlerdir [121].

Australo-Anglo-American Spondiloartrit Konsorsiyumu (TASC) tarafından yürütülen genetik çalışmalar ve bu çalışmalar sonucunda ortaya konulan aday genler farklı etnik kökenlerde bu verilerin çalışılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu kapsamda Kore toplumunda 1164 hasta ve 752 kontrol ile yürütülen bir çalışmada *IL1R2*, *ANTXR2* gen bölgeleri ve 2p15, 21q22 genler arası bölgelerdeki polimorfizmin AS'ye yatkınlık riski araştırılmıştır. *ERAP1* gen bölgesinde yer alan rs27037 ve rs27044 SNP'leri ile 2p15 kodlamayan bölgede yer alan rs10865331 SNP'sinin Kore toplumunda hastalık açısından risk alleli olarak tanımlanabileceği bildirilmiştir [122].

Han Çin toplumunda AS ile ilişkili genlerin belirlenmesine yönelik yürütülen bir çalışmada *IL23R*, *ERAP1*, *STAT3*, *JAK2*, *TNFRSF1A* ve *TRADD* gen bölgelerinde belirlenen 115 SNP bölgesinin hastalık ile ilişkisi incelenmiştir. Modifiye New York kriterlerine göre AS tanısı konmuş 775 hasta ve yine aynı kriterler dikkate alınarak AS olmadığı tespit edilen 1587

kontrol ile yürütülen çalışmada Sequenom iPLEX ve ABI OppenArray genotipleme platformları kullanılmıştır. Çalışma neticesinde *TNFRSF1A* (rs4149577), *STAT3* (rs2293152 ve rs1053005) ve *ERAP1* (rs27038 ve rs27037) gen polimorfizmlerinin önemli düzeyde hastalık ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [123].

Macar toplumunda Kafkas etnik kökene sahip hastalar ile ilişkilendirme çalışmalarında sık karşılaşmadığımız bazı SNP bölgeleri hastalık riski açısından analiz edilmiştir (AS için rs11805303 SNP'si ilk olarak bu çalışmada test edilmiştir). 206 hasta ve 235 kontrol ile yürütülen çalışmada *IL23R* gen bölgesinde yer alan rs11805303, rs10889677, rs1004819, rs2201841, rs11209032, rs11209026, rs10489629, rs7517847 ve rs7530511 SNP'leri PCR-RFLP tekniği kullanılarak hastalık ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. rs11805303'de T allelinin ve rs1004819'da A allelinin kontrol grupları ile kıyaslandığında önemli düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte rs10889677 ve rs2201841 SNP'leri de Macar toplumunda hastalık ile ilişkilendirilmiştir [124].

Lin ve arkadaşları tarafından 2011 yılında Han Çin toplumunda yapılan kapsamlı genom ilişkilendirme çalışmaları ile AS ile ilişkili olabilecek 2 yeni kromozom bölgesi tanımlanmıştır. Bunlardan biri 5q14.3 kromozom bölgesinde yer alan *EDIL3* ve *HAPLN1* gen bölgeleri arasında yer alan rs4552569, diğeri ise 12q12 kromozomu üzerinde yer alan *ANO6* gen bölgesi içerisinde yer alan rs17095830 SNP'leridir. Bu çalışma ile aynı zamanda daha önce Avrupalılarda AS ile ilişkilendirilen MHC gen kompleksi içerisinde yer alan rs13202464 ve 2p15 kodlamayan bölgede yer alan rs10865331 SNP'lerinin Han Çin toplumunda hastalık açısından risk ortaya koyduğu belirlenmiştir. Çalışma kapsamında tanımlanan 2 yeni kromozom bölgesinin kemik formasyonu ve kırık oluşumu ile ilgili oldukları ve AS'nin etiyolojisinin anlaşılmasında önemli veriler sunabileceği bildirilmiştir [125].

İspanyol toplumunda 300 hasta ve 300 kontrol ile yapılan bir çalışmada *ERAP1* polimorfizmi ve haplotiplerinin AS hastalık riski ve hastalığın fonksiyonel şiddeti ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada; rs30187, rs17482078, rs2287987, rs26653 ve rs10050860 SNP'lerinin hastalık ile ilişkili olduğu, bunlardan 3'ünde (rs17482078, rs2287987 ve rs10050860) güçlü bağlantı dengesizliği tespit edilmiştir. Haplotip analizinde ise *ERAP1*'in 5'upstream bölgesinde yer alan rs41135'in güçlü bir şekilde ilişkilendirildiği

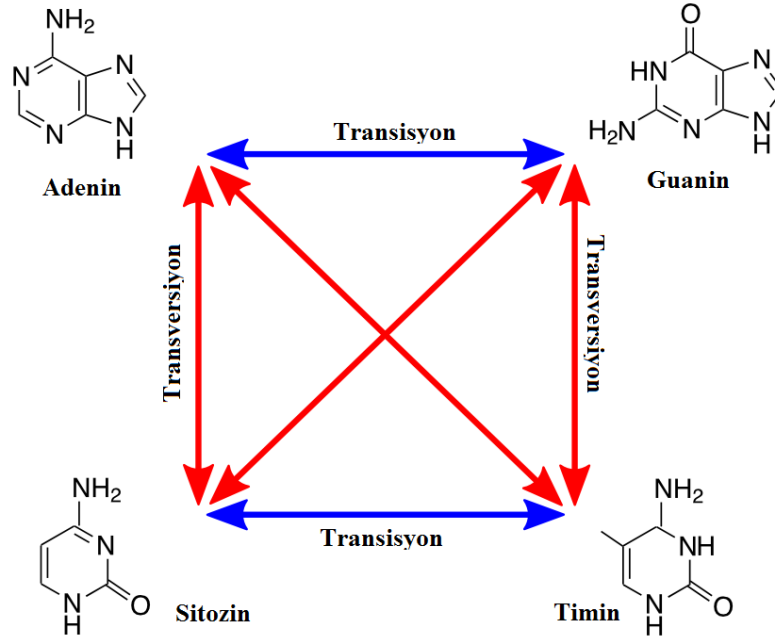
bildirilmiştir. Hastalığın fonksiyonel şiddeti ile ilgili olarak SNP rs17481856'nın bir risk faktörü olduğu ve rs27044'ün ise bu açıdan sınırdan bir eğilim gösterdiği vurgulanmıştır [35].

Kanada kökenli 2 merkezde 241 Kafkas etnik kimliğe sahip hasta (hastaların %81'i erkek ve hastaların tümü HLA-B27 pozitif) ile yürütülen bir çalışmada antijen sunumunda rol alan bazı gen bölgelerinin hastalığın radyografik şiddeti ve ilerleyişi ile ilişkisi incelenmiştir. Periferik kan örneklerinden elde edilen DNA'da *ERAP1*, *LMP2*, *LMP7*, *TAP1* ve *TAP2* gen bölgelerinde yer alan toplam 13 SNP'nin ilişkisi incelenmiştir. Hastalığın radyografik şiddeti lineer regresyon ve hastalığın gelişimi ise lojistik regresyon ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda; *ERAP1* gen bölgesinde yer alan rs30187 ve *LMP2* gen bölgesinde yer alan rs17587 SNP'lerinin radyografik şiddetin ve hastalığın ilerleyişinin öngörülmesi açısından önemli düzeyde ipuçları verebileceği bildirilmiştir [126].

IL-23 immün sistemde rol alan ve AS patogenezinde önemli bir rolü olan yardımcı T 17 hücrelerinin (*Th17*) farklılaşmasını uyaran bir gen bölgesidir. Wong ve arkadaşları immün sistemde rol alan *IL23R* ve *IL12B* gen bölgelerinde görülen polimorfizmin hastalığın şiddeti ve hastalık riski ile olan ilişkisini araştırmışlardır. *IL23R* gen polimorfizmi (rs10889677) ve *IL12B* gen polimorfizminin (rs3212227) 362 Tayvanlı hasta ve 362 kontrol ile yapılan çalışmada hastalık riskini önemli düzeyde arttırdığı bildirilmiştir. Aynı zamanda *IL12B* gen polimorfizminin hastalığın gelişimi ve şiddeti ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır [127].

1.1.10 Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Ankilozan Spondilit ile İlişkisi

Genetik varyasyonun modern bileşeni tek nükleotid polimorfizmleri (SNP, **Single Nucleotide Polymorphism**)'dir. SNP'ler insan genomunda yüksek sıklıkta görülen tek baz çifti değişiklikleri olarak ifade edilmektedir [128]. Genomda görülme sıklığının %1'den daha fazla olması ile mutasyonlardan ayrılırlar [129]. Bu baz değişikliklerinin boyutu tam olarak bilinmemekle birlikte 3 milyar bazdan oluşan insan genomunda 10 milyon SNP'nin bulunduğu tahmin edilmektedir [130]. Genetik çeşitliliğin temelinde SNP'ler bulunmaktadır. SNP'ler nükleotid değişim modeline göre transisyon tip SNP'ler (C/T veya G/A) ya da transversiyon tip SNP'ler (Şekil 1.3) olarak isimlendirilmektedir [131].



Şekil 1. 3 Tek nükleotid değişiminde transversiyon ve transisyonlar [132].

DNA'nın yapısal ve fonksiyonel özellikleri dikkate alındığında SNP'ler farklı sınıflara ayrılmaktadır. Gen üzerindeki pozisyonuna bağlı olarak SNP'ler ekson (eSNP), intron (iSNP) ve promotor SNP (pSNP) olarak isimlendirilmektedir. Gen ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici bölgelerde yer alan SNP'ler düzenleyici SNP ya da rSNP olarak tanımlanmaktadır. SNP'ler genom üzerinde kodlanan veya kodlanmayan bölgelerde görülebilmektedir. Kodlanmayan bölgelerdeki SNP'lerin fonksiyonel etkileri tam olarak bilinmez iken kodlanan bölgelerdeki SNP'ler protein yapı ve fonksiyonu üzerine etkilidir. Kodlanan bölgede meydana gelen nükleotid değişimi protein fonksiyonunda değişiklik meydana getirmiyorsa sinonim SNP (sSNP), protein yapı ve fonksiyonunda değişiklik meydana getiriyorsa sinonim olmayan SNP (nsSNP) olarak tanımlanmaktadır [133], [134], [135].

SNP'ler insan genomunda genetik varyasyonun en yaygın formudur. Birçok SNP insan popülasyonunun büyük çoğunluğunda dikkat çekici bir şekilde ortaktır [136]. SNP'ler tipik olarak 2 allele sahiptir. Bu durum her bir SNP bölgesinde yaygın olarak 2 baz çifti görülme olasılığının bulunması ile açıklanır. Bir SNP'nin frekansı genellikle daha az yaygın allelin frekansı ya da minör allel frekansı olarak verilir. Örneğin; minör allel (G) frekansının 0,40 olması, popülasyonun %40'nın G alleleline sahip olduğunu, %60'nın ise majör allele (daha yaygın allele) sahip olduğunu ifade etmektedir. SNP'ler bazı koşullarda

genetik varyantların aksine genetik rahatsızlıkların temel nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır [137]. Bir gen bölgesinde oluşan varyasyon protein işlevinde olumsuz yönde bir değişikliğe neden olabilmekte ve sonuçta oluşan nadir genetik varyantlar hastalığa neden olmaktadır. İnsan genomundaki tek baz değişimleri olarak tanımlanan SNP'lere yapısal olarak eşdeğer görülse de düşük frekansta görülen bu değişimler mutasyon olarak ifade edilmektedir [138].

SNP'ler hastalığa yatkınlık, hastalığın gelişimi, ilaç yanıtı ve hastalıkların tanısında yararlanılan yararlı moleküler markerlardır [139]. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile birçok hastalığın tanısı, hastalığa yatkınlık ve hastalığın şiddeti ile ilgili insan genomunda birçok SNP tanımlanmış ve ilişkilendirilmiştir [140], [141], [142]. AS'nin tanısı, hastalığın ilerleyişi ve hastalık riskinin tanımlanması amacı ile toplumumuz dışında farklı toplumlarda çalışılmış ve bazı SNP'ler AS ile ilişkilendirilmiştir [7], [34], [99], [143].

1.1.11 SNP Genotipleme Yöntemleri

SNP analiz yöntemleri 2 ana çerçevede değerlendirilmektedir. Bunlar yeni SNP'lerin taranması-keşfinde kullanılan teknikler ve bilinen SNP'lere ait allellerin tespit edilmesinde kullanılan teknikler olarak farklılaşmaktadır. Her geçen gün ilerleyen teknoloji ile SNP tespit yöntemleri pahalı, zaman ve emek alan sistemlerden nispeten ucuz, tam otomatize ve yüksek verimli sistemlere dönüşmüştür. SNP'lerin analizinde allelik ayırım, yapısal özellikler, reaksiyon formatı ve allel tespit mekanizmaları dikkate alındığında Şekil 1.4'te yer alan onlarca yöntemin pratikte kullanıldığı görülmektedir [144], [145].

SNP'lerin yapısal özellikleri dikkate alınarak tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan metodlar; tek zincir yapısal polimorfizm analizi (SSCPs) [146], heterodubleks analizi [147], direkt DNA dizileme ve varyant tespit çipleridir [148].

Allel ayırımında ise allele spesifik 4 farklı mekanizma yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar; hibridizasyon, nükleotid bağlanması, oligonükleotid bağlanması ve enzimatik kesimdir [149].



Şekil 1. 4 SNP analiz yöntemlerinin sınıflandırılması ([144], [145] no'lu kaynaklardan uyarlanmıştır)

SNP analizi amacı ile günümüzde yaygın olarak kullanılan birçok ticari ürün bulunmaktadır (Çizelge 1.5) [150]. Bu ticari ürünler çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahip olmakla birlikte çalışmanın amacı ve verimliliği, kaynağın türü çerçevesinde araştırmacılar tarafından tercih edilebilmektedir.

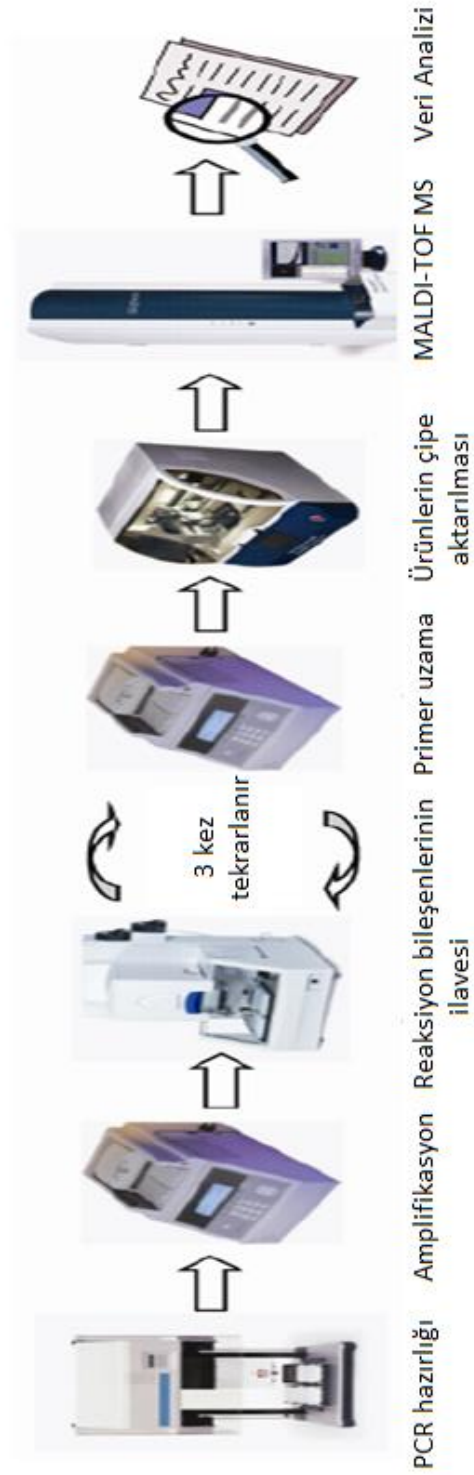
Bu tez çalışmasında iPLEX SNP genotipleme yöntemi ve MassArray Platformu (Şekil 1.5) [151] tercih edilmiştir (Sequenom Inc.). Bu yöntemin tercih edilmesinde, yöntemin multipleks reaksiyonlara olanak sağlaması, verilerin kısa sürede %99.7'den daha yüksek bir kesinlikle elde edilmesi, düşük maliyetli olması, aynı anda yüzlerce örnekte çok sayıda SNP'nin analizine imkân vermesi ve ülkemizde ulaşılabilir olması etken olmuştur.

Bu yöntemde SNP içeren genom bölgeleri spesifik primerler kullanılarak Multiplex PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılır. Ürünler kalıp olarak kullanılarak tek baz uzama reaksiyonu gerçekleştirilir. Tanımlayıcı bir primer 3' ucundaki nükleik asit sekansına yapışır ve primerin 3'ucu ddNTP içeren tek bir baz tarafından uzatılır [152]. Gerçekleştirilen reaksiyonda polimorfizmin görüldüğü DNA bölgesi PCR için kalıp rolü üstlenmiştir. 3'ucu allelik bazdan meydana gelen primerin hedef DNA'da bulunan allele komplementer olması durumunda primer uzaması gerçekleşecektir. Primerdeki uzama hedef DNA molekülündeki allel hakkında bilgi sağlamaktadır. Tek baz uzama reaksiyonu

neticesinde elde edilen ürünler MALDI-TOF MS (Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometrisi) ile analiz edilerek allellerin tespiti gerçekleştirilir [152], [153].

Çizelge 1. 5 SNP analizinde kullanılan ticari ürünlerin performans değerlendirmesi [150]

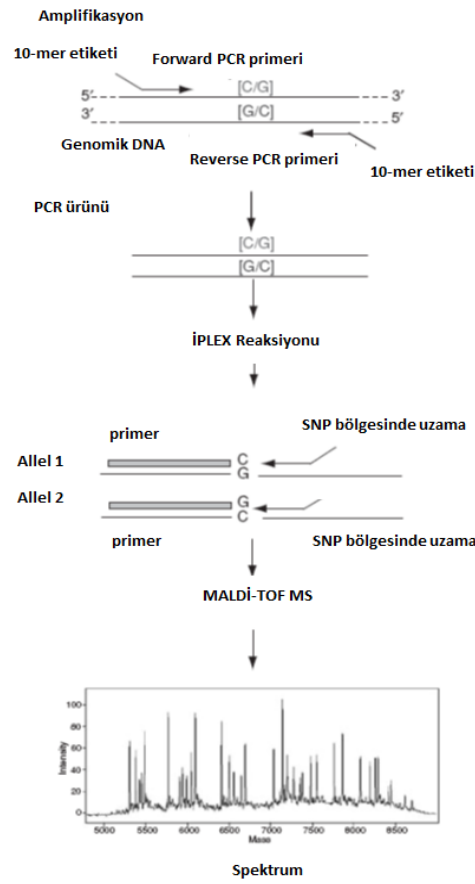
Ticari Marka	Analiz Performansı (8 saat/kışı)	Avantaj	Dezavantaj
TaqMan	3840 örnek/gün	Basitlik, Yüksek örnek işlem hacmi	Tek plex , Pahalı assaylar
SNPstream	1536 örnek/2 gün	Çoklu assaylar, Yüksek örnek işlem hacmi	Düşük multipleks, Multiplekste kısıtlama
SNPlex	1536 örnek/3 gün	48 plexe kadar çıkılabilir, Yüksek örnek işlem hacmi	Karmaşık reaksiyon hazırlama
hME/iPLEX	3840 örnek/2,5 gün	Düşük assay maliyeti, Yüksek örnek işlem hacmi	Sık bakım gerektiren ekipmanlar
Goldengate	172 örnek/3 gün	Orta-yüksek multipleks, Yüksek geçiş oranı ve kesinlik, orta örnek işlem hacmi	Düşük plexler (384-96) , Pahalı
MIP	24 örnek/3 gün	Uygun maliyetli , Çok yüksek multipleks assay	Karmaşık reaksiyon hazırlama, Düşük örnek işlem hacmi
GeneChip	4-8 örnek/4 gün	Ultra-yüksek multipleks (100-500 K) Çok uygun maliyetli, nicel analiz araçları	Örnek başına iki çip gerektirir
Infinium I ve II	8 örnek/3 gün	Ultra-yüksek multipleks, Yüksek geçiş oranı ve kesinlik	Nicel analizler tartışmaya açıktır



Şekil 1. 5 MassArray Platformu şematik gösterimi [151]

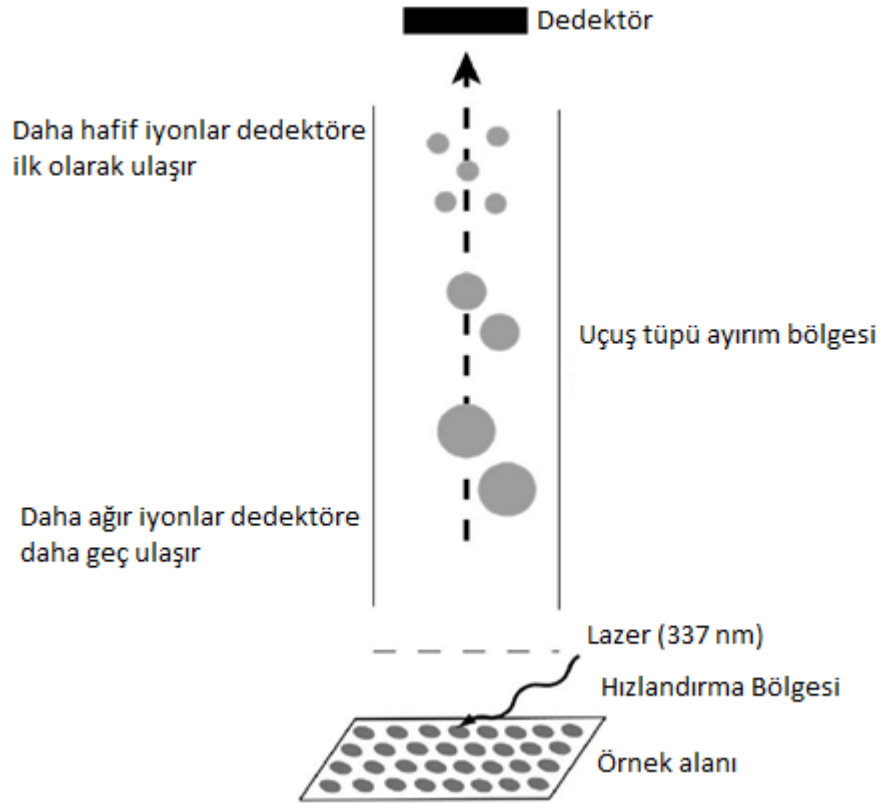
Yöntem temelde multiplex PCR ve MALDI-TOF MS gibi iki analitik yöntemin entegrasyonuna dayanmaktadır. MALDI-TOF MS tekniği SNP tanımlama ve allel frekansının analiz edilmesinde, proteinlerin miktar analizi ve tanımlanmasında, protein

tabanlı biyomoleküllerin profillenmesinde ve proteomik analizlerde yaygın olarak kullanılan doğruluk oranı ve verimliliği yüksek başarılı bir yöntemdir [154], [155], [156]. Allel ayırımına yönelik farklı stratejiler geliştirilmiş olmasına rağmen uygulamada araştırmacılar rutin olarak primer uzatma temelindeki yaklaşımları kullanmaktadırlar (Şekil 1.6). MALDI-TOF MS aynı zamanda birçok farklı örnekle çok sayıda genetik markerın aynı anda analizine imkân sağlamaktadır. Yöntemin önemli avantajlarından biri de tüm genomda SNP taranmasına olanak sağlamasıdır [156]. MALDI-TOF platformu allel spesifik ürünlerin bir matriks bileşeni ile metal bir plaka üzerinde karışımını içermektedir. Bu karışım kısa süreli bir lazer atışı ile ısıtılarak güçlü bir potansiyel farkın oluşması sağlanır. Oluşan potansiyel fark iyonizasyonun gerçekleştiği gaz fazına geçişi sağlar.



Şekil 1. 6 Tek baz uzama reaksiyonunun şematik gösterimi [153].

İyonlar dedektöre doğru hızlandırılır ve kütle/yük oranının hesaplanmasına izin veren uçuş zamanı (iyonların detektöre ulaşma zamanı) ölçülür (Şekil 1.7). Matriks ile iyonizasyon esnasında spektral analizi kolaylaştıran tek yüklü iyonlar üretilir [152].



Şekil 1. 7 MALDI-TOF MS platformunun şematik gösterimi [157].

1.2 Tezin Amacı

SNP'lerin hastalığa yatkınlık, hastalık riski ve hastalığın ilerlemesi hakkında önemli veriler sağladığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar farklı toplumlarda ve etnik kökenlerde risk allellerinin değişiklik gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle hastalık risk tanımlaması ya da hastalığın tanısı için referans alınacak SNP'lerin her topluma özgü olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasının amacı; daha önce farklı toplumlarda AS ile ilişkilendirilmiş SNP allellerinin toplumumuzdaki dağılımının tespit edilerek, çok sayıda SNP'nin multiplex PCR ve MALDI TOF MS tabanlı bir analiz platformu ile AS ile ilişkisinin belirlenmesi ve hastalarda SNP'lerin çeşitli klinik ve demografik verilerle ilişkilerinin araştırılmasıdır.

Bu tez çalışmasının bir diğer amacı, çok sayıda SNP'nin kısa süre içerisinde, çok sayıda örnekte ve nispeten düşük maliyet ile standart koşullar altında analiz edilmesinin önünü açmaktır.

1.3 Hipotez

Toplumumuzda AS ile ilişkili SNP'leri tanımlayarak; hastalığa genetik yatkınlığı gösterebilecek, ileride hastalığın erken dönemde kısa sürede tanısının konulmasına yardımcı olacak genetik yönlendirmeyi sağlayacak, doğru ve erken tanıyı takiben, doğru aşamada, hastalığın önleyici ve durdurucu tedavisinin başlatılmasına katkı sunabilecek bir biyomarkırın tespit edilebileceği öngörülmektedir.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışma Populasyonu

Çalışma popülasyonu klinik muayene ve radyolojik bulgular çerçevesinde kesin AS tanısı konulmuş 100 adet hasta örneği ve yine aynı tanı yöntemleri ile AS olmadığı tespit edilen 101 adet kontrol örneği olmak üzere toplam 201 örnekten oluşmaktadır.

2.1.2 Kan Örneklerinin Alınması ve Arşivlenmesi

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut ÖZAL Tıp Merkezi'nin 2013/111 no'lu araştırma protokol kodu ve 14.08.2013 tarihli Etik Kurul Onayı (EK-A) ile periferik kan örnekleri yine aynı hastanenin Romatoloji Kliniğine başvuran hastalardan EDTA'lı tüplere alınmıştır. Hastalardan örnek alınmadan önce kişiler çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve bilgilendirilmiş olur formu (EK-B) ile hastaların onayı alınmıştır. Örnek alınan hastalardan AS ile ilişkili olabilecek diğer durumların belirlenmesi amacıyla hasta bilgi formu örneği doldurmaları istenmiştir (EK-C).

2.1.3 Kimyasal Maddeler, Enzimler ve Kitler

Kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapmak amacıyla DNA izolasyon kiti (Invisorb Spin Blood Mini Kit) Invitek'ten temin edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan dNTP'ler (100 mM) Applied Biosystems'den, HotStarTaq Plus

DNA polimeraz (5 U/ μ l) , 10 x PCR tampon çözeltisi ve MgCl₂ (25 mM) QIAGEN'den ve tüm deneysel çalışmalarda kullanılan ultrasaf distile su Invitrogen'den temin edilmiştir.

PCR'da ve genotiplemede kullanılan primerler ve probler Sequenom Inc. tarafından sentezlenmiştir.

PCR sonrası temizleme reaksiyonunda kullanılan shrimp alkaline fosfataz enzimi (1.7 U/ μ l) ve tampon çözeltisi; tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılan iPLEX enzim, 10 x iPLEX tampon çözeltisi, iPLEX Extension Mix ve rezin ile muamele aşamasında kullanılan SpectroCLEAN rezin Sequenom Inc.'den temin edilmiştir.

2.1.4 Cihazlar

Mini santrifüj/vorteks-BIOSAN

Santrifüj-Beckman Coulter

Mikrosantrifüj-Beckman Coulter

Termal çalkalayıcı-BIOSAN

Emniyet kabini-Nüve

MassArray nanodispenser-Sequenom

Mikro-hacim UV-Vis spektrofotometre-Thermo

Termal cyclers-BIO-RAD

Döner çalkalayıcı-Scientific Industries

MassArray analyser- Sequenom Inc.

2.2 Yöntem

Bu tez çalışmasında kullanılan yöntemler iPLEX® Gold Application Guide (2009) [151] ve iPLEX® Gold SNP Genotyping Training Protocol (2009) [158] referans alınarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu ticari kit (Invisorb Spin Blood Mini Kit, Katalog No:1031100300) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İzolasyondan önce Elüsyon Tamponu D (Elution Buffer D) 2.0 ml'lik tüpe alınıp 56°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 200 µl kan örneği 1.5 ml'lik reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. 200 µl lizis tamponu HL (Lysis Buffer HL) eklenip, pipetle beş kez aşağı ve yukarı doğru karıştırılarak 56°C'deki çalkalamalı inkübatörde 3 dakika inkübe edilmiştir. 20 µl Proteinaz K eklenip kısa bir süre vortekslenmiştir. Reaksiyon tüpü 56°C'deki çalkalamalı inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir. 200 µl bağlanma tamponu HL (Binding Buffer HL) eklenip vorteksle ya da 4-5 kez aşağı yukarı pipetleme yapılarak karıştırılmıştır. RTA spin filtre seti (RTA Spin Filter Set) olarak adlandırılan tüpler alınıp hazırlanan karışım eklenmiş ve kapağı kapatılarak 1 dakika inkübe edilmiştir. Bu sette üstte spin filtre ve altta receiver (Alıcı) tüplerden oluşan birbiri içine geçebilen özel üretilmiş tüpler bulunmaktadır. 13.000 x g'de (12.000 rpm) 2 dakika santrifüjlendikten sonra süzüntü atılıp RTA spin filtre yeni bir 2.0 ml'lik alıcı tüpe konulmuştur. 500 µl ön yıkama tamponu (Pre-Wash Buffer) RTA spin filtreye eklenmiştir. Filtrenin kapağı kapatılıp 13.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra süzüntü atılıp RTA spin filtre yeni bir alıcı tüpe konulmuştur. Yıkama aşamasında 700 µl yıkama tamponu (Wash Buffer) eklenip 13.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra süzüntü atılarak RTA spin filtre yeni bir alıcı tüpe konulmuştur. Yıkama aşaması iki kez tekrar edilmiştir. RTA spin filtre tekrar yeni bir alıcı tüpe konularak etanolün tamamen uzaklaşması için 4 dakika en yüksek hızda santrifüjlenmiştir. RTA spin filtre yeni bir 1.5 ml'lik alıcı tüpe konulup önceden ısıtılmış (56°C) elüsyon tamponundan 75 µl eklenip oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. 8.000 x g'de (9.500 rpm) 1 dakika santrifüjlenerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.2 DNA Miktar ve Saflık Tayini

DNA miktar ve saflık tayini 260 nm ve 280 nm dalga boylarında uv-vis spektrofotometrede ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir. DNA'nın saf olarak elde edilebilmesi için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değeri oranının 1.7 ile 2.0 arasında olması gerekmektedir ($A_{260}/A_{280}=1.7-2.0$) [159]. DNA miktarı, 260 nm'deki bir optik dansite (OD) ünitesinin 50 µg/ml çift iplikli DNA'ya eşit kabul edilmesiyle hesaplanmıştır. DNA miktarı aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{DNA miktarı} = \text{OD ünitesi} \times \text{sulandırma faktörü} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

*DNA'nın 1:10 oranında sulandırılması durumunda sulandırma faktörü 10 olarak alınır.

İzole edilen her bir DNA'nın saflık derecesi ve miktarı NanoDrop Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak kontrol edilmiştir. Her bir genomik DNA örneğinin 1 µl'si cihaza yüklenerek DNA miktarı ve saflığı belirlenmiştir.

2.2.3 Kütle Spektroskopisi Temelli Deney Tasarımı

2.2.3.1 Deney Tasarımı

Bu tez çalışmasında Sequenom Assay Designer™ kullanılarak deney tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Multipleks reaksiyonlarda tek bir kuyuda çalışılabilecek olan SNP sayısı plex terimi ile tanımlanmıştır. Çalışmada yer alan SNP bölgeleri için tasarlanan primerlerde multipleks reaksiyon oluşumunu engelleyecek dimer oluşumu bulunduğu ve SNP'lerdeki hedef bölgelerde birbiri ile çakışan diziler mevcut olduğu için 19 örneğin bir plexte diğer 2 örneğin ise 2. bir plexte çalışılması planlanmıştır (Çizelge 2.1).

2.2.3.2 Primer ve Prob Tasarımı

Amplifikasyon primerleri tasarlanırken ideal olarak polimorfik bölgeyi içeren optimum amplikon boyutunun 80 ile 120 baz çifti arasında olması tercih edilmektedir ve 400 baz çiftinden daha uzun fragmentlerin bulunmamasına özen gösterilmelidir. Amplifikasyon primerinin 5' ucuna 5'-ACGTTGGATG-3' dizisini içeren genel bir 10-mer etiketi

eklenmektedir. Primerlerin muhtemel dimer oluşumu açısından kontrolü Sequenom Assay Designer™ yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 1 Multipleks reaksiyonlarda yer alan SNP'ler

Multipleks reaksiyon	SNP'ler			
Plex 1	rs7302230	rs10865331	rs27044	rs868213
	rs30187	rs2287987	rs10050860	rs1343151
	rs2310173	rs1004819	rs2242944	rs2303138
	rs10489629	rs7743761	rs11209026	rs4333130
	rs11465804	rs10889677	rs27037	
Plex 2	rs17482078	rs27434		

Problar amplifikasyon sonrası elde edilen PCR ürününe spesifik hibridizasyon gerçekleştirerek ortamda var olan allelin belirlenmesi için tek bazlık bir uzama gerçekleştirmekte ve kalıp diziye göre uzamaktadır. Ürünler arasında allele özgü kütle farklılıkları (Çizelge 2.2) meydana gelmekte ve bu farklılıklar MassARRAY® Typer 4.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmektedir.

Çizelge 2. 2 SNP allelleri arasındaki kütle farklılıkları [151].

Terminatör	A	C	G	T
A	0	-24	16	55.9
C	24	0	40	79.9
G	-16	-40	0	39.9
T	-55.9	-79.9	-39.9	0

Tasarım aşamasında uzama probunun 3' ucu polimorfik bölgenin hemen yanında ve 15-30 nükleotid uzunluğunda olacak şekilde tasarlanmıştır. Probların Tm (erime sıcaklığı) değeri yaklaşık olarak 60 °C veya daha yüksek olacak şekilde sentezlenmiştir. Uzama

probları ile yapılacak olan amplifikasyonlarda verimli sonuçlar elde etmek için uzama primerleri ve ürünlerinin kütleleri arasında aynı assayin allelleri hariç minimum 30 Da'luk fark bulunmaktadır ve analit kütleleri 4500-9000 Da arasında tercih edilmiştir. Tek baz uzama problemlerinin tasarımında da Sequenom'un Assay Designer™ yazılımı kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında genotiplenen 21 SNP'ye ait Referans SNP (rs) numaraları, polimorfik bölgeyi içeren amplikon uzunluğu, multipleks PCR'da kullanılan forward ve reverse primerler ve tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılan uzama problemleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2. 3 SNP'ler ve genotipleme primerleri

SNP Numarası	Forward Primerler	Reverse Primerler	Uzama Probu	Amplikon uzunluğu
rs7302230	ACGTTGGATGCCCCAGGGAACATTGAGAAC	ACGTTGGATGTCACACAGTCATAAGCTGTC	AGAGCCTCTCACCAC	107
rs30187	ACGTTGGATGCCCTTCATGTAGTCTTGG	ACGTTGGATGACCATGATGAACACTTGGAC	CTTGGACACTGCAGA	121
rs10865331	ACGTTGGATGGTGCAAGGTCTAAGTGAAGT	ACGTTGGATGATGGCCACTTTACGACTTGC	TGCATCAGCTTGACCAC	102
rs2287987	ACGTTGGATGGTCTTCTGCATCAAGTAAGC	ACGTTGGATGAGTGTGAATGAGCTTATACC	TTCATGGGCCACAGTCA	100
rs27044	ACGTTGGATGTAAGCAGACATGGACAGACG	ACGTTGGATGCTGATAGTTGTGCACACAGG	GGCAGGAGTAGTAGTT	108
rs868213	ACGTTGGATGAGGGATAGGGATCAGGAATG	ACGTTGGATGTGAGTCACTGCAACACAGCGAG	TCACATTCTTGAGGAGGT	122
rs10050860	ACGTTGGATGCATTTTCACATTCCTCCTTG	ACGTTGGATGCCATTGACATTCATCACCAG	ATTATCACCAGCAAAATCC	134
rs1343151	ACGTTGGATGGTGTGTTGGTGGCAGTTC	ACGTTGGATGGCAAGAGGAGAGAACTCAG	GAGAACTCAGTGCCAATT	117
rs2310173	ACGTTGGATGGACTGACTTCCACACACTTC	ACGTTGGATGAAGGAGGGTATCCCTTGATG	GGGACAAAGAAAGTGAATTT	106
rs1004819	ACGTTGGATGCAGCACAAAGCATTCTAGGAC	ACGTTGGATGCACCTGACCTGCTTTATGCTG	CTTTATGCTGTGATCTTACT	143
rs2242944	ACGTTGGATGATAAAGCATGAGGTGGGAG	ACGTTGGATGGTGAAGTAGGCCATCTATTG	TGTATGTTTTAGTATCAGTGG	130
rs2303138	ACGTTGGATGCTGTCTGAAACAGGGCTTCG	ACGTTGGATGTAGGCAAGGTACCTCTCAAG	TCTTGAAATGAGAACCATACT	116
rs10489629	ACGTTGGATGTAAGTCATGCCAGTTTCCG	ACGTTGGATGGTACTCTCTGTGATAAGCTTG	GGGGTGAATTATGATGTCAGCCA	116
rs7743761	ACGTTGGATGAAGTAAGAGATTCAACCCTCC	ACGTTGGATGATTGCTGGTGCATAGGTGAG	GGGCATAGGTGAGTAGATGCTT	117
rs11209026	ACGTTGGATGAAATTCGCAAAACCTAC	ACGTTGGATGGACAACAGAGGAGACATTGG	CTGGGATATTTAACAGATCATTC	143
rs4333130	ACGTTGGATGCACCCTCACACAGGAAAAAC	ACGTTGGATGTTGGCTAAGGATTCAAAACCC	AGTAGCTAGTTAGTCTATGTTTCA	120
rs11465804	ACGTTGGATGCAGTATGATGGGTAAATGG	ACGTTGGATGATCTCTACAGGGCACCTTAC	TGGGCTTTTGGTAGTCTTTTAG	113
rs10889677	ACGTTGGATGTAAGAATTCCCGGGAGC	ACGTTGGATGCCCTTCGGGACCTTAATCTC	ACCTTAATCTCTAAATTTAAGAAAT	110
rs27037	ACGTTGGATGGGGCATATAAATCCATTG	ACGTTGGATGGGAACAAGATCTCAATTC	TCATTATTATTACAAATTGTTAGGG	140
rs17482078	ACGTTGGATGCTGATAGTTGTGCACACAGG	ACGTTGGATGTAAGCAGACATGGACAGCG	GCTCAGTCTCAGAGC	108
rs27434	ACGTTGGATGGTCTTCTGCATCAAGTAAGC	ACGTTGGATGAGTGTGAATGAGCTTATAC	TGAGCTTATACCTGGTG	100

2.2.3.3 Multiplex PCR Uygulaması

Genomik DNA'daki hedef bölge, tasarlanan primer çiftleri kullanılarak multipleks PCR ile amplifiye edilmiştir. Reaksiyon 95°C'de 2 dakika ön denatürasyon, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama basamakları ile 44 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. PCR bileşenleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2. 4 Multiplex PCR karışımı

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Reaksiyonda Kullanılan Bileşen Hacmi (µl)
dH ₂ O	N/A	1,800
10X PCR Tamponu	1x (2 mM MgCl ₂)	0,500
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	0,400
dNTP karışımı	500 µM	0,100
Primer karışımı (0,5 µM)	0,1 µM	1,00
Roche PCR Enzimi (5 U/µl)	1.0 U/reaksiyon	0,200
DNA (10 ng/µl)	2 ng/µl	1,00
Toplam Hacim		5,00

2.2.3.4 dNTP Nötralizasyonu (SAP Uygulaması)

Multiplex PCR sonrası ampliconlardaki bağlanmamış dNTP'ler shrimp alkalen fosfotaz (Shrimp alkaline phosphotase: SAP) ile nötrale edilmiştir. SAP, serbest dNTP'den bir fosfat grubunu keserek geri dönüşümsüz olarak dNDP'ye çevirmektedir. Serbest halde bulunan bağlanmamış dNTP'leri defosforile etmek için hazırlanan SAP reaksiyonu bileşenleri Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Multiplex PCR sonrası her bir kuyudaki PCR ürününün üzerine SAP enzimi ve tampon çözeltisini içeren reaksiyon karışımından 2 µl eklenip, örneklerin yer aldığı plaka yavaşça karıştırılıp 1000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. SAP reaksiyonu 37 °C' de 40 dakika

süreyle gerçekleştirilerek, enzimin inaktif hale gelmesi için reaksiyon karışımı 85 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir.

Çizelge 2. 5 SAP reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	7 µl reaksiyondaki son hacim	2µl SAP karışımı içerisindeki bileşen miktarı
dH ₂ O	N/A	1,53
TS Tamponu (10X)	0,24 X	0,17
SAP Enzimi (1,7 U/µl)	0,5 U	0,30
Toplam Hacim (µl)	N/A	2 µl

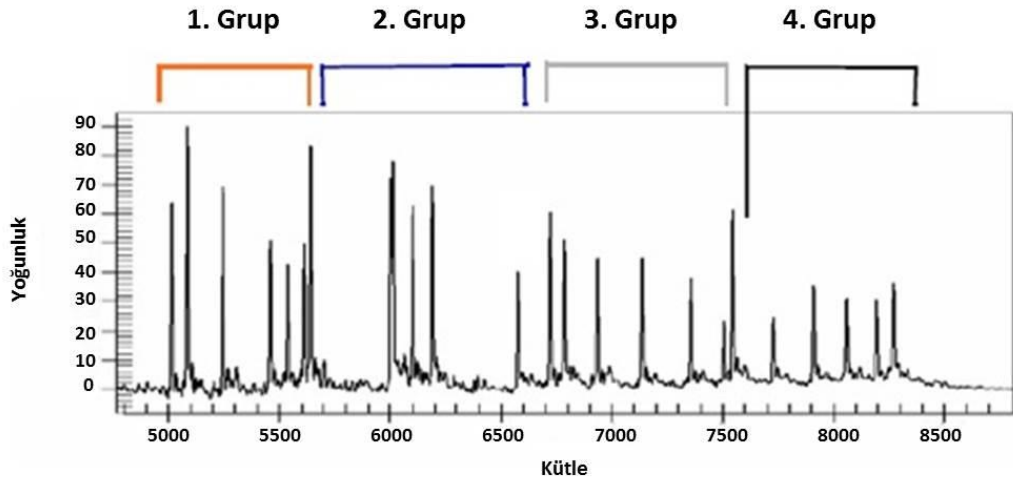
2.2.3.5 Tek Baz Spesifik Uzama Reaksiyonu

Tek baz spesifik uzama reaksiyonundaki uzama probu konsantrasyonları, pik yoğunluğu ve analit kütlesi arasındaki ters orantı nedeniyle ayarlanmalıdır. Kütlesi en yüksek olan primerin (~8500 Da) pik yoğunluğu daha düşük kütleli primerlerin ortalamasına göre % 25’ten daha azdır. Kütle arttıkça sinyal-gürültü oranı azalmaya eğilimlidir. Sinyal-gürültü oranının dengelenmesi açısından oligoların konsantrasyonlarının ayarlanması tavsiye edilir. Konsantrasyon düzenlemesinin yapılmaması halinde gürültüden dolayı sinyaller ayırt edilemez. Genotipleme reaksiyonlarında, analit pikleri kaçırılabilmekte ve genotipleme hataları ortaya çıkabilmektedir.

Analit kütlesi ve sinyal-gürültü oranı arasındaki ters orantıya ek olarak, pik uzunluklarında da beklenmeyen varyasyonlar meydana gelebilmektedir. Bu varyasyonlar tutarsız oligonükleotid kalitesinden ve MALDI’deki düşük desorpsiyon/iyonizasyon özelliğinden kaynaklanabilmektedir.

İfade edilen sorunların giderilmesi ve modernize edilmesi için tek baz spesifik uzama reaksiyonunun hazırlanmasında dört farklı yöntem belirlenmiştir. İlk üç yöntem primerlerin kütlesine göre 2, 3 ve 4 aşamalı olarak gruplara ayrılarak konsantrasyonlarının ayarlanmasını gerektirmektedir. Dördüncü yöntem bütün primerlerin kütlesine göre spesifik bir konsantrasyonda karışımını ve bu konsantrasyonların kullanılarak spektrumda her bir primerin dengelenmesini

gerektirmektedir. Bu tez çalışmasında, uzama primeri konsantrasyonları düşük kütleli primerlerden yüksek kütleli primerlere doğru dört aşamalı olarak ayarlanmıştır. Düşük kütleli primer grubunun konsantrasyonu 7.0 μM , bir sonraki grubun 9.3 μM , üçüncü grubun 11.6 μM ve en yüksek kütleli grubun ise 14.0 μM olacak şekilde ayarlanmıştır. 7/9.3/11.6/14 μM konsantrasyonlarındaki uzama probu karışımı uygun miktarda dH_2O eklenerek hazırlanmıştır.



Şekil 2. 2 Dört aşamalı uzama probu ayarlama metoduna göre primerlerin sınıflandırılması [151]

Prob konsantrasyonları, belirlenen değerlere ayarlandıktan sonra uzama problemlerini içeren bir stok karışım hazırlanır. SAP ile yapılan PCR sonrası temizleme işlemi sonucu elde edilen ürünlerin tasarlanan problemlerin hedef bölge ile hibridizasyonu ile tek kütle-modifiye nükleotid uzaması gerçekleştirilir. Bunun için öncelikle uzama problemleri, tampon çözelti, enzim ve kütle modifikasyonlu ddNTP'leri içeren bir primer uzama reaksiyon kokteyli (Çizelge 2.6) hazırlanarak amplifikasyon ürünlerinin üzerine ilave edilir. Bu reaksiyon ile primerin, deneyin tasarımına ve allele bağlı olarak, tek kütle modifikasyonlu nükleotid ile sonlanması sağlanır. Tek baz spesifik uzama reaksiyonu Çizelge 2.7'de belirtilen koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 6 Tek baz spesifik uzama reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	9µl reaksiyon hacmindeki son konsantrasyon	2 µl karışım içersindeki bileşen miktarı (µl)
dH ₂ O	N/A	0.619
iPLEX Tamponu (10X)	0.222X	0.200
iPLEX Terminasyon karışımı	1X	0.200
iPLEX Uzama Primeri Karışımı 7/9.3/11.6/14 µM	0.84/1.04/1.57	0.940
iPLEX Enzim	1X	0.041
Hacim (µl)	N/A	2
SAP+PCR	N/A	7
Toplam Hacim (µl)	N/A	9

Çizelge 2. 7 Tek baz spesifik uzama reaksiyonu koşulları

Basamaklar	İşlem	Sıcaklık ve Süre
1	Ön denatürasyon	94 °C'de 30 saniye
2	Denatürasyon	94 °C'de 5 saniye
3	Bağlanma	52 °C'de 5 saniye
4	Uzama	80 °C'de 5 saniye
5	Son uzama	72 °C'de 3 dakika
Döngü sayıları; 3.-4. basamaklar 5 döngü; 2.-4. basamaklar 40 döngü		

2.2.3.6 Rezin Uygulaması

Tek baz spesifik uzama reaksiyonu ürünleri spektrometrik analiz optimizasyonu için Na⁺, K⁺ ve Mg⁺² gibi iyonları uzaklaştırılarak arka plan kirliliğini minimuma indirmek için katyonik değişim sağlayan rezin ile muamele edilmiştir. Rezin ince uzun bir spatül yardımı ile bulunduğu kaptan çukur plaka üzerine aktarılmıştır ve çukur plaka üzerinde

bulunan kuyulara yayılması sağlanmıştır. Uygulama sonrası fazla rezin plakadan sıyrılarak uzaklaştırılmıştır. Resin uygulaması en az 20 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu esnada, örnek plakadaki her bir kuyucuğa 16 µl dH₂O eklenmiştir. Örnek plaka yavaşça alt-üst edilerek çukur plaka üzerine yerleştirilmiştir. Örnek ve çukur plakalar birlikte tutulmuş ve yavaşça ters çevrilerek rezinin çukur plakadan örnek plakaya dökülmesi sağlanmıştır. Çukur plakaya hafifçe vurarak rezinin tamamının örnek plakaya dökülmesi sağlanmıştır. Kuyucuklarda hava kabarcıkları oluşmaması için plaka kısa bir süre santrifüj edilmiştir. Örnek plakası döner-çalkalayıcıda oda sıcaklığında 35 dakika döndürülmüştür ve 3200 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

2.2.3.7 Ürünlerin Çipe Aktarılması

Resin ile ortamda istenmeyen iyonların ve arka plan kirliliğinin uzaklaştırılmasının ardından elde edilen modifiye PCR ürününden 15nl alınarak 384-element SpectroCHIP® II üzerine dağıtmak için nanodispenser kullanılmıştır. Oligonükleotidlerin silika çip üzerindeki matriks spotlarına aktarılması oligonükleotidleri MALDI-TOF matriksine (3-hidroksipikolinik asit) dahil etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde vakum altında delikli iğnelerin kapiler etkisinden ve nano hacimde gerçekleştirdiği dağılımdan yararlanılmıştır [151], [153]

2.2.3.8 MALDI-TOF ile Genotipleme

Modifiye PCR ürünleri 384-element SpectroCHIP® II üzerine dağıtılmış, analiz için kütle spektroskopisi (MassARRAY® Analyser 4) cihazına yüklenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Lazer atımı sonrası elde edilen verilerin analizi, spektro görüntüsünün ve allel spesifik piklerin elde edilmesi için cihazda bulunan MassARRAY® TYPER 4.0 genotipleme yazılımından yararlanılmıştır. Spektrumda doğru analitin beklenen pozisyonunun hesaplanması için deney tasarımı aşamasında elde edilen bilgiler kullanılmaktadır.

2.2.4 İstatistik Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 15.0, Chicago, IC, USA) programı kullanılmıştır. Tüm testlerde $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

2.2.4.1 Hardy-Weinberg Dengesi

Hardy-Weinberg kuralı yeterli büyüklükteki bir popülasyonda, seleksiyon (seçilim), mutasyon ve göç olaylarının meydana gelmediği ve rastlantısal eşleşmenin olduğu koşullarda gen ve genotip frekanslarının sabit kaldığını ifade eder. Gen ve gen frekansları dengeye ulaşmış olan popülasyonlara dengeli popülasyon ya da Hardy-Weinberg dengesinde (HWE) olan popülasyon adı verilmektedir [160]. Hardy Weinberg kuralına uygun olan popülasyonlarda allel frekansları nesilden nesile değişmemektedir. Genotip frekansları ise allel frekanslarından tahmin edilebilmektedir [161]. İnsandaki çoğu SNP'nin allel ve genotip frekanslarının nesilden nesile değişmediği yani Hardy Weinberg dengesinde olduğu bilinmektedir [162], [163].

Bu tez çalışmasında Hardy Weinberg dengesi test edilirken öncelikle genotiplerin çalışma grubundaki gözlenen birey sayıları bulunmuştur. Allel frekansları hesaplanmıştır. Hesaplanan allel frekansları kullanılarak beklenen genotip frekansları elde edilmiştir. Hardy Weinberg kuralına göre allel frekansları sırasıyla p ve q olan iki allelli (A ve a) bir lokusta genotip frekanslarının $p^2+2pq+q^2=1$ denkleminde uyması beklenmektedir [161]. Eşitlikte $p^2 = AA$; $2pq = Aa$ ve $q^2 = aa$ genotiplerinin frekansını göstermektedir.

Çalışmamızda gözlenen değerler ile beklenen değerler arasındaki farkın önemli olup olmadığını test etmek ve çalışma grubunun her bir SNP için Hardy Weinberg dengesini değerlendirmek amacıyla ki-kare testi uygulanmıştır. p değeri ≤ 0.05 olan SNP'lerin HWE dengesinde olmadığı kabul edilmiştir.

2.2.4.2 Olasılıklar Oranı (Odds Ratio: OR) Testi

Hastalardaki genetik değişimin ortaya çıkma olasılığı olarak tanımlanabilecek olan olasılıklar oranı testi ile çalışma grupları (hasta ve kontrol) istatistiki olarak değerlendirilmektedir [164]. Çalışma grupları karşılaştırıldığında bir SNP allelinin veya genotipinin artan frekansta olması, ilgili SNP allelinin bulunmasının hastalık riskini arttırabileceğini göstermektedir [165]. Genetik değişimin hastalık ile ilişkilendirilebilmesi için olasılıklar oranının 1'den büyük olması gereklidir [164].

Bu tez çalışmasında AS ve SNP allel ve genotiplerinin ilişkileri OR değerleri hesaplanarak belirlenmiştir.

AS ile SNP genotiplerinin ilişkilendirilmesinde çalışma popülasyonunda kontrol grubuna göre yaygın olan homozigot genotip belirlenmiş ve referans olarak alınmıştır. OR değerleri ve %95 güven aralıkları homozigot karşılaştırma modeline (Örneğin AA ile CC) ve dominant modele (Örneğin AA+AC ile CC) göre hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler 1'den büyükse AS ile ilişkilendirilmiştir.

2.2.4.3 Klinik Değişkenlerin SNP'lerle İlişkisinin Belirlenmesi

Ailede romatizmal hastalık öyküsü, ailede ilişkili seronegatif spondiloartropati öyküsü, ailede AS olgusu, tanı konulmasında geçen süre, cinsiyet, yaş gibi klinik ve demografik değişkenlerin SNP'lerle ilişkisinin belirlenebilmesi için ki-kare testi ve Fisher kesinlik testi (Fisher's exact test) kullanılmıştır.

2.2.4.4 Lojistik Regresyon Analizi

Lojistik regresyon analizi ile en az değişkeni kullanarak en iyi uyuma sahip olacak şekilde bağımlı ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi tanımlayabilen ve biyolojik olarak kabul edilebilir bir modelin kurulması amaçlanmaktadır. Bu tez çalışmasında AS riskinin hesaplanmasında klinik ve demografik veriler açısından SNP genotipleri analiz edilmiştir.

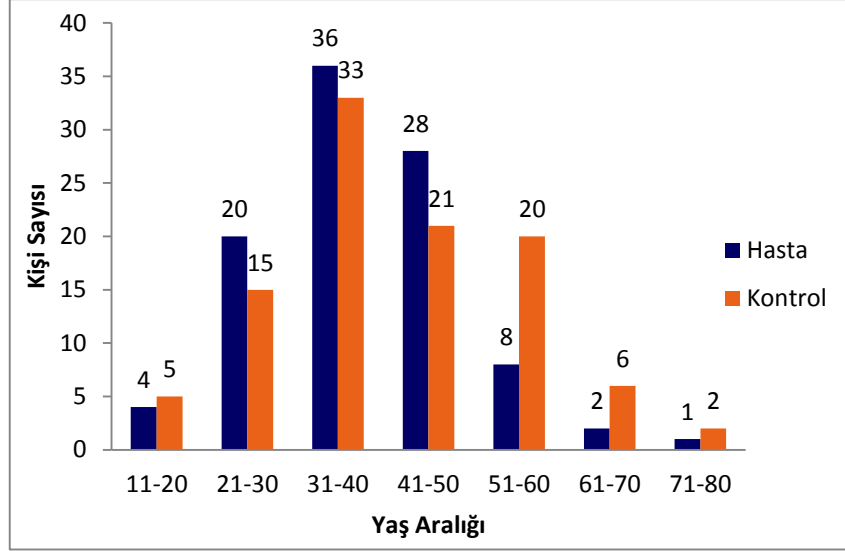
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Ankilozan Spondilit Tanısının Konulması ve Çalışma Populasyonunun Tanıtılması

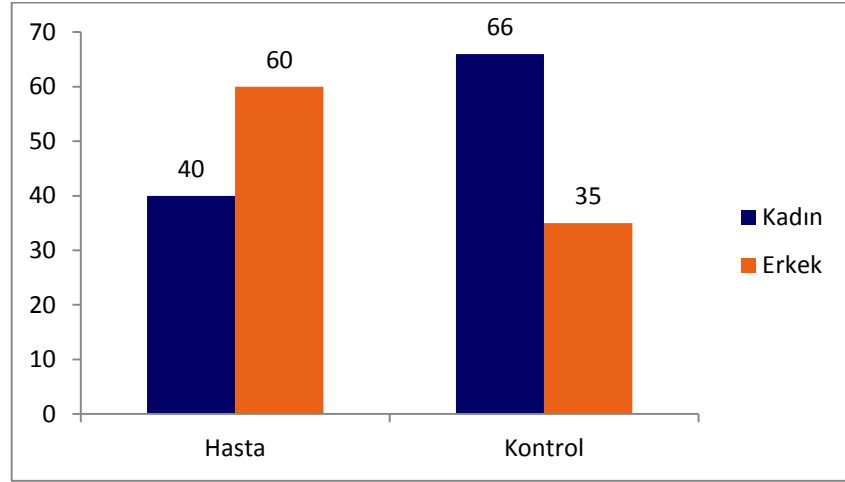
AS tanısı, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut ÖZAL Tıp Merkezi Romatoloji Kliniğine başvuran kişilerde Doç. Dr. Metin ÖZGEN tarafından konulmuştur. Kliniğe başvuran hastalarda AS tanısı klinik ve radyolojik tanı kriterleri kullanılarak Modifiye New York Kriterlerine göre konulmuştur. Çalışma populasyonu, kesin AS tanısı konulmuş 100 adet hasta ve 101 adet kontrol örneği olmak üzere toplam 201 örnekten oluşmaktadır.

AS genellikle 20-30 yaş arasında ortaya çıkar, hastalığın 45 yaşından sonra nadir olarak görüldüğü bilinmektedir [18]. Yaş faktörünün AS tanısı açısından önemli bir parametre olması sebebi ile çalışma grubundaki bireylerin yaş dağılımları belirlenmiştir. Çalışma grubumuzdaki bireylerin en küçüğü 15 en büyüğü ise 75 yaşındadır. Yaş ortalamaları ise 40'tır (Şekil 3.1).

AS açısından dikkat çeken diğer bir olgu hastalığın kadın ve erkeklerde görülme sıklığının farklı olmasıdır [9]. Hastalığın erkeklerde kadınlardan yaklaşık olarak 3,5 kat daha sık görüldüğü bildirilmiştir [9]. Çalışma grubundaki bireylerin cinsiyet dağılımı yapılmış ve erkek olgu sayısının kadın olgu sayısından 1,5 kat fazla olduğu gözlenmiştir. Çalışma grubunda 95 erkek 106 kadın yer alırken, hasta olgu sayısı ise 60 erkek 40 kadın olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.2).

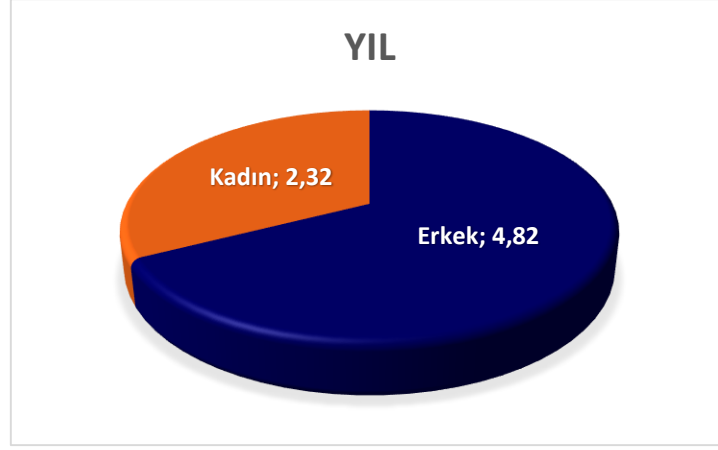


Şekil 3. 1 Çalışma grubundaki bireylerin yaş dağılım grafiği



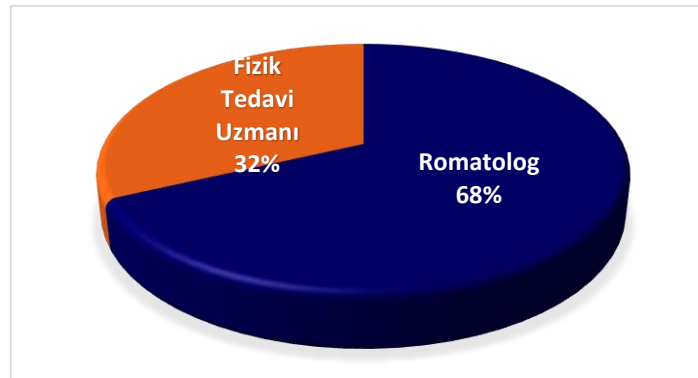
Şekil 3. 2 Çalışma grubunda yer alan bireylerin cinsiyet dağılım grafiği

Hastalığın tanısının net bir şekilde konulamaması kesin tanı konuluncaya kadar geçen sürede hastada yaşam kalitesini önemli düzeyde etkileyen postür ve omurga bozukluklarının olması ve bunların çoğunun geriye döndürülememesi AS hastalarının karşı karşıya olduğu en önemli sorunlardır. Her ne kadar hastalığın başlangıç semptomları 20 ve 30'lu yaşlarda görülse de hastalığın kesin teşhisi 5-10 yıl gecikmektedir [79], [80], [81], [82]. Çalışma grubumuzda yer alan hastalarda da benzer durum gözlenmiştir. Hastalığın tanısının yaklaşık olarak 4 yıl (3,82 yıl) geciktiği tespit edilmiştir. Cinsiyete bağlı tanı gecikmesi değerlendirildiğinde; erkeklerde 4,82 yıl, kadınlarda 2,32 yıl tanının geç konulduğu tespit edilmiştir (Şekil3.3).



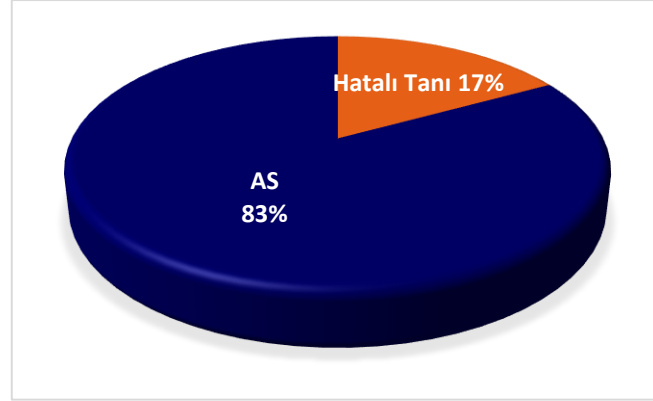
Şekil 3. 3 Cinsiyete bağlı tanı gecikme süresi grafiği

Teşhis aşamasında doktorların büyük bir çoğunluğu tarafından karşılaşılan zorluk AS'nin bel fıtığı (lumbar disc herniaton-LDH) ile benzer radyolojik görünüm sergilemesidir. Bu nedenle AS hastalarının büyük bir bölümüne başlangıçta bel fıtığı tanısı konulmakta hatta önemli bir bölümü bel fıtığı tanısı ile cerrahi müdahale görmektedir [85]. Klinik belirtilerin tek başına tanı için yeterli olmaması, serolojik ve radyolojik bulgularında iyi analiz edilmesini gerekli kılmaktadır. Fakat yine de kesin tanı için yeterli değildir. Eldeki bulguların bu konuda uzman romatologlar tarafından değerlendirilmesi hastalığın erken dönemde ve kesin tanısının konulması açısından önem arz etmektedir. Çalışma grubunda yer alan bireylere tanının konulduğu birimler açısından değerlendirildiğinde; 100 hastadan 68'ine uzman Romatolog, 32'sine ise Fizik Tedavi uzmanı tarafından AS teşhisi konulduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.4).

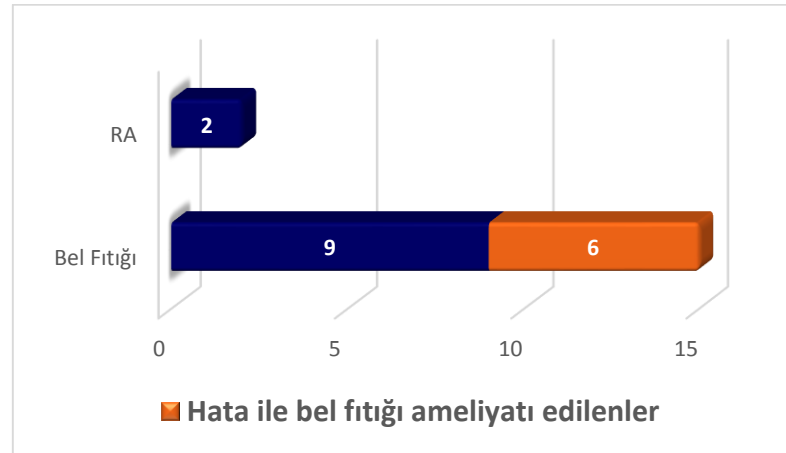


Şekil 3. 4 Hastalık tanısının konulduğu birimlerin yüzde dağılım grafiği

Hatalı tanı açısından çalışma grubunda yer alan hastalar değerlendirildiğinde; hastaların %17'sine (17 hasta) başlangıçta AS dışında farklı bir teşhis konulduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.5). Bu 17 hastanın 2'sine romatoid artrit, 15'ine ise bel fıtığı teşhisi konulduğu tespit edilmiştir. Bel fıtığı teşhisi konulan 15 hastadan 6'sının ise hatalı tanı sonrası bel fıtığı ameliyatı yapıldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.6).

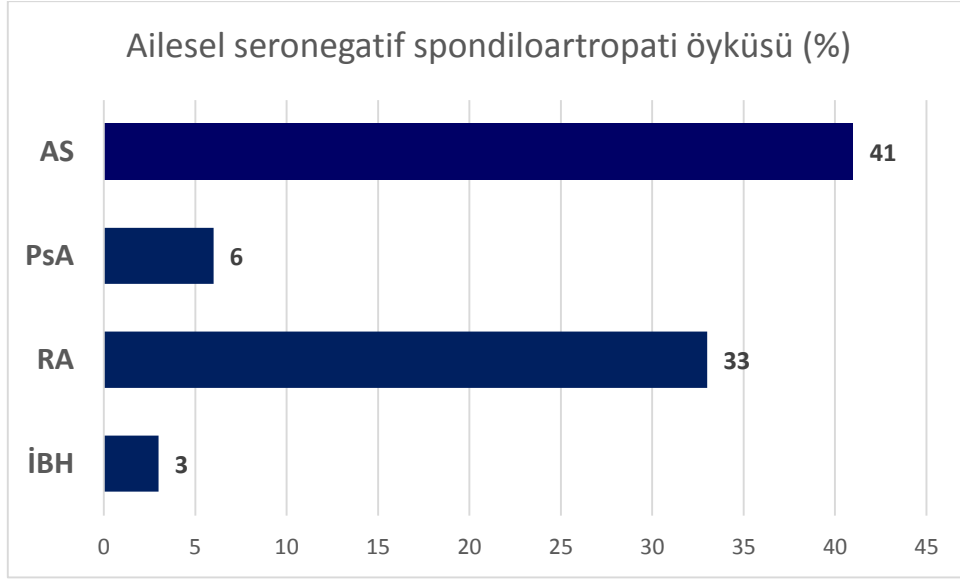


Şekil 3. 5 AS tanısında başarı oranı grafiği



Şekil 3. 6 Hatalı tanı alan hastaların dağılım grafiği

AS açısından en önemli risk faktörlerinden biri ailesel hastalık öyküsüdür [25]. Çalışma grubunda yer alan hasta bireyler bu açıdan değerlendirildiğinde birinci derece akrabalarında 41 AS, 6 PsA (Psöriatik artrit), 33 RA (Romatoid artrit) ve 3 İBH (inflamatuvar bağırsak hastalıkları) vak'ası görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7 Ailesel seronegatif spondiloartropati öyküsü yüzde dağılım grafiği.

3.2 DNA'ların Saflık ve Miktar Analizi

Hasta ve kontrol örneklerinden elde edilen genomik DNA'lar herhangi bir karışıklığa neden olmamak için kodlanmıştır. İzolasyon sonucu elde edilen bu örnekler NanoDrop Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve absorbans değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). Ölçüm sonucunda 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değeri oranı 1.7 ile 2.0 arasında olan örnekler uygun olarak değerlendirilmiş [159] ve çalışmaya dahil edilmiştir. Bu aralık dışında kalan örnekler ise çalışmadan çıkarılmıştır.

Çizelge 3. 1 Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini

Hasta No	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
AS0001	82.3	1.646	0.902	1.82
AS0002	98.5	1.97	1.067	1.85
AS0003	83.4	1.667	0.921	1.81
AS0004	36	0.72	0.395	1.82
AS0005	48.8	0.976	0.539	1.81
AS0006	47.6	0.952	0.504	1.89
AS0007	41.9	0.838	0.453	1.85
AS0008	93.1	1.862	0.984	1.89

Çizelge 3. 1 Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini (devamı)

Hasta No	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
AS0009	61.6	1.232	0.672	1.83
AS0010	57.5	1.151	0.605	1.90
AS0011	80.8	1.617	0.866	1.87
AS0012	108.1	2.163	1.166	1.85
AS0013	49.5	0.989	0.522	1.90
AS0014	42.9	0.859	0.472	1.82
AS0015	50.4	1.009	0.541	1.86
AS0016	50.2	1.003	0.537	1.87
AS0017	54.1	1.083	0.601	1.80
AS0018	43.6	0.873	0.487	1.79
AS0019	35.9	0.719	0.395	1.82
AS0020	52.7	1.053	0.574	1.84
AS0021	61.2	1.224	0.65	1.88
AS0022	56.1	1.122	0.615	1.82
AS0023	44.7	0.895	0.48	1.86
AS0024	117.3	2.346	1.252	1.87
AS0025	54	1.079	0.594	1.82
AS0026	34.9	0.699	0.369	1.89
AS0027	51.6	1.032	0.563	1.83
AS0028	73.8	1.476	0.809	1.82
AS0029	70.9	1.417	0.742	1.91
AS0030	144.8	2.896	1.536	1.88
AS0031	86.3	1.726	0.908	1.90
AS0032	64.9	1.298	0.707	1.84
AS0033	151.2	3.024	1.618	1.87
AS0034	33	0.659	0.353	1.87
AS0035	31.2	0.624	0.34	1.84
AS0036	35	0.7	0.37	1.89
AS0037	70.3	1.406	0.774	1.82
AS0038	65.4	1.307	0.71	1.84

Çizelge 3. 1 Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini (devamı)

Hasta No	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
AS0039	52.6	1.052	0.579	1.82
AS0040	50.3	1.005	0.551	1.82
AS0041	46.3	0.926	0.491	1.89
AS0042	55.6	1.112	0.602	1.85
AS0043	64.4	1.298	0.719	1.81
AS0044	69.6	1.393	0.753	1.85
AS0045	76.9	1.537	0.853	1.80
AS0046	89.5	1.791	0.958	1.87
AS0047	42	0.839	0.451	1.86
AS0048	46.9	0.937	0.494	1.90
AS0049	66	1.32	0.706	1.87
AS0050	59.3	1.187	0.64	1.85
AS0051	43.7	0.873	0.469	1.86
AS0052	53.7	1.074	0.542	1.98
AS0053	103.8	2.076	1.093	1.90
AS0054	87	1.739	0.966	1.80
AS0055	65.8	1.316	0.714	1.84
AS0056	50.1	1.002	0.551	1.82
AS0057	33.6	0.673	0.354	1.90
AS0058	58.6	1.172	0.643	1.82
AS0059	39.9	0.797	0.439	1.81
AS0060	67.5	1.35	0.731	1.85
AS0061	37.1	0.741	0.387	1.92
AS0062	46.1	0.922	0.498	1.85
AS0063	32.7	0.624	0.351	1.86
AS0064	70.1	1.403	0.774	1.81
AS0065	56.6	1.131	0.612	1.85
AS0066	80.5	1.611	0.87	1.85
AS0067	72.8	1.456	0.799	1.82
AS0068	43.6	0.871	0.473	1.84

Çizelge 3. 1 Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini (devamı)

Hasta No	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
AS0069	43.4	0.869	0.48	1.81
AS0070	44.8	0.896	0.493	1.82
AS0071	54.6	1.092	0.597	1.83
AS0072	50	1	0.537	1.86
AS0073	58.1	1.162	0.633	1.84
AS0074	153.2	3.064	1.623	1.89
AS0075	42.1	0.841	0.462	1.82
AS0076	37.7	0.755	0.404	1.87
AS0077	128.8	2.575	1.379	1.87
AS0078	55.7	1.114	0.611	1.82
AS0079	74.5	1.49	0.809	1.84
AS0080	32.3	0.645	0.314	1.89
AS0081	36.6	0.733	0.383	1.91
AS0082	46.8	0.936	0.5	1.87
AS0083	54	1.079	0.575	1.88
AS0084	221.8	4.437	2.343	1.89
AS0085	55	1.1	0.607	1.81
AS0086	81.5	1.63	0.864	1.89
AS0087	53.7	1.075	0.574	1.87
AS0088	50.2	1.005	0.554	1.81
AS0089	41.6	0.832	0.437	1.90
AS0090	20.7	0.254	0.14	1.81
AS0091	23.1	0.461	0.253	1.82
AS0092	21.3	0.427	0.237	1.80
AS0093	21.6	0.431	0.233	1.85
AS0094	32	0.641	0.349	1.84
AS0095	27.1	0.542	0.292	1.86
AS0096	25.4	0.509	0.281	1.81
AS0097	20.9	0.368	0.202	1.82
AS0098	47.4	0.948	0.521	1.82

Çizelge 3. 1 Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini (devamı)

Hasta No	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
AS0099	22.6	0.374	0.207	1.81
AS0100	28	0.561	0.31	1.81
AS0101	25.5	0.51	0.28	1.82
AS0102	52.3	1.047	0.578	1.81
AS0103	20.1	0.281	0.143	1.97
AS0104	54.5	1.09	0.79	1.88
AS0105	20.8	0.415	0.228	1.82
AS0106	116.3	2.326	1.235	1.88
AS0107	40.4	0.809	0.431	1.88
AS0108	20.8	0.367	0.2	1.84
AS0109	27.9	0.559	0.31	1.80
AS0110	41.4	0.827	0.436	1.90
AS0111	39.3	0.786	0.406	1.94
AS0112	28.5	0.571	0.299	1.91
AS0113	28.5	0.57	0.305	1.87
AS0114	34.3	0.685	0.376	1.82
AS0115	24.6	0.493	0.258	1.91
AS0116	16.8	0.336	0.18	1.87
AS0117	21	0.38	0.2	1.90
AS0118	85.7	1.714	0.95	1.80
AS0119	28.2	0.564	0.306	1.84
AS0120	43.4	0.868	0.483	1.80
AS0121	52.5	1.051	0.578	1.82
AS0122	58.1	1.162	0.63	1.85
AS0123	29.7	0.594	0.309	1.92
AS0124	32	0.641	0.34	1.89
AS0125	32.2	0.644	0.332	1.94
AS0126	38.1	0.763	0.42	1.82
AS0127	28	0.559	0.306	1.83
AS0128	61.7	1.234	0.69	1.79

Çizelge 3. 1 Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini (devamı)

Hasta No	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
AS0129	39.9	0.797	0.441	1.81
AS0130	29.2	0.584	0.31	1.89
AS0131	107.2	2.145	1.185	1.81
AS0132	21.1	0.353	0.181	1.95
AS0133	27.6	0.551	0.296	1.86
AS0134	34.5	0.69	0.368	1.88
AS0135	41.3	0.825	0.452	1.83
AS0136	28.7	0.573	0.311	1.84
AS0137	31.2	0.624	0.345	1.81
AS0138	37.1	0.742	0.408	1.82
AS0139	42.7	0.854	0.466	1.83
AS0140	25.8	0.515	0.281	1.83
AS0141	31.7	0.635	0.351	1.81
AS0142	32.2	0.645	0.358	1.80
AS0143	46.2	0.925	0.503	1.84
AS0144	40.7	0.813	0.441	1.84
AS0145	59.8	1.196	0.664	1.80
AS0146	21.3	0.275	0.152	1.81
AS0147	60.8	1.217	0.678	1.80
AS0148	33.7	0.674	0.369	1.83
AS0149	129.1	2.582	1.436	1.80
AS0150	44.3	0.885	0.46	1.92
AS0151	59.1	1.208	0.665	1.93
AS0152	41.6	0.832	0.45	1.85
AS0153	84.7	1.695	0.932	1.82
AS0154	64.9	1.297	0.715	1.81
AS0155	24.4	0.487	0.271	1.79
AS0156	72	1.44	0.79	1.82
AS0157	27.3	0.546	0.277	1.97
AS0158	73.5	1.47	0.813	1.81

Çizelge 3. 1 Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini (devamı)

Hasta No	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
AS0159	33.3	0.667	0.361	1.84
AS0160	20.2	0.384	0.201	1.91
AS0161	27.7	0.55	0.305	1.80
AS0162	22.3	0.446	0.234	1.90
AS0163	22.1	0.443	0.246	1.80
AS0164	37.1	0.742	0.412	1.80
AS0165	21.4	0.316	0.163	1.93
AS0166	22.8	0.55	0.303	1.82
AS0167	20.8	0.252	0.132	1.91
AS0168	23.2	0.465	0.242	1.92
AS0169	35.4	0.709	0.38	1.86
AS0170	65.8	1.316	0.704	1.87
AS0171	58.3	1.165	0.646	1.80
AS0172	33.9	0.677	0.357	1.90
AS0173	108	2.16	1.18	1.83
AS0174	29.7	0.595	0.317	1.87
AS0175	33.7	0.674	0.373	1.81
AS0176	21.1	0.421	0.223	1.89
AS0177	38.2	0.765	0.413	1.85
AS0178	25.3	0.505	0.263	1.92
AS0179	39.9	0.799	0.424	1.89
AS0180	35.7	0.714	0.395	1.81
AS0181	20.2	0.404	0.215	1.88
AS0182	49.9	0.998	0.55	1.82
AS0183	20.2	0.305	0.163	1.87
AS0184	25.7	0.514	0.28	1.84
AS0185	39.3	0.786	0.43	1.83
AS0186	21.5	0.314	0.167	1.88
AS0187	29.2	0.585	0.322	1.82
AS0188	142.7	2.854	1.484	1.92

Çizelge 3. 1 Hasta ve kontrol grubu örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık tayini (devamı)

Hasta No	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
AS0189	22.1	0.442	0.241	1.84
AS0190	28.6	0.571	0.304	1.88
AS0191	25.6	0.512	0.284	1.80
AS0192	61.7	1.234	0.678	1.82
AS0193	44.7	0.893	0.468	1.91
AS0194	47.3	0.947	0.521	1.82
AS0195	65.6	1.313	0.722	1.82
AS0196	56.3	1.126	0.624	1.81
AS0197	29.7	0.594	0.319	1.86
AS0198	45.4	0.907	0.494	1.84
AS0199	40.2	0.804	0.436	1.84
AS0200	52	1.039	0.577	1.80
AS0201	40.2	0.805	0.445	1.81

3.3 SNP, Primer ve Probların Genom Dizisi Üzerindeki Konumları

Bu çalışmada; araştırma makaleleri, genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), NCBI SNP veri tabanı ve SNPedia veri tabanı kullanılarak farklı populasyonlarda AS ile ilişkili olduğu tespit edilen SNP'ler tespit edilmiş ve genotiplenmek üzere seçilmiştir. Yapılan taramalar sonucu çalışmada incelenmek üzere seçilen SNP'ler, genomdaki konumları ve allel bilgileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Tespit edilen 21 SNP'nin genom üzerindeki konumları NCBI portalı SNP veritabanı kullanılarak doğrulanmıştır. Sequenom Assay Designer™ kullanılarak tasarlanan PCR forward, reverse primerler ile tek baz spesifik uzama problemlerinin genom dizisi üzerindeki konumları manuel olarak belirlenerek yapılan çalışmaların doğrulaması yapılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan rs27037 polimorfizmine ait primer ve uzama probu dizileri genom dizisi üzerinde SNP'nin bulunduğu konum merkezde olmak üzere yaklaşık 160 bç'lik bölgeler örnek olarak seçilerek gösterilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3. 2 SNP'lerin genomdaki konumu ve allel bilgileri

SNP	Kromozom Lokasyonu	Fiziki Lokasyonu	Gen Sembolü	Alleller	Çalışılan Toplamlar	Kaynaklar
rs10865331	2p15	62324337	intergenic	A/G	Avrupa/Kore/İspanyol /Çin/Tayvan	[7], [122], [125],[123], [166]
rs2242944	21q22	39093252	intergenic	A/G	Avrupa	[7]
rs11209026	1p31	67240275	<i>IL23R</i>	C/T	Avrupa	[7],[143]
rs4333130	4q21	80028675	<i>ANTXR2</i>	C/T	Avrupa	[7], [167]
rs2310173	2q11	102047167	<i>IL1R2</i>	G/T	Avrupa	[7]
rs27037	5q15	96758990	<i>ERAP1</i>	G/T	Çin/Kafkas/Avrupa/Kore/Tayvan	[122], [123], [168], [169]
rs27434	5q15	96793809	<i>ERAP1</i>	A/G	Çin/Kore	[7], [122], [170]
rs27044	5q15	96783148	<i>ERAP1</i>	C/G	Avrupa/Çin/Kanada/Kafkas/Kore/Tayvan	[35], [169], [170], [171], [172], [173]
rs17482078	5q15	96783162	<i>ERAP1</i>	C/T	Avrupa	[35], [168], [171]
rs10050860	5q15	96786506	<i>ERAP1</i>	C/T	Avrupa/Kanada	[168], [170], [171], [173]
rs30187	5q15	96788627	<i>ERAP1</i>	C/T	Avrupa/İspanyol/Kanada/Asya	[7], [35], [143], [168], [173]
rs2287987	5q15	96793832	<i>ERAP1</i>	C/T	Avrupa/Kafkas/İngiliz	[35], [168], [170], [171]
rs1004819	1p31	67204530	<i>IL23R</i>	C/T	Macar/Portekiz	[120], [124], [143], [174], [175]
rs10489629	1p31	67222666	<i>IL23R</i>	A/G	Avrupa/Macar	[124], [174], [176]
rs11465804	1p31	67236843	<i>IL23R</i>	G/T	Kanada/Avrupa	[174], [176]
rs1343151	1p31	67253446	<i>IL23R</i>	C/T	Avrupa	[174], [175]
rs10889677	1p31	67259437	<i>IL23R</i>	A/C	Macar/Avrupa	[120], [124], [127]
rs7743761	6p21	31368323	intergenic	A/C	Avrupa	[7]
rs868213	16q22	67186554	<i>EXOC3L1</i>	C/T	Avrupa/İngiliz	[121]
rs2303138	5q15	97015006	<i>LNPEP</i>	A/G	Avrupa	[143]
rs7302230	12p13	7135836	<i>CLSTN3</i>	A/G	Avrupa	[143]

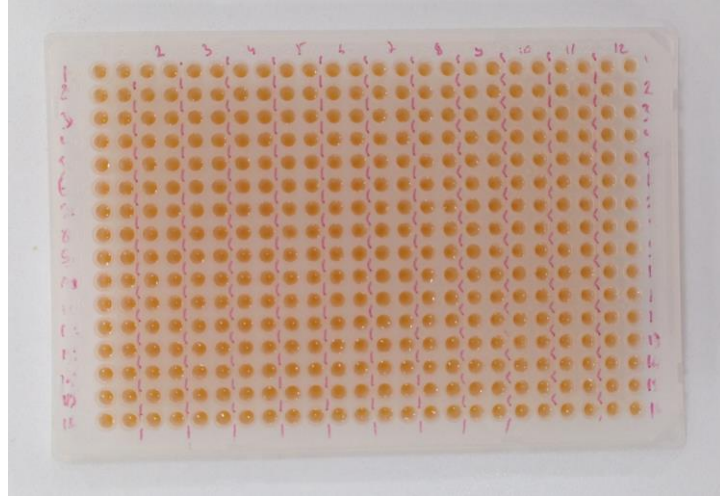
Bölüm 2.2.3.2’de belirtildiği üzere multipleks PCR primerleri tasarlanırken her bir amplifikasyon primerinin 5' ucuna 10-mer etiketi (5'-ACGTTGGATG-3') eklenmiştir. Bu durumu biraz daha açıklamak gerekirse; forward PCR primeri tasarlanırken Çizelge 3.3’de kırmızı ile gösterilen dizinin 5' ucuna 10-mer etiketi eklenerek primerin dizisi 5'ACGTTGGATG**GGGAACAAGATCTCAATTC**3' olarak elde edilmiştir. Reverse primer tasarlanırken ise Çizelge 3.3’de mavi ile gösterilen dizinin reverse ve komplementeri alınarak 5' ucuna 10-mer etiketi eklenmiş ve reverse primerin dizisi 5'ACGTTGGATG**GGGGCATATAAATCCATTG** 3' olarak elde edilmiştir. Uzama probu tasarlanırken ise Çizelge 3.3'de yeşil renk ile gösterildiği gibi probun 3' ucu polimorfik bölgenin hemen yanında seçilmiştir.

Çizelge 3. 3 rs27037 no’lu SNP’nin bulunduğu DNA dizisi
(Forward PCR primeri kırmızı ile gösterilen diziye, reverse primeri mavi ile gösterilen diziye ve uzama probu ise yeşil ile gösterilen diziye uygun olarak tasarlanmıştır)

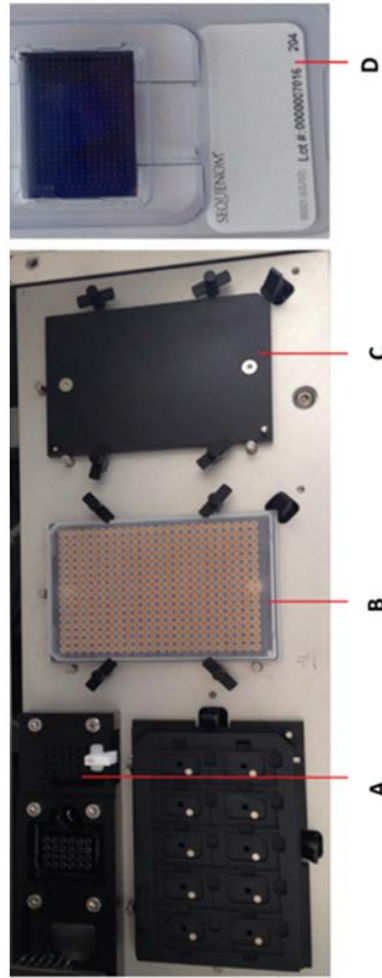
SNP’nin bulunduğu Genom Bölgesi DNA dizisi	Uzunluk (bç)
5’TTAGAAACCATAAGACATGGGGAAGAATACAATGTGAGGAGTACGCCAGGAATGTG GAGTCATAGCATTACACTGAGGCAGAACAGATGAACAAATAGTG GGGAACAAGATCTC AATTC CCTTCCTCCTCTAT TCATTATTATTACAATTGTTAGGG [G/T]TGTTTTTCTT TTAGAAATTCAAAGATTTGGAAAAAGTAA CAATGGATTATATGCCCC CTTCAAAGATA TGTAGCAGTGAAATGGTGAGATGAAACAACCTTTAAAAAAAATCTTACTCTTAGAAAAT TAGCAAAGGAAACATTAGTGCCAACAATATA-3’	160 bç [G/T] 160 bç

3.4 Genotipleme Sonuçları

Multiplex PCR reaksiyonları sonucu elde edilen ürünleri içeren plate görüntüsü Şekil 3.8’de verilmektedir. Elde edilen ürünler Nanodispenser cihazı kullanılarak 384-element SpectroCHIP® II üzerine (Şekil3.9) dağıtılmış ve genotipleme analizi MALDI-TOF MS cihazının yazılımı MassARRAY TYPERS™ 4.0 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen veriler yazılımın veritabanına otomatik olarak kaydedilmiştir.



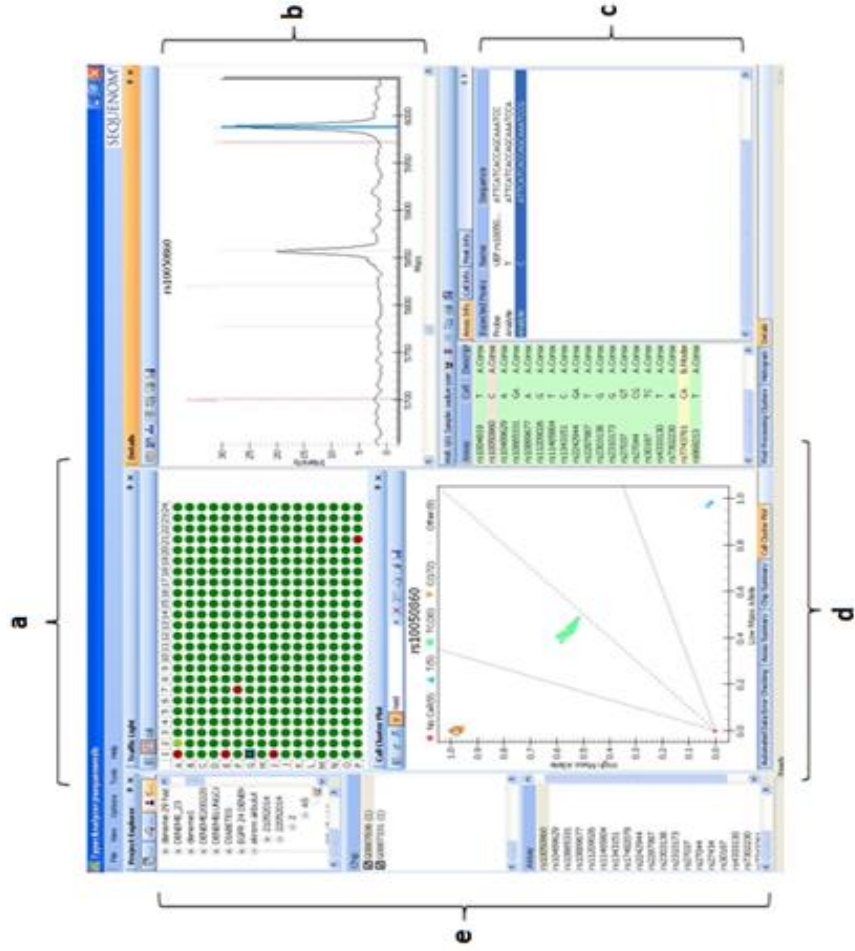
Şekil 3. 8 Multiplex PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin transfer öncesi 384 kuyulu plate görüntüsü



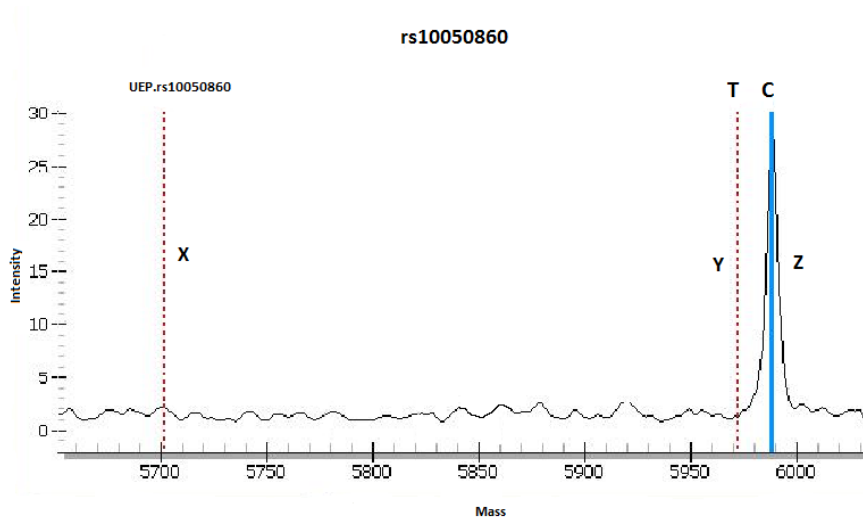
Şekil 3. 9 Nanodispenser cihazı iç görünüm (A: Aktarım yapılacak chip'in konumlanacağı alan, B:Çipe aktarılabacak örnekleri kuyucuklarında bulunduran plate, C: İkincil bir plate alanı, D:Aktarım yapılacak chip)

Şekil 3.10'da MassArray Typer™ 4.0 Analyzer yazılım arayüzüne ait bir görsel sunulmaktadır. Görselde 384 örneğin çalışıldığı bir deney setinde rs10050860'a ait genotipleme sonuçları örnek olarak gösterilmiştir. Şekil 3.10'da gösterilen alan (Traffic Lights) çip üzerine aktarılan örneğin analizi sonucu elde edilen başarıyı göstermektedir. Her bir nokta çip üzerinde bir örneği temsil eder ve renkler analiz başarısını tanımlar. Koyu yeşil renk iyi kalitede veri elde edildiğini, açık yeşil renk orta kalitede veri elde edildiğini ve kırmızı renk ise aktarım yapılan örnekte herhangi bir veri elde edilemediğini ya da elde edilen verilerin kararsız olduğunu tanımlar. Şekil 3.10 b'de gösterilen spectrum analiz edilen örneğe ait sinyaller ile genotip ve kütle dağılımını gösteren spektrumları göstermektedir. Şekil 3.10 c'de gösterilen alanda her bir kuyuda bulunan SNP'ler için genotipleme verileri (beklenen pikler, genotipler, uzama reaksiyonu ürünlerinin dizileri) verilmektedir. Şekil 3.10 d'de gösterilen alanda (Cluster Plot) analiz içilen seçilen deneydeki düşük kütleli allel ile yüksek kütleli allel arasındaki alanı göstermektedir. Şekil 3.10 e'de gösterilen (Project Explorer) alanda ise yapılan tüm analizlere ait veritabanındaki verilere ve assay'lere erişim için gereken menüler yer almaktadır.

Şekil 3.11'de analizi yapılan rs10050860'a ait bir spektrum örneği gösterilmiştir. Bu SNP için tasarlanan uzama primerinin 5700,7 Da olduğu; yapılan assay tasarımında elde edilen bilgilere göre tek baz uzama reaksiyonu sonucunda diziye T veya C alleli dahil olursa sırasıyla 5972,0 veya 5988,0 Daltonluk dizilerin elde edileceği bilinmektedir. Şekil 3.11'de X, Y ve Z ile gösterilen dikey çizgiler rs10050860 için incelenmesi gereken önemli verileri işaret etmektedir. X ile gösterilen pik 5700,7 Da'luk bağlanmamış uzama primerini (UEP: Unexpended Primers) göstermektedir. Z ile gösterilen pik 5988,0 Da olan C allelinin varlığını göstermektedir. Fakat 5972,0 Da için pik oluşumu gözlenmediğinden T allelinin var olmadığı anlaşılmaktadır (Y). Spektrumda görülen düşük yoğunluktaki pikler multipleks reaksiyondaki diğer SNP'lere ait bağlanmamış uzama primerlerini ve allelleri göstermektedir.



Şekil 3. 10 rs10050860 için MassArray Typer 4.0 genotipleme sonucu a) Analiz sonuçlarının trafik ışıkları modeli ile gösterimi b) Spektrum c)Genotipleme sonucu d) Kümelenme alanı e) Proje arşiv menüsü.



Şekil 3. 11 rs10050860'a ait spektrum görüntüsü

3.5 İstatistik Analizler

3.5.1 Hardy-Weinberg Dengesi Testi Sonuçları

Çalışma kapsamında 21 SNP için gözlenen birey sayıları, allel ve genotip frekansları belirlenerek Hardy-Weinberg dengesi test edilmiştir. Hardy-Weinberg Dengesi χ^2 testi ile değerlendirilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 4 Hardy-Weinberg Dengesi testi sonuçları

SNP'ler	Genotipler	Gözlenen	Beklenen	Ki-kare	P değeri
rs1004819	CC	50	50.8	0.045	0.832
	TC	102	100.5		
	TT	49	49.8		
rs10050860	CC	170	167.5	4.829	0.028
	TC	27	32.0		
	TT	4	1.5		
rs10489629	AA	86	84.1	0.352	0.553
	GA	88	91.8		
	GG	27	25.1		
rs10865331	AA	46	40.3	2.645	0.104
	GA	88	99.4		
	GG	67	61.3		
rs10889677	AA	50	46.8	0.812	0.368
	CA	94	100.4		
	CC	57	53.8		
rs11209026	GG	178	178.7	0.740	0.39
	AG	23	21.7		
	AA	0	0.7		
rs11465804	GG	1	1.3	0.069	0.792
	GT	30	29.5		
	TT	170	170.3		
rs1343151	CC	104	103.2	0.084	0.772
	CT	80	81.7		
	TT	17	16.2		
rs1742078	CC	169	146.9	85.504	<0.001
	CT	28	72.2		
	TT	31	8.9		
rs2242944	AA	34	32.6	0.159	0.691
	GA	94	96.7		
	GG	73	71.6		
rs2287987	CC	4	1.6	4.268	0.039
	CT	28	32.8		
	TT	169	166.6		
rs2303138	GG	172	171.2	0.64	0.425
	GA	27	28.6		
	AA	2	1.2		

Çizelge 3. 4 Hardy-Weinberg Dengesi testi sonuçları (devamı)

SNP'ler	Genotipler	Gözlenen	Beklenen	Ki-kare	P değeri
rs2310173	GG	68	59.7	5.64	0.018
	GT	83	99.7		
	TT	50	41.7		
rs27037	GG	100	104.6	2.61	0.106
	GT	90	80.8		
	TT	11	15.6		
rs27044	CC	98	101.7	1.65	0.199
	CG	90	82.5		
	GG	13	16.7		
rs27434	GG	98	98.2	0.005	0.944
	AG	85	84.6		
	AA	18	18.2		
rs30187	CC	65	65.2	0.004	0.948
	TC	99	98.5		
	TT	37	37.2		
rs433130	TT	87	82.8	1.668	0.197
	TC	84	92.4		
	CC	30	25.8		
rs7302230	AA	180	180.5	0.611	0.435
	GA	21	19.9		
rs7743761	CC	56	80.6	56.532	<0.001
	CA	142	92.7		
	AA	2	26.6		
rs868213	TT	178	178.7	0.740	0.39
	CT	23	21.7		

Genetik ilişkilendirme çalışmalarında, fenotipler ile SNP'ler ilişkilendirilmeden önce genellikle her bir SNP Hardy-Weinberg Dengesi açısından test edilmelidir [177]. Hardy-Weinberg Kuralına göre dengede olan bir popülasyonun sınırsız sayıda bireyden oluştuğu kabul edilmektedir. İlişkilendirme çalışmaları kapsamında sınırlı sayıda birey ile çalışılması örnekleme hatalarının da dikkate alınmasını gerekli kılmaktadır [178].

3.5.2 Ankilozan Spondilit ile SNP'lerin ilişkilendirilmesi

Genetik ilişkilendirme çalışmalarında çalışma sonucunda elde edilen veriler ile SNP'ler arasındaki ilişkinin test edilmesinde genel olarak genotipik ve allelik olmak üzere 2 farklı yaklaşım bulunmaktadır. İlişkilendirme çalışmaları için uygun testin tespit edilmesinde

ilk aşama bir genetik modelin belirlenmesi ile başlamaktadır. Bu çerçevede heterozigot ya da homozigot allellerden biri model olarak kabul edilmektedir [177].

3.5.2.1 Ankilozan Spondilit ile SNP Genotiplerinin İlişkilendirilmesi

AS ile SNP genotiplerinin ilişkilendirilmesi amacı ile gerçekleştirilen çalışma kapsamında 21 SNP'nin genotiplemesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5). Genotipleme sonuçları için OR testi kontrol grubunda yaygın olan homozigot genotip referans alınarak gerçekleştirilmiştir [179].

Her bir SNP için OR değerleri ve %95 güven aralıkları dominant model ve homozigot karşılaştırma modeli dikkate alınarak hesaplanmıştır. Hastalık ile ilişkili genotiplerin $OR > 1$ ve $p \leq 0.05$ koşulunu sağlamaları beklenmektedir .

rs11209026 için veriler analiz edildiğinde hasta ve kontrol grubunda GG genotipinin bulunmasına karşın AA genotipine sahip bireylerin bulunmadığı görülmüştür (Çizelge 3.5). WTCCC (Wellcome Trust Case Control Consortium) ve TASC (The Australo-Anglo American Spondylitis Consortium) tarafından 2007 yılında yürütülen genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında rs1129026 AS riski ile ilişkilendirilmiştir ($p = 9.1 \times 10^{-14}$) [7], [143].

Calystenin-3 (*CLSTN3*) gen bölgesinde yer alan rs7302230 için veriler analiz edildiğinde hasta ve kontrol grubunda AA genotipinin bulunmasına karşın GG genotipine sahip bireylerin bulunmadığı görülmüştür (Çizelge 3.5). WTCCC ve TASC tarafından yürütülen genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında rs7302230 AS riski ile ilişkilendirilmiştir ($p = 1.1 \times 10^{-4}$) [143].

EXOC3L1 gen bölgesinde yer alan rs868213 için veriler analiz edildiğinde hasta ve kontrol grubunda TT genotipinin bulunmasına karşın CC genotipine sahip bireylerin bulunmadığı görülmüştür (Çizelge 3.5). Pointon ve arkadaşları tarafından 1,604 hasta ve 1,020 kontrol ile gerçekleştirilen bir çalışmada rs868213'ün hastalık ile ilişkisi ($p = 0.00002$, $OR = 1.45$ (%95GA= 1.22-1.72) tanımlanmıştır [121].

Genotipleme verileri analiz edildiğinde rs7743761 polimorfizminde CC genotipi kontrol grubunda yaygın olarak görülmesi sebebi ile referans olarak kabul edilmiştir. Polimorfik bölgede gözlemlenen CA genotipi için p değeri < 0.0001 olarak hesaplanmış ve istatistiki

olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) kabul edilmiştir. rs7743761 için OR değeri 4.933 (%95GA= 2.437-9.986) olarak hesaplanmış ve AS riski ile ilişkilendirilmiştir. rs7743761 için CC genotipi referans olarak alınarak dominant modele göre (CA+AA) analiz edildiğinde p değeri 0.0001 ve OR değeri 4.905 (%95GA= 2.43-9.92) olarak hesaplanmış, istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiş ve AS riski ile ilişkilendirilmiştir.

Reveille ve arkadaşları tarafından 2010 yılında Avrupa kökenli 2,053 hasta ve 5,140 kontrol ile yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmasında 6p21 kromozom bölgesinde yer alan rs7743761 AS riski ile ilişkilendirilmiştir ($p=5.0 \times 10^{-304}$) [7].

Çizelge 3. 5 Ankilozan spondilit ile SNP genotiplerinin ilişkilendirilmesi

SNP	Birey sayısı	Genotip	Hasta	Kontrol	OR (%95 GA)	P değeri
rs1004819	Hasta: 100 Kontrol: 101	CC	26 (0.260)	24 (0.237)	Referans	
		TC	48 (0.480)	54 (0.535)	0.8205 (0.417-1.616)	0.5671
		TT	26 (0.260)	23 (0.228)	1.0435 (0.474-2.297)	0.916
		TC+TT	74 (0.740)	77 (0.763)	1.0769 (0.528-2.193)	0.838
rs10050860	Hasta: 100 Kontrol: 101	CC	84 (0.840)	86 (0.851)	Referans	
		TC	14 (0.140)	13 (0.129)	1.1026 (0.489-2.485)	0.814
		TT	2 (0.020)	2 (0.020)	1.0238 (0.141-7.437)	0.9814
		TC+TT	16 (0.160)	15 (0.149)	1.0921 (0.507-2.349)	0.8217
rs10489629	Hasta: 100 Kontrol: 101	AA	47 (0.47)	39 (0.386)	Referans	
		GA	39 (0.39)	49 (0.485)	0.6604 (0.363-1.200)	0.1736
		GG	14 (0.14)	13 (0.129)	0.8936 (0.376-2.125)	0.7991
		GA+GG	53 (0.53)	62 (0.614)	0.5755 (0.324-1.024)	0.0600
rs10865331	Hasta: 100 Kontrol: 101	GG	39(0.390)	28(0.277)	Referans	
		AA	20 (0.200)	26 (0.257)	0.552 (0.259 -1.179)	0.1250
		GA	41 (0.410)	47 (0.466)	0.6263 (0.329-1.189)	0.1526
		GA+AA	61 (0.610)	73 (0.723)	0.5999 (0.332-1.085)	0.0911
rs10889677	Hasta: 100 Kontrol: 101	CC	27(0.270)	30(0.297)	Referans	
		AA	29 (0.290)	21 (0.208)	1.5344 (0.714-3.298)	0.2729
		CA	44 (0.440)	50 (0.495)	0.9778 (0.506-1.890)	0.9467
		CA+AA	73(0.730)	71(0.703)	1.1424 (0.618-2.111)	0.6709
rs11209026	Hasta: 100 Kontrol: 101	GG	86 (0.860)	92 (0.911)	Referans	
		AG	14 (0.140)	9 (0.089)	1.6641 (0.685-4.042)	0.2607
		AA	0 (0.000)	0 (0.000)	1.0694 (0.021-54.49)	0.9733
		AG+AA	14(0.140)	9(0.089)	1.0694 (0.021-54.49)	0.9733
rs11465804	Hasta: 100 Kontrol: 101	TT	82(0.820)	88(0.871)	Referans	
		GG	1 (0.010)	0 (0.000)	3.218 (0.129- 80.12)	0.4761
		GT	17 (0.170)	13 (0.129)	1.403 (0.642-3.069)	0.3959
		GG+GT	18(0.180)	13(0.129)	1.486 (0.6851-3.222)	0.3161

Çizelge 3. 5 Ankilozan spondilit ile SNP genotiplerinin ilişkilendirilmesi (devamı)

SNP	Birey sayısı	Genotip	Hasta	Kontrol	OR (%95 GA)	P değeri
rs1343151	Hasta: 100 Kontrol: 101	CC	54 (0.540)	50 (0.495)	Referans	
		CT	37 (0.370)	43 (0.426)	0.7967 (0.444-1.428)	0.4457
		TT	9 (0.090)	8 (0.079)	1.0417 (0.373-2.909)	0.9379
		TT+CT	46(0.460)	51(0.505)	1.2821 (0.570-2.883)	0.5479
rs17482078	Hasta: 100 Kontrol: 101	CC	84 (0.840)	85 (0.842)	Referans	
		CT	14 (0.140)	14 (0.138)	1.012 (0.455-2.252)	0.9769
		TT	2 (0.020)	2 (0.020)	1.012 (0.1393-7.351)	0.9907
		TT+CT	16(0.160)	16(0.158)	1.401 (0.645-3.0397)	0.3934
rs2242944	Hasta: 100 Kontrol: 101	GG	35(0.350)	38(0.377)	Referans	
		AA	18 (0.180)	16 (0.158)	1.2214 (0.541-2.759)	0.6305
		GA	47 (0.470)	47 (0.465)	1.0857 (0.588-2.002)	0.7922
		AA+GA	65(0.650)	63(0.623)	1.1202 (0.630-1.991)	0.6990
rs2287987	Hasta: 100 Kontrol: 101	TT	84(0.840)	85(0.842)	Referans	
		CC	2 (0.020)	2 (0.020)	1.0119 (0.139-7.351)	0.9907
		CT	14 (0.140)	14 (0.138)	1.0119 (0.455-2.252)	0.9769
		CC+CT	16(0.160)	16(0.158)	1.0119 (0.475-2.154)	0.9755
rs2303138	Hasta: 100 Kontrol: 101	GG	88 (0.880)	84 (0.832)	Referans	
		GA	12 (0.120)	15 (0.149)	0.7636 (0.337-1.727)	0.5171
		AA	0 (0.000)	2 (0.020)	0.1910 (0.009-4.036)	0.2875
		GA+AA	12 (0.120)	17 (0.169)	0.6738 (0.304-1.495)	0.3317
rs2310173	Hasta: 100 Kontrol: 101	GG	33 (0.330)	35 (0.347)	Referans	
		GT	45 (0.450)	38 (0.376)	1.2560 (0.661-2.387)	0.4868
		TT	22 (0.220)	28 (0.277)	0.8333 (0.400-1.735)	0.6261
		GT+TT	67 (0.670)	66 (0.653)	1.2689 (0.701-2.297)	0.4314
rs27037	Hasta: 100 Kontrol: 101	GG	47 (0.470)	53 (0.525)	Referans	
		GT	49 (0.490)	41 (0.406)	1.3477 (0.761-2.386)	0.3059
		TT	4 (0.040)	7 (0.069)	0.6444 (0.177-2.340)	0.5042
		GT+TT	53 (0.530)	48 (0.475)	1.2451 (0.716-2.166)	0.4378
rs27044	Hasta: 100 Kontrol: 101	CC	45 (0.450)	53 (0.525)	Referans	
		CG	48 (0.480)	42 (0.416)	1.3460 (0.758-2.389)	0.3102
		GG	7 (0.070)	6 (0.059)	1.3741 (0.431-4.386)	0.537
		CG+GG	55 (0.550)	48 (0.475)	1.3495 (0.775-2.350)	0.2895
rs27434	Hasta: 100 Kontrol: 101	GG	43 (0.430)	55 (0.545)	Referans	
		AG	48 (0.480)	37 (0.366)	1.6593 (0.924-2.981)	0,0901
		AA	9 (0.090)	9 (0.089)	1.2791 (0.468-3.499)	0.6317
		AG+AA	57 (0.570)	46 (0.455)	1.5849 (0.908-2.766)	0.1050
rs30187	Hasta: 100 Kontrol: 101	CC	29 (0.290)	36 (0.356)	Referans	
		TC	51 (0.510)	48 (0.476)	1.3190 (0.704-2.472)	0.3877
		TT	20 (0.200)	17 (0.168)	1.4604 (0.649-3.285)	0.3598
		TC+TT	71 (0.710)	65 (0.644)	1.356 (0.7489-2.455)	0.3147

Çizelge 3. 5 Ankilozan spondilit ile SNP genotiplerinin ilişkilendirilmesi (devamı)

SNP	Birey sayısı	Genotip	Hasta	Kontrol	OR (%95 GA)	P değeri
rs4333130	Hasta: 100	TT	44 (0.440)	43 (0.426)	Referans	
		TC	42 (0.420)	42 (0.416)	0.977 (0.5365-1.780)	0.9401
	Kontrol: 101	CC	14 (0.140)	16 (0.158)	0.855 (0.3724-1.964)	0.7121
		TC+CC	56 (0.560)	58 (0.574)	0.944 (0.540 -1.649)	0.8384
rs7302230	Hasta: 100	AA	92 (0.920)	88 (0.871)	Referans	
		GA	8 (0.080)	13 (0.129)	0.5886 (0.233-1.489)	0.2630
	Kontrol: 101	GG	0 (0.000)	0 (0.000)	0.96 (0.02-48.75)	0.982
		GA+GG	8 (0.080)	13 (0.129)	0.5886 (0.233-1.489)	0.2630
rs7743761	Hasta: 99	CC	13 (0.131)	43 (0.426)	Referans	
		CA	85 (0.859)	57 (0.564)	4.9325 (2.437-9.986)	<0.0001
	Kontrol: 101	AA	1 (0.010)	1 (0.009)	3.3077 (0.193-56.64)	0.4091
		CA+AA	86 (0.869)	58 (0.574)	4.9045 (2.426-9.917)	<0.0001
rs868213	Hasta: 100	TT	87 (0.870)	91 (0.901)	Referans	
		CT	13 (0.130)	10 (0.099)	1.3598 (0.567-3.263)	0.4913
	Kontrol: 101	CC	0 (0.000)	0 (0.000)	1.05 (0.02-53.28)	0.982
		CT+CC	13 (0.130)	10 (0.099)	1.3598 (0.567-3.263)	0.4913

3.5.2.2 Ankilozan Spondilit ile SNP Allelerinin İlişkilendirilmesi

SNP allellerinin AS ile ilişkilendirilmesinde öncelikli olarak her bir SNP için bulunan allellerin sayıları tespit edilmiştir. Sayıları tespit edilen birinci ve ikinci SNP'nin allel frekansları hesaplanmıştır. Belirlenen allel frekansları kullanılarak SNP allellerinin olasılıklar oranı, %95 güven aralığı ve p değeri hesaplanmıştır. İlişkilendirmede minör allelin majör allele göre kıyaslanması model olarak kullanılmıştır.

rs7743761 için hasta ve kontrol grubundaki allel dağılımı incelendiğinde C allelinin frekansının A allelinin frekansından yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.90 (%95GA= 1.26-2.87) ve p değeri 0.002 olarak hesaplanmıştır ($p \leq 0.05$) (Çizelge 3.6). Sonuç olarak çalışma grubumuzda rs7743761 A allelinin AS riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3. 6 Ankilozan spondilit ile SNP allellerinin ilişkilendirilmesi

SNP		1.Allelin Frekansı		2.Allelin Frekansı		Minör allelin Majör allele göre		
SNP	1. Allel	2. Allel	Hasta	Kontrol	Hasta	Kontrol	OR (%95 GA)	P Değeri
rs1004819	C	T	0.500	0.505	0.500	0.495	1.02 (0.69-1.51)	0.921
rs10050860	C	T	0.910	0.916	0.090	0.084	1.08 (0.54-2.15)	0.836
rs10489629	A	G	0.665	0.629	0.335	0.371	0.85 (0.57-1.28)	0.447
rs10865331	G	A	0.595	0.510	0.405	0.490	0.71 (0.48-1.05)	0.087
rs10889677	C	A	0.490	0.545	0.510	0.455	1.24 (0.84-1.84)	0.274
rs11209026	G	A	0.930	0.955	0.070	0.045	1.61 (0.68-3.82)	0.276
rs11465804	T	G	0.905	0.936	0.095	0.064	1.53 (0.73-3.18)	0.259
rs1343151	C	T	0.725	0.708	0.275	0.292	0.92 (0.60-1.42)	0.704
rs17482078	C	T	0.910	0.911	0.090	0.089	1.01 (0.51-2.00)	0.975
rs2242944	G	A	0.585	0.609	0.415	0.391	1.10 (0.74-1.65)	0.625
rs2287987	T	C	0.910	0.911	0.090	0.089	1.01 (0.51-2.00)	0.975
rs2303138	G	A	0.940	0.906	0.060	0.094	0.61 (0.29-1.30)	0.204
rs2310173	G	T	0.555	0.535	0.445	0.465	0.92 (0.62-1.36)	0.682
rs27037	G	T	0.715	0.728	0.285	0.272	1.06 (0.69-1.65)	0.776
rs27044	C	G	0.690	0.733	0.310	0.267	1.23 (0.80-1.90)	0.345
rs27434	G	A	0.670	0.728	0.330	0.272	1.32 (0.86-2.02)	0.208
rs30187	C	T	0.545	0.594	0.455	0.406	1.22 (0.82-1.81)	0.321
rs4333130	T	C	0.650	0.634	0.350	0.366	0.93 (0.62-1.40)	0.733
rs7302230	A	G	0.960	0.936	0.040	0.064	0.61 (0.25-1.50)	0.277
rs7743761	C	A	0.561	0.708	0.439	0.292	1.90 (1.26-2.87)	0.002
rs868213	T	C	0.935	0.950	0.065	0.050	1.33 (0.57-3.12)	0.505

TASC (The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium) tarafından 2010 yılında Avrupa kökenli 2,053 hasta ve 5,140 kontrol ile yapılan genom çapında ilişkilendirme (GWAS) çalışmasında 6p21 kromozom bölgesinde bulunan rs7743761 AS riski ile ilişkilendirilmiştir ($p=5.0 \times 10^{-304}$) [7]. rs7743761 SNP bölgesi için Avrupa toplumu dışında farklı toplumlarda bir ilişkilendirme çalışması tespit edilememiştir.

rs1004819 için hasta ve kontrol gruplarının allel frekansları incelendiğinde C allelinin kontrol grubunun frekansının T allelinden yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.02 (%95GA=0.69-1.51) ve p değeri 0.921 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini öngörmesine karşın p değerinin istatistiki olarak anlamlı kabul edilen sınırlar ($p \leq 0.05$) dışında olması sebebi ile rs1004819 polimorfizmi AS ile ilişkilendirilememiştir.

2013 yılında Macar toplumunda 206 hasta ve 182 kontrol ile gerçekleştirilen çalışmada *IL23R* gen bölgesinde yer alan rs1004819 polimorfizminin hastalık riski oluşturduğu ($p=0.029$, OR=1.40, %95GA=1.03-1.89) bildirilmiştir [120]. Portekiz toplumunda 358 hasta ve 285 kontrol ile gerçekleştirilen ilişkilendirme çalışmasında rs1004819 polimorfizminin hastalık ile güçlü bir ilişkiye sahip olduğu bildirilmiştir ($p=0.0049$, OR=1.4) [180]. Birçok çalışmada rs1004819 polimorfizmi UK, Kanada ve Macar toplumlarında hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir [124], [143], [175], [176].

rs10050860 için hasta ve kontrol gruplarının allel dağılım frekansı incelendiğinde C allelinin frekansının T allelinin frekansından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.08 (%95GA=0.54-2.15) ve p değeri 0.836 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini öngörmesine karşın p değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilecek sınırlar ($p \leq 0.05$) dışında olduğu için rs10050860 polimorfizmi AS riski ile ilişkilendirilememiştir.

Chen ve arkadaşları tarafından 8,530 hasta ve 12,449 hasta verisi ile gerçekleştirilen bir meta analiz çalışmasında *ERAP1* gen polimorfizminin AS hastalık riski ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışma neticesinde rs10050860 polimorfizminin ($p=0.006$, OR=0.772) önemli düzeyde hastalık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [168]. Harvey ve arkadaşları tarafından UK toplumunda 1,604 hasta ve 1,021 kontrol ile gerçekleştirilen genetik

ilişkilendirme çalışmasında rs10050860 polimorfizminin AS riski ile güçlü ilişkisi bildirilmiştir ($p=1.2 \times 10^{-4}$) [170].

rs10889677 için hasta ve kontrol gruplarının allel dağılım frekansı incelendiğinde C allelinin kontrol grubunun frekansının A allelinin kontrol grubu frekansından yüksek olmasına karşın hasta grubunun frekansının A allelinden daha düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.24 (%95GA= 0.84-1.84) ve p değeri 0.274 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini öngörmesine karşın p değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilecek sınırlar ($p \leq 0.05$) dışında olduğu için rs10889677 polimorfizmi AS riski ile ilişkilendirilememiştir.

Szabo ve arkadaşları tarafından Macar toplumunda 206 hasta 182 kontrol ile yürütülen ve *IL23R* gen bölgesinde yer alan rs10889677 polimorfizminin AS ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, rs10889677 polimorfizminin hastalık riskini 2 kattan daha fazla arttırdığı bildirilmiştir ($p=0.047$, OR=2.10, %95GA=1.01-4.53) [120]. Wong ve arkadaşları tarafından 362 hasta ve 362 kontrol ile Tayvan toplumunda gerçekleştirilen bir çalışmada rs10889677 polimorfizminin hastalık riski ve hastalık şiddeti ile ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışma neticesinde *IL23R* gen polimorfizminin (rs10889677) hastalık riskini önemli düzeyde arttırdığı bildirilmiştir [127]. Karaderi ve arkadaşları tarafından İngiliz toplumunda 730 hasta ve 1,331 kontrol ile gerçekleştirilen bir meta analiz çalışmasında benzer sonuçlar elde edilmiş ve rs10889677 ($p=0.0051$, OR=1.21, %95GA= 1.06-1.39) polimorfizminin hastalık riski ile ilişkisi bildirilmiştir [181].

IL23R gen bölgesinde yer alan rs11209026 için hasta ve kontrol gruplarının allel dağılım frekansı incelendiğinde G allelinin frekansının A allelinin frekansından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.61 (%95GA=0.68-3.82) ve p değeri 0.276 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini öngörmesine karşın p değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilecek sınırlar ($p \leq 0.05$) dışında olduğu için rs11209026 polimorfizmi AS riski ile ilişkilendirilememiştir.

Avrupa toplumunda 2010 yılında yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmasında rs11209026 ($p=9.1 \times 10^{-14}$) polimorfizminin AS riski ile güçlü bir ilişkiye sahip olduğu bildirilmiştir [7]. Kore toplumunda 451 hasta ve 392 kontrol ile gerçekleştirilen bir diğer ilişkilendirme çalışmasında rs11209026 polimorfizmi AS ile ilişkilendirilememiştir [182].

rs11465804 için hasta ve kontrol gruplarının allel dağılım frekansı incelendiğinde T allelinin frekansının G allelinin frekansından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.53 (%95GA=0.73-3.18) ve p değeri 0,259 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini öngörmesine karşın p değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilecek sınırlar ($p \leq 0.05$) dışında olduğu için rs11465804 polimorfizmi AS riski ile ilişkilendirilememiştir.

IL23R gen bölgesinde yer alan rs11465804 polimorfizminin AS ile risk ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada Karaderi ve arkadaşları İngiliz toplumunda hem hasta-kontrol çalışması hem de meta analiz çalışması gerçekleştirmişlerdir. Her iki çalışmada da rs11465804 polimorfizminin hastalık riski ile güçlü bir şekilde ilişkilendirildiği bildirilmiştir ($p=0.011$ ve 0.0009) [181]. Kanada toplumunda 3 farklı popülasyondan (Alberta, Toronto ve Newfoundland) 796 hasta ve 742 kontrol ile yapılan ilişkilendirme çalışmasında rs11465804 polimorfizminin Toronto ($p=0.007$) ve Newfoundland ($p=0.0007$) popülasyonlarında hastalık ile güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir [176].

2012 yılında Lee ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer meta analiz çalışmasında da rs11465804 polimorfizminin Avrupa toplumunda ($p=0.001$, $OR=0.672$, %95GA=0.538-0.852) AS riskini arttırdığı, fakat Asya toplumunda benzer sonuçların görülmediği bildirilmiştir [174].

ERAP1 gen bölgesinde yer alan rs27037 polimorfizmi için hasta ve kontrol gruplarının allel dağılım frekansı incelendiğinde G allelinin frekansının T allelinin frekansından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.06 (%95GA=0.69-1.65) ve p değeri 0.776 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini ($OR > 1$) öngörmesine karşın p değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilecek sınırlar ($p \leq 0.05$) dışında olduğu için rs11465804 polimorfizmi AS riski ile ilişkilendirilememiştir.

ERAP1 gen bölgesi içerisinde yer alan rs27037 polimorfizmi başta Çin, Kafkas, Avrupa, Kore ve Tayvan toplumlarında olmak üzere birçok toplumda AS riski ile ilişkilendirilmiştir [122], [123], [168], [169]. Tayvan toplumunda 2012 yılında 797 hasta 1,150 kontrol ile yapılan bir çalışmada rs27037 polimorfizminin ($p=5.5 \times 10^{-5}$, $OR=1.30$, %95GA= 1.15-1.48) hastalık riski ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir [169].

ERAP1 gen polimorfizminin, mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da AS riski ile ilişkili olduğu bilinmektedir [2]. *ERAP1* gen bölgesi içerisinde yer alan rs27044 için hasta ve kontrol gruplarının allel dağılım frekansı incelendiğinde C allelinin frekansının G allelinin frekansından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.23 (%95GA=0.80-1.90) ve p değeri 0.345 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini (OR>1) öngörmesine karşın p değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilecek sınırlar ($p \leq 0.05$) dışında olduğu için rs27044 polimorfizmi AS riski ile ilişkilendirilememiştir.

Tsui ve arkadaşları *ERAP1* ve *ERAP2* polimorfizminin ailesel AS ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında Kafkas kökenli 199 AS'li aile ile çalışmış ve rs27044 polimorfizminin ailesel AS açısından önemli ölçüde risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir [172]. Wang ve arkadaşları tarafından Tayvan popülasyonunda yapılan bir çalışmada ise 797 Tayvanlı hasta ve 1,150 kontrol ile *ERAP1* polimorfizminin hastalık riski ve sindesmoft oluşumu ile ilişkisi araştırılmıştır. Sindesmoft; omurga arası disklerin hastalığın etkisi ile zaman içerisinde kemikleşmesi sonucu omurgalar arasında oluşan kemik köprüleri ifade etmektedir. Çalışmada rs27044 ($p=1.5 \times 10^{-4}$, OR= 1.28, %95GA=1.13-1.46) ve rs30187 ($p=1.7 \times 10^{-3}$, OR=1.23, %95GA=1.08-1.40) polimorfizmlerinin hastalığa yatkınlıktan sorumlu olabileceği, aynı zamanda bu SNP'lerin AS'de sindesmoft oluşumu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [169].

21q22 kromozom bölgesinde genler arası alanda yer alan rs2242944 için hasta ve kontrol gruplarının allel dağılım frekansı incelendiğinde G allelinin frekansının A allelinin frekansından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.10 (%95GA=0.74-1.65) ve p değeri 0.625 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini (OR>1) öngörmesine karşın p değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilecek sınırlar ($p \leq 0.05$) dışında olduğu için rs2242944 polimorfizmi AS riski ile ilişkilendirilememiştir.

Avrupa toplumunda (İngiliz, Avustralya ve Kuzey Amerika kökenli) 2,053 hasta ve 5,140 kontrol ile yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmasında rs2242944 polimorfizmi hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir ($p=8.3 \times 10^{-20}$) [7]. Genler arası bölgede yer alan

rs2242944'e en yakın gen *PSMG1* olup, bu gen bölgesi AS'in de yer aldığı seronegatif spondiloartropatiler sınıfında yer alan IBH ile ilişkilendirilmiştir [7], [183].

EXOC3L1 gen bölgesinde yer alan rs868213 için hasta ve kontrol gruplarının allel dağılım frekansı incelendiğinde T allelinin frekansının C allelinin frekansından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Minör allelin yaygın allele göre OR değeri 1.33 (%95GA=0.57-3.12) ve p değeri 0.505 olarak hesaplanmıştır. OR değeri AS ile ilişki olabileceğini ($OR>1$) öngörmesine karşın p değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilecek sınırlar ($p\leq 0.05$) dışında olduğu için rs868213 polimorfizmi AS riski ile ilişkilendirilememiştir.

Pointon ve arkadaşları tarafından Avrupa toplumuna ait veriler kullanılarak gerçekleştirilen bir meta analiz çalışmasında *EXOC3L1* gen bölgesinde yer alan rs868213 ($p=0.00002$, $OR=1.45$, %95GA=1.22-1.72) polimorfik bölgesinin hastalık riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [121].

Çalışmamızda *ERAP1* gen bölgesinde yer alan rs27434, rs30187, rs17482078, rs2287987 polimorfizmlerinin AS riski ile ilişkilerini değerlendirmek üzere hesaplanan OR değerleri (Çizelge 3.6), hastalık ile SNP'lerin ilişkili olduklarını ($OR>1$) öngörmesine karşın hesaplanan p değerleri istatistiki olarak anlamlı kabul edilen ($p\leq 0.05$) sınırlar içinde bulunmadığı için örnek sayısının artırılarak çalışmanın tekrar değerlendirilmesi önerilmektedir. AS ile ilişkilendirme çalışmaları farklı toplumlarda gerçekleştirilmiş, bu çalışmalarda elde edilen veriler bu tez çalışmasında değerlendirilmiştir (Çizelge 3.7).

3.5.3 Lojistik Regresyon Analizi

Çalışma kapsamında AS hastalık riski ile ilişkili olabilecek en uygun genetik modeli tanımlayabilmek için hastalık olgusu ile genetik, klinik ve demografik bir çok parametre arasında ki ilişki çapraz tablolar ve ki-kare testi ile analiz edilmiştir. Bu analizler neticesinde AS hastalık olgusu ile ilişkilendirilen parametreler dikkate alınarak AS hastalık riskini tanımlayan en uygun lojistik regresyon modeli oluşturulmuştur. Lojistik regresyon analizi ile en az değişkeni kullanarak en iyi uyuma sahip olacak şekilde bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi tanımlayabilen ve biyolojik olarak kabul edilebilir bir model oluşturulmuştur [184]. Bu çerçevede aşağıda sırası ile AS olgusu-

klirik demografik değişkenler ve genotipler-klirik değişkenler ile ilişkilendirilmiştir. Analiz neticesinde ilişki tespit edilen parametreler ile AS hastalık riskini tanımlayan lojistik regresyon modeli oluşturulmuştur.

Çizelge 3. 7 Ankilozan spondilit – SNP ilişkilendirme çalışması yapılan toplumlar
(+: ilişkilendirilen, X: Çalışma yapılıp ilişki bulunamayan, -: Çalışma yapılmayan, İlişkilendirme Düzeyi; A: Allel, G: Genotip, Kullanılan Yöntem; L: Lojistik regresyon, R: Regresyon, K: Kikare, V: Varyans analizi, W: Web tabanlı ilişkilendirme yazılımları)

Ülke SNP	TR	AVR/ ABD	PORT	İSPN	MCR	ÇİN	KORE	TYVN	KFKS	KND	İNG
rs1004819	x	+ AGL	+ AK	-	+ AGL	x	x	-	-	+ AK	+ AGL
rs10050860	x	-	+ AR	+ AK	+ AR	+ AK	x	-	+ AL	+ AR	+ AL
rs10489629	x	+ AK	+ AK	-	+ GAL	-	x	-	+ AR	+ AR	+ AK
rs10865331	x	+ AL	-	+ AGK	-	+ AL	+ AK	+ AGK	-	-	+ AL
rs10889677	x	+ AL	-	-	+ AGL	+ AGL	x	-	-	x	+ AL
rs11209026	x	+ AL	x	-	+ AGL	-	x	-	-	+ AL	+ AL
rs11465804	x	+ AR	x	-	-	-	x	-	+ AR	+ AR	+ AK
rs1343151	x	+ AL	x	+ AK	+ AL	x	x	-	-	x	+ AL
rs17482078	x	-	+ AR	+ AL	+ AR	+ AK	+ AR	-	+ AK	+ AR	+ AK
rs2242944	x	+ AL	-	x	-	-	x	-	-	-	-
rs2287987	x	+ AR	x	+ AL	+ AR	-	X	-	+ AW	x	+ AL
rs2303138	x	+ AL	x	-	-	-	-	-	-	-	x
rs2310173	x	+ AL	-	-	-	-	x	-	-	-	-
rs27037	x	+ AL	-	-	-	+ AL	+ AK	+ AGL	+ AW	-	-
rs27044	x	+ AL	+ AR	+ AL	+ AR	+ AGL	+ AR	+ AGL	+ AGK	+ AGR	+ AR
rs27434	x	+ AL	-	-	-	+	+ AK	-	-	-	+ AL
rs30187	+ GK	+ AL	+ AR	+ AL	x	+ AR	+ AR	+ AR	+ AGL	+ AGL	+ AGV
rs4333130	x	+ AL	-	-	-	x	x	-	-	-	+ AL
rs7302230	x	+ AL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs7743761	+ AGL	+ AL	-	-	-	x	-	-	-	-	+ AL
rs868213	x	+ AK	-	-	-	-	-	-	-	-	+ AK

3.5.3.1 Ankilozan Spondilit ile Klinik ve Demografik Değişkenlerin İlişkilendirilmesi

Çalışma kapsamında bazı klinik ve demografik değişkenlerin AS olma durumu ile ilişkisinin araştırılması amacı ile çapraz tablolar oluşturulmuştur. Klinik ve demografik değişkenlere ilişkin veriler Hasta Bilgi Formu (Ek-B) aracılığıyla hastalara yöneltilen anket soruları ile sağlanmıştır.

Gerçekleştirilen analizlerde cinsiyet, ailede romatizmal hastalık öyküsü, ailede inflamatuvar bağırsak hastalık öyküsü, ailede bel fıtığı öyküsü, ailede AS öyküsü, ailede psöriatik artrit öyküsü ve AS arasındaki ilişki incelenmiştir. Analiz neticesinde cinsiyet, ailede romatizmal hastalık öyküsü, ailede AS hastalık öyküsü ve ailede bel fıtığı hastalık öyküsü ile AS ilişkilendirilmiştir. İlişkilendirilen klinik ve demografik değişkenler aşağıda verilmiştir.

Ankilozan spondilit ile cinsiyetin ilişkilendirilmesi

Çalışma popülasyonunda yer alan bireylerin hasta olma durumları ve cinsiyetleri analiz edildiğinde; cinsiyetin hastalık ile ilişkili ($p=0.001$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3. 8 Ankilozan spondilit ve cinsiyet ilişkisi

		Cinsiyet			
		Erkek	Kadın	Toplam	p değeri ($p \leq 0.05$)
Kontrol	Kişi	36	65	101	0.001
	Yüzdesi	35.6%	64.4%	100%	
Hasta	Kişi	60	40	100	
	Yüzdesi	60%	40%	100%	
Toplam	Kişi	96	105	201	
	Yüzdesi	47.8%	52.2%	100%	

Hastalığın erkeklerde görülme yüzdesinin kadınlardan daha yüksek olduğu, hasta grubunda yer alan erkek sayısının 60, kadın sayısının ise 40 olduğu tespit edilmiştir. Çapraz tablolarda hastalık ile ilişkilendirilen cinsiyet demografik verisi lojistik regresyon analizi için modele dahil edilmiştir.

Ankilozan spondilit ile ailede romatizmal hastalık öyküsünün ilişkilendirilmesi

Çalışma popülasyonunda yer alan bireyler ailede romatizmal hastalık öyküsü ve AS olma durumu açısından test edildiğinde aralarında istatistiki olarak anlamlı bir ilişkinin ($p=0.003$) bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.9). Çalışma popülasyonunda yer alan toplam 100 AS'li hastanın 33'ünün birinci derece akrabalarında romatizmal bir hastalık olgusu tespit edilmiştir. Çapraz tablolarda hastalık ile ilişkilendirilen ailede romatizmal hastalık öyküsü klinik değişkeni lojistik regresyon analizi için modele dahil edilmiştir.

Çizelge 3. 9 Ankilozan spondilit ve ailede romatizmal hastalık öyküsü ilişkisi

		Ailede romatizmal hastalık öyküsü			
		Yok Grubu	Var Grubu	Toplam	p değeri ($p \leq 0.05$)
Kontrol	Kişi	86	15	101	0.003
	Yüzdesi	85.1%	15.9%	100%	
Hasta	Kişi	67	33	100	
	Yüzdesi	67%	33%	100%	
Toplam	Kişi	153	48	201	
	Yüzdesi	76.1%	23.9%	100%	

Ankilozan Spondilit ile Ailede Bel Fıtığı Hastalık Öyküsünün ilişkilendirilmesi

Çalışma popülasyonunda yer alan bireyler ailede bel fıtığı hastalık öyküsü ve AS olma durumu açısından test edildiğinde aralarında istatistiki olarak anlamlı bir ilişkinin ($p<0.001$) bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.10). Çalışma popülasyonunda yer alan toplam 100 AS'li hastanın 40'ının birinci derece akrabalarında bel fıtığı hastalık olgusu tespit edilmiştir. Çapraz tablolarda hastalık ile ilişkilendirilen ailede bel fıtığı hastalık öyküsü klinik değişkeni lojistik regresyon analizi için modele dahil edilmiştir.

Ankilozan Spondilit ile Ailede Ankilozan Spondilit Hastalık Öyküsünün ilişkilendirilmesi

Çalışma popülasyonunda yer alan bireyler ailede AS hastalık öyküsü ve AS olma durumu açısından test edildiğinde aralarında istatistiki olarak anlamlı bir ilişkinin ($p<0.001$) bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.11). Çalışma popülasyonunda yer alan toplam 100 AS'li hastanın 41'inin birinci derece akrabalarında AS hastalık olgusu tespit edilmiştir.

Çapraz tablolarda hastalık ile ilişkilendirilen ailede AS hastalık öyküsü klinik değişkeni lojistik regresyon analizi için modele dahil edilmiştir.

Çizelge 3. 10 Ankilozan spondilit ve ailede bel fıtığı hastalık öyküsü ilişkisi

		Ailede bel fıtığı öyküsü			p değeri ($p \leq 0.05$)
		Yok Grubu	Var Grubu	Toplam	
Kontrol	Kişi	88	13	101	< 0.001
	Yüzdesi	87.1%	12.9%	100%	
Hasta	Kişi	60	40	100	
	Yüzdesi	60%	40%	100%	
Toplam	Kişi	148	53	201	
	Yüzdesi	73.6%	26.4%	100%	

Çizelge 3. 11 Ankilozan spondilit ve ailede ankilozan spondilit hastalık öyküsü ilişkisi

		Ailede ankilozan spondilit hastalık öyküsü			p değeri ($p \leq 0.05$)
		Yok Grubu	Var Grubu	Toplam	
Kontrol	Kişi	100	1	101	< 0.001
	Yüzdesi	99%	1%	100%	
Hasta	Kişi	59	41	100	
	Yüzdesi	59%	41%	100%	
Toplam	Kişi	159	42	201	
	Yüzdesi	73.6%	26.4%	100%	

3.5.3.2 Ankilozan Spondilit Hastalarında SNP Genotiplerinin Klinik Değişkenlerle İlişkilendirilmesi

Genotipleme analizleri tamamlanan 21 SNP'nin bazı klinik ve demografik değişkenler ile ilişkisinin araştırılması için Hasta Bilgi Formlarında yer alan anket soruları aracılığı ile elde edilen veriler kullanılarak bağımsız iki değişken arasındaki ilişki çapraz tablolar ve ki-kare testi ile analiz edilmiştir.

Analizlerde AS'li hastalarda ailede romatizmal hastalık öyküsü, ailede inflamatuvar bağırsak hastalık öyküsü, ailede bel fıtığı öyküsü, ailede AS öyküsü, ailede psöriatik artrit öyküsü ve SNP'ler arasındaki ilişki incelenmiştir. Analiz neticesinde ailede romatizmal hastalık öyküsü ve ailede bel fıtığı hastalık öyküsü ile bazı SNP'ler ilişkilendirilmiştir (Çizelge 3.12). İlişkilendirilen SNP'ler ve klinik değişkenler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3. 12 AS'li Hastalarda SNP Genotiplerinin Klinik Değişkenlerle İlişkisi ($p \leq 0.05$)

SNP	Ailede İBH	Ailede Romatizma	Ailede Psöriatik Artrit	Ailede Bel Fıtığı	Ailede AS
rs1004819	0.165	0.839	1.000	0.032	0.875
rs10050860	0.411	0.458	0.245	0.148	0.756
rs10489629	1.000	0.835	0.681	0.252	0.355
rs10865331	0.279	0.415	0.676	0.802	0.407
rs10889677	0.177	0.966	1.000	0.017	0.670
rs11209026	1.000	1.000	0.591	0.410	0.308
rs11465804	0.452	0.283	0.588	0.043	0.743
rs1343151	0.593	0.352	0.684	0.287	0.726
rs17482078	0.411	0.458	0.245	0.148	0.756
rs2242944	0.280	0.256	1.000	0.087	0.482
rs2287987	0.411	0.458	0.245	0.148	0.756
rs2303138	1.000	0.746	1.000	0.535	0.757
rs2310173	1.000	0.191	0.393	0.931	0.839
rs27037	1.000	0.835	1.000	0.624	0.766
rs27044	1.000	0.835	1.000	0.624	0.766
rs27434	0.576	0.437	0.398	0.458	0.166
rs30187	1.000	0.503	1.000	0.280	0.163
rs4333130	0.581	0.837	1.000	0.511	0.694
rs7302230	1.000	0.434	1.000	0.471	0.713
rs7743761	1.000	0.539	0.580	0.650	0.172
rs868213	0.344	0.037	0.576	0.275	0.313

Ailede Romatizmal Hastalık Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi

Çalışma populasyonunda yer alan AS'li hastaların birinci derece akrabalarında romatizmal hastalık görülme durumu ile SNP'ler arasındaki ilişki analiz edildiğinde rs868213 polimorfizmi ve ailede romatizmal hastalık öyküsü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişkinin ($p=0.037$) bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3. 13 Ailede romatizmal hastalık öyküsü ile rs868213 polimorfizmi ilişkisi

rs868213		Ailede romatizmal hastalık öyküsü			
		Yok Grubu	Var Grubu	Toplam	p değeri ($p \leq 0.05$)
TT	Hasta sayısı	55	32	87	0.037
	Yüzdesi	63.2%	36.8%	100%	
CT+CC	Hasta sayısı	12	1	13	
	Yüzdesi	92.3%	7.7%	100%	
Toplam	Hasta sayısı	67	33	100	
	Yüzdesi	67%	33%	100%	

EXOC3L1 gen bölgesinde yer alan rs868213 polimorfizmine ait genotipler ile ailede romatizmal hastalık öyküsü arasındaki ilişkiyi gösteren çapraz tablo incelendiğinde; TT genotipini taşıyan 87 hastadan 32'sinde (%36.8) ailede romatizmal hastalık görüldüğü, CT+CC genotipini taşıyan 13 hastadan 1'inde (%7.7) ailede romatizmal hastalık öyküsü görüldüğü tespit edilmiştir ($p=0.037$).

Ailede Belfıtığı Öyküsü ile SNP'lerin İlişkilendirilmesi

Çalışma populasyonunda yer alan AS'li hastaların birinci derece akrabalarında bel fıtığı görülme durumu ile SNP'ler arasındaki ilişki analiz edildiğinde *IL23R* gen bölgesinde yer alan rs1004819, rs10889677, rs11465804 polimorfizmleri ve ailede bel fıtığı hastalık öyküsü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişkinin bulunduğu tespit edilmiştir.

rs1004819 polimorfizmine ait genotiplerin ailede bel fıtığı öyküsü ile ilişkisini gösteren çapraz tablo incelendiğinde (Çizelge 3.14); CC genotipini taşıyan 26 hasta bireyden

15'inde (%57.7) ailede bel fıtığı olgusu görüldüğü, TC+TT genotipini taşıyan 74 hastadan 25'inde (%33.8) ailede bel fıtığı olgusu görüldüğü tespit edilmiştir (p=0.032).

Çizelge 3. 14 Ailede bel fıtığı öyküsü ile rs1004819 polimorfizmi ilişkisi

rs1004819		Ailede bel fıtığı öyküsü			
		Yok Grubu	Var Grubu	Toplam	p değeri (p≤0.05)
CC	Hasta sayısı	11	15	26	0.032
	Yüzdesi	42.3%	57.7%	100%	
TC+TT	Hasta sayısı	49	25	74	
	Yüzdesi	66.2%	33.8%	100%	
Toplam	Hasta sayısı	60	40	100	
	Yüzdesi	60%	40%	100%	

rs10889677 ve ailede bel fıtığı öyküsü için gerçekleştirilen analiz incelendiğinde (Çizelge 3.15); CC genotipine sahip 27 hasta bireyden 16'sında (%59.3) ailede bel fıtığı olgusu görüldüğü, CA+AA genotipine sahip 73 hastadan 24'ünde (%32.9) ailede bel fıtığı olgusu görüldüğü tespit edilmiştir (p=0.017).

Çizelge 3. 15 Ailede bel fıtığı öyküsü ile rs10889677 polimorfizmi ilişkisi

rs10889677		Ailede bel fıtığı öyküsü			
		Yok Grubu	Var Grubu	Toplam	p değeri (p≤0.05)
CC	Hasta sayısı	11	16	27	0.017
	Yüzdesi	40.7%	59.3%	100%	
CA+AA	Hasta sayısı	49	24	73	
	Yüzdesi	67.1%	32.9%	100%	
Toplam	Hasta sayısı	60	40	100	
	Yüzdesi	60%	40%	100%	

rs11465804 polimorfizmine ait genotipler ile ilgili çapraz tablo incelendiğinde (izelge 3.16) ise TT genotipine sahip 82 hastadan 29’unda (%35.4) ailede bel fıtığı olgusu görüldüğü, GT+GG genotipine sahip 18 hastadan 11’inde (%61.1) ailede bel fıtığı olgusu görüldüğü tespit edilmiştir (p=0.043).

Çizelge 3. 16 Ailede bel fıtığı öyküsü ile rs11465804 polimorfizmi ilişkisi

rs11465804		Ailede bel fıtığı yks			
		Yok Grubu	Var Grubu	Toplam	p değeri (p≤0.05)
TT	Hasta sayısı	53	29	82	0.043
	Yüzdesi	64.6%	35.4%	100%	
GT+GG	Hasta sayısı	7	11	18	
	Yüzdesi	38.9%	61.1%	100%	
Toplam	Hasta sayısı	60	40	100	
	Yüzdesi	60%	40%	100%	

3.5.3.3 AS Hastalık Riski için Lojistik Regresyon Modeli

AS hastalık riski ile klinik, demografik değişkenler ve SNP genotiplerinin ilişkisinin analiz edilmesi amacı ile Lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Analizin başarısı, oluşturulacak modelin uygunluğu ile orantılı olduğu için ilk aşamada çalışma kapsamında incelenen klinik, demografik değişkenler ve SNP’ler hastalık olgusu ile çapraz tablolar oluşturularak ilişkilendirilmiştir. Çapraz tablolarda hastalık riski ile istatistiki olarak anlamlı çıkan rs7743761, cinsiyet, ailede romatizmal hastalık öyküsü, ailede bel fıtığı hastalık öyküsü ve ailede AS yks değişkenleri lojistik regresyon modeline dahil edilmiştir. Backward-Wald lojistik regresyon modeli ile gerçekleştirilen analiz neticesinde; rs7743761 (p=0.003), cinsiyet (p=0.007), ailede AS hastalık öyküsü (p<0.001) ve ailede bel fıtığı hastalık öyküsü (p<0.001) modelinin AS hastalık riskini tanımlayan en uygun model olduğu tespit edilmiştir (izelge 3.17).

Lojistik regresyon analizi neticesinde rs7743761 polimorfizmi AS hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir (p=0.003, OR=3.493 %95GA= 1.534-7.955). rs7743761’in hastalık

riskini 3,5 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Genotip ve allel düzeyinde de hastalık riski ile ilişkilendirilen rs7743761 polimorfik bölgesi 6. Kromozom üzerinde *HLA-S* ve *DHFRP2* (Dihidrofolat redüktaz pseudogen 2) gen bölgeleri arasında yer almaktadır. *HLA-S* ve *DHFRP2* genleri protein kodlama yeteneğini kaybetmiş işlevsel olmayan pseudogen bölgeleridir. Reveille ve arkadaşları tarafından 2008 yılında Avrupa kökenli 2,108 hasta (Avusturalya, İngiliz ve Kuzey Amerikalı) ve İngiliz toplumundan 1,500 kontrol ile yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmasında rs7743761 AS riski ile ilişkilendirilmiştir ($p < 10^{-267}$, OR=4.5) [185]. Australo Anglo American Spondiloartrit Konsorsiyumu (TASC) tarafından Avrupa kökenli 2,053 AS'li hasta ve 5,140 kontrol ile gerçekleştirilen GWAS çalışmasında rs7743761 polimorfizmi hastalık riski ile güçlü şekilde ilişkili bulunmuştur ($p = 5 \times 10^{-304}$) [7]. 2012 yılında Schaub ve arkadaşları genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında SNP ve hastalık ilişkilendirme çalışmalarının çok geniş bir genom alanında yapıldığını ve bu nedenle spesifik sonuçlar alınıp alınmadığını değerlendirmek amacı ile birçok hastalık ve SNP'ye ait verileri analiz etmişlerdir. Bu çalışma kapsamında değerlendirilen verilerden biri de TASC tarafından yapılan çalışma neticesinde elde edilen rs7743761'e ait veriler olmuştur. Yapılan çalışma neticesinde rs7743761 ile AS hastalık riski ilişkisi anlamlı bulunmuştur ($p = 5 \times 10^{-303}$) [186]. Bu veriler çalışmamız sonucunda elde edilen veriler ile uyumludur.

Çizelge 3. 17 Lojistik regresyon analiz sonuçları

Parametre	p değeri ($p \leq 0.05$)	OR	%95 Güven aralığı
rs7743761	0.003	3.493	1.534 - 7.955
Ailesel bel fıtığı öyküsü	< 0.001	4.710	2.047 - 10.834
Ailesel AS öyküsü	< 0.001	53.752	6.916 - 417.767
Cinsiyet	0.007	2.671	1.309 - 5.451

Lojistik regresyon analizinde AS hastalık riski ile ilişkilendirilen diğer olgu ailede bel fıtığı hastalık öyküsü olmuştur ($p < 0.001$, OR=4.710 %95GA= 2.047-10.834) (Çizelge 3.17). Ailede bel fıtığı olgusunun hastalık riskini 4,7 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Çalışmamız ile *IL23R* gen bölgesinde bulunan rs1004819 ($p=0.032$), rs10889677 ($p=0.017$) ve rs11465804 ($p=0.043$) polimorfizmine sahip bel fıtığı hastalarında AS görülme riski

istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Literatürde ilk olarak bu çalışma ile *IL23R* gen bölgesinde ki 3 polimorfik bölgenin bel fıtığı olgusu taşıyan kişilerde AS görülme riskini arttırdığı tespit edilmiştir. *IL23R* geni immün sistemde rol alan interlökin (*IL*) gen ailesinin bir üyesi olup inflamatuvar yanıtın oluşmasında ve buna bağlı disk dejenerasyonunda rol almaktadır [31]. *IL23R* polimorfizminin AS hastalık riskini arttırdığına yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. rs1004819 polimorfizmi Macar ve Kafkas toplumunda [120], [124], [143], [174], [175]; rs10889677 polimorfizmi Macar ve Avrupa toplumlarında [120], [124], [127]; rs11465804 polimorfizmi Kanada ve Avrupa toplumlarında [174], [176] AS hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir. Fakat bu 3 polimorfik bölgenin bel fıtığı olgusu görülen kişilerde AS hastalık riskini arttırdığına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bel fıtığı en yaygın görülen iskelet kas hatlıklarından biridir. Her ne kadar etiyolojisi ve patogenezi tam olarak bilinmese de son dönemlerde yapılan çalışmalar ile bel fıtığında vücut ağırlığı, mekanik yük, fiziksel aktivite ile birlikte genetik faktörlerinde rol aldığı gösterilmiştir [187], [188]. İntervertebral disklerde dejenerasyon ve sırt ağrısı ile karakterize olan bel fıtığında tıpkı AS'te olduğu gibi inflamatuvar yanıtın oluşmasında çeşitli medyatörler görev almaktadır. İnterlökin gibi bazı sitokinler inflamatuvar yanıtın oluşmasında ve disk dejenerasyonunda önemli rol oynamaktadır [189], [190]. Bel fıtığının etiyoloji ve patogenezinin aydınlatılmasına yönelik birçok çalışma yapılmış ve hastalık riski ile birçok genetik unsur (*COL1A1*, *IL1A* ve *PARK2*) ilişkilendirilmiştir [191], [192], [193], [194], [195], [196], [197].

Hem AS hem de bel fıtığında; intervertebral disklerde dejenerasyon görülmesi, ankiloz oluşumu ve oluşan inflamatuvar ortaya çıkan sitokinlerin aynı gen ailesi içerisinde bulunması çalışmamız kapsamında analiz edilen 21 SNP ile bel fıtığı arasında daha önce herhangi bir ilişkilendirme yapıp yapılmadığını düşündürmektedir. Bu düşünce çerçevesinde çalışmamız kapsamında analiz edilen 21 SNP ve bel fıtığı genetik ilişkisine yönelik kapsamlı veritabanı taraması yapılmış ve bu alanda literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ailesel bel fıtığı olgusu ile ilgili diğer bir tereddüt ise bu tez çalışmasının “1.1.7 AS tanısında karşılaşılan sorunlar” başlıklı bölümünde de ifade ettiğimiz üzere; AS'nin bel fıtığı (lumbar disc herniaton-LDH) ile benzer radyolojik görünüm sergilemesidir. Bu nedenle AS hastalarının büyük bir bölümüne başlangıçta bel

fıtığı tanısı konulmakta hatta önemli bir bölümü bel fıtığı tanısı ile cerrahi müdahale görmektedir [85]. Çalışmamız kapsamında da benzer bir olgu ile karşılaşılmıştır. Çalışma grubumuz içerisinde yer alan 15 AS hastasına başlangıçta bel fıtığı tanısı konulduğu ve bunlardan 6 (%6) tanesinin bu tanıya bağlı olarak cerrahi müdahaleye maruz kaldığı tespit edilmiştir. Bu durum çalışmamızda ailede bel fıtığı öyküsü olan bireylerin gerçekte mi yoksa hatalı tanı sonucu mu bel fıtığı tanısı aldıklarını düşündürmektedir. Ailede bel fıtığı öyküsü olan hastaların hatalı tanı almaları durumu, rs1004819, rs10889677 ve rs11465894 polimorfizmleri ile AS hastalık riski arasındaki ilişki sonucunu ortaya çıkarabilecektir. Bu durumun aydınlatılması için ailesel bel fıtığı öyküsü olan AS hastalarının ve olgunun tespit edildiği birinci derece akrabalarının dahil edildiği bir çalışma ile AS hastalık riskinin radyolojik, klinik ve genetik olarak tekrar değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Lojistik regresyon analizi ve çapraz tablolar (ki-kare testi) ile ailede AS hastalık öyküsü ile AS hastalık riski ilişkilendirilmiştir ($p < 0.001$, $OR = 53.752$ %95GA=6.914-417.767) (Çizelge 3.17). Analiz neticesinde AS hastalarının birinci derece akrabalarında hastalığın görülme riskinin normalden yaklaşık olarak 54 kat (53.8) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışma grubumuzda yer alan 100 AS hastasının 41'inde (%41) AS olgusu belirlenmiştir (Çizelge 3.11). Brown ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; birinci derece akrabalarda AS hastalık riskinin normalden 52 kattan daha fazla olduğu bildirilmiştir [25]. Çalışma ile monozigotik ikizlerde hastalığın nüks etme olasılığı %63 (17/27), birinci derece akrabalarda %8.2 (441/5309), ikinci derece akrabalarda %1 (8/834) ve üçüncü derece akrabalarda %0.7 (7/997)'dir. Ebeveyn çocuk arasında hastalığın görülme riski %7.9 (37/466) iken kardeşler arasında hastalığın görülme riski %8.2 (404/4924)'dir [25]. Çalışmamızda elde edilen veriler literatür verileri ile örtüşmektedir.

Çalışmamızda hem lojistik regresyon analizi ($p = 0.007$) hem de çapraz tablolar (ki-kare testi) ($p = 0.001$) ile gerçekleştirilen analizlerde cinsiyetin hastalık riski açısından önemli bir parametre olduğu tespit edilmiştir. Lojistik regresyon analizi neticesinde erkeklerde hastalığın görülme riskinin kadınlardan 2,7 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p = 0.007$, $OR = 2.671$ %95GA=1.309-5.451) (Çizelge 3.17). Çalışma grubunda yer alan 100 hastadan 60'ının (%60) AS hastası olduğu görülmektedir. Dünya genelinde milyonlarca insanın müzdarip olduğu yaygın bir otoimmün hastalık olan AS'de yapılan epidemiyolojik

alışmalar incelendiğinde kadın erkek oranının coğrafik ve etnik değişim gösterdiği görölmektedir. Finlandiya’da bu oran 2.7 [198], Yunanistan’da 4.0-6.1 [199], [200], İtalya’da 7.0 [201], Norveç’te 3.1 [202], İran’da 1.4 [203], Tayvan’da 1.5 [204], Kuzey Amerika’da 6.0 [205], Latin Amerika’da 2.0 [206], Çin’de 1.7-4.5 [207], [208] ve Türkiye’de 1.2-2.8 [24], [209] arasında değişim göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen erkek/kadın hasta oranına (2.7 kat) ilişkin veriler daha önce ölkemizde yapılan çalışmalara ilişkin literatür verilerini desteklemektedir. Hastalığın klinik anlamda seyrinin bayanlarda daha hafif seyrettiği, semptomların çoğunun önemsenmediği ve bazı bayan hastalara 50’li yaşlarda hastalık tanısının konulduğu, hatta bazılarının hastalığı bilmeden yaşamlarını sürdürdüğü düşünölmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

AS omurga ve sakroiliak eklemleri etkileyen kronik, iflamatuar ve otoimmün bir hastalıktır. Hastalığa neden olan faktörler tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber; patogenezinde genetik, çevresel ve immünolojik birçok faktörün rol aldığı düşünülmektedir. Hastalık nedenlerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar diğer romatizmal hastalıklarda olduğu gibi immün yanıtın oluşmasına yönelik mekanizmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Hastalık açısından en önemli dezavantaj olan omurga deformasyonu ve intervertebral disk dejenerasyonuna neden olan inflamasyon süreci bu çerçevede önem arz etmektedir. Özellikle iflamatuar yanıtın oluşmasında önemli rolleri olan IL'ler, aminopeptidazlar, interferonlar ve tümör nekrozis faktör gibi sitokin ve reseptörleri üzerine yoğunlaşan bu çalışmalar sadece ilişkilendirme düzeyinde kalmış, hastalığın moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllarda hastalığa yatkınlık, hastalığın gelişimi, ilaç yanıtı ve hastalıkların tanısında yararlanılan moleküler markerlar olan ve insan genomunda yüksek sıklıkta görülen tek baz değişimleri olarak adlandırılan SNP'ler ile AS hastalık riskinin ilişkilendirilmesine yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. İlişkilendirme çalışmalarında dikkat çeken önemli sonuçlardan biri farklı gen bölgeleri ya da SNP'lerin coğrafik ve etnik olarak farklı toplumlarda farklı sonuçlar vermesi olmuştur.

AS açısından önemli sorunlardan biri de hastalığın ilerleyişine bağlı olarak gerçekleşen omurga deformasyonu ve buna bağlı olarak oluşan işgücü kaybıdır. Birçok genç insan

henüz 40'lı yaşlarda omurga deformasyonu nedeni ile işgöremez hale gelmekte ve yaşantılarının en verimli dönemlerinde iş hayatından uzak kalmaktadırlar. Buna ek olarak oluşan fiziki deformasyon kişinin sosyal hayatta da kendini geri planda tutmasına sebebiyet vermektedir. Hastalığın erken dönemde teşhisi ve omurga deformasyonu gerçekleşmeden gerekli fizik tedavinin ve hastalığın ilerleyişini yavaşlatıcı kimyasal tedavinin uygulanması bu açıdan büyük önem arz etmektedir. Hastalık açısından bir diğer handicap ise hastalığın teşhisinin 5 ile 10 yıl arasında geç konulmasıdır. Hastalık belirtilerinin LDH gibi bazı inflamatuvar hastalıklarla karıştırılması ve LDH için uygulanan tedavinin AS'nin klinik semptomlarını perdelemesi hastaların hasta olduklarını bilmeden yıllarca yaşantılarına devam etmesi ile sonuçlanmaktadır.

Toplumumuzda; AS ile ilişkili SNP'leri tanımlayarak hastalığa genetik yatkınlığı belirleyecek, ileride hastalığın erken dönemde, kısa sürede tanısının konulmasına yardımcı olacak genetik yönlendirmeyi sağlayacak, doğru ve erken tanıyı takiben, yaşam kalitesini olumsuz etkileyecek postür ve omurga bozuklukları oluşmadan, işgücü kaybı olmadan, doğru aşamada, hastalığın önleyici ve durdurucu tedavisinin başlatılmasına katkı sunmak amacı ile gerçekleştirilen bu tez çalışmasında; toplumumuzda ilk defa 21 SNP ile AS hastalık riski incelenmiştir. Analiz edilen bu SNP'lerin büyük bir bölümü immün yanıtın oluşmasında sitokin metabolik yolunda rol oynayan aminopeptidazları (*ERAP1*, *IL23R*, *CLSTN3*, *EXOC3L1*) sentezleyen gen bölgelerinde yer almaktadır.

Bu tez çalışması ile; 7 farklı gen bölgesi ve 3 genler arası bölgede olmak üzere toplam 21 SNP'nin AS hastalık riski ile ilişkisi genotip ve allel düzeyinde araştırılmış, toplumumuzda ilk defa bu çalışma ile 6. Kromozom üzerinde *HLA-S* ve *DHFR2* psödogen bölgeleri arasında yer alan rs7743761 polimorfizminin allel ve genotip düzeyinde toplumumuzda AS hastalık riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir ($p=0.003$, $OR=3.493$ %95GA=1.534-7.955). rs7743761 için A allelini taşıyan bireylerde taşımayanlara oranla hastalığın görülme riskinin 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p=0.002$, $OR=1.90$ %95GA=1.26-2.87). Genotip düzeyinde CA genotipini taşıyan bireylerde hastalığın görülme riskinin normalden yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0001$, $OR=4.93$ %95GA=2.437-9.986).

Çalışmamız kapsamında bazı klinik ve demografik değişkenlerin hastalık durumuna katkıları ki-kare ve Fischer'in kesinlik testi ile analiz edilmiştir. Ailede romatizmal hastalık öyküsü ($p=0.003$), ailede AS hastalık olgusu ($p<0.001$), ailede bel fıtığı hastalık öyküsü ($p<0.001$) ve cinsiyet ($p=0.001$) değişkenlerinin AS hastası olma durumu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında klinik değişkenler ile SNP'lere ait genotipler ki-kare ve Fischer'in kesinlik testi ile hastalık riski açısından analiz edildiğinde; ailede romatizmal hastalık öyküsü ile rs868213 ($p=0.037$), ailede bel fıtığı olgusu ile rs1004819 ($p=0.032$), rs10889677 ($p=0.017$) ve rs11465804 ($p=0.043$) polimorfizmlerinin hastalık riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1 Analiz edilen klinik değişkenler ile ilişkilendirilen SNP'ler

SNP	Ailede İBH	Ailede Romatizma	Ailede Psöriatik Artrit	Ailede Bel Fıtığı	Ailede AS
rs1004819				+	
rs10889677				+	
rs11465804				+	
rs868213		+			

Çalışma kapsamında hasta olma durumu-klinik değişken ve klinik değişken-SNP ilişkilendirme çalışması sonucunda ilişki tespit edilen değişkenler ve SNP'ler ile gerçekleştirilen lojistik regresyon analizinde rs7743761 ($p=0.003$, OR=3.493 %95GA=1.534-7.955), ailede bel fıtığı olgusu ($p<0.001$, OR=4.710 %95GA=2.047-10.834), ailede AS olgusu ($p<0.001$, OR=53.752 %95GA=6.916-417.767) ve cinsiyet ($p=0.007$, OR=2.671 %95GA=1.309-5.451) değişkenleri ile oluşturulan modelin AS hastalık riskini açıklayan en uygun model olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile; Avusturalya, İngiliz ve Kuzey Amerika toplumlarından Avrupa kökenli bireylerde AS hastalık riski ile ilişkilendirilen rs7743761 polimorfizmini toplumumuzda ilk defa genotip ve allel düzeyinde AS hastalık riski ile ilişkilendirilmiştir. AS'in genetik aktarımına ve cinsiyete bağlı değişimine ait çalışma verilerimiz literatür ile

doğrulanmıştır. Çalışma ile literatürde ilk defa Ailede bel fıtığı olgusu ile SNP'ler arasında AS hastalık riski açısından ilişki tespit edilmiştir.

4.2 Öneriler

Gerçekleştirilen bu tez çalışması ile elde edilen sonuçlar dikkate alınarak aşağıda sıralanan konuların ileriki çalışmalar ile detaylandırılması önerilmektedir.

1. Çalışma popülasyonunun büyüklüğünün arttırılıp replikasyon çalışmasının gerçekleştirilerek birçok toplumda hastalık riski ile ilişkilendirilen fakat toplumumuzda benzer ilişki kurulamayan *ERAP1* ve *IL23R* gen polimorfizmlerinin tekrar analiz edilmesi ve örnek sayısından kaynaklanan etkilerinin analiz edilmesi,
2. SNP ilişkilendirme çalışmalarında dikkat çeken bir unsur olan coğrafik ve etnik değişim parametresi dikkate alınarak toplumumuza özgü yeni SNP'lerin keşfi için genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının yapılması,
3. Bazı SNP'ler ile ilişkilendirilen klinik değişkenlerin hastalığın patogenezi üzerine fonksiyonel etkilerinin araştırılması,
4. Bel fıtığı ile ilişkilendirilen SNP'ler konusunda literatürde karşılaşılan tereddütlerin giderilmesi adına örneklerin ailelerinin de dahil edilerek ailesel ilişkilendirme çalışmasının yapılmasını,
5. Gerçekleştirilen tez çalışması ile hastalık riski ile ilişkilendirilen rs7743761 ve rs1004819, rs10889677, rs11465804, rs868213 SNP'leri ve klinik değişkenler kullanılarak bir AS risk panelinin tasarlanması, bu panelin hekime erken ve kesin tanı amacı ile yardımcı olacak şekilde bir biyomarkır olarak kullanım potansiyelinin araştırılması, önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Braun, J. ve Sieper, J., (2007). "Ankylosing spondylitis", *The Lancet*, 369: 1379-1390.
- [2] Robinson, P.C. ve Brown, M.A., (2014). "Genetics of ankylosing spondylitis", *Molecular immunology*, 57: 2-11.
- [3] Shamji, M.F. Bafaquh, M. ve Tsai, E., (2008). "The pathogenesis of ankylosing spondylitis".
- [4] Evaluations, Vertebral ankylosis, <http://www.imei.com/connections/ank.html>, 23 Ağustos 1997.
- [5] Thomas, G.P. ve Brown, M.A., (2010). "Genetics and genomics of ankylosing spondylitis", *Immunological reviews*, 233: 162-180.
- [6] Ward, M.M. Reveille, J.D. Learch, T.J. Davis, J.C. ve Weisman, M.H., (2008). "Impact of ankylosing spondylitis on work and family life: comparisons with the US population", *Arthritis Care & Research*, 59: 497-503.
- [7] Consortium, A.-A.-A.S., (2010). "Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci", *Nature genetics*, 42: 123-127.
- [8] Zochling, J. Maxwell, L. Beardmore, J. ve Boonen, A., (2005). "TNF - alpha inhibitors for ankylosing spondylitis", *The Cochrane Library*.
- [9] Dean, L.E. Jones, G.T. MacDonald, A.G. Downham, C. Sturrock, R.D. ve Macfarlane, G.J., (2014). "Global prevalence of ankylosing spondylitis", *Rheumatology*, 53: 650-657.
- [10] Wei, J.C.-C. Hung, K.-S. Hsu, Y.-W. Wong, R.-H. Huang, C.-H. Jan, M.-S. Wu, S.-J. Juan, Y.-S. ve Chang, W.-C., (2012). "Genetic polymorphisms of stromal interaction molecule 1 associated with the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in HLA-B27 positive ankylosing spondylitis patients", *PloS one*, 7: e49698.
- [11] Kenna, T. Lau, M. Keith, P. Ciccia, F. Costello, M. Bradbury, L. Low, P. Agrawal, N. Triolo, G. ve Alessandro, R., (2015). "Disease-associated polymorphisms in ERAP1 do not alter endoplasmic reticulum stress in patients with ankylosing spondylitis", *Genes and immunity*, 16: 35-42.
- [12] Feldtkeller, E. Lemmel, E.-M. ve Russell, A.S., (2003). "Ankylosing spondylitis in the pharaohs of ancient Egypt", *Rheumatology international*, 23: 1-5.
- [13] Benedek, T.G., (2009). "How did ankylosing spondylitis become a separate disease?", *Clinical & Experimental Rheumatology*, 27: S3.

- [14] Ebringer, A., (2012). Ankylosing spondylitis and Klebsiella: Springer.
- [15] Linden, S.V.D. Valkenburg, H.A. ve Cats, A., (1984). "Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis", *Arthritis & Rheumatism*, 27: 361-368.
- [16] Rudwaleit, M. Khan, M.A. ve Sieper, J., (2005). "The challenge of diagnosis and classification in early ankylosing spondylitis: do we need new criteria?", *Arthritis & Rheumatism*, 52: 1000-1008.
- [17] Braun, J. Baraliakos, X. Golder, W. Hermann, K.-G. Listing, J. Brandt, J. Rudwaleit, M. Zuehlendorf, S. Bollow, M. ve Sieper, J., (2004). "Analysing chronic spinal changes in ankylosing spondylitis: a systematic comparison of conventional x rays with magnetic resonance imaging using established and new scoring systems", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63: 1046-1055.
- [18] Akkoc, N., (2008). "Are spondyloarthropathies as common as rheumatoid arthritis worldwide? A review", *Current rheumatology reports*, 10: 371-378.
- [19] Boonen, A., (2002). "Socioeconomic consequences of ankylosing spondylitis", *Clinical and experimental rheumatology*, 20: S-23.
- [20] Khan, M.A., (2002). "Update on spondyloarthropathies", *Annals of internal medicine*, 136: 896-907.
- [21] Karkucak, M. Cakirbay, H. Capkin, E. Topbas, M. Guler, M. Tosun, M. ve Baltaci, D., (2011). "The prevalence of ankylosing spondylitis in the eastern Black Sea region of Turkey", *Eur J Genet Med*, 8: 40-45.
- [22] Gürler, A. Kaptanoğlu, E. Elden, H. Nacitarhan, V. ve Hizmetli, S., (2004). "The prevalence of ankylosing spondylitis among university students", *Turkish Journal of Rheumatology*, 1: 29-35.
- [23] Bodur, H. Ataman, Ş. Buğdaycı, D.S. Rezvani, A. Nas, K. Uzunca, K. Emlakçioğlu, E. Karatepe, A.G. Durmuş, B. ve Sezgin, M., (2012). "Description of the registry of patients with ankylosing spondylitis in Turkey: TRASD-IP", *Rheumatology international*, 32: 169-176.
- [24] Onen, F. Akar, S. Birlik, M. Sari, I. Khan, M.A. Gurler, O. Ergor, A. Manisali, M. ve Akkoc, N., (2008). "Prevalence of ankylosing spondylitis and related spondyloarthritides in an urban area of Izmir, Turkey", *The Journal of rheumatology*, 35: 305-309.
- [25] Brown, M. Laval, S. Brophy, S. ve Calin, A., (2000). "Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59: 883-886.
- [26] Raychaudhuri, S.P. ve Deodhar, A., (2014). "The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis", *Journal of autoimmunity*, 48: 128-133.
- [27] Végvári, A. Szabó, Z. Szántó, S. Glant, T.T. Mikecz, K. ve Szekanecz, Z., (2009). "The genetic background of ankylosing spondylitis", *Joint Bone Spine*, 76: 623-628.
- [28] Kelley, J. Walter, L. ve Trowsdale, J., (2005). "Comparative genomics of major histocompatibility complexes", *Immunogenetics*, 56: 683-695.
- [29] Vandedonck, C. ve Knight, J.C., (2009). "The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research", *Briefings in functional genomics & proteomics*, 8: 379-394.

- [30] Brionez, T.F. ve Reveille, J.D., (2008). "The contribution of genes outside the major histocompatibility complex to susceptibility to ankylosing spondylitis", *Current opinion in rheumatology*, 20: 384-391.
- [31] Brown, M., (2008). "Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis", *Rheumatology*, 47: 132-137.
- [32] Braun, J. Bollow, M. Remlinger, G. Eggens, U. Rudwaleit, M. Distler, A. ve Sieper, J., (1998). "Prevalence of spondylarthropathies in HLA - B27 positive and negative blood donors", *Arthritis & Rheumatism*, 41: 58-67.
- [33] Ebringer, A. ve Wilson, C., (2000). "HLA molecules, bacteria and autoimmunity", *Journal of Medical Microbiology*, 49: 305-311.
- [34] Burton, P.R. Clayton, D.G. Cardon, L.R. Craddock, N. Deloukas, P. Duncanson, A. Kwiatkowski, D.P. McCarthy, M.I. Ouwehand, W.H. ve Samani, N.J., (2007). "Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants", *Nature genetics*, 39: 1329-1337.
- [35] Szczypiorska, M. Sánchez, A. Bartolomé, N. Arteta, D. Sanz, J. Brito, E. Fernández, P. Collantes, E. Martínez, A. ve Tejedor, D., (2011). "ERAP1 polymorphisms and haplotypes are associated with ankylosing spondylitis susceptibility and functional severity in a Spanish population", *Rheumatology*, 50: 1969-1975.
- [36] Elyan, M. ve Khan, M.A., (2006). "Diagnosing ankylosing spondylitis", *The Journal of rheumatology*, 78: 12-23.
- [37] Sciences, C.f.I.O.o.M. ve Kellgren, J.H., (1963). *The epidemiology of chronic rheumatism*: Blackwell.
- [38] Bennett, P. ve Burch, T., (1967). "New York symposium on population studies in the rheumatic diseases: new diagnostic criteria", *Bull Rheum Dis*, 17: 8.
- [39] Calin, A. Porta, J. Fries, J.F. ve Schurman, D.J., (1977). "Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis", *Jama*, 237: 2613-2614.
- [40] Mansour, M. Cheema, G.S. Naguwa, S.M. Greenspan, A. Borchers, A.T. Keen, C.L. ve Gershwin, M.E., (2007). "Ankylosing spondylitis: a contemporary perspective on diagnosis and treatment": Elsevier.
- [41] Y, K., (1999). *Spondiloartritler*, D.E. Gümüşdiş G, ed. *Klinik Romatoloji*. İstanbul: Deniz Matbaası, 441-465.
- [42] Rudwaleit, M. Metter, A. Listing, J. Sieper, J. ve Braun, J., (2006). "Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria", *Arthritis & Rheumatism*, 54: 569-578.
- [43] Poddubnyy, D. ve Rudwaleit, M., (2012). "Early spondyloarthritis", *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 38: 387-403.
- [44] Van Der Linden, S. ve Van Der Heijde, D., (1998). "Ankylosing spondylitis: clinical features", *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 24: 663-676.
- [45] Mader, R., (1999). "Atypical clinical presentation of ankylosing spondylitis": Elsevier.
- [46] El Maghraoui, A. Bensabbah, R. Bahiri, R. Bezza, A. Guedira, N. ve Hajjaj-Hassouni, N., (2003). "Cervical spine involvement in ankylosing spondylitis", *Clinical rheumatology*, 22: 94-98.

- [47] Ball, J., (1971). "Enthesopathy of rheumatoid and ankylosing spondylitis", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 30: 213.
- [48] McGonagle, D. Khan, M.A. Marzo-Ortega, H. O'Connor, P. Gibbon, W. ve Emery, P., (1999). "Enthesitis in spondyloarthropathy", *Current opinion in rheumatology*, 11: 244-250.
- [49] Shaikh, S.A., (2007). "Ankylosing spondylitis: recent breakthroughs in diagnosis and treatment", *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*, 51: 249.
- [50] Gensler, L., (2011). "Clinical features of ankylosing spondylitis", *Rheumatology*, 5th edn. Mosby Elsevier, Philadelphia: 1129-1134.
- [51] Vander Linden SJ, V.d.H.D., (2000). Spondyloarthropathies, H.E. Ruddy S, Sledge CB,, ed. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: WB Saunders, 1039-1053.
- [52] Sampaio-Barros, P.D. Bertolo, M.B. Kraemer, M.H. Neto, J. ve Samara, A.M., (2001). "Primary ankylosing spondylitis: patterns of disease in a Brazilian population of 147 patients", *The Journal of rheumatology*, 28: 560-565.
- [53] Baek, H. Shin, K. Lee, Y. Kang, S. Lee, E. Yoo, C. ve Song, Y., (2004). "Clinical features of adult-onset ankylosing spondylitis in Korean patients: patients with peripheral joint disease (PJD) have less severe spinal disease course than those without PJD", *Rheumatology*, 43: 1526-1531.
- [54] Trontzas, P. Andrianakos, A. Miyakis, S. Pantelidou, K. Vafiadou, E. Garantziotou, V. ve Voudouris, C., (2005). "Seronegative spondyloarthropathies in Greece: a population-based study of prevalence, clinical pattern, and management. The ESORDIG study", *Clinical rheumatology*, 24: 583-589.
- [55] Mundinger, A. Ioannidou, M. Meske, S. Dinkel, E. Beck, A. ve Sigmund, G., (1991). "MRI of knee arthritis in rheumatoid arthritis and spondylarthropathies", *Rheumatology international*, 11: 183-186.
- [56] Vinje, O. Dale, K. ve Møller, P., (1985). "Radiographic evaluation of patients with Bechterew's syndrome (ankylosing spondylitis): findings in peripheral joints, tendon insertions and the pubic symphysis and relations to non-radiographic findings", *Scandinavian journal of rheumatology*, 14: 279-288.
- [57] Lambert, R.G. Dhillon, S.S. Jhangri, G.S. Sacks, J. Sacks, H. Wong, B. Russell, A.S. ve Maksymowych, W.P., (2004). "High prevalence of symptomatic enthesopathy of the shoulder in ankylosing spondylitis: deltoid origin involvement constitutes a hallmark of disease", *Arthritis Care & Research*, 51: 681-690.
- [58] Bostan, E.E. Borman, P. Bodur, H. ve Barca, N., (2003). "Functional disability and quality of life in patients with ankylosing spondylitis", *Rheumatology international*, 23: 121-126.
- [59] Heuft - Dorenbosch, L. Van Tubergen, A. Spoorenberg, A. Landewé, R. Dougados, M. Mielants, H. Van Der Tempel, H. ve Van Der Heijde, D., (2004). "The influence of peripheral arthritis on disease activity in ankylosing spondylitis patients as measured with the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index", *Arthritis Care & Research*, 51: 154-159.
- [60] Joshi, A.B. Markovic, L. Hardinge, K. ve Murphy, J., (2002). "Total hip arthroplasty in ankylosing spondylitis: an analysis of 181 hips", *The Journal of arthroplasty*, 17: 427-433.

- [61] Parvizi, J. Duffy, G.P. ve Trousdale, R.T., (2001). "Total knee arthroplasty in patients with ankylosing spondylitis", *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 83: 1312-1316.
- [62] Gran, J. ve Skomsvoll, J., (1997). "The outcome of ankylosing spondylitis: a study of 100 patients", *Rheumatology*, 36: 766-771.
- [63] Robertson, L. ve Davis, M., (2004). "A longitudinal study of disease activity and functional status in a hospital cohort of patients with ankylosing spondylitis", *Rheumatology*, 43: 1565-1568.
- [64] Bañares, A. Hernández-García, C. Fernández-Gutiérrez, B. ve Jover, J.A., (1998). "Eye involvement in the spondyloarthropathies", *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 24: 771-784.
- [65] Brophy, S. Pavy, S. Lewis, P. Taylor, G. Bradbury, L. Robertson, D. Lovell, C. ve Calin, A., (2001). "Inflammatory eye, skin, and bowel disease in spondyloarthritis: genetic, phenotypic, and environmental factors", *The Journal of rheumatology*, 28: 2667-2673.
- [66] Sun, J.P. Khan, M.A. Farhat, A.Z. ve Bahler, R.C., (1992). "Alterations in cardiac diastolic function in patients with ankylosing spondylitis", *International journal of cardiology*, 37: 65-72.
- [67] Cooper, C. Carbone, L. Michet, C. Atkinson, E. O'Fallon, W. ve Melton 3rd, L., (1994). "Fracture risk in patients with ankylosing spondylitis: a population based study", *The Journal of rheumatology*, 21: 1877-1882.
- [68] Vosse, D. Feldtkeller, E. Erlendsson, J. Geusens, P. ve van der Linden, S., (2004). "Clinical vertebral fractures in patients with ankylosing spondylitis", *The Journal of rheumatology*, 31: 1981-1985.
- [69] Souza Jr, A.S. Müller, N.L. Marchiori, E. Soares-Souza, L.V. ve de Souza Rocha, M., (2004). "Pulmonary abnormalities in ankylosing spondilitis: inspiratory and expiratory high-resolution CT findings in 17 patients", *Journal of thoracic imaging*, 19: 259-263.
- [70] Kiris, A. Ozgocmen, S. Kocakoc, E. Ardicoglu, O. ve Ogur, E., (2003). "Lung findings on high resolution CT in early ankylosing spondylitis", *European journal of radiology*, 47: 71-76.
- [71] Fischer, R. Trudgian, D.C. Wright, C. Thomas, G. Bradbury, L.A. Brown, M.A. Bowness, P. ve Kessler, B.M., (2012). "Discovery of candidate serum proteomic and metabolomic biomarkers in ankylosing spondylitis", *Molecular & Cellular Proteomics*, 11: M111. 013904.
- [72] Spoorenberg, A. Van der Heijde, D. De Klerk, E. Dougados, M. De Vlam, K. Mielants, H. Van der Tempel, H. ve Van der Linden, S., (1999). "Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis", *The Journal of rheumatology*, 26: 980-984.
- [73] Ruof, J. ve Stucki, G., (1999). "Validity aspects of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in ankylosing spondylitis: a literature review", *The Journal of rheumatology*, 26: 966-970.
- [74] Taylor, H. Wardle, T. Beswick, E. ve Dawes, P., (1991). "The relationship of clinical and laboratory measurements to radiological change in ankylosing spondylitis", *Rheumatology*, 30: 330-335.

- [75] Sieper, J. Braun, J. Rudwaleit, M. Boonen, A. ve Zink, A., (2002). "Ankylosing spondylitis: an overview", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61: iii8-iii18.
- [76] Franssen, M. Van de Putte, L. ve Gribnau, F., (1985). "IgA serum levels and disease activity in ankylosing spondylitis: a prospective study", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 44: 766-771.
- [77] Oostveen, J. Prevo, R. Den Boer, J. ve Van de Laar, M., (1999). "Early detection of sacroiliitis on magnetic resonance imaging and subsequent development of sacroiliitis on plain radiography. A prospective, longitudinal study", *The Journal of rheumatology*, 26: 1953-1958.
- [78] Blum, U. Buitrago-Tellez, C. Mundinger, A. Krause, T. Laubenberger, J. Vaith, P. Peter, H. ve Langer, M., (1996). "Magnetic resonance imaging (MRI) for detection of active sacroiliitis--a prospective study comparing conventional radiography, scintigraphy, and contrast enhanced MRI", *The Journal of rheumatology*, 23: 2107-2115.
- [79] Feldtkeller, E. Khan, M. van der Heijde, D. van der Linden, S. ve Braun, J., (2003). "Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis", *Rheumatology international*, 23: 61-66.
- [80] Aggarwal, R. ve Malaviya, A.N., (2009). "Diagnosis delay in patients with ankylosing spondylitis: factors and outcomes—an Indian perspective", *Clinical rheumatology*, 28: 327-331.
- [81] Yacoub, Y.I. Amine, B. Laatiris, A. Bensabbah, R. ve Hajjaj-Hassouni, N., (2012). "Relationship between diagnosis delay and disease features in Moroccan patients with ankylosing spondylitis", *Rheumatology international*, 32: 357-360.
- [82] Ozgocmen, S. Ardicoglu, O. Kamanli, A. Kaya, A. Durmus, B. Yildirim, K. Baysal, O. Gur, A. Karatay, S. ve Altay, Z., (2009). "Pattern of disease onset, diagnostic delay, and clinical features in juvenile onset and adult onset ankylosing spondylitis", *The Journal of rheumatology*, 36: 2830-2833.
- [83] Mau, W. Zeidler, H. Mau, R. Majewski, A. Freyschmidt, J. Stangel, W. ve Deicher, H., (1988). "Clinical features and prognosis of patients with possible ankylosing spondylitis. Results of a 10-year followup", *The Journal of rheumatology*, 15: 1109-1114.
- [84] Rudwaleit, M. Van der Heijde, D. Khan, M. Braun, J. ve Sieper, J., (2004). "How to diagnose axial spondyloarthritis early", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63: 535-543.
- [85] Gerdan, V. Akar, S. Solmaz, D. Pehlivan, Y. Onat, A.M. Kisacik, B. Sayarlioglu, M. Erhan, C. Tezcan, M.E. ve Ozturk, M.A., (2012). "Initial diagnosis of lumbar disc herniation is associated with a delay in diagnosis of ankylosing spondylitis", *The Journal of rheumatology*, 39: 1996-1999.
- [86] Braun, J. Sieper, J. Breban, M. Collantes-Estevez, E. Davis, J. Inman, R. Marzo-Ortega, H. ve Mielants, H., (2002). "Anti-tumour necrosis factor α therapy for ankylosing spondylitis: international experience", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61: iii51-iii60.
- [87] Dougados, M. Dijkmans, B. Khan, M. Maksymowych, W. Van Der Linden, S. ve Brandt, J., (2002). "Conventional treatments for ankylosing spondylitis", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61: iii40-iii50.

- [88] Davis, J.C. Van Der Heijde, D. Braun, J. Dougados, M. Cush, J. Clegg, D.O. Kivitz, A. Fleischmann, R. Inman, R. ve Tsuji, W., (2003). "Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial", *Arthritis & Rheumatism*, 48: 3230-3236.
- [89] van der Heijde, D. Kivitz, A. Schiff, M.H. Sieper, J. Dijkmans, B.A. Braun, J. Dougados, M. Reveille, J.D. Wong, R.L. ve Kupper, H., (2006). "Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: Results of a multicenter, randomized, double - blind, placebo - controlled trial", *Arthritis & Rheumatism*, 54: 2136-2146.
- [90] Braun, J. Brandt, J. Listing, J. Zink, A. Alten, R. Golder, W. Gromnica-Ihle, E. Kellner, H. Krause, A. ve Schneider, M., (2002). "Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial", *The Lancet*, 359: 1187-1193.
- [91] Braun, J. Landewé, R. Hermann, K.G.A. Han, J. Yan, S. Williamson, P. ve van der Heijde, D., (2006). "Major reduction in spinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab: results of a multicenter, randomized, double - blind, placebo - controlled magnetic resonance imaging study", *Arthritis & Rheumatism*, 54: 1646-1652.
- [92] Campion, G. Jarner, D. ve Calin, A., (1986). "The differential effect of rest and exercise in rheumatoid arthritis and ankylosing-spondylitis": Oxford Univ Press United Kingdom Walton St Journals Dept, Oxford, England Ox2 6dp.
- [93] Raithel, K.S., (1989). "Chronic Pain and Exercise Therapy", *Physician and Sportsmedicine*, 17: 203-205,208.
- [94] Brewerton, D. Hart, F. Nicholls, A. Caffrey, M. James, D. ve Sturrock, R., (1973). "Ankylosing spondylitis and HL-A 27", *The Lancet*, 301: 904-907.
- [95] Schlosstein, L. Terasaki, P.I. Bluestone, R. ve Pearson, C.M., (1973). "High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis", *New England Journal of Medicine*, 288: 704-706.
- [96] Consortium, I.G.o.A.S., (2013). "Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci", *Nature genetics*, 45: 730-738.
- [97] Jaakkola, E. Herzberg, I. Laiho, K. Barnardo, M.C. Pointon, J.J. Kauppi, M. Kaarela, K. Tuomilehto-Wolf, E. Tuomilehto, J. ve Wordsworth, B.P., (2006). "Finnish HLA studies confirm the increased risk conferred by HLA-B27 homozygosity in ankylosing spondylitis", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65: 775-780.
- [98] Khan, M. Kushner, I. Braun, W. Zachary, A. ve Steinberg, A., (1978). "HLA—B27 Homozygosity in Ankylosing Spondylitis: Relationship to Risk and Severity", *Tissue Antigens*, 11: 434-438.
- [99] Evans, D.M. Spencer, C.C. Pointon, J.J. Su, Z. Harvey, D. Kochan, G. Oppermann, U. Dilthey, A. Pirinen, M. ve Stone, M.A., (2011). "Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility", *Nature genetics*, 43: 761-767.

- [100] MacLean, I. Iqbal, S. Woo, P. Keat, A. Hughes, R. KINGSLEYJ, G. ve Knight, S., (1993). "HLA - B27 subtypes in the spondarthropathies", *Clinical & Experimental Immunology*, 91: 214-219.
- [101] Reveille, J. Inman, R. Khan, M. Yu, D. ve Jin, L., (2000). "Family studies in ankylosing spondylitis: microsatellite analysis of 55 concordant sib pairs", *J Rheumatol*, 27: 5.
- [102] Lopez - Larrea, C. Sujirachato, K. Mehra, N. Chiewsilp, P. Isarangkura, D. Kanga, U. Dominguez, O. Coto, E. Pena, M. ve Setien, F., (1995). "HLA - B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis Evidence for new associations", *Tissue Antigens*, 45: 169-176.
- [103] Gonzalez - Rocas, S. Alvarez, M. Gonzalez, S. Dieye, A. Makni, H. Woodfield, D. Housan, L. Konenkov, V. Abbadi, M. ve Grunnet, N., (1997). "HLA - B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis", *Tissue Antigens*, 49: 116-123.
- [104] Armas, J.B. Gonzalez, S. Martinez - Borra, J. Laranjeira, F. Ribeiro, E. Correia, J. Ferreira, M. Toste, M. López - Vazquez, A. ve López - Larrea, C., (1999). "Susceptibility to ankylosing spondylitis is independent of the Bw4 and Bw6 epitopes of HLA - B27 alleles", *Tissue Antigens*, 53: 237-243.
- [105] García, R. Rognan, D. Lamas, J. Marina, A. ve Castro, J., (1998). "An HLA - B27 polymorphism (B* 2710) that is critical for T - cell recognition has limited effects on peptide specificity", *Tissue Antigens*, 51: 1-9.
- [106] García - Fernández, S. Gonzalez, S. Mina Blanco, A. Martinez - Borra, J. Blanco - Gelaz, M. López - Vazquez, A. ve López - Larrea, C., (2001). "New insights regarding HLA - B27 diversity in the Asian population", *Tissue Antigens*, 58: 259-262.
- [107] Djouadi, K. Nedelec, B. Tamouza, R. Genin, E. Ramasawmy, R. Charron, D. Delpech, M. ve Laoussadi, S., (2001). "Interleukin 1 gene cluster polymorphisms in multiplex families with spondylarthropathies", *Cytokine*, 13: 98-103.
- [108] Brown, M.A., (2009). "Genetics and the pathogenesis of ankylosing spondylitis", *Current opinion in rheumatology*, 21: 318-323.
- [109] McLean, I. Adams, D. ve Highton, J., (1985). "HLA-B27 and ankylosing spondylitis: an anti-idiotypic model", *Journal of clinical & laboratory immunology*, 18: 123-127.
- [110] Robinson, W.P. Van Der Linden, S.M. Khan, M.A. Rentsch, H.U. Cats, A. Russell, A. ve Thomson, G., (1989). "HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27+ patients", *Arthritis & Rheumatism*, 32: 1135-1141.
- [111] Brown, M.A. Pile, K.D. Kennedy, L.G. Calin, A. Darke, C. Bell, J. Wordsworth, B.P. ve Cornelis, F., (1996). "HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 55: 268-270.
- [112] Wei, J. Tsai, W. Lin, H. Tsai, C. ve Chou, C., (2004). "HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients", *Rheumatology*, 43: 839-842.
- [113] Calin, A. Marder, A. Becks, E. ve Burns, T., (1983). "Genetic differences between B27 positive patients with ankylosing spondylitis and B27 positive healthy controls", *Arthritis & Rheumatism*, 26: 1460-1464.

- [114] Van der Linden, S. Valkenburg, H. ve Cats, A., (1983). "The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals: a family and population study", *Rheumatology*, 22: 18-19.
- [115] Brown, M.A. Kennedy, L.G. Macgregor, A.J. Darke, C. Duncan, E. Shatford, J.L. Taylor, A. Calin, A. ve Wordsworth, P., (1997). "Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins the role of genes, HLA, and the environment", *Arthritis & Rheumatism*, 40: 1823-1828.
- [116] Pedersen, O. Svendsen, A.J. Ejstrup, L. Skytthe, A. Harris, J. ve Junker, P., (2008). "Ankylosing spondylitis in Danish and Norwegian twins: occurrence and the relative importance of genetic vs. environmental effectors in disease causation", *Scandinavian journal of rheumatology*, 37: 120-126.
- [117] Pickart, C.M., (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination", *Annual review of biochemistry*, 70: 503-533.
- [118] Wang, S. Adrianto, I. Wiley, G.B. Lessard, C.J. Kelly, J.A. Adler, A.J. Glenn, S.B. Williams, A.H. Ziegler, J.T. ve Comeau, M.E., (2012). "A functional haplotype of UBE2L3 confers risk for systemic lupus erythematosus", *Genes and immunity*, 13: 380-387.
- [119] Consortium, G.A.o.P. ve 2, t.W.T.C.C.C., (2010). "A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1", *Nature genetics*, 42: 985-990.
- [120] Szabo, M. Safrany, E. Pazar, B. Melegh, B.I. Kisfali, P. Poor, G. Figler, M. Szekanecz, Z. Czirjak, L. ve Melegh, B., (2013). "Marked diversity of IL23R gene haplotype variants in rheumatoid arthritis comparing with Crohn's disease and ankylosing spondylitis", *Molecular biology reports*, 40: 359-363.
- [121] Pointon, J.J. Harvey, D. Karaderi, T. Appleton, L.H. Farrar, C. Stone, M.A. Sturrock, R.D. Reveille, J.D. Weisman, M.H. ve Ward, M.M., (2010). "The chromosome 16q region associated with ankylosing spondylitis includes the candidate gene tumour necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD)", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69: 1243-1246.
- [122] Bang, S.-Y. Kim, T.-H. Lee, B. Kwon, E. Choi, S.H. Lee, K.S. Shim, S.C. Pope, A. Rahman, P. ve Reveille, J.D., (2011). "Genetic studies of ankylosing spondylitis in Koreans confirm associations with ERAP1 and 2p15 reported in white patients", *The Journal of rheumatology*, 38: 322-324.
- [123] Davidson, S.I. Liu, Y. Danoy, P.A. Wu, X. Thomas, G.P. Jiang, L. Sun, L. Wang, N. Han, J. ve Han, H., (2011). "Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70: 289-292.
- [124] Safrany, E. Pazar, B. Csöngéi, V. Jaromi, L. Polgar, N. Sipeky, C. Horvath, I. Zeher, M. Poór, G. ve Melegh, B., (2009). "Variants of the IL23R gene are associated with ankylosing spondylitis but not with Sjögren syndrome in Hungarian population samples", *Scandinavian journal of immunology*, 70: 68-74.
- [125] Lin, Z. Bei, J.-X. Shen, M. Li, Q. Liao, Z. Zhang, Y. Lv, Q. Wei, Q. Low, H.-Q. ve Guo, Y.-M., (2012). "A genome-wide association study in Han Chinese identifies new susceptibility loci for ankylosing spondylitis", *Nature genetics*, 44: 73-77.
- [126] Haroon, N. Maksymowych, W.P. Rahman, P. Tsui, F.W. O'Shea, F.D. ve Inman, R.D., (2012). "Radiographic severity of ankylosing spondylitis is associated with

- polymorphism of the large multifunctional peptidase 2 gene in the Spondyloarthritis Research Consortium of Canada cohort", *Arthritis & Rheumatism*, 64: 1119-1126.
- [127] Wong, R.-H. Wei, J.C.-C. Huang, C.-H. Lee, H.-S. Chiou, S.-Y. Lin, S.-H. Cai, Y.-W. Hung, P.-H. Wang, M.-F. ve Yang, S.-F., (2012). "Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity of ankylosing spondylitis", *The Journal of rheumatology*, 39: 135-140.
 - [128] Consortium, G.P., (2010). "A map of human genome variation from population-scale sequencing", *Nature*, 467: 1061-1073.
 - [129] Brookes, A.J., (1999). "The essence of SNPs", *Gene*, 234: 177-186.
 - [130] Ingelman - Sundberg, M., (2001). "Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy", *Journal of internal medicine*, 250: 186-200.
 - [131] Thomson, M.J., (2010). *Molecular plant breeding*: CABI.
 - [132] Thomas, K., A Simple Method for Estimating the Rate of Transition vs. Transversion Mutations, <http://asserttrue.blogspot.com.tr/2013/06/a-simple-method-for-estimating-rate-of.html#>, 31 Ekim 2014.
 - [133] Chasman, D. ve Adams, R.M., (2001). "Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation", *Journal of molecular biology*, 307: 683-706.
 - [134] Kwok, P.-Y., (2003). "Single Nucleotide Polymorphisms", Humana, Totowa, NJ.
 - [135] Ateş Sönmezoglu, Ö.Y., A. Eserkaya Güleç, T., (2010). "Tek Nükleotid Farklılıkları (Snp) ve Buğdayda Kullanımı", *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3: 55-66.
 - [136] Consortium, I.H., (2010). "Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations", *Nature*, 467: 52-58.
 - [137] Kerem, B.-s. Rommens, J.M. Buchanan, J.A. Markiewicz, D. Cox, T.K. Chakravarti, A. Buchwald, M. ve Tsui, L.-C., (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis", *Science*, 245: 1073-1080.
 - [138] Bush, W.S. ve Moore, J.H., (2012). "Genome-wide association studies", *PLoS computational biology*, 8: e1002822.
 - [139] Taira, C. Matsuda, K. Yamaguchi, A. Sueki, A. Koeda, H. Takagi, F. Kobayashi, Y. Sugano, M. ve Honda, T., (2013). "Novel high-speed droplet-allele specific-polymerase chain reaction: Application in the rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms", *Clinica Chimica Acta*, 424: 39-46.
 - [140] Grin, B. Loeb, S. Roehl, K. Cooper, P.R. Catalona, W.J. ve Helfand, B.T., (2014). "A rare 8q24 single nucleotide polymorphism (SNP) predisposes North American men to prostate cancer and possibly more aggressive disease", *BJU international*.
 - [141] Milne, R.L. Herranz, J. Michailidou, K. Dennis, J. Tyrer, J.P. Zamora, M.P. Arias-Perez, J.I. González-Neira, A. Pita, G. ve Alonso, M.R., (2014). "A large-scale assessment of two-way SNP interactions in breast cancer susceptibility using 46 450 cases and 42 461 controls from the breast cancer association consortium", *Human molecular genetics*, 23: 1934-1946.
 - [142] He, Q. He, Q. Liu, X. Wei, Y. Shen, S. Hu, X. Li, Q. Peng, X. Wang, L. ve Yu, L., (2014). "Genome-wide prediction of cancer driver genes based on SNP and cancer SNV data", *American journal of cancer research*, 4: 394.

- [143] WTCCC, T., (2007). "Association scan of 14,500 nsSNPs in four common diseases identifies variants involved in autoimmunity", *Nature genetics*, 39: 1329.
- [144] Kwok, P.-Y. ve Chen, X., (2003). "Detection of single nucleotide polymorphisms", *Current issues in molecular biology*, 5: 43-60.
- [145] Landegren, U. Nilsson, M. ve Kwok, P.-Y., (1998). "Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis", *Genome Research*, 8: 769-776.
- [146] Orita, M. Iwahana, H. Kanazawa, H. Hayashi, K. ve Sekiya, T., (1989). "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 2766-2770.
- [147] Lichten, M.J. ve Fox, M.S., (1983). "Detection of non-homology-containing heteroduplex molecules", *Nucleic acids research*, 11: 3959-3971.
- [148] Wang, D.G. Fan, J.-B. Siao, C.-J. Berne, A. Young, P. Sapolsky, R. Ghandour, G. Perkins, N. Winchester, E. ve Spencer, J., (1998). "Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome", *Science*, 280: 1077-1082.
- [149] Kwok, P.-Y., (2000). "High-throughput genotyping assay approaches", *Pharmacogenomics*, 1: 95-100.
- [150] Ragoussis, J., (2006). "Genotyping technologies for all", *Drug Discovery Today: Technologies*, 3: 115-122.
- [151] Sequenom, (2009). iPLEX Gold Application Guide, Sequenom, ed^eds.
- [152] Sauer, S., (2006). "Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications", *Clinica Chimica Acta*, 363: 95-105.
- [153] Gabriel, S. Ziaugra, L. ve Tabbaa, D., (2009). "SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform", *Current protocols in human genetics*: 2.12. 11-12.12. 16.
- [154] Tanaka, K. Waki, H. Ido, Y. Akita, S. Yoshida, Y. Yoshida, T. ve Matsuo, T., (1988). "Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time? of? flight mass spectrometry", *Rapid communications in mass spectrometry*, 2: 151-153.
- [155] Aebersold, R. ve Mann, M., (2003). "Mass spectrometry-based proteomics", *Nature*, 422: 198-207.
- [156] Tost, J. ve Gut, I.G., (2005). "Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications", *Clinical biochemistry*, 38: 335-350.
- [157] Edwards, J.R. Ruparel, H. ve Ju, J., (2005). "Mass-spectrometry DNA sequencing", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 573: 3-12.
- [158] Sequenom, (2009). iPLEX® Gold SNP Genotyping Training Protocol, Sequenom, ed^eds.
- [159] Sambrook, J. Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., (1989). *Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press New York*.
- [160] Sivas, H., (2009). *Populasyon Genetiği*, H. Sivas, ed. Genetik. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, 196-211.

- [161] Dudek, R.W., (2010). Genetics: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- [162] Hardy, G.H., (1908). "Mendelian proportions in a mixed population", *Science*, 28: 49-50.
- [163] Weinberg, W., (1908). "Über vererbungsgesetze beim menschen", *Molecular and General Genetics MGG*, 1: 440-460.
- [164] Wang, W.Y. Barratt, B.J. Clayton, D.G. ve Todd, J.A., (2005). "Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns", *Nature Reviews Genetics*, 6: 109-118.
- [165] Lewis, C.M., (2002). "Genetic association studies: design, analysis and interpretation", *Briefings in bioinformatics*, 3: 146-153.
- [166] Wen, Y.-F. Wei, J.C.-C. Hsu, Y.-W. Chiou, H.-Y. Wong, H.S.-C. Wong, R.-H. Ikegawa, S. ve Chang, W.-C., (2014). "rs10865331 Associated with Susceptibility and Disease Severity of Ankylosing Spondylitis in a Taiwanese Population", *PloS one*, 9: e104525.
- [167] Karaderi, T. Keidel, S. Pointon, J. Appleton, L. Brown, M. Evans, D. ve Wordsworth, B., (2014). "Ankylosing spondylitis is associated with the anthrax toxin receptor 2 gene (ANTXR2)", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73: 2054-2058.
- [168] Chen, R. Yao, L. Meng, T. ve Xu, W., (2012). "The association between seven ERAP1 polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis involving 8,530 cases and 12,449 controls", *Rheumatology international*, 32: 909-914.
- [169] Wang, C.-M. Ho, H.-H. Chang, S.-W. Wu, Y. Lin, J.-C. Chang, P.-Y. Wu, J. ve Chen, J.-Y., (2012). "ERAP1 genetic variations associated with HLA-B27 interaction and disease severity of syndesmophytes formation in Taiwanese ankylosing spondylitis", *Arthritis Res Ther*, 14: 125.
- [170] Harvey, D. Pointon, J.J. Evans, D.M. Karaderi, T. Farrar, C. Appleton, L.H. Sturrock, R.D. Stone, M.A. Oppermann, U. ve Brown, M.A., (2009). "Investigating the genetic association between ERAP1 and ankylosing spondylitis", *Human molecular genetics*, 18: 4204-4212.
- [171] Lee, Y.H. Choi, S.J. Ji, J.D. ve Song, G.G., (2011). "Associations between ERAP1 polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis", *Inflammation Research*, 60: 999-1003.
- [172] Tsui, F.W. Haroon, N. Reveille, J.D. Rahman, P. Chiu, B. Tsui, H.W. ve Inman, R.D., (2010). "Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69: 733-736.
- [173] Maksymowych, W. Inman, R. Gladman, D. Reeve, J. Pope, A. ve Rahman, P., (2009). "Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis", *Arthritis & Rheumatism*, 60: 1317-1323.
- [174] Lee, Y.H. Choi, S.J. Ji, J.D. ve Song, G.G., (2012). "Associations between interleukin-23R polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis", *Inflammation Research*, 61: 143-149.
- [175] Duan, Z. Pan, F. Zeng, Z. Zhang, T. Wang, S. Li, G. Xu, S. Xu, J. ve Zhang, L., (2012). "Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and ankylosing

- spondylitis susceptibility: a meta-analysis", *Rheumatology international*, 32: 1209-1214.
- [176] Rahman, P. Inman, R.D. Gladman, D.D. Reeve, J.P. Peddle, L. ve Maksymowych, W.P., (2008). "Association of interleukin - 23 receptor variants with ankylosing spondylitis", *Arthritis & Rheumatism*, 58: 1020-1025.
 - [177] Lunetta, K.L., (2008). "Genetic association studies", *Circulation*, 118: 96-101.
 - [178] Sariyel, V. ve Yıldız, M.A., (2008). "Hemoglobin Polymorphism in Japanese Quails (*Coturnix japonica*) ", *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 22 (46):(2008) 48-50, 22: 48-50.
 - [179] Sturiale, C.L. Gatto, I. Puca, A. D'Arrigo, S. Giarretta, I. Albanese, A. Di Rocco, C. Maira, G. ve Pola, R., (2013). "Association between the rs1333040 polymorphism on the chromosomal 9p21 locus and sporadic brain arteriovenous malformations", *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry: jnnp-2012-304045*.
 - [180] Pimentel-Santos, F. Ligeiro, D. Matos, M. Mourao, A. Sousa, E. Pinto, P. Ribeiro, A. Sousa, M. Barcelos, A. ve Godinho, F., (2009). "Association of IL23R and ERAP1 genes with ankylosing spondylitis in a Portuguese population".
 - [181] Karaderi, T. Harvey, D. Farrar, C. Appleton, L.H. Stone, M.A. Sturrock, R.D. Brown, M.A. Wordsworth, P. ve Pointon, J.J., (2009). "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*, 48: 386-389.
 - [182] Sung, I.-H. Kim, T.-H. Bang, S.-Y. Kim, T.-J. Lee, B. Peddle, L. Rahman, P. Greenwood, C.M. Hu, P. ve Inman, R.D., (2009). "IL-23R polymorphisms in patients with ankylosing spondylitis in Korea", *The Journal of rheumatology*, 36: 1003-1005.
 - [183] Kugathasan, S. Baldassano, R.N. Bradfield, J.P. Sleiman, P.M. Imielinski, M. Guthery, S.L. Cucchiara, S. Kim, C.E. Frackelton, E.C. ve Annaiah, K., (2008). "Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease", *Nature genetics*, 40: 1211-1215.
 - [184] Bircan, H., (2004). "Lojistik regresyon analizi: Tıp verileri üzerine bir uygulama", *Kocaeli Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 2: 185-208.
 - [185] Reveille, J.D., Sims, A., Maksymowych, W.P., Ward, M.M., Stone, M.A., Rahman, P., Weisman, M.H., Inman, R.D., Gladman, D.D., Davis, J.C., Learch, T.J., Savage, L., Diekman, L., Danoy, P., Pointon, J.J., Zhou, X., Evans, D., Wordsworth, B.P., Brown, M.A., (24-29 October 2008). Genomewide Association Study in Ankylosing Spondylitis Identifies Major Non-MHC Genetic Determinants of Disease Susceptibility, eds. American College of Rheumatology 2008 Annual Scientific Meeting. California.
 - [186] Schaub, M.A. Boyle, A.P. Kundaje, A. Batzoglou, S. ve Snyder, M., (2012). "Linking disease associations with regulatory information in the human genome", *Genome Research*, 22: 1748-1759.
 - [187] Karasugi, T. Semba, K. Hirose, Y. Kelempisioti, A. Nakajima, M. Miyake, A. Furuichi, T. Kawaguchi, Y. Mikami, Y. ve Chiba, K., (2009). "Association of the tag SNPs in the human SKT gene (KIAA1217) with lumbar disc herniation", *Journal of Bone and Mineral Research*, 24: 1537-1543.

- [188] Song, Y.-Q. Karasugi, T. Cheung, K.M. Chiba, K. Ho, D.W. Miyake, A. Kao, P.Y. Sze, K.L. Yee, A. ve Takahashi, A., (2013). "Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant", *The Journal of clinical investigation*, 123: 4909.
- [189] Aparicio, J.P. Bances, I.F. Fernández, E.L.-A. Montes, A. Aparicio, A.P. Vázquez, J.P. García, S.R. García, S.A. Fernández, P.L. ve Valle-Garay, E., (2011). "The IL-1 β (+ 3953 T/C) gene polymorphism associates to symptomatic lumbar disc herniation", *European Spine Journal*, 20: 383-389.
- [190] Lin, W. Lin, J. Chen, X. Wu, C. Zhang, L. Huang, Z. ve Lai, J., (2011). "Interleukin-10 promoter polymorphisms associated with susceptibility to lumbar disc degeneration in a Chinese cohort", *Genet Mol Res*, 10: 1719-1727.
- [191] Videman, T. Saarela, J. Kaprio, J. Näkki, A. Levälahti, E. Gill, K. Peltonen, L. ve Battié, M.C., (2009). "Associations of 25 structural, degradative, and inflammatory candidate genes with lumbar disc desiccation, bulging, and height narrowing", *Arthritis & Rheumatism*, 60: 470-481.
- [192] Williams, F.M. Bansal, A.T. van Meurs, J.B. Bell, J.T. Meulenbelt, I. Suri, P. Rivadeneira, F. Sambrook, P.N. Hofman, A. ve Bierma-Zeinstra, S., (2013). "Novel genetic variants associated with lumbar disc degeneration in northern Europeans: a meta-analysis of 4600 subjects", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72: 1141-1148.
- [193] Rajasekaran, S. Kanna, R.M. Senthil, N. Raveendran, M. Cheung, K.M. Chan, D. Subramaniam, S. ve Shetty, A.P., (2013). "Phenotype variations affect genetic association studies of degenerative disc disease: conclusions of analysis of genetic association of 58 single nucleotide polymorphisms with highly specific phenotypes for disc degeneration in 332 subjects", *The Spine Journal*, 13: 1309-1320.
- [194] Rajasekaran, S. Kanna, R.M. Senthil, N. Raveendran, M. Ranjani, V. Cheung, K.M. Chan, D. Kao, P.Y. Yee, A. ve Shetty, A.P., (2014). "Genetic susceptibility of lumbar degenerative disc disease in young Indian adults", *European Spine Journal*: 1-7.
- [195] Mu, J. Ge, W. Zuo, X. Chen, Y. ve Huang, C., (2014). "A SNP in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to symptomatic lumbar disc herniation in the Chinese Han population", *European Spine Journal*, 23: 498-503.
- [196] Mayer, J.E. Iatridis, J.C. Chan, D. Qureshi, S.A. Gottesman, O. ve Hecht, A.C., (2013). "Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration", *The Spine Journal*, 13: 299-317.
- [197] Seki, S. Kawaguchi, Y. Chiba, K. Mikami, Y. Kizawa, H. Oya, T. Mio, F. Mori, M. Miyamoto, Y. ve Masuda, I., (2005). "A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease", *Nature genetics*, 37: 607-612.
- [198] Kaipiainen-Seppänen, O. Aho, K. ve Heliovaara, M., (1997). "Incidence and prevalence of ankylosing spondylitis in Finland", *The Journal of rheumatology*, 24: 496-499.
- [199] Anagnostopoulos, I. Zinzaras, E. Alexiou, I. Papathanasiou, A.A. Davas, E. Koutroumpas, A. Barouta, G. ve Sakkas, L.I., (2010). "The prevalence of

- rheumatic diseases in central Greece: a population survey", *BMC musculoskeletal disorders*, 11: 98.
- [200] Alamanos, Y. Papadopoulos, N. Voulgari, P. Karakatsanis, A. Siozos, C. ve Drosos, A., (2004). "Epidemiology of ankylosing spondylitis in Northwest Greece, 1983–2002", *Rheumatology*, 43: 615-618.
 - [201] De Angelis, R. Salaffi, F. ve Grassi, W., (2007). "Prevalence of spondyloarthropathies in an Italian population sample: a regional community-based study", *Scandinavian journal of rheumatology*, 36: 14-21.
 - [202] Gran, J. Husby, G. ve Hordvik, M., (1985). "Prevalence of ankylosing spondylitis in males and females in a young middle-aged population of Tromsø, northern Norway", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 44: 359-367.
 - [203] Davatchi, F. Jamshidi, A.-R. Banihashemi, A.T. Gholami, J. Forouzanfar, M.H. Akhlaghi, M. Barghamdi, M. Noorolahzadeh, E. Khabazi, A.-R. ve Salesi, M., (2008). "WHO-ILAR COPCORD study (stage 1, urban study) in Iran", *The Journal of rheumatology*, 35: 1384-1390.
 - [204] Chou, C.-T. Pei, L. Chang, D.-M. Lee, C.-F. Schumacher, H. ve Liang, M., (1994). "Prevalence of rheumatic diseases in Taiwan: a population study of urban, suburban, rural differences", *The Journal of rheumatology*, 21: 302-306.
 - [205] Mikkelsen, W.M. Dodge, H.J. Duff, I.F. ve Kato, H., (1967). "Estimates of the prevalence of rheumatic diseases in the population of Tecumseh, Michigan, 1959–60", *Journal of chronic diseases*, 20: 351-369.
 - [206] Reyes-Llerena, G.A. Guibert-Toledano, M. Penedo-Coello, A. Pérez-Rodríguez, A. Baez-Duenas, R.M. Charnicharo-Vidal, R. ve Cardiel, M.H., (2009). "Community-based study to estimate prevalence and burden of illness of rheumatic diseases in Cuba: a COPCORD study", *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, 15: 51-55.
 - [207] Liao, Z. Pan, Y. Huang, J. Huang, F. Chi, W. Zhang, K. Lin, Z. Wu, Y. He, W. ve Wu, J., (2009). "An epidemiological survey of low back pain and axial spondyloarthritis in a Chinese Han population", *Scandinavian journal of rheumatology*, 38: 455-459.
 - [208] Ye, Z. Zhuang, J. Wang, X. Li, J. ve Zhang, L., (2006). "Epidemiological survey on prevalence of ankylosing spondylitis in 5992 Shenzhen inhabitants", *Chin J Clin Rheumatol*, 10: 159-161.
 - [209] Çakır, N. Pamuk, Ö.N. Derviş, E. İmeryüz, N. Uslu, H. Benian, Ö. Elçi, E. Erdem, G. Sarvan, F.O. ve Şenocak, M., (2012). "The prevalences of some rheumatic diseases in western Turkey: Havsa study", *Rheumatology international*, 32: 895-908.

EK-A

ETİK KURUL ONAYI

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU				
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"TOPLUMUMUZDA ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALIĞINA GENETİK YATKINLIĞIN KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ İLE BELİRLENMESİ"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	2013/111			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Dilek TURGUT BALIK			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İSTANBUL			
DESTEKLEYİCİ				
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
Belge Adı			Açıklama
TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
SİGORTA	☐		
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
İLAN	☐		
YILLIK BİLDİRİM	☐		
SONUÇ RAPORU	☐		
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
Diğer	☐		
Karar No:	Tarih: 14.08.2013		
Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemi, dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

Sayfa 1

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı / Protokol Numarası: Toplumumuzda ankilozan spondilit hastalığına genetik yatkınlığın kütle spektroskopisi ile belirlenmesi

Araştırmanın Konusu: Bu araştırmanın konusu toplumumuzda ankilozan spondilit hastalığına genetik yatkınlığı belirlemede tek nükleotid polimorfizmlerinin rolünün araştırılmasıdır.

Araştırmanın Amacı: Bu araştırmanın temel amacı; toplumumuzda ankilozan spondilit hastalığına genetik yatkınlığı belirleyerek, ileride hastalığın erken dönemde, kısa sürede tanısının konulmasına yardımcı olacak genetik yönlendirmeyi sağlamak, doğru ve erken tanıyı takiben, yaşam kalitesini olumsuz etkileyecek postür ve omurga bozuklukları oluşmadan, işgücü kaybı olmadan, doğru aşamada, hastalığın önleyici ve durdurucu tedavisinin uygulanmasının başlatılmasına katkı sunmaktır.

Araştırmanın Süresi: 24 ay

Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı: 180-200

Araştırmada İzlenecek Yöntem: Çalışmaya başlayabilmek için yöntemin ilk basamağında hasta ve kontrol bireylerinden periferik kan alımına ihtiyaç duyulmaktadır. Deneysel basamaklar; Kan örneklerinin alınması, Genomik DNA izolasyonu, Multiplex PCR, Genotip Analizi, İstatistik Analiz şeklindedir. İzole edilecek olan DNA örnekleri deneysel çalışma tamamlanıp önerilen çalışma ile ilgili bütün bilimsel veriler yayınlanıncaya kadar muhafaza edilecektir.

Alternatif Tedavi veya Girişimler: -

Araştırma Sırasında Karşılaşılabilecek Riskler: Çalışmalarda hasta ile ilgili herhangi bir risk bulunmamaktadır. Hastalardan kan alımı sonrası tüm çalışmalar laboratuvar ortamında gerçekleştirilecektir.

Araştırma İlacının Olası Yan Etkileri: Araştırmada hastaya ilaç uygulaması yapılmayacaktır.

Alınan örnekler sadece önerilen çalışmada kullanılacaktır. Hasta veya temsilcisinin araştırmaya katılmayı kabul etmedikleri durumda hastanın tetkik ve tedavisinde hiçbir aksama yaşanmayacaktır.

Bilgilendirilmiş Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Hasta No:

Hastanın Adı, Soyadı / İmzası:

Hastanın Doğum tarihi:

(Gerekli veya zorunlu durumlarda) Hastanın veli/vasisinin Adı, Soyadı / İmzası:

Doktorun İmzası:

Tanığın Adı, Soyadı / İmzası:

Tarih:

HASTA BİLGİ FORMU

HASTA BİLGİ FORMU

İşlem esnasında ve sonrasında gerekli olabileceği düşünülen bilgileri içeren aşağıdaki soruları lütfen dikkatlice okuyarak cevaplayınız

Adı Soyadı :
 Protokol No :
 Doğum Tarihi :
 Doğum Yeri :
 Tanı Yöntemi :

Bölüm :
 Tarih :
 Cinsiyeti : E ☐ K ☐

1.	<u>Sikayetleriniz ne kadar zamandır devam ediyor?</u>		
2.	<u>Ankilozan spondilit tanısı ne zaman konuldu ?</u>		
3.	<u>Ankilozan spondilit tanısı kim tarafından konuldu?</u>		
Romatolog/FTR/Klinik			
4.	Ailenizde <u>inflamatuvar bağırsak hastalığı</u> tanısı konmuş hasta var mı?	Evet ☐	Hayır ☐
Cevabınız evet ise : <u>Yakınlık derecesi:</u>			
5.	Ailenizde herhangi bir <u>romatizmal rahatsızlığı</u> olan var mı?	Evet ☐	Hayır ☐
Cevabınız evet ise : <u>Yakınlık derecesi</u>			
6.	Ailenizde <u>psöriatik artrit</u> tanısı konmuş hasta var mı?	Evet ☐	Hayır ☐
Cevabınız evet ise : <u>Yakınlık derecesi</u>			
7.	Ailenizde bel fıtığı tanısı konmuş hasta var mı?	Evet ☐	Hayır ☐
Cevabınız evet ise : <u>Yakınlık derecesi :</u>			
8.	Ailenizde <u>ankilozan spondilit</u> tanısı konmuş hasta var mı?	Evet ☐	Hayır ☐
Cevabınız evet ise : <u>Yakınlık derecesi</u>			

Ev Tel:

Cep Tel.:

Adres:

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ekrem AKBULUT
Doğum Tarihi ve Yeri : 10.02.1978, Malatya
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ekremakbulut@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	-
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji	Fırat Üniversitesi	2003
Lisans	Biyoloji	İnönü Üniversitesi	2000
Lise	Türkçe-Matematik	Malatya Lisesi	1995

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2013-	Tunceli Üniversitesi Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü	Öğretim Görevlisi
2009-2013	EGA Danışmanlık ve İnşaat Ltd. Şti.	Genel Müdür

2007-2009	Türkoğlu Gıda ve Tekstil A.Ş.	Proje Koordinatörü
2006-2007	Atamis İlaç Sanayi A.Ş.	Eğitmen
2004-2006	Şitoğlu Gıda Ltd Şti.	Genel Müdür Yardımcısı

YAYINLARI

Makale

1. Turgut-Balik, D., **E. Akbulut**, D. Shoemark, V. Çelik, R. Sessions, K. Moreton, J. Holbrook, L. Brady , Cloning and Sequence Analysis of Lactate Dehydrogenase Gene from Human Malaria Parasite Plasmodium vivax , Biotechnology Letters , 26 , 1051-1055 , 2004.
2. **Akbulut, E.**, Çelik, V., Turgut-Balik, D. , Plasmodium vivax ve Plasmodium falciparum'un Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genlerinin Nükleotid Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi , Türkiye Parazitoloji Dergisi. , 29 (3) , 149-153 , 2005.

Bildiri

1. Çelik, V., **E. Akbulut**, D. Turgut-Balık, “*Plasmodium falciparum*’un Laktat Dehidrogenaz Enziminin Bazı Rezidülerinin Mutagenез İle Analizi”, *XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Sayfa: 23, Malatya, 4-7 Eylül 2002, Sözlü Bildiri.
2. D. Turgut-Balık, **E. Akbulut**, V. Çelik, L. Brady, “*Plasmodium vivax*’ın laktat dehidrogenaz enzimini kodlayan geninin izolasyonu ve klonlanması.” *XIII. Ulusal Parazitoloji Kongresi*, Sayfa:43, Konya, 8-12 Eylül 2003. Bu çalışma Kongrede Konferans olarak sunulmuştur.
3. **Akbulut, E.**, V. Çelik, L. Brady, D. Turgut-Balık, Ortak Hedef Belirleme Açısından İnsan Sıtma Parazitlerinin İki Türünün Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genlerinin Nükleotid Düzeyinde Karşılaştırmalı Analizi, *14. Biyoteknoloji Kongresi*, Eskişehir, 31 Ağustos - 2 Eylül 2005, Sözlü Bildiri.

Kitap

1. Turgut-Balık D, Erdemir A., Ozkan E, **Akbulut E**, Schaum’s Outlines Biology Third Edition, Chapter 7, The Nature of the Gene, Nobel Akademik Yayıncılık, Editör: Mehmet Karataş (Çeviri Editör’e gönderildi).

Proje

1. “*Plasmodium vivax*’ın Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle İzolasyonu ve Klonlanması”, FÜBAP (Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri) Projesi, Proje No: 694, Araştırmacı, 2001-2003.
2. “Toplumumuzda ankilozan spondilit hastalığına yatkınlığın kütle spektroskopisi ile belirlenmesi” Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Doktora Projesi, Proje No: 2014-07-04-DOP01, Araştırmacı, 2014-.
3. “Pendimethalin herbisiti uygulanan Dinçer ve Remzibey Aspir (*Carthamus tinctorius*) çeşitlerinde bazı biyokimyasal değişimlerin incelenmesi” Tunceli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Projesi, Proje No: MFTUB-014-08, Araştırmacı, 2014-.
4. “Theileriosis’in tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ilaç adayı tespit etmek için Kumarin türevlerinin *Theileria annulata*’nın enolaz enzimin inhibisyon potansiyelinin araştırılması”, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Ar-Ge Destek Programı, Proje No: , Araştırmacı, 2014-.

Üyelikler

1. Türk Biyokimya Derneği
2. Avrupa Biyokimya Dernekleri Fedarasyonu (FEBS)

Ödülleri

1. TÜBİTAK-2237 “Proje eğitimi etkinliklerini destekleme programı”, Eğitim Katılım Desteği, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2013.
2. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Bursu, 2014.

Diğer

Teknik Not: Batu, A., Kırmacı, B., **Akbulut, E.**, Kayısı Pekmezi Üretim Tekniği, Gıda Teknolojileri Dergisi, 2007 (2), 53-57, 2007.