



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BÖLGEMİZDEKİ ANKİLOZAN
SPONDİLİTLİ HASTALARDA HLA-B*27 ALT
TİPLEMESİ VE HASTALIK AKTİVASYONU
İLE İLİŞKİSİ

Sibel MOLLAMEHMETOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Fahri UÇAR

TRABZON-2013



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BÖLGEMİZDEKİ ANKİLOZAN
SPONDİLİTLİ HASTALARDA HLA-B*27 ALT
TİPLEMESİ VE HASTALIK AKTİVASYONU
İLE İLİŞKİSİ

Sibel MOLLAMEHMETOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Fahri UÇAR

TRABZON-2013

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Sibel MOLLAMEHMETOĞLU’ nun hazırladığı “BÖLGEMİZDEKİ ANKİLOZAN SPONDİLİTLİ HASTALARDA HLA-B*27 ALT TİPLEMESİ VE HASTALIK AKTİVASYONU İLE İLİŞKİSİ” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Fahri UÇAR

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL

Prof. Dr. Fahri UÇAR

Doç. Dr. Erhan ÇAPKIN

Tarih: .../.../201...

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../.../...

Sibel MOLLAMEHMETOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince her türlü bilgi ve deneyimini benimle paylaşan danışmanım sayın Prof. Dr. Fahri UÇAR' a en içten saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL' e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU' na, Doç. Dr. Ersan KALAY' a, Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER' e ve öğretim görevlisi Dr. Bayram TORAMAN' a teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisansa başladığım tarihten itibaren bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen özellikle tez hazırlama ve yazma döneminde hep yanımda olan arkadaşım Arş. Gör. Burcu YÜCEL' e, laboratuvar çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan Arş. Gör. Ceren SÜMER' e ayrıca bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Pelin KÜÇÜK' e, Arş. Gör. Orhan SEZGİN' e, Arş. Gör. Adem YILDIRIM' a, Arş. Gör. Gülden YORGANCIĞLU' na Figen SEYMEN' e ve Abide CANSIZ'a gönülden teşekkür ederim. Ayrıca bizden bilgi ve şefkatlerini esirgemeyen Biyolog Tülay KÖSEAHMET' e ve Kimyager Fatmagül YENİSEY' e çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim ve hissedeceğim aileme şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bu çalışmayı, 2008.114.001.6 numaralı proje kapsamında destekleyen KTÜ BAP Koordinasyon Birimi' ne teşekkür ederim.

Sibel MOLLAMEHMETOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç kapak sayfası	
KABUL VE ONAY SAYFASI	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
KISALTMALAR SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ	vii
1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Ankilozan Spondilit	4
4.1.1 Ankilozan Spondilit Etiyopatogenezi	4
4.1.2 Ankilozan Spondilit' e Genetik Yaklaşım	5
4.1.3 AS Tedavisi	5
4.1.4. AS' de Laboratuvar Bulguları ve Görüntüleme Özellikleri	6
4.2. Major Histokompatibilite Gen Kompleksi (MHC)	10
4.2.1 İnsan MHC Genleri ve Kalıtımı	10
4.2.2 Sınıf I ve II MHC Moleküllerinin Yapı ve Fonksiyonları	13
4.2.3 HLA ve AS İlişkisi	16
5. GEREÇ VE YÖNTEM	20
5.1. Gereç	20

5.1.1. Çalışma Grubu	20
5.1.2. Kimyasallar	21
5.1.3. Araç ve Gereçler	22
5.2. Yöntemler	26
5.2.1. Periferik Kandan Salting – Out Yöntemi ile DNA İzolasyonu	26
5.2.2. Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	27
5.2.3. HLA- B*27 Alt Tiplerinin PCR-SSP Yöntemiyle Belirlenmesi	27
5.3. İstatistik Analiz	29
6. BULGULAR	30
6.1. AS Hastalarında ve Kontrol Grubunda HLA-B*27 Dağılımı	30
6.2. AS' li Hastalarda ve Kontrol Grubunda HLA-B*27 Alt Tiplerinin Dağılımı	32
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
8. SONUÇLAR	42
8.1. Sonuçlar	42
8.2. Öneriler	42
9. KAYNAKLAR	44
10. ETİK KURUL ONAYI	54
11.ÖZGEÇMİŞ	56

KISALTMALAR SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**

AS	Ankilozan Spondilit
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
MIM	Mendelian Inheritance in Man
ASAS	Assesment of SpondyloArthritis International Society
PCR-SSP	Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sekans Spesifik Primer
TNF	Tümör Nekroz Faktör
CRP	C-Reaktif Protein
NSAII	Non-steroid anti-inflamatuvar ilaç
ESH	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
SİE	Sakroiliak eklem

ÖZET

Bölgemizdeki Ankilozan Spondilitli Hastalarda HLA-B*27 Alt Tiplemesi ve Hastalık Aktivasyonu İle İlişkisi

Ankilozan spondilit (AS) [MIM 106300], eklem ağrılarıyla, ilerleyen omurga katılığıyla, sakroiliak kemiğin iltihabıyla tanımlanan ve etiyolojisi kesin olarak bilinmeyen kronik, sistemik ve inflamatuvar bir hastalıktır. Çalışmamız 121 AS (72 erkek ve 49 kadın) hastasından ve 400 sağlıklı bireyin dahil olduğu kontrol grubundan seçilmiş olan 20 bireyin kanından elde edilen DNA örneklerinin PCR-SSP yöntemiyle HLA-B*27 allel frekansı ve HLA-B*27 alt gruplarının dağılımlarının incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Bölgemizde HLA-B*27 pozitifliği AS hasta grubunda %95.05 oranında kontrol grubunda ise %5 oranında bulunmuştur. AS hastalarında HLA-B*2701, B*2702, B*2705, B*2707, B*2708, B*2712, B*2723, B*2731, B*2740, B*2748, B*2756 alt grupları saptanmıştır. Kontrol grubunda ise B*2702, B*2705, B*2756 alt grupları ve AS' den farklı olarak B*2753 alt grubuna rastlanmıştır. AS hasta grubunda en sık HLA-B*2756 (%68.7) alt grubu gözlenmiştir. Bunu takiben %19.1 oranında HLA-B*2702, %2.60 oranında HLA-B*2748, %1.74 oranında HLA-B*2701, B*2705 ve B*2740, %0.87 oranında HLA-B*2707, B*2708, B*2712, B*2723 ve B*2731 alt grupları gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise %38.1 oranla en sık HLA-B*2705 alt grubu, onu takiben %28.5' luk eşit oranla HLA-B*2702 ve HLA-B*2756 alt grupları ve %4.76 oranla HLA-B*2753 alt grubu gözlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda AS hastalarında HLA-B*27 pozitifliği bölgemizde %95.05 oranında bulunmuştur. HLA-B*2756 alt grubu frekansı AS hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (%68.7' ye %28.5; P= 0.003). Bu sonuç HLA-B*2756' nın bölgemizde AS' ye yatkınlıkta rolü olabileceğini düşündürmüştür. Kontrol grubunda ise HLA-B*2705' in (%38.1) yüksek oranda görülmesi hastalıkla negatif ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Allel dağılımı, Ankilozan Spondilit, HLA-B*27, PCR-SSP.

SUMMARY

HLA-B*27 Subtyping in Patients with Ankylosing Spondilitis and its Relation to Disease Activation in Our Region

Ankylosing Spondilitis (AS) [MIM 106300] is a chronic, systemic and inflammatory disease with unknown exact etiology, defined with the presence of pain in joints, progressive joint stiffness and inflammation in sacroiliac joints. This study was aimed to search for HLA-B*27 allele frequency and the distribution of HLA-B27 subtypes in DNAs obtained from blood samples of 121 AS patients (72 male and 49 female) and 20 subjects out of a control group consist of 400 healthy people using PCR-SSP method.

HLA-B27 positivity was determined at 95.05% frequency in AS patient group while it was 5% in the control group. HLA B*2701, B*2702, B*2705, B*2707, B*2708, B*2712, B*2723, B*2731, B*2740, B*2748, B*2756 subtypes were detected in AS patients. In the control group, B*2702, B*2705, B*2756 subtypes and differently from AS group, B*2753 subtype was found. The most frequent subtype was HLA-B27*56 (68.7%) in AS patient group. In addition, HLA-B*2702 with 19.1% frequency, HLA-B*2748 with 2.60% frequency, HLA-B*2701, B*2705 and B*2740 with 1.74% frequency, HLA-B*2707, B*2708, B*2712 B*2723 and B*2731 with 0.87% frequency were found. HLA-B*2705 was the most frequent subtype which was 38.1% in the control group followed by HLA-B*2702 and B27*56 subtypes with 28.5% frequency and HLA-B*2753 subtype with 4.76% frequency were detected.

In conclusion, HLA-B*27 positivity was seen at 95.05% frequency in AS patients in our region. The frequency of HLA-B*2756 subtype was detected significantly higher in AS patients compare to control group (68.7% vs. 37.5%; $P=0.003$). This result suggests that HLA-B*2756 might have a role in susceptibility to AS disease. As HLA-B*2705 subtype was seen higher (38.1%) in the control group, there might be negative association between the disease and the subtype.

Key words: Allele distribution, Ankylosing Spondilitis, HLA-B*27, PCR-SSP

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Ankilozan Spondilit (AS) spondiloartropatiler (SpA) grubunda yer alan, kesin olarak etiyolojisi bilinmeyen kronik, sistemik, inflamatuvar bir hastalıktır. Başlıca aksiyal iskeleti tutan ve bunun yanında periferik eklemleri ve eklem dışı sistemleri de etkileyerek, yaşam kalitesini azaltan romatizmal bir hastalıktır (1, 2). Tüm dünyada prevalansı %0.2-%1.4 olarak bilinmektedir ve erkek/kadın oranı da 2-3/1' dir (3, 4). SpA, temel olarak AS' nin yanı sıra reaktif artrit, psöriatik artrit, akut anterior üveit, inflamatuvar barsak hastalığı ile ilişkili artrit gibi ortak özellikleri içeren bir grup kronik romatizmal hastalığı içermektedir (5).

AS etiyolojisi tam net olarak anlaşılmasa da genetik faktörler hastalık gelişimine zemin hazırlar. Birçok aday gen olmak ile birlikte günümüzde insan lökosit antijenlerine (HLA) ait ve MHC Sınıf I molekülü olan HLA-B*27 AS ile ilişkisi kesin olarak gösterilmiştir. AS' li hastaların %90-95' de HLA-B*27 pozitifdir (6, 7). HLA-B*27 pozitif olan hastalarda ekstra-artiküler tutulum görülme sıklığı artmaktadır ve takipte bu göz önünde bulundurulmalıdır. HLA-B*27' nin bugüne kadar 72 alt grubu tespit edilmiştir. Alt grupların sayısı yeni yöntemlerle her geçen gün artmaktadır. AS' nin HLA-B*2705, HLA-B*702 ve HLA-B*2704 alt grupları ile kuvvetli, HLA-B*2703, HLA-B*2706, HLA-B*2709 ile zayıf ilişkili olduğu bildirilmektedir (8-13).

Moleküler genetik yöntemlerin günümüzde daha iyi gelişmesiyle HLA doku grupları da alt gruplarına ayrılmış ve hastalığa neden olan alleller daha net anlaşılmaya başlanmıştır. Örneğin daha önce AS' li vakalarda HLA-B*27 pozitifliği bilinmekteydi. Ancak şimdilerde her HLA-B*27 pozitifliği olan kişi AS hastası olmamakta, olanlar ise aynı şiddette seyretmemektedir (8, 9).

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Polikliniğinde takip edilen AS tanısı almış hastalarda HLA-B*27 genleri (allel seviyesinde) polimorfizm dağılımını aydınlatmayı amaçlayan bir çalışma olarak planlanmıştır. Bu nedenle çalışmamız Doğu Karadeniz bölgesinde AS hastalarında, hastalıkla pozitif ilişkili veya negatif ilişkili daha önce belirlenmemiş olan HLA-B*27 alt tiplerinin dağılımını, hastalık aktivasyonu ile ilişkisini ve hastalığın tedavi seçeneklerine farmakogenetik katkı sağlanmasını amaçlamıştır.

4.1 Ankilozan Spondilit

Ankilozan spondilit (AS) [MIM 106300], ilerleyen omurga katılığıyla, sakroiliak kemiğin inflamasyonu ile tanımlanan ve etiyolojisi tam olarak bilinmeyen kronik, sistemik ve inflamatuvar bir hastalıktır (14-16). Hastalığın belirtileri sıklıkla geç adolesan veya erken erişkinlik döneminde başlar. 16 yaşından önce ve 45 yaşından sonra başlaması ise çok rastlanmayan bir durumdur. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülen bu hastalık kadınlarda çoğunlukla daha yavaş seyretmektedir (17-19). Hastalığın erkeklerde daha ciddi seyretmesinin altında ihtimal olan X geni ile ya da androjen reseptör gen aktivitesi ile hastalık arasında yapılan araştırmalar sonucu herhangi bir ilişki saptanmamıştır (20). Genel olarak hastalığın beyaz ırkta prevalansı %0.2-1.4 arasındadır (21).

4.1.1 Ankilozan Spondilit Etiyopatogenezi

AS etiyolojisi açık değildir. Hastalığın patogenezinde çok sayıda HLA ve HLA dışı gen araştırılmıştır (22). AS' de B27' nin patofizyolojik rolü üzerindeki görüşler içinde en güçlü olan "otoimmünite" dir. Yani bazı bakteri türlerine karşı cevap olarak oluşturulan sitotoksik T hücrelerinin, artritogenik peptidlerin B27 tarafından T hücrelerine sunulması sonucunda konağın kendi dokusuna yönelmesi şeklindedir (23). Başka bir görüş ise, B27 molekülünün antijen sunumu dışında kendine özgü özellikleri olan bir molekül olması ve bazı uyaranlar sonucu inflamasyona neden olması görüşüdür. Peptidlerin B27 tarafından bağlandıktan sonra B27' nin stabilitesinin bozulduğu ve bu nedenle hatalı bir biçimde katlandığı ve hatalı B27 moleküllerinin çeşitli genleri aktive etmesi sonucu pro-inflamatuvar sitokinlerin aktive edildiği de ileri sürülmektedir (24, 25). Serbest HLA-B*27 ağır zincirleri taşıyan monositlerin de hastalık patogenezinde önemli olduğuna dair güçlü deliller saptanmıştır (26). Ayrıca patogeneizde bağırsak geçirgenliğinin artması, intestinal inflamasyon ve intestinal bakterilerin rolü ile ilgili kanıtlar üzerinde de durulmaktadır. AS hastalarında yapılan endoskopik çalışmalarda özellikle aktif periferik eklem hastalığı olanları %60' ında intestinal inflamasyon saptanmıştır (27). Ayrıca spondiloartropati olguların serumlarında *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis* gibi bakterilere karşı IgA düzeylerinde artış saptanmıştır (22).

4.1.2 Ankilozan Spondilit' e Genetik Yaklaşım

AS etiyolojisi kesin olmamasına rağmen, hastalığın iyi bilinen bir genetik yapısı bulunmaktadır. İki önemli ikiz çalışması AS hastalığına ait genetik yatkınlığı aydınlatmıştır. Yapılan çalışmalarda, dizigotik ikizlerde %13' lük monozigotik ikizlerde %63' lük bir kümelenme saptanmıştır. Hastalığın genetik alt yapıya bağlı olarak görülme riski yaklaşık %90 olarak saptanmıştır (28, 29). 1973 yılında AS ile HLA-B*27 genleri arasındaki güçlü ilişkili olduğu ileri sürülmüş olmakla birlikte bu ilişkinin varlığı günümüzde kesin olarak bilinmektedir. AS hastalarının %90-95' inde HLA-B*27 pozitifdir fakat B*27 bu hastalık için genetik riskin ancak 1/3' nin daha azından sorumludur. AS hastalarının yaklaşık %90' ında HLA-B*27 allellerinden bir tanesi pozitifdir. Buna karşın seropozitif yakını olmayan HLA-B*27 pozitif kişilerde bu hastalığın oluşma riski ancak %5 kadar saptanmıştır. Bu risk eğer birinci dereceden AS' li akraba varsa 5-16 kat artmaktadır (7). AS ile B*27 alt grupları arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma; B*2705' in dünyada yaygın olarak görüldüğünü, Kuzey Avrupa ülkelerinde ve Yahudilerde B*2702' nin, Çin ve Japonya' da B*2704' ün, Hindistan' da ve Avrupa' da B*2707 alt tiplerinin görüldüğünü saptamıştır (22, 30, 31). Güneydoğu Asya' da görülen B*2706 ve Sardinya' da görülen B*2709 alt tiplerinin hastalıkla ilişkili olmadığı görülmüştür (22). Hatta bazı çalışmalarda HLA-B*2706' nın AS' ye karşı koruyucu rol oynadığı düşünülmüştür (32).

4.1.3 AS Tedavisi

AS; ağrı, tutukluk ve hareket kısıtlılığına sebep olduğundan dolayı yaşam kalitesinin bozulmasını yol açar. AS tedavisinde ilk olarak 1949 yılında fenilbutazon klinik tedaviye girmiştir. Fenilbutazon kullanımı aplastik anemi ve karaciğer hasarı gibi yan etkilerinden dolayı kısıtlanmıştır. İndometazin 1965 yılında AS tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda ise ibuprofen, proksikam, meloksikam ve diklofenak gibi birçok ilacın etkinliği gösterilmiştir. Son yıllarda AS tedavisinde selektif COX-2 inhibitörlerin etkinliği gösterilmiştir (22, 33). AS tedavisinde non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAI) köşe taşlarıdır (33). AS tedavisinde kullanılan NSAI semptomları düzeltmede etkin olmakla beraber hastalığın ilerleyişi üzerinde etkisiz olduğu görülmüştür. Uluslararası Ankilozan Spondilit Değerlendirme ve Çalışma Grubu (ASAS) ve Avrupa Antiromatizma Cemiyeti (EULAR), son yıllarda NSAI ve

diğer uygulamalara cevap vermeyen hastalarda diğer bir farmakolojik yaklaşım olan anti tümör nekroz faktör alfa (anti TNF- α) tedavilerinin uygulanması yönünde tavsiyede bulunmuşlardır. Tedavinin pahalı olması dezavantajı yanında çabuk cevap alınması ve etkinliğinin uzun sürmesi avantajlarındandır (34). Günümüzde infliksimab, etanercept ve adalimumab olmak üzere 3 ajanın AS' de kullanımı FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır. Ayrıca aynı cemiyet AS' in etkin bir şekilde tedavisinde farmakolojik ve non farmakolojik tedavilerin (fizik tedavi, egzersiz, eğitim, kaplıca vb) kombine olması gerektiğini savunmuştur (35).

4.1.4. AS' de Laboratuvar Bulguları ve Görüntüleme Özellikleri

AS' li hastaların yaklaşık 3/4' ünde kronik bel ağrısı ve tutukluk ilk yakınmalardandır. Genellikle yerinin saptanması zor olan bu ağrı derin gluteal ve sakroiliak bölgede hissedilebilir. Başlangıçta tek taraflı ve geçici olan ağrı zamanla iki tarafa da yayılan devamlı ağrıya dönüşür. AS' in ayırıcı tanısında, erken yaşta başlayıp ve giderek artan, sabah uyanıldığında veya dinlenmeden sonra tutulumun çok görüldüğü, hareketle bu yakınmaların azaldığı, spinal mobilite ve derin nefes almada kısıtlanmaya yol açan, tipik inflamatuvar bel ağrısı önemli rol oynar (36).

AS' li hastalarda %70' e varan oranlarda eritrosit sedimentasyon hızında (ESH) ve serum C-reaktif protein (CRP) düzeylerinde artış gözlenmiştir. Ancak CRP düzeyi hastalık aktivitesinin belirlenmesinde daha yararlıdır. Hastaların %38.1-60' ında serum IgA düzeyinde artış gözlenmektedir. Hastalık aktivitesi ve periferik eklem tutulumuyla serum IgA düzeyi akut faz reaktantları arasında korelasyon bulunmaktadır (36-41).

AS için geliştirilen özel sınıflama kriterleri birçok defa yenilenmesine rağmen radyografik sakroiliitin varlığı hastalığın tanısı için hala çok önemlidir (Tablo 1) (42). Çünkü hastalığın en önemli özelliklerinden birisi aksiyal tutulumdur ve hastalığın ilerlemesiyle birlikte hastaların yaklaşık %90' ında radyografik sakroiliit görülür (43).

Tablo 1. AS İçin Tanımlanmış Kriter Setleri (Linden’ den, 42).

AS için tanımlanmış kriter setleri.
Roma AS sınıflama kriterleri (1963)
1. Üç aydan fazla devam eden ve istirahatla düzelmeyen bel ağrısı ve sertlik varlığı 2. Torakal bölgede ağrı ve sertlik 3. Lomber omurga hareketlerinde kısıtlılık 4. Göğüs ekspansiyonunda azalma 5. İritis öyküsü veya sekel varlığı Radyolojik Kriterleri 6. Radyografik olarak bilateral AS’ e özgü sakroiliak eklem (SİE) değişikliklerinin olması ve bilateral osteoartritin dışlanması Kesin AS için, 1. Grade 3-4 bilateral sakroiliit ve bir klinik kriter 2. En az dört klinik kriter
New York AS sınıflama 1966
1. Lomber omurganın 3 planda hareket kısıtlılığı: öne fleksiyon, lateral fleksiyon, ekstansiyon 2. Dorsolomber bileşke veya lomber omurgada ağrı 3 Dördüncü interkostal aralıktan ölçülen göğüs ekspansiyonunun 2,5 cm ve altında olması Radyografilerin Gradelenmesi Normal, 0; Şüpheli,1: minimal sakroiliit, 2; orta derecede sakroiliit,3; ankiloz,4

Kesin AS için, 1. Grade 3-4 bilateral sakroiliit ve en az bir klinik kriter 2. Grade 3-4 unilateral veya grade 2 bilateral sakroiliit ve ilk klinik kriter veya ikinci ve üçüncü klinik kriterler Olası AS Grade 3-4 sakroiliit ve klinik kriterlerin yokluğu
Modifiye New York kriterleri 1984
1. Klinik Kriterler: 1. Üç aydan daha fazla süredir egzersizle düzelen ancak istirahatle dinmeyen bel ağrısı ve sertlik. 2. Lomber omurga hareketlerinin hem sagittal hem de frontal planlarda kısıtlanması 3. Yaş ve cinsiyete uygun normal değerlere göre göğüs ekspansiyonunda daralma 2. Radyolojik kriterler: Sakroiliit evre > 2 çift taraflı veya evre 3-4 tek taraflı Kesin AS için, 1. Unilateral grade 3-4 veya bilateral grade 2-4 sakroiliit ve herhangi bir klinik kriter Olası AS Üç klinik kriter varlığı veya radyolojik kriterlerin klinik kriterler olmaksızın varlığı

New York kriterleri 2002 yılında aşağıdaki şekilde modifiye edilmiştir (44).

Modifiye New York Kriterleri

En az üç aydır var olan, egzersizle düzelip istirahatle düzelmeyen bel ağrısı

Lomber omurganın sagittal ve frontal düzlemlerde hareket kısıtlılığı

Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinse göre normal değerlerin altında olması

Evre 2-4 bilateral sakroiliit

Evre 3-4 unilateral sakroiliit

Kesin AS: Klinik kriterlerden herhangi birisi ile birlikte tek taraflı evre 3-4 veya çift taraflı evre 2-4 sakroiliit

Tablo 2. Aksiyal Spondiloartrit (SpA) için ASAS Sınıflama Kriterleri (Rudwaleit' den, 45).

Bel ağrısının süresi ≥ 3 ay olan ve başlangıç yaşı < 45 yaş olan hastalarda

Görüntülemelerde sakroiliit artı ≥ 1 SpA bulgusu	HLA-B*27 artı ≥ 2 SpA bulgusu
SpA Bulguları	Görüntülemelerde sakroiliit
İnflamatuvar bel ağrısı, Artrit, Entezit (topuk), Üveit, Daktilit, Psöriyazis, Crohn /kolit, NSAIİ iyi yanıt, SpA için aile öyküsü, HLA, artmış CRP	MRG'de aktif (akut) inflamasyon SpA ile ilişkili sakroiliit için fazla fikir vericidir Modifiye New York kriterlerine göre kesin radyografik sakroiliit

4.2 Major Histokompatibilite Gen Kompleksi (MHC)

MHC, bütün omurgalılarda var olan, bağışıklıkla ilgili ve ilgisiz fonksiyonları bulunan bir grup genin genel adıdır (46). Bu genler bağışıklığı denetlemektedir ve aynı zamanda doku uyumunda da rol oynamaktadır (47).

1931 yılında Landsteiner, eritrosit antijenlerini keşfetmiştir. Kan transfüzyonu için grup uyumunun gerekliliğini vurgulamış ve doku/organ transplantasyonu için doku antijenlerinin uyumunu dile getirmiştir (48). Yine 1930' lu senelerde G. D. Snell ve R. A. Gorer farelerde doku antijenlerinin varlığından söz etmiştir (49). Farelerde yapılan transplantasyon deneyleri sonucunda doku reddinde rol oynayan gen bölgeleri saptanmıştır ve bu genlerin tümüne doku uyum bölgesi (tissue histocompatibility loci) adı verilmiştir. Yapılan bu ilk çalışmalar sonucunda farelerde bu genlere histokompatibilite antijeni karşılığı olarak H-2 adı verilmiştir (50, 51).

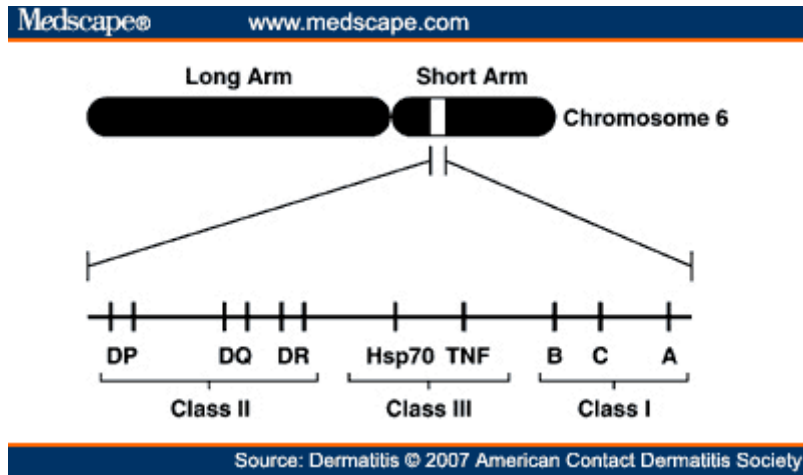
Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar bütün memeli türlerinde MHC kompleksinin bulunduğunu göstermiştir. Dausel 1958 yılında insanlarda doku antijenlerini bulmuştur (48, 49) Aynı yıl içerisinde çok kan transfüzyonu yapmış lösemi hastalarında ve çok sayıda doğum yapmış kadınların %20-30' unun serumlarında Van Rood ve arkadaşları, lökositlere karşı üretilmiş antikorları tespit etmişlerdir. Bu antijenlere ise Human Leucocyte Antigen (HLA) adı verilmiştir ve daha sonraki yıllarda bütün vücut hücrelerinde varlıkları bulunmuştur (52-55).

MHC moleküllerinin başlıca görevi, T-lenfositlerinin peptide bağlanmasını sağlamaktır. Enfekte olmuş hücrelerin T-hücreleri tarafından tanınması, hücre yüzeyinde bulunan viral antijenlerle beraber MHC antijenlerinin olmasına da bağlıdır. Ayrıca MHC' nin diğer bir önemli fonksiyonu da hücre yüzeyindeki diğer reseptörlerle olan etkileşimidir (56).

4.2.1 İnsan MHC Genleri ve Kalıtımı

İlk olarak kemirgenlerde tanımlanan MHC gen bölgesinin insandaki karşılığı 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.31) lokalize olmuştur ve yaklaşık olarak 4 megabazlık (Mb) bir yer kaplar (Şekil 1). İlk olarak beyaz kan hücrelerinde gösterilmiş olup, 'İnsan Lökosit Antijenleri' (Human Leucocyte Antigens), HLA olarak adlandırılırlar. Bu

bölgede immün yanıtla ilgili olan genlerin yanında immün yanıtla ilgisi tanımlanamayan bazı genlerde bulunmaktadır. İnsan MHC gen bölgesi günümüzde tamamen dizilenmiştir ve Nature dergisinde 28 Ekim 1999 tarihinde yayınlanmıştır. Bu bölge yaklaşık olarak 200'den fazla farklı gen içermektedir ve 4 sınıfa ayrılmaktadır: Sınıf I, II, III ve IV (50, 57-61, 62, 63).



Şekil 1. İnsanda MHC Gen Bölgesi (Schram'dan, 64).

HLA antijenleri yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre 3 alt bölgeye ayrılır. Sınıf I bölgesi, MHC' nin telomerik ucunda yer alır. HLA-A, -B, -C olarak adlandırılan transplantasyon antijenlerini ve HLA-E, -F, -G olarak adlandırılan klasik olmayan antijenleri kodlayan gen bölgelerini, HLA-H, -J, -K, -L, -X gibi pseudogenleri ve gen segmentlerini kapsar. Sınıf II bölgesi sentromere yakın uçta lokalize olmuştur. HLA-DRA, -DRB, -DQA, -DQB, -DPA, -DPB, -DNA, -DMA, -DMB, -DOA, -DOB- lokusları, LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 gibi antijen işlenmesinde rol oynayan genler ve bunların yanı sıra bazı psödogenler de bu bölgede yerleşmiştir. HLA-DRB ile HLA-B bölgeleri arasında Sınıf III genleri bulunur. Bu bölgede kodlanan bazı gen ürünleri şunlardır: C4B, C4A, Bleferidin, C2, HSP-70, TNFa (Tablo 3) (50, 63, 65-68). HLA allelleri tanımlanırken önce HLA başa yazılır, HLA'nın lokusunu gösteren harfler büyük harfle yazılır. Eğer moleküler yöntemle çalışılmışsa bu harflerin ardından '*' eki ile beraber allel numarası yazılır. Serolojik yöntemle çalışıldığında ise harflerin ardından allel numarasını belirten rakam eklenir (59) (Tablo 3).

Tablo 3. HLA allelleri tanımlanırken kullanılan terminoloji (Dalva’ dan, 61).

TERMİNOLOJİ	RAKAM SIRA NO	İFADE ETTİĞİ BİLGİ
HLA	-	HLA bölgesini ifade eder ve bir HLA genine ön ek olarak kullanılır
HLA.DRB1	-	Belli bir HLA lokusu (Ör: DRB1)
HLA-DRB1*13	1-2	Spesifik bir antijeni (Ör: DR13) kodlayan bir aile grubunu tanımlar
HLA-DRB1*1301	3-4	Spesifik bir HLA allelini tanımlar (DR13ün 01 alleli)
HLA-DRB1*1301N	5/9	Eksprese edilmeyen (Null) bir alleli gösterir, L harfi ise zayıf ekspresyon işaretidir.
HLA-DRB1*130102	5-6	Sessiz (Sinonim) mutasyonu olan bir alleli ifade eder
HLA-DRB1*13010102	7-8	Kodlama bölgesi (ekson) dışında mutasyonu olan bir alleli gösterir.
HLA-DRB1*13010102N	5/9	Kodlama bölgesi dışında mutasyonu olan Null bir alleli gösterir.

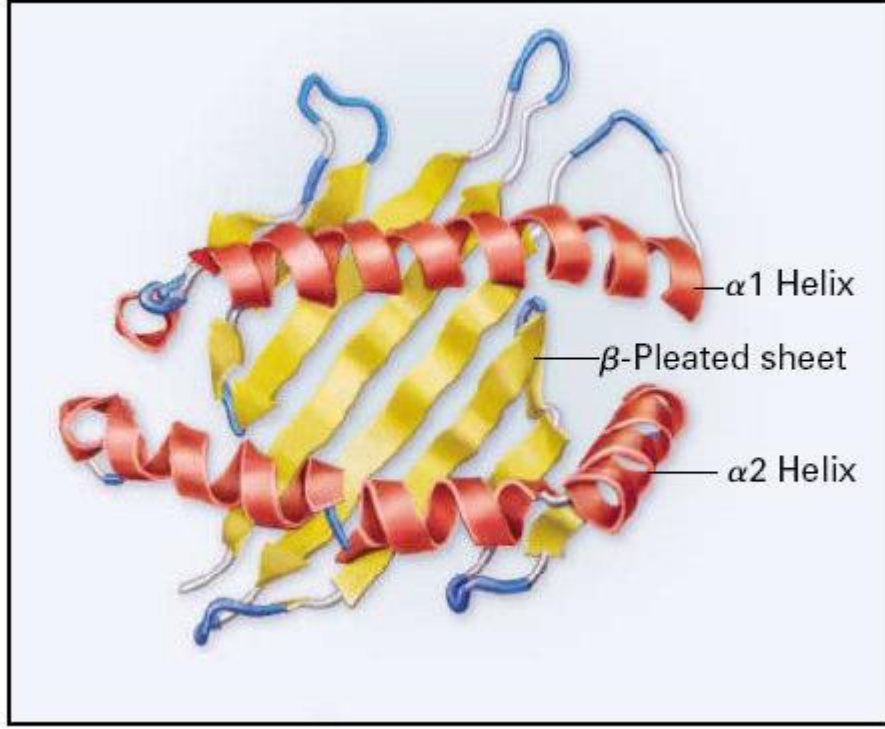
İnsanlarda MHC genleri Mendel kurallarına göre nesilden nesile aktarılırlar (69, 70). HLA antijenleri fetüsün erken safhasında yani 6. haftada ortaya çıkmaktadır ve sentezlenmeleri ömür boyu devam etmektedir (70-75). Her bireyde bulunan kromozom çiftinin yarısı anneden yarısı babadan gelmektedir. Yani çocuklar ile anne baba arasında bir haplotip uyumluluğu vardır. Bir haplotipte bulunan alleller bir blok halinde geçerler. Bu genetik geçişler sırasında yaklaşık %1-3 oranında rekombinasyon görülebilir (59).

Tüm HLA genleri kodominanttır yani herhangi bir HLA lokusundaki her iki allelde eksprese edilir. HLA' da çok sayıda gen lokusları olduğundan dolayı normal bir popülasyonda çok sayıda haplotip bulunmaktadır (76, 77).

HLA moleküllerinin immün sistemdeki rolü T hücrelerine antijen sunmaktır. T hücreleri antijen reseptörlerini tek başına tanıyamazlar ve bu yüzden HLA moleküllerine ihtiyaç duyarlar. HLA moleküllerine bağlanan antijenler immün yanıtın oluşmasında anahtar rol oynarlar (78).

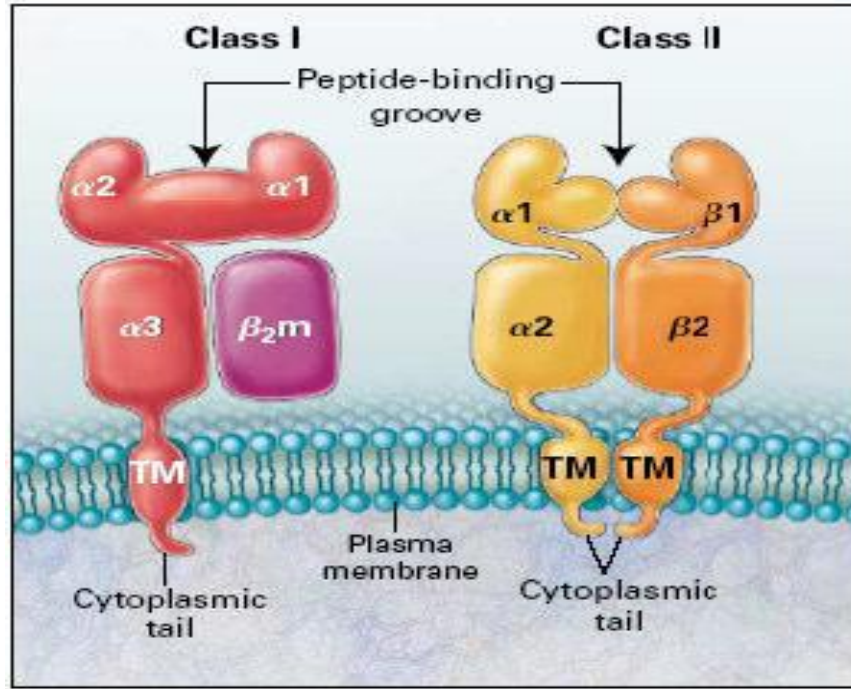
4.2.2 Sınıf I ve II MHC Moleküllerinin Yapı ve Fonksiyonları

Sınıf I antijenler bütün çekirdekli hücrelerin zarında bulunan, glikoprotein yapısında moleküllerdir (73, 79, 80). Bu antijenler α ve β olmak üzere 2 polipeptid zincirinden oluşmuşlardır. α zinciri 44 KD mol ağırlığında, β zinciri ise 12 KD mol ağırlığında olup "Beta-2 mikroglobulin" adını almıştır. β zinciri α zincirine nonkovalent olarak bağlanmıştır. Bu molekül 15. kromozomda bulunan genlerden sentezlenmektedir ve bütün insanlarda aynıdır. HLA Sınıf I molekülünün fonksiyonu β mikroglobulinin varlığına bağlıdır yani β mikroglobulin α zincirinden ayrılırsa ya da konjenital olarak yoksa HLA sınıf I molekülü işlev görmez (71, 81). α zinciri $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ olmak üzere 3 alt birimden oluşmaktadır. Peptid bağlama bölgesi ile HLA molekülü şekil 2' de gösterilmiştir (82). HLA sınıf I antijenleri sitotoksik T hücrelerinin virüsle enfekte olmuş hücreleri tanınmasında görevlidirler. Yani yabancı virüs antijeni, enfekte hücre yüzeyinde HLA-A, B ve C antijenleri ile beraber olursa tanınmaktadır. Virüsle enfekte olmuş hücrenin HLA sınıf I antijeni ile sitotoksik T hücresi farklı ise bu tanınma çok az olmakta ya da hiç olmamaktadır (71, 81, 83). HLA moleküllerinin en önemli fonksiyonlarından biri immünolojik peptidleri bağlamaktır. Endojen sentezlenen protein moleküllerini CD8+ T lenfositleri, HLA sınıf I antijenleri ile birlikte tanımaktadır (82).

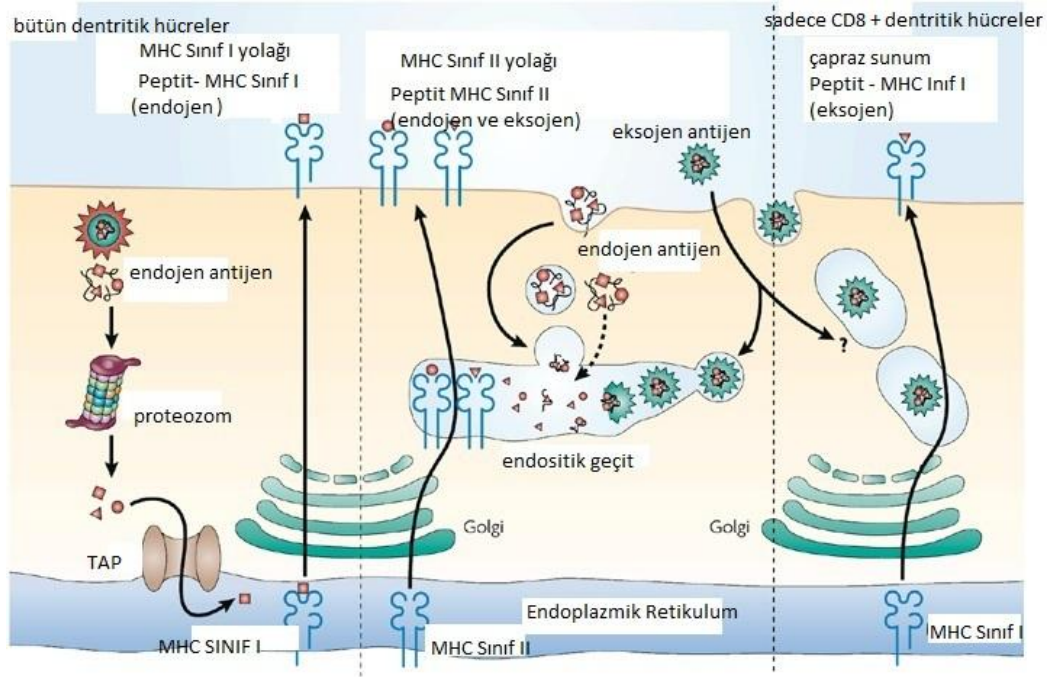


Şekil 2. HLA ile peptid bağlanma bölgesinin şematik görünümü (Çevirgen' den, 82).

Sınıf II antijenler, T lenfositler ve B lenfositler, monositler ile Langerhans ve dentritik hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır. Yani antijen sunan hücreler sınıf II moleküllerini yüzeyinde taşırlar. Lenfositlerin ve makrofajların etkileşiminde de rol alırlar (50, 57, 84). Sınıf II antijenler α ve β olmak üzere 2 adet transmembran glikoprotein zincirinden oluşurlar. Bu iki zincirin hücre zarı dışında $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ ve $\beta 2$ olmak üzere domainleri bulunur. $\alpha 1$ ve $\beta 1$ zincirleri sınıf I moleküllerinde olduğu gibi antijenlere ait olan peptidlerin yerleşebileceği çukur tarzında yapı oluştururlar (Şekil 3). Sınıf II antijenler CD4 taşıyan T-lenfositlerine eksojen kaynaklı (hücre dışında sentezlenen proteinlerden kaynaklı) antijen sunmada görevlidirler. Böylece CD4 taşıyan yardımcı T-lenfositleri uyarılmış olup, immün cevapta rol oynayan B lenfositler, T-lenfositler gibi hücre kontrolünde görev alırlar (57-61) (Şekil 4).



Şekil 3. HLA sınıf I ve sınıf II molekülleri (Çevirgen' den 82).



Şekil 4. Hücrelerde antijen sunumu yolağı (Villadangos' dan, 85).

4.2.3 HLA ve AS İlişkisi

HLA antijenleri ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma vardır. Bu çalışmaların amacı; hastalığın genetik geçişli olup olmadığını araştırmak, hastalıkla ilgili tedavi yöntemleri belirleyebilmek ve sonuçta moleküler patogeneze ulaşmak şeklinde sayılabilir (82). Yapılan çalışmalar sonucunda bazı hastalıklar ile bazı HLA allelleri arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Bu hastalıkların pek çoğunda HLA molekülünün dışında çok sayıda gen ve çevresel etmenlerde rol oynamaktadır. Yani hastalıklar ile HLA' nın tek başına ilişkisi vardır demek zordur. Fakat bazı hastalıklarla HLA arasında sıkı bir ilişki vardır. Bunun en belirgin örneği HLA-B*27 ile AS arasında olan ilişkidir (Tablo 4).

Tablo 4. Bazı haslıklar ve ilişkili HLA allelleri (Uçar’ dan, 48)

HASTALIK	İLGİLİ HLA ANTİJENİ	ORTALAMA RÖLATİF RİSK
Hematokromozis	A3	-
Narkolepsi	DR2	-
Ankilozan spondilit	B27	81.8
Reiter sendromu	B27	40
Psoriatik spondilit	B27	10
Akut anterior üveit	B27	8
Behçet hastalığı	B5	3.3
Romatoid artrit	DR4	6.4
Pausi artiküler romatoid art.	DR5/DP2	7
Kronik hepatit	B8	
Sistemik lupuseritematozus	DR3/C4	17.1
Sjögren sendromu	DR3	5.6
İnsulin bağ. Diabetes mellit	DQ8/DR3/4	31.8
Goodpasture	DQ57	0.1
Multiple skleroz	DR2	20
Myastenia gravis	DR2/B8/A2	6
Hodking hastalığı	B18	—
	DR4	—

HLA ve hastalıklar ile ilişkili çalışmalar; ilişki (association) ve bağlantı (linkeage) çalışmaları şeklinde 2’ ye ayrılır. Bağlantı çalışmaları ailesel veriler kullanıldığında,

ilişki çalışmaları ise popülasyon tabanlı veriler kullanıldığında yapılır. Bir hastalık ile HLA arasındaki ilişki, hasta ve kontrol gruplarında yapılan çalışmalar neticesinde, popülasyon çalışmalarıyla belirlenir. HLA lokusu ile hastalığı kontrol eden genler arasında bir beraberlik olup olmadığını ortaya koymada ise aile çalışmaları yararlı olmaktadır(82, 86). HLA ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi açıklayan teoriler şunlardır:

HLA molekülleri etiyolojik ajanların reseptörleridir: Bazı HLA molekülleri, toksinler, virüsler ve bazı yabancı maddeler gibi ajanlar için reseptör görevi yaparlar. Örneğin AS' ye sebep olan HLA molekülü bir virüs için reseptör ise, B*27 taşıyan kişilerde AS riski yüksek olacaktır ve ancak virüse maruz kalındığında hastalık oluşacaktır (87).

HLA molekülü antijenik peptidler için seçicidir: Yani vücuttaki antijenik peptidler, belirli HLA molekülleri tarafından T lenfositlerine sunulabilmektedir. Örneğin bazı HLA-B*27 molekülü bazı peptidleri almada spesifik olabilir ve bunun neticesinde bu molekülü taşıyanlar AS hastalığına yatkın olabilirler (62, 87).

T hücre reseptörü hastalık predispozisyonunu belirler: Hastalık gelişmesinde T hücre reseptörü sorumludur. HLA molekülü T hücresinin antijeni tanımasını sınırlandırmıştır, bundan dolayı hastalık ile HLA arasında dolaylı bir ilişki vardır (87).

Moleküler mimikri (Hastalık ajanları HLA molekülünü taklit eder) : Hastalıkla ilişkili HLA antijenleri ile hastalık ajanı immünolojik olarak benzerlik gösterebilir. Bu moleküler benzerlik hipotezi şöyle açıklanabilir: Etiyolojik ajan, HLA antijeni ile etiyolojik ajan arasında olan benzerlik sebebiyle vücudun kendi molekülü gibi algılanabilir ve hiçbir immün yanıt oluşmaz. Yani immün sistem hareket geçirilmeden etiyolojik ajan tarafından hastalık oluşur.

Etiyolojik ajanın yabancı olarak algılanmasından dolayı şiddetli bir immün yanıt oluşur. HLA ile etiyolojik ajanın benzerliğinden dolayı immün yanıt HLA'ya yönlendirilir ve böylece otoimmün bir hastalık oluşur (87).

HLA doku tiplemesi testleri günümüzde; antropolojik çalışmalarda, babalık tayininde, transplantasyon öncesinde ve HLA-hastalık ilişkisini incelemede kullanılır. Doku tiplemesi için; serolojik testler (mikrolenfosit toksisite testi, isoelektrik focusing,

biyokimyasal testler, iki boyutlu jel elektroforezi), hücresel testler (karışık lenfosit kültürü) ve genomik testler kullanılır (50).

HLA tiplmesinde en yaygın kullanılan yöntem lenfosit mikrositotoksisite testidir (88). Bir bireyin HLA tipi genellikle fenotip olarak bildirilir (89). Günümüzde DNA teknolojisinin gelişmesine bağlı olarak MHC doku tiplmesi farklı yöntemler kullanılarak DNA düzeyinde yapılmaktadır. Günümüzde moleküler yöntemler daha yaygın kullanılmaktadır (73, 74). Bu moleküler yöntemler MHC' nin çok sayıda polimorfizm içeren gen taşımasından, diğer yöntemlere göre daha ucuz ve zahmetsiz olmasından dolayı daha idealdir (50, 67).

Sekansa özgü primer kullanılması (SSP- Sequence Spesific Primer) yönteminde; primerler hazırlandıkları allele göre DNA' nın o alleli taşıyan kısmına bağlanır ve böylece PCR reaksiyonu başlar. O allele spesifik olan kuyucukta eğer primere uygun allel varsa DNA' nın o parçası çoğalır. Pozitif reaksiyon olan kuyucuklarda 2 adet ürün görünür. Elde edilen sonuçlar bilgisayarda değerlendirilir (61).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma, 2008-2010 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran Modifiye New York kriterlerine göre AS tanısı almış, 121 hastanın (72 erkek, 49 kadın) Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında periferik kan örneklerinden izole edilen DNA' larından yapıldı. Fakültenin Sağlık Bakanlığında onaylı Doku Tipleme Laboratuvarında doku grupları belirlenen AS öyküsü olmayan kemik iliği ve böbrek transplant hastalarının sağlıklı kemik iliği ve böbrek vericileri (400 kişi) kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bu çalışma, 2008.114.001.6 numaralı proje kapsamında KTÜ BAP tarafından desteklenmiş ve Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından (2009/61) onaylanmıştır.

Çalışma grubundaki hastaların klinik olarak değerlendirilmeleri, KTÜ Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Tosun, Doç. Dr. Murat KARKUCAK ve Doç. Dr. Erhan ÇAPKIN tarafından yapılmıştır. AS tanısı, hastaların şikayetlerine göre fizik muayene, radyolojik, biyokimyasal test sonuçları kullanılarak New York kriterlerine göre konuldu. AS hastaları için bilgilendirme dosyaları oluşturulmuş olup, yaş, cinsiyet, aile ve akrabaları ile ilgili bilgiler uzman hekimler tarafından dosyalarına kaydedildi.

Çalışma grubundaki 121 hastanın ve AS hastası olmayan yukarıda sözü edilen 400 sağlıklı bireyin her birinden EDTA' lı tüplere 5 ml kan alındı, DNA' ları izole edilip 20°C' de çalışma yapılana kadar saklandı.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kitler, kimyasallar ve sarf malzemeler çeşitli ticari firmalardan temin edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Kullanılan kimyasallar ve ürün kodları alfabetik sıra ile verilmiştir.

Kimyasal Malzeme	Katalog No.
Agaroz	Sigma, A-0169
Ammonyum asetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)	Sigma, A-1542.
Borik asit (H_3BO_3)	Merk, 1.00160.
Bromfenol mavisi ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$)	Merk, 1.08122.0005
Etidyum bromit ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$)	Sigma, E-7637
Etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Mey, Türkiye
Etilen diamintetra-asetik asit (EDTA)	Sigma, E-5134
Hidroklorik asit (HCl)	Merk, 1.00314.2500
HLA-B*27 PCR-SSP Kiti	Olerup SSP
Ksilen siyanol ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$)	Merk, 1.12007.2500
Proteinaz K	Promega, V3021
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merk,
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merk, 1.06462
Sodyum klorür (NaCl)	Merk, 1.01540.0500
Taq DNA Polimeraz	Sigma, E-5134
Proteinaz K	Promega, V3021
Taq DNA Polimeraz	Promega, M1661
Tris baz (Tris-base) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Appllichem, A2264.1000
Tris hidroklorit ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	Merk, 1.01547.0100

3.1.3. Araç ve Gereçler

Çalışma kullandığımız çeşitli araç ve gereçler alfabetik sıra ile Tablo 7’ de verilmiştir

Tablo 7. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

Cihazlar	Marka
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Buz makinesi	Scotman, İngiltere
Deiyonize su sağlayıcı	Barnstead, ABD
Derin dondurucu (-35)	Arçelik, Türkiye
Distile su cihazı	Şimşek labor teknik, Türkiye
Doğru akım güç kaynağı (250 volt)	EC-250-90
pH metre	Hanna, Portekiz
Etüv	Vilbert Lourmat, Fransa
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
HLA analiz programı	Olerup, İsveç
Laminar air flow	Powtech, Türkiye
Manyetik karıştırıcı	IKA, USA
Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV, İtalya
Otomatik pipet seti	Rainin, ABD
Pastör fırını	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz

Tablo 7’ nin devamı

Polaroid kamera	Gel Cam, İngiltere
Polaroid kamera filmleri	Sigma, ABD
Spektrofotometre	Beckman/Coulter, ABD
Termocycle	Techne Genius, İngiltere
Ultraviole transillüminatör	Vilbert Lourmat, Fransa
Vorteks	Nüve NM110, Türkiye
Yatay elektroforez düzeneği	EC-250-90
Yüksek devirli santrifüj	Hettich, Almanya

5.1.4. Anabilim dalımızda moleküler genetik çalışmalarda kullanılan standart solüsyonlar

5.1.4.1. DNA izolasyon solüsyonları

5X Eritrosit Lizis Çözeltisi (1L)

NaCl : 40,1 g

KCl : 1,8 g

MgCl₂.6H₂O: 7,15 g

veya,

10X Eritrosit Lizis Çözeltisi (1L)

NH₄Cl 82.9 g

KHCO₃ 10 g

Na₂EDTA(0.5M) 20 ml

Proteinaz K çözeltisi (10 mg/ml)

100 mg Proteinaz K

10 ml Proteinaz K seyreltme tamponu

Nuclei Lizis Tamponu (pH 8.2)

10 mM Tris base, = (1.21 g Tris base)

400 mM NaCl, = (23.4 g NaCl)

2 mM Na₂EDTA = (0.74 g Na₂EDTA)

Proteinaz K seyreltme tamponu (pH 8.0)

0.05 M Tris HCl = (0.788 g Tris HCl)

1 mM CaCl₂ = (0.011 g CaCl₂)

Amonyum asetat (9 M, 100 ml)

74 g amonyum asetat

%10'luk (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS, 100 ml)

10 g SDS

0.5M Na₂ EDTA (pH 8.0, 500 ml)

93,5 g Na₂ EDTA

1M Tris-HCl (pH 7.4, 1 L)

157. 6 g Tris-HCl

TE Tamponu (Tris-EDTA, pH 8.0, 500 ml)

10 mM Tris HCl

1 mM Na₂EDTA

5.1.4.2. Klasik Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

10X TBE elektroforez tamponu (Tris-borik asit-EDTA, (pH ▲8.0)

108 g Tris baz

55 g Borik asit

40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

0.5 X çalışma solüsyonu olarak kullanıldı.

Etidium bromide solüsyonu (10mg/ml)

10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işıktan korunarak muhafaza edildi.

Non-denatüre yükleme tamponu (Loading Buffer)

% 50 (w/v) Sükroz

% 0,1 (w/v) Bromfenol mavisi

% 0,1 (w/v) Xylene cyanole

50 mM Na₂ EDTA (pH: 8)

5.2. Yöntemler

Bu çalışmada insan 6. kromozomunun üzerinde bulunan MHC geninin sınıf I bölgesindeki HLA-B*27 gen polimorfizmlerinin belirlenmesi ve B*27 pozitifliği olanların alt gruplarını belirlemek amacıyla hastalardan ve kontrol grubundan 5 ml periferik kan örnekleri alınarak salting-out yöntemi ve otomatize magnetik bead (QIAGEN EZ1) yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı (90).

5.2.1.Periferik Kandan Salting – Out Yöntemi ile DNA İzolasyonu

EDTA' lı tüpteki 5 ml kan 50 ml' lik falkon tüpe alınıp, üzerine 40 ml ELB konarak 30 dk buz üzerinde bekletildi. Soğutmalı santrifüjde +4 °C' de 2500rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant atıldı, kalan pellet üzerine tekrar 40 ml ELB eklendi ve pellet resüspanse edildi. Tekrar 2500 rpm' de 10 dk. santrifüj edildi. Bu ELB ile yıkama işlemi temiz bir pellet elde edinceye kadar yaklaşık 3 defa tekrar edildi. Son yıkamayı takiben elde edilen pellet üzerine 4ml NLB ve 120 µl Proteinaz K eklenip çalkalandı. Son olarak tüplere 425 µl SDS eklendi ve dikkatlice tüpler alt-üst edilerek 37 °C' de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası etüvden çıkarılan örnekler 30 dk. oda ısısında bekletildi. Oda ısısına gelen tüplere 1.4 ml 6M NaCl eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. Örnekler oda ısısında 4500rpm' de 15dk. santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice yeni bir 50 ml' lik falkon tüpe alınarak tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi. Süpernatant 50ml'lik falkon tüpe alınarak üzerine son hacim 20 ml olacak şekilde yavaşça %96' lık etil alkol eklendi. Kapakları kapatılan falkonlar yavaşça altüst edilerek DNA bir araya getirildi. DNA %70' lik etil alkolden geçirilerek 1.5ml' lik ependorf tüpe alındı. Tüpler 1000rpm' de 45 sn. santrifüj edilerek pelletin çökmesi sağlandı. Alkolün fazlası uzaklaştırılarak pellet kurumaya bırakıldı. Pelletin kurduğundan emin olduktan sonra, 500 µl TE buffer eklenerek DNA pelleti

sulandırıldı, 1 gece iyice çözünmesi için oda ısısında bırakıldı. DNA örnekleri çalışma yapılncaya kadar -20 °C’ de bekletildi.

5.2.2. Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen DNA’ların 1/50 oranında dilüsyonları hazırlandı, spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu. 260/280 nm değerlerine göre DNA’ nın saflığı herhangi bir protein veya RNA kontaminasyonunun olmaması için çalışmaya ideal oran olan 1.8’ e yakın olanlar dahil edildi. 1 OD’ nin 50 ng/µl DNA miktarına eşitliğinden gidilerek 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılmak üzere HLA doku tipi analizi için DNA’ lar steril deiyonize su ile 30 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

5.2.3. HLA- B*27 Alt Tiplerinin PCR-SSP Yöntemiyle Belirlenmesi

AS’li hastalarda MHC-HLA genlerinin tiplendirmesi PCR-SSP yöntemi ile yapıldı (53). Hastaların HLA-B*27 alleli taşıyıp taşımadığını belirlemek için standart hale getirilmiş ticari PCR-SSP kitleri (Olerup, İsveç) kullanıldı. Her bir kit için PCR reaksiyonu kuruldu ve amplifikasyon sonrası %2’ lik agaroz jelde yürütüldü. Elde edilen sonuçlar uygun bilgisayar programında değerlendirilerek kişilerin doku tipleri belirlendi. Daha sonra HLA-B*27 alleli pozitif olan hastalar yüksek rezolüsyonlu PCR-SSP çalışması ile yeniden reaksiyona tabi tutulup HLA-B*27 alt tipleri belirlendi. HLA-B*27 alt grupları için 32 farklı yüksek rezolusyonlu primer kullanıldı.

Çalışmamızda HLA-B*27 alt gruplarının tespiti için Olerup, İsveç firmasından temin edilen 32 kuyucuklu PCR-SSP HLA-B*27 kit kullanıldı. Bu sistemde her bir kuyucuk spesifik primerler emdirilmiş şekilde dizayn edilmiştir. Primerler, optimal PCR amplifikasyonuna göre dizayn edilmiştir.

HLA-B*27 alt gruplarının analizinde PCR-SSP yöntemiyle her bir örnek için son hacim 340 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı.

Master miks (Olerup)102 µl

Distile su175.5 µl

Taq Polimeraz enzimi2.5 µl

DNA (30 ng/µl),60 µl

Hazırlanan master miksler vortekste karıştırıldı ve her bir hasta için 32 kuyucuklu pleytin herbir kuyucuğuna 10' ar µl paylaştırıldı. Tablo 8' de verilen PCR döngü programına uygun olarak amplifiye edildi.

Tablo.8. HLA-B*27 Alt grup analizi için PCR döngü programı

Başlangıç denatürasyonu	94°C	2 dakika	10 döngü
Denatürasyon	94°C	10 saniye	
Annealing-extansiyon	65°C	1 dakika	
Denatürasyon	94°C	10 saniye	20 döngü
Annealing	61°C	50 saniye	
Extansiyon	72°C	30 saniye	
Hold	4 °C	Süresiz	

Amplifiye edilen HLA-B*27 PCR-SSP ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi için 0.5X veya 1XTBE tamponlu %2' lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler, her bir hasta için 32 kuyucuğa sahip jele yüklenerek 1X TBE' li tampon ortamında, 80V, 45A' de 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçların UV transillüminatörde değerlendirilmesinde her bir kuyucukta bulunan pozitif kontrollerin çalışıp çalışmadığı kontrol edilerek çift bant gösteren kuyucuklar pozitif kabul edildi ve jel dökümantasyon görüntüleme sistemiyle fotoğraflanıp bilgisayara kayıt edildi.

5.3. İstatistik Analiz

HLA-B*27 alt gruplarının hasta ve kontrol gruplarında dağılımının hesaplanmasında Arlequin v311 bilgisayar programıyla yapıldı (91). Elde edilen frekanslara ki-kare testi uygulandı ve $P < 0.005$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 121 AS (72 erkek, 49 kadın) hastasının kan örneklerinden izole edilen DNA'lar, KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı polikliniğine başvurmuş, Modifiye New York kriterlerine göre Ankilozan Spondilit tanısı almış hastalardan elde edilmiştir. Kontrol grubu ise KTÜ Tıp Fakültesi Doku Tipleme Laboratuvarında doku grupları belirlenmiş, her aileden yalnız bir kişi olacak şekilde rastgele seçilmiş, AS öyküsü olmayan kemik iliği ve böbrek transplant hastalarının sağlıklı donör adaylarından seçilmiştir. Çalışmamızda yer alan 121 AS hastasının 115'inde HLA-B*27 pozitifliği belirlenmiştir.

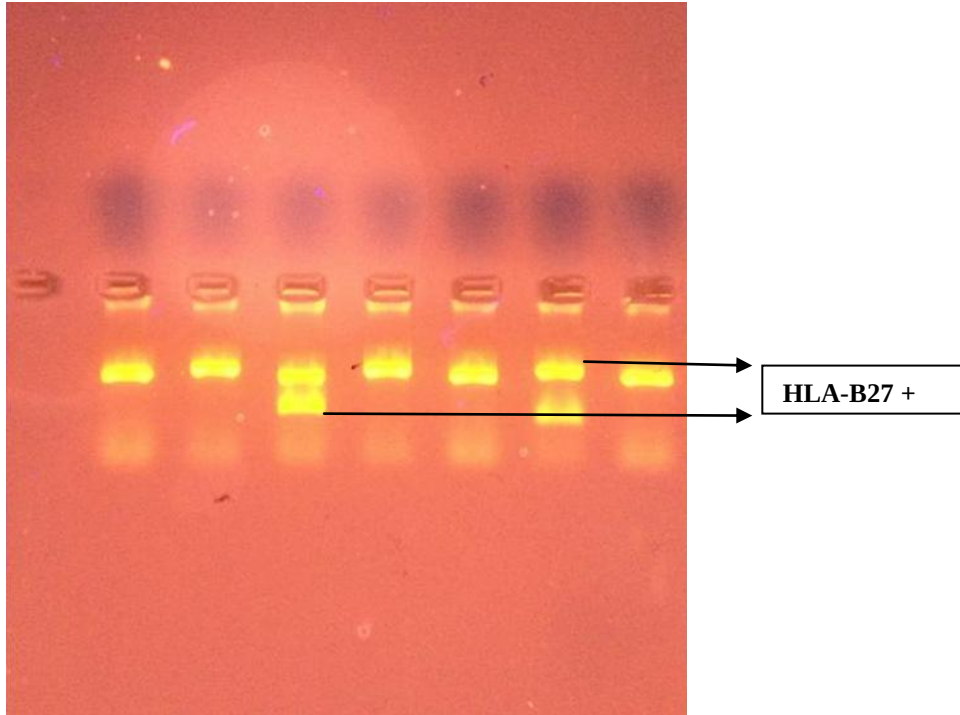
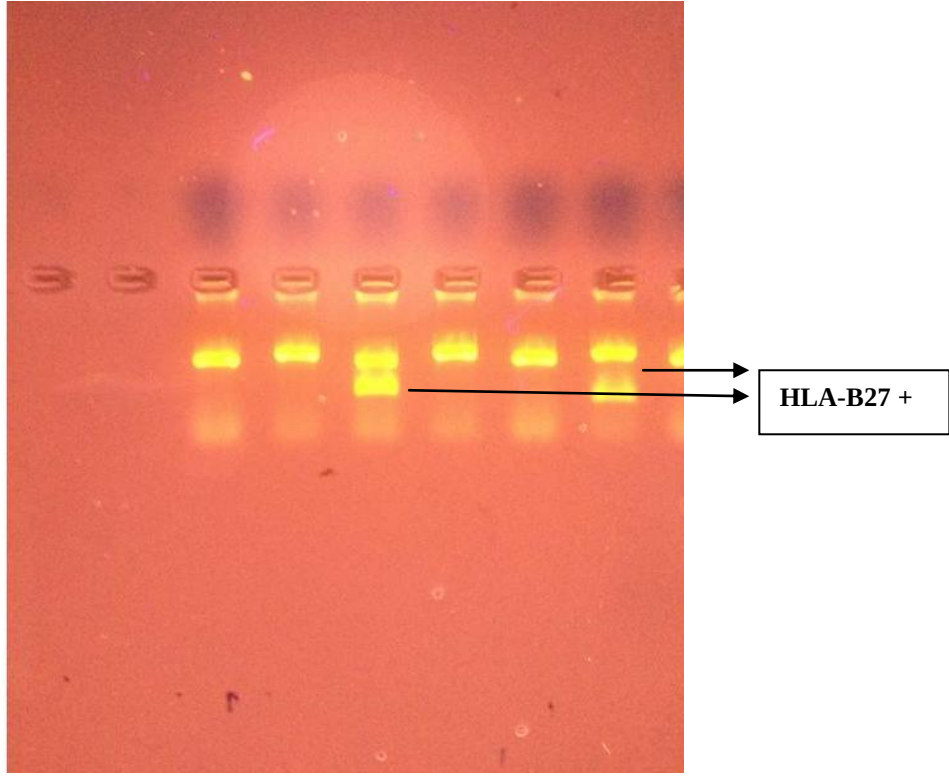
6.1. AS Hastalarında ve Kontrol grubunda HLA-B*27 Dağılımı

AS öyküsü olmayan kemik iliği ve böbrek transplant hastalarından oluşmuş, toplam 400 bireyin dahil olduğu çalışma grubunda 20 bireyin HLA-B*27 (+) olduğu, geriye kalan 380 bireyin ise HLA-B*27 (-) olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda AS hastalarında HLA-B*27 frekansı %95, kontrol grubunda ise %4.5 olarak belirlenmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. AS Hastalarında ve Kontrol Grubunda HLA-B*27'nin Frekansı

	HLA B*27 (+)	HLA B*27 (-)
Sağlıklı (Popülasyon)	20 (%5)	380 (%95)
Hasta grubu (AS)	115 (%95.05)	6 (%4.95)

Resim 1. B*27 (+) jel görüntüleri



6.2. AS'li Hastalarda ve Kontrol Grubunda HLA-B*27 Alt Tiplerinin Dağılımı

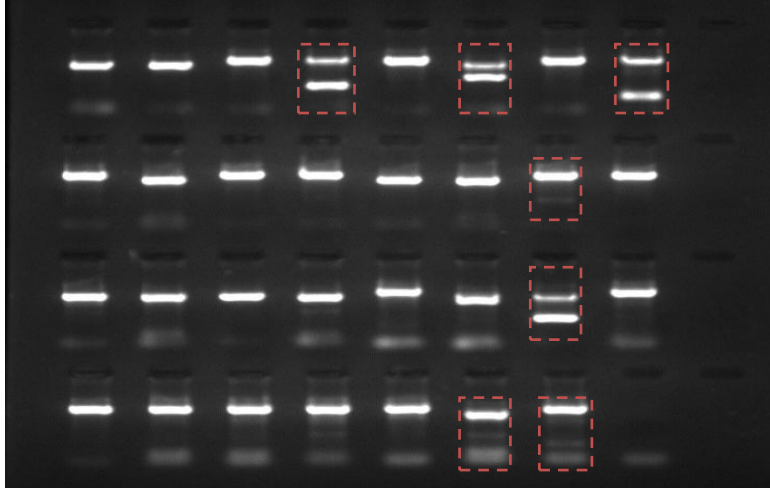
AS hastaları ve kontrol grubunda HLA-B27 alt gruplarının dağılımı Tablo 10' da verildi. AS hastalarında HLA B*2701, B*2702, B*2705, B*2707, B*2708, B*2712, B*2723, B*2731, B*2740, B*2748, B*2756 alt grupları belirlendi. Kontrol grubunda ise B*2702, B*2705, B*2756 alt grupları ve AS'den farklı olarak B*2753 alt grubu tespit edildi. HLA-B*2707, B*2708, B*2712, B*2723 ve B*2731 alt grupları sadece birer hastada görüldü, frekansları %0,87 olarak hesaplandı. HLA-B*2705, B*2701 ve B*2740 ise ikişer hastada bulundu, frekansları %1,74 olarak hesaplandı. HLA-B*2748 ise 3 hastada tespit edildi (%2,60). AS hastalarında en sık gözlenen ikinci alt grup B*2702 %19,1 oranında görülürken kontrol grubunda ise %37,5 oranında görüldü. HLA-B*2702 kontrol grubunda yüksek hesaplanmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Benzer olarak HLA-B*2705 kontrol grubunda hastalara oranla çok daha yüksek görülmesine rağmen (%38,1), istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. HLA-B*2753 hasta popülasyonunun da hiç görülmezken, kontrol grubunda sadece 1 kişide tespit edilip frekansı %4,76 olarak hesaplandı. HLA-B*2756 hem kontrol (%28,5) hem de hasta grubunda (%68,7) en sık görülen alt gruptur. Hasta grubunda kontrole göre yüksek hesaplanması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$).

Tablo 10. AS hasta ve kontrol grubunda HLA-B*27 alt gruplarının dağılımı

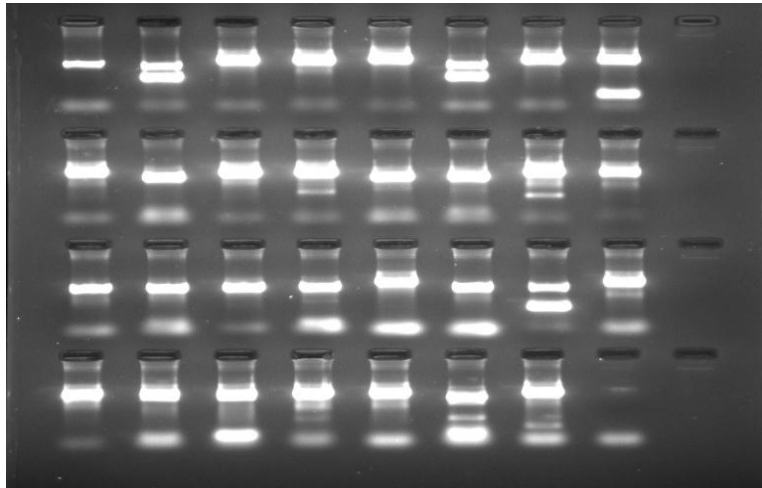
HLA-B*27 Alt Grupları	Kontrol Grubu		Hasta Grubu		P değeri
	n =21	Frekans	n =115	Frekans	
HLA-B*2701	-		2	%1,74	
HLA-B*2702	6	%37,5	22	%19,1	0,56
HLA-B*2705	8	%38,1	2	%1,74	
HLA-B*2707	-		1	%0,87	
HLA-B*2708	-		1	%0,87	
HLA-B*2712	-		1	%0,87	
HLA-B*2723	-		1	%0,87	

Tablo 10' un devamı

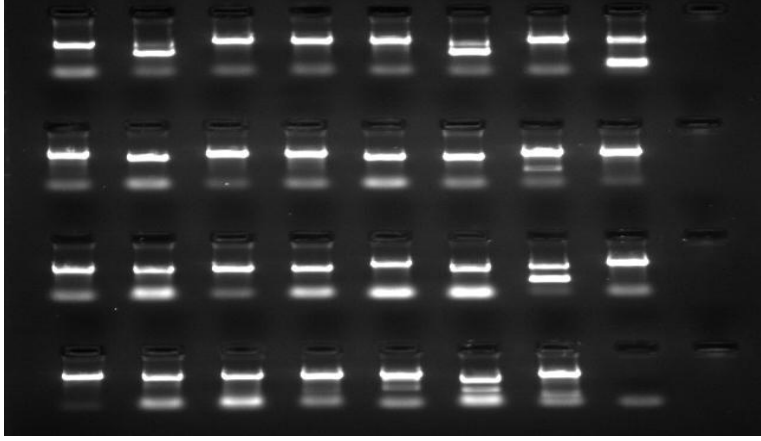
HLA-B*2731	-		1	%0,87	
HLA-B*2740	-		2	%1,74	
HLA-B*2748	-		3	%2,60	
HLA-B*2753	1	%6,25	-	-	
HLA-B*2756	6	%28.5	79	%68,7	0,001



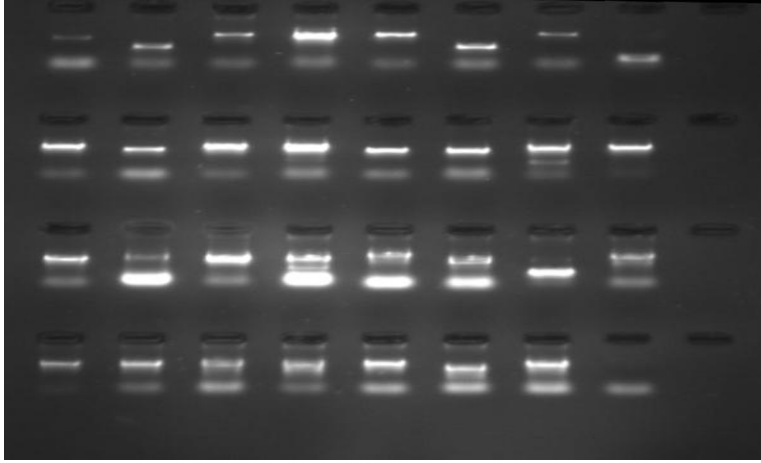
Resim 2. HLA-B*2756'nin agaroz jel görüntüsü(4, 6, 8, 15, 23, 30, 31 no' lu örnekler pozitifdir).



Resim 3. HLA-B*2702'nin agaroz jel görüntüsü



Resim 4. HLA-B*2748'in agaroz jel görüntüsü.



Resim 5. HLA-B*2705'in agaroz jel görüntüsü

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ankilozan Spondilit (AS), omurgada ilerleyen katılık ve eklem ağrısı ile karakterize edilen sistemik inflamatuvar bir romatizmal hastalıktır (92). Hastalığın belirtileri sıklıkla geç adolesan veya erken erişkinlik döneminde başlar. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülen bu hastalık kadınlarda çoğunlukla daha yavaş seyretmektedir. Genel olarak hastalığın beyaz ırkta prevalansı % 0.2-1.4 olarak bilinmektedir (21). AS etiolojisinde genetik ve çevresel faktörler rol oynadığı bilinmektedir. Genetik faktörlerden özellikle 6. kromozomun kısa kolunda lokalize immün sistem genlerinden olan ve oldukça polimorfizm gösteren HLA class I gen ailesinin bir üyesi olan HLA-B27 ile ilişkilendirilmektedir. (92, 95). AS'li hastaların %90-95'de HLA-B27 pozitifdir (6, 7). HLA-B27 pozitif olan hastalarda ekstra-artiküler tutulum görülme sıklığı artmaktadır ve takipte bu göz önünde bulundurulmalıdır. HLA B 27'nin bugüne kadar 62 alt grubu tespit edilmiştir. AS'in HLA-B*2705, HLA-B*2702 ve HLA-B*2704 alt grupları ile kuvvetli, HLA-B*2703, HLA-B*2706, HLA-B*2709 ile zayıf ilişkili olduğu bildirilmektedir (8-13).

Çalışmamızda yer alan 121 AS hastasının 115 tanesinde ve 400 sağlıklı kontrol grubunda yer alan 20 kişide HLA-B*27 pozitifliği tespit edilmiştir. Kontrol grubunda 4 farklı HLA-B*27 alt grubu, AS hasta grubunda ise 11 farklı HLA-B*27 alt grubu (HLA B*2701, B*2702, B*2705, B*2707, B*2708, B*2712, B*2723, B*2731, B*2740, B*2748, B*2756) tespit edilmiştir. Kontrol grubunda bulunan alt gruplardan HLA-B*2753 hariç hepsi (HLA-B*2702, B*2705 ve B*2756) AS hasta grubunda da tespit edilmiştir. HLA-B*2705 frekansı kontrol grubunda AS hastalarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu veri HLA-B*2705'in hastalığa karşı koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. HLA alt tiplerinin AS hastalarındaki dağılımı ile ilgili literatürde bir çok popülasyon çalışması bulunmaktadır. Dünya genelinde yapılan bir meta-analizde; HLA-B27 alt tiplerinden B*2702, B*2704 ve B*2705'in AS ile pozitif ilişkili, B*2706 ve B*2709'un ise AS ile negatif ilişkili olduğunu göstermiştir (48).

Bizim çalışmamızda hasta grubunda en yaygın alt grup HLA*B2756 olmasına rağmen, ülkemizde Konya'da yapılan bir tez çalışmasında ise AS hastalarında HLA-

B*2702, B*2704, B*2705 ve B*2707 alt grupları, kontrol gruplarında ise HLA-B*2702, B*2703, B*2704, B*2705 ve HLA-B*2702 /B*2705 alt grupları tespit edilmiştir. Bu çalışmada HLA-B*2705 (%65.2) en yaygın alt gruptur. Kontrol grubunda ise en yaygın alt tip bizim çalışmamızda olduğu gibi HLA-B*2705 bulunmuştur (94). Yine ülkemizde Samsun'da yapılan bir başka çalışmada HLA-B*27 (+) 38 hastadan oluşan AS hasta grubunda ve 47 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda en sık HLA-B*2705 (%66) alt grubu görülmüştür. Bunun haricinde hasta ve kontrol grubunda sırasıyla %26.3 ve %34 oranında HLA-B*2702 alt grubu görülmüştür. B*2708 alt grubu ise kontrol grubunda görülmemesine rağmen %2.6 oranında hasta grubunda görülmüştür (95). Ülkemizin Doğu Anadolu Bölgesinde yer alan Erzurum'da 43 hasta ve 39 gönüllü kemik iliği vericisinden oluşan kontrol grubuyla yapılan çalışmada HLA-B*27 alt gruplarının dağılımında hasta ve kontrol gruplarının arasında belirgin bir farka rastlanmamıştır. İlk olarak HLA*B2746, B*2749 ve B*2767 alt grupları saptanmıştır. B*27 alt grupları arasında hem AS hastalarında hem de kontrollerde en yaygın HLA*B2702 ve B*2705 görülmüştür. HLA-B*2702 alt grubu hasta ve kontrollerde %48.8 ve %46.2 oranında baskın olarak görülmüştür (96). Yine İstanbul'da SpA'lı (spondiloartropati) hastalarda yapılan bir çalışmada sağlıklı kontrol grubunda HLA-B*27 pozitifliği %2.6 bulunmuştur. Hastalarda ise HLA-B*2705 baskın allel olarak öne çıkmıştır (97).

Çalışmamızda HLA-B*2756 kontrol grubuna göre AS hastalarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuç HLA-B*2756'nın bölgemizde AS'ye yatkınlıkta rolü olduğunu düşündürmektedir. Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde AS hasta ve kontrol grubunda HLA-B*2756 alt grubuna rastlanmamıştır. Bunun nedeni bölgemizde yaşayan insanların daha sık bu allelleri taşımalarından ve rezolüsyonu yüksek yeni moleküler teknikler sayesinde tespit edilen yeni alleller olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Ülkemizde bu konuda çok fazla sayıda çalışma olmamasına rağmen ülkemiz dışında başka bir çok yerde AS hastalarında HLA-B*27 alt gruplarının frekansı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin; Kore popülasyonunda hasta grubunda HLA-B*2705 en baskın alt grup olarak belirlenmiştir. Bu sonucu da Japonlar gibi diğer

Asyalılar da HLA-B*2704'e sahip olduklarından dolayı dikkate değer bulmuşlardır. Bununla beraber hastalarda HLA-B*2704 haricinde başka bir alt gruba rastlanmamıştır.

Aynı çalışmada etnik gruplar arasında HLA-B*27 alt gruplarının dağılımı; Tayvan, Tayland ve Endonezya popülasyonlarında bulunan AS hastalarında HLA-B*2704, Hollanda popülasyonunda ise HLA-B*2705 yaygın olarak görülmüştür (98).

Çin'de Han popülasyonunda yapılan bir çalışmada HLA-B*27 alt gruplarına bakılmış ve HLA-B*2704 ve B*2705 alt grupları sık görülmüştür fakat B*2705'e nispeten B*2704 ile AS arasında sıkı bir ilişki gözlenmiştir (99). Çin Wuhan popülasyonunda AS hastalarında HLA-B*27 alt gruplarının dağılımı incelendiğinde HLA-B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706 ve B*2713 olmak üzere 6 alt grup tespit edilmiştir. HLA-B*2704 ve B*2705 hasta ve kontrol grubunda yaygın olarak görülmüştür. AS hastalarında kontrole oranla HLA-B*2704 frekansı HLA-B*2705 frekansına göre daha yüksek hesaplanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları HLA-B*2704 ve B*2705'in özellikle de B*2704'ün Çin Wuhan halkında hastalıkla güçlü bir ilişkisi olduğunu göstermiştir (100).

İran popülasyonunda yapılan çalışmada, 60 AS hastası ve 430 sağlıklı kan vericisi seçilmiştir. 40 hastada (%66.7) ve 17 kontrol grubundan bireyde (%3.95) HLA-B*27 pozitif görülmüştür. HLA-B*2702, B*2704, B*2705 ve B*2707 alt grupları ve bir hastada da HLA-B*2702/B*2710 alt grubu saptanmıştır. AS hasta grubu ve kontrol grubunda bu allellerin dağılımı arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak; İranlılar arasında Kafkas alt grupların baskın olmasına rağmen, bu popülasyon spesifik Kafkas ve doğu alt gruplarının kombinasyonu ile karakterize edilmiştir. Çalışmada her ne kadar sonuç bu şekil de yorumlansa da bulunan benzer örnek sonuçlarından ve daha çok etnik grup çalışmalarının sonuçlarının beklenmesi gerektiğinden net bir sonuç vermek için dikkat edilmesi gerektiği belirtilmiştir (101).

Sardinya ve Macar popülasyonun da AS ile HLA-B*27 alt grupları arasındaki ilişkiyi inceleyen iki farklı çalışmada diğer Kafkas popülasyon çalışmalarında olduğu gibi HLA-B*2705 ile hastalık arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur (102, 103).

Kıbrıs Rum kesimi halkında yapılan (60 kontrol ve 42 hasta) HLA-B*27 alt grupları çalışmasında hasta grubunda HLA-B*2702 ve B*2705 baskın alt grup olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda buna ek olarak sadece HLA-B*2707 gözlenmiştir. HLA-B*2707'nin sadece sağlıklı kontrol grubunda görülmesi hastalık için koruyucu rol oynadığını düşündürmüştür (104).

İsrail popülasyonunda yapılan çalışmada da AS hasta grubunda diğer ülkelere benzer olarak HLA-B*2702 ve B*2705 alt grubu yaygın olarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubu arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda hasta grubuna ek olarak düşük frekansta da olsa HLA-B*2701 ve B*2707 alt grupları saptanmıştır. HLA-B*2702 alt grubu İsrail'deki Aşkenazi Yahudilerinde hastalığa yatkınlıkta majör alt grup olarak görülmüştür (105).

Hırvat popülasyonunda, 50 AS hastası ve 38 B-27 (+) sağlıklı kontrol grubundan oluşan çalışmada PCR-SSP yöntemi ile HLA-B*27 alt grupları dağılımı incelenmiştir. AS hasta grubunda HLA-B*2705 (%83) , B*2702 (%13.2), B*2704 ve B*2701 olmak üzere 4 alt grup tespit edilmiştir. B*27 (+) hasta grubunda ise en sık allel olarak HLA-B*2705 ve HLA-B*2702 bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna göre AS ve HLA-B*27 alt grupları arasında belirli bir ilişki olduğunu gösteren belirgin bir kanıt bulunmamıştır (106).

Danimarka popülasyonunda yapılan bir çalışmada HLA-B*27 (+) 51 sağlıklı kan vericisinde ve 30 AS hastasında HLA-B*27 alt grupları incelenmiş ve sağlıklı kontrol grubunda HLA-B*2705 (%90.2) ve HLA-B*2702 (%9.8) alt grupları bulunmasına rağmen AS hasta grubunda yalnızca HLA-B*2705 alt grubu bulunmuştur. Bu sonuca göre Danimarka popülasyonunda belirli HLA-B*27 alt grupları ile AS arasındaki ilişkiye dair kayda değer bir ilişki saptanmamıştır (107).

Kuzeybatı İspanya'da bulunan özerk Galiçya popülasyonunda yapılan HLA-B*27 ve HLA-B*27 alt gruplarıyla AS arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi, AS hastalarının %94.3'ünde, sağlıklı organ vericilerinin ise %9.34'ünde HLA-B*27 pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada 11 tane HLA-B*27 alt grubu bulunmuştur fakat AS hastalarında HLA-B*2701, B*2709 ve B*2710 alt gruplarına rastlanmamıştır. Normal popülasyonda HLA-B*2702, B*2705 ve B*2708 alt

grupları görülmüştür. AS ile HLA-B*2705 (%88) ve B*2702 (%12) alt grupları ilişkilendirilmiştir. AS ile HLA-B*27 alt grupları frekansı arasındaki bu ilişki diğer bölgelerdeki İspanyol halk ile benzer bulunmuştur (108).

Venezuela popülasyonunda yapılan çalışmada hasta grubunda en yaygın alt grup HLA-B*2702 ve B*2705 saptanmıştır. Sağlıklı kontrol grubunda ise en yaygın alt grup HLA-B*2708 tespit edilmiştir. Bu sonuçta hastalık için koruyucu alt grup olduğunu düşündürmüştür (109). HLA-B*27 (+) AS hastasında yapılan 7 çalışma hasta ve kontrol grubunda HLA-B*2706'nın koruyucu rol oynadığını göstermiştir (110).

Kolombiya popülasyonunda yapılan çalışmada HLA-B*2702 ve B*2705 en yaygın alt grup olarak tespit edilmiştir ve burada yaşayan etnik gruplar arasında HLA-B*27'nin farklılık göstermediği dikkat çekmiştir. Yine bu çalışmada AS hastalığı ile HLA-B*2702, B*2704 ve B*2705 alt gruplarının en yüksek ilişkili olduğu saptanmıştır (111).

Özetle, farklı popülasyonlarda yapılan çeşitli çalışmalarda, AS' li hastalarda en yaygın alt tiplerin B*2705 ve B*2702 olduğu gösterilse de her popülasyonda farklı HLA-B*27 alt tipleri ön plana çıkmaktadır. Ülkemizde konuyla ilgili yapılan kısıtlı sayıdaki çalışmalarda ise AS hastalarında B*2705 'in B*2702'den daha sık görüldüğü belirtilmiştir (94, 95, 96). Gerçek popülasyon dağılımları eksik olup farklı bölgelerde hangi allellerin hastalıkla pozitif veya negatif ilişkili olduğu, hastalık aktivasyonu hakkında yeterli bilgi mevcut değildir.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda AS hastalarında HLA-B*27 pozitifliği diğer ülkelerde yapılan popülasyon çalışmalarına benzer şekilde %95.05 oranında, kontrol grubunda ise %4.95 oranında görüldü. Diğer ülkelerin aksine AS hasta grubunda en yaygın HLA-B*27 alt grubu HLA-B*2756 (%68.7) saptandı. Kontrol grubunda ise frekansı en yüksek alt grup diğer ülkelerde olduğu gibi HLA-B*2705 (%38.1) ve HLA-B*2702 ve HLA-B*2756 (%28.5) olarak saptandı. Bu sonuç, bizim bölgemizde diğer bölgelere ve ülkelere göre AS hasta popülasyonunda bulunan HLA-B*27 alt grupları bakımından farklılık olduğunu göstermiştir.

Tablo 11. AS' nin çeşitli ülkelerdeki HLA-B*27 alt grupları ile ilişkisi

ÜLKE	AS ile İlişkili HLA-B*27 Alt Tipleri	
Türkiye(Trabzon)	B*2702	B*2756
Türkiye(Konya)	B*2702	B*2705
Türkiye(Samsun)	B*2702	B*2705
Türkiye(Erzurum)	B*2702	B*2705
Asya:Tayvan/Tayland/Kore/Japonya/Hollanda	B*2704	B*2705
Çin Han/ Wuhan	B*2704	B*2705
Kafkas (Sardinya/Macar)		B*2705
Kıbrıs Rum kesimi	B*2702	B*2705
İsrail	B*2702	B*2705
Hırvatistan	B*2702 B*2704	B*2705
Danimarka	B*2702	B*2705
Kuzeybatı İspanya	B*2702	B*2705
Venezuela	B*2702	B*2705
Kolombiya	B*2702 B*2704	B*2705

Tablo 11. Çeşitli ülkelerde AS'ye karşı koruyucu olduğu düşünülen HLA-B*27 alt grupları

Ülke	AS'ye karşı koruyucu olan HLA-B*27 alt grupları			
Türkiye(Trabzon)		B*2705		
Türkiye(Konya)		B*2705		
Türkiye(Samsun)		B*2705		
Türkiye(Erzurum)	B*2702			
Çin Han/ Wuhan	B*2704	B*2705		

8. SONUÇLAR

8.1. Sonuçlar

AS hastalarında; %95.05 oranında HLA-B*27 pozitifliği bulunmuştur.

Çalışmamızda HLA-B*27 pozitif AS hastalarında HLA B*2701, B*2702, B*2705, B*2707, B*2708, B*2712, B*2723, B*2731, B*2740, B*2748, B*2756 alt grupları tespit edilmiştir.

Kontrol grubunda ise HLA-B*27 pozitifliği %4.95 oranında bulunmuş, B*2702, B*2705, B*2753 ve B*2756 alt grupları tespit edilmiştir.

AS hasta grubunda HLA-B*2756 en sık görülen alt gruptur (%68.7). Ayrıca HLA-B2756 kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). Bu sonuç HLA-B*2756'nın bölgemizde AS hastalığına yatkınlıkta pozitif ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Kontrol grubunda ise en sık HLA-B2705 alt grubu bulunmuştur (%38.1). Ancak, HLA-B*2705'in AS hasta grubuna göre kontrol grubunda yüksek bulunması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen hastalıkla negatif ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

8.2. Öneriler

HLA B27 pozitifliğinin ve alt gruplarının ülke genelinde AS hastalarında çalışılarak, ülkemizde hastalıkla pozitif ve negatif ilişkili HLA-B*27 alt gruplarının tespit edilmesi.

HLA gen bölgesinde yer alan HLA genlerinin ve diğer genlerin hastalıkla ilişkisinin araştırılması.

Sonuçların biyokimyasal ve immünolojik testlerle karşılaştırılması.

AS hastalarının klinik bulgularına (hastalığın şiddeti, tedavi süresi) göre alt sınıflara ayrılarak, B27 allelerinin bu alt sınıflarda dağılımının incelenmesi.

Hastalığın etiyolojisinin tam olarak aydınlatılabilmesi için çevresel faktörlerin hastalıktaki rolünün çalışılması.

Yukarıdaki önerilere ilaveten HLA-B*27 pozitifliğinin AS de tanısında kullanılan önemli bir kriter olmasının yanında, alt grupların hastalığın şiddeti ile ilişkili olabileceği ve tedavi planlamasında klinisyene yol gösterebileceğine inanmaktayız.

9. KAYNAKLAR

1. Maksymowcyh WP (2003). Spondyloarthropathies: Ankylosing spondylitis. Rheumatology (Eds: Hochberg H, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH). 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Lmt, 1183-92.
2. Haywood KL, Garratt AM, Dawes PT (2003). Patientassessed health in ankylosing spondylitis: astructured review. Rheumatology 44: 577-86.
3. Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A, Sieper J (1998). Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. Arthritis Rheum 41: 58-67.
4. Gran JT, Husby G, Hordvik M (1985). Prevalence of ankylosing spondylitis in males and females in a young middle-aged population of Tromso, northern Norway. Ann Rheum Dis 44: 359-67.
5. Khan MA (2002) Update on spondyloarthropathies. Ann Intern Med 136: 896-907.
6. Camcıoğlu Y (2007). Antijenin yakalanması ve lenfositlere sunumu. Temel İmmünoloji. (Ed: Camcıoğlu Y, Deniz G). İstanbul, 41-61.
7. Baron M, Zendel I (1989). HLA-B27 testing in ankylosing spondylitis: an analysis of the pretesting assumptions. J Rheumatol 16: 631-6.
8. Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, Akkoc N (2007). The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. Autoimmun Rev 6: 183-9.
9. Akkoc N, van der Linden S, Khan M (2006). Ankylosing spondylitis and symptom-modifying vs disease-modifying therapy. Best Pract Res Clin Rheumatol 20: 539-57.
10. Shamji MF, Bafaquh M, Tsai E (2008). The pathogenesis of ankylosing spondylitis. Neurosurg Focus 24: E3.
11. Galocha B, de Castro JA (2008). Folding of HLA-B27 subtypes is determined by the global effect of polymorphic residues and shows incomplete correspondence to ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 58: 401-12.
12. Nicknam MH, Mahmoudi M, Amirzargar AA, Ganjalikhani Hakemi M, Khosravi F, Jamshidi AR, Amirkhani A, Ansaripour B, Pourpak Z, Moin M, Nikbin (2008). Determination of HLA-B27 Subtypes in Iranian Patients with Ankylosing Spondylitis. Iran J Allergy Asthma Immunol 7: 19-24.

13. Ben Radhia K, Ayed-Jendoubi S, Sfar I, Ben Romdhane T, Makhlouf M, Gorgi Y, Ayed K (2008). Distribution of HLA-B*27 subtypes in Tunisians and their association with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 75: 172-5.
14. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DCO, Sturrock RD (1973). Ankylosing spondylitis and HLA-B27. *Lancet* 301: 904-907.
15. Calin C (1998). Terminology, introduction, diagnostic criteria, and overview, in *The Spondylarthritides* (Eds: Calin, A, Taurog, JD). Oxford University Press, 1-15.
16. Espinoza LR, Cuellar ML (1997). Clinical aspects of the spondyloarthropathies, in *HLA-B27 in The Development of Spondyloarthropathies* (Ed: Lopez-Lerrea C). Landes Austin, 1-16.
17. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD (1973). Ankylosing spondylitis and HLA-B27. *Lancet* 28; 1: 904-7.
18. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM (1973). High association of an HLA antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *New Engl. J Med* 288: 704-706.
19. Gran JT, Husby G (2003). Epidemiology of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* (Eds: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH). Mosby: Philadelphia, 1153-9.
20. Sieper J, Braun J, Rudwaillet M, Boonen A, Zink A (2002). Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 3: 8-18.
21. Arnett FC.(1997). Ankylosing spondylitis. *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology* (Ed: Koopman WJ). Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1197–208.
22. Maksymowych WP (2003). Spondyloarthropathies: Etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* (Eds: Hochberg M, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH). 3 ed. Philadelphia: Elsevier Limited, 1183-92.
23. Sieper J, Braun J (1995). Pathogenesis of spondylarthropathies. Persistent bacterial antigen, autoimmunity, or both? *Arthritis Rheum* 38: 1547-54.
24. Mear JP, Schreiber KL, Münz C, Zhu X, Stevanović S, Rammensee HG, Rowland-Jones SL, Colbert RA (1999). Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol* 163: 6665-70.

25. Luthra-Guptasarma M, Singh B (2004). HLA-B27 lacking associated beta2-microglobulin rearranges to auto-display or cross-display residues 169-181: a novel molecular mechanism for spondyloarthropathies. *FEBS Lett* 575: 1-8.
26. Tsai WC, Chen CJ, Yen JH, Ou TT, Tsai JJ, Liu CS, Liu HW (2002). Free HLA class I heavy chain-carrying monocytes--a potential role in the pathogenesis of spondyloarthropathies. *J Rheumatol* 29: 966-72.
27. Mielants H, Veys EM, Goemaere S, Goethals K, Cuvelier C, De Vos M (1991). Gut inflammation in the spondyloarthropathies: clinical, radiologic, biologic and genetic features in relation to the type of histology. A prospective study. *J Rheumatol* 18: 1542-51.
28. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, Taylor A, Calin A, Wordsworth P (1997). Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum* 40: 1823-8.
29. Järvinen P (1995). Occurrence of ankylosing spondylitis in a nation wide series of twins. *Arthritis Rheum* 38: 381-3.
30. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole (1987). AR Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 30: 201-12.
31. Reveille JD, Arnett FC (2005). Spondyloarthritis: update on pathogenesis and management. *Am J Med* 118: 592-603.
32. Zawacka A, Loll B, Biesiadka J, Saenger W, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A (2005). X-ray diffraction analysis of crystals from the human major histocompatibility antigen HLA-B*2706 in complex with a viral peptide and with a self-peptide. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 1: 1097-9.
33. Sieper J (2007). Management of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* (Eds: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH). 3rd ed. Philadelphia: Mosby, 1143-64.
34. Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R, Collantes E, Davis JC Jr, Dijkman B, Dougados M, Géher P, Inman RD, Khan MA, Kvien TK, Leirisalo-Repo M, Olivieri I, Pavelka K, Sieper J, Stucki G, Sturrock RD, van der Linden S, Wendling D, Böhm H, van Royen BJ, Braun J; 'ASsessment in AS' international working group; European League Against Rheumatism (2006). ASAS/EULAR

- recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 65: 442-52.
35. Van Gaalen FA (2012). Does HLA-B*2706 protect against ankylosing spondylitis? A meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 15: 8-12.
 36. Khan MA (1997). Ankylosing spondylitis. *Primer on rheumatic diseases* (Ed: Klippel JH). Atlanta; Arthritis Foundation, 189-93.
 37. Zeboulon N, Dougados M, Gossec L (2008). Prevalence and characteristics of uveitis in spondylarthropathies: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 67: 955-9.
 38. Luthra HS (2001). Extraarticular rheumatoid arthritis. *Arthritis and Allied Conditions* (Ed: Koopman WJ). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1187-201.
 39. Voskuyl AE, Zwinderman AH, Westedt ML, Vandenbroucke JP, Breedveld FC, Hazes JMW (1996). The mortality of rheumatoid vasculitis compared with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 266-71.
 40. Woltheim AF, Madison PJ, Isenberg AD, Woo P, Glass DN. Rheumatoid arthritis the clinical Picture. *Oxford Textbook of Rheumatology*. 4th ed, Atlanta: Oxford University Press, 1004-31.
 41. Khan MA, Braun WE, Kushner I (1977). Comparison of clinical features of HLA-B27 positive and negative patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 20: 909-12.
 42. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A (1984). Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 27: 361-8.
 43. Braun J, Sieper (2007). Ankylosing spondylitis. *Lancet* 369: 1379-90.
 44. Martínez B, Caraballo L, Hernández M, Valle R, Avila M, Iglesias Gamarra A (1999). HLA-B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis (As) in Colombia. *Rev Invest Clin* 51: 221-6.
 45. Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL (2003). Anti-TNF- α therapies: the next generation. *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 736-46.
 46. Trowsdale J (1995). “ Both man & bird & beast” : comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics review* 41: 1-17.

47. Snell GD (1981). Studies in histocompatibility. Science 213: 172-178.
48. Uçar F, Ovalı E, Değer O, Önder E, Kartı SS (2001). MHC gen kompleksi ve HLA doku tiplendirmesi testlerinin önemi. İbn-i Sina Tıp Dergisi 6: 117-124.
49. Gürtekin M, Aydın F, Oğuz FS (1997). Kemik iliği nakli yapılacak hastaya verici seçilmesinde Karışık lenfosit kültür testi ve genotiplemenin uyumu. Klinik Gelişim Dergisi 10: 12-16.
50. Beksaç M (2004). HLA ve Doku tiplendirmesi. THD Kan ve Kemik iliği Transplantasyonu Kurs Kitabı, 42-49.
51. Koein J, Sato A (2000). HLA System First of Two Parts. N Eng J Med 343: 702-709.
52. Oğuz FS, Kalaycıoğlu S, Diler AS, Tozki H, Sargin D, Carin M, Dorak MT (2003). HLA system affects the age-at-onset in chronic myeloid leukemia. Am J Hematol 73: 256-62.
53. Qlerup O, Zetterquist H (1992). HLA-DR Typing by PCR amplification with Sequence-Specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. Tissue Antigens 39: 225-235.
54. Çarin M (1997). Transplantasyon İmmunolojisi (HLA sistemi). Klinik gelişim Dergisi 10: 7-11.
55. Sebik F (1998). HLA sistemi. Aktüel Tıp Dergisi 3: 86-89.
56. Svegaard A, Ryder LP (1976). Interaction Of Hla Molecules With Nonimmunological Ligands As An Explanation Of HLA And Disease Association. Lancet 2: 547-9.
57. Roitt I, Brostoff J, Male D (2001). Immunology. 6th ed. New York: Mosby, 91-189.
58. Çarin M (2005). MHC ve kanser ilişkisi. IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Manisa, Ankara, 24-27 Kasım 2005, 10-11.
59. Tabakcıoğlu K (2005). Trakya bölgesinde yaşayan bipolar duygudurum bozukluğu olan hastalarda HLA Sınıf I (A, B) ve Sınıf II (DR) polimorfizmleri sıklığı. Uzmanlık tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne.
60. Lewin B (2004). Genes VIII. 1st ed. Upper Saddle River: Pearson Printice Hall, 779-781.
61. Dalva K (2004). Her yerde karşımda; nedir bu HLA tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi. IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu, Ankara, 23-28 Eylül 2004, 42-52.

62. Tekin S (2004). Paranoid şizofreni olgularında HLA Sınıf I (A ve B) ve Sınıf II (DR) allellerinin sıklığı. Uzmanlık tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne.
63. Gruen JR, Weissman SM (1997). Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 90: 4252-4265.
64. Olivieri I, van Tubergen A, Salvarani C, van der Linden S (2002). Seronegative Spondyloarthritides. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 16: 723-739.
65. Singer R (1995). Psoriasisste HLA antijenlerinin dağılımı ve klinik özellikler ile ilişkisi. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul.
66. Bahram S (2005). From MAC to MIC: MHC class I genes come full circle. *Scientific Communication* 2: 46-48.
67. IMGT/HLA (Immunogenetics/Human leukocyte antigens) sequence database (2005). EBI Support. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>.
68. Hurley CK, Ellis JM (1993). DNA methods for HLA typing a workbook for beginners. 4: 39-63.
69. Lu KC (2001). Tissue and solid organ allograft rejection. *Samter's Immunologic Diseases* (Eds: Austen KF, Frank MM, Atkinson JP Cantor H). 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, 1121-1132.
70. Etiz P (2009). Bölgemizdeki HLA Dağılımı. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
71. Ekici N (2000). Atopik Dermatitli Olgularda HLA Antijenlerinin Dağılımı. Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
72. Singh N, Agraval S, Ratogi AK (1997). Infectious Disease and Immunity: Special Reference to Major Histocompatibility Complex. *Emerging Disease* 3: 41-49.
73. Schwartz BD (1996). The major histocompatibility complex. *Clinical Immunology Principle and Practice* (Ed: Rich RR). St Louis Missouri Lange Medical, 95-113.
74. Bidwell JL (1992). Applications of the polymerase chain reaction to HLA class II typing. *Vox Sang* 63: 81-89.
75. Gülmezoğlu E, Ergüven S (1994). Doku Uygunluk Antijenleri. *İmmünoloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık*, Ankara; 29-39.
76. Özalp AU (2001). Mesane tümörü ve HLA ilişkisinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, İstanbul.

77. Özcan R (2007). Kroroziv madde içimine bağlı özafagus darlığı gelişimi ve HLA ilişkisinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul.
78. Pirim İ (2008). I. Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kurs Kitabı, 10-12.
79. Akçam FZ (2005). HLA Sistemi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 25: 829-834.
80. Oguz FS, Çarin M (1999). MHC genlerinin organizasyonu. Sendom 11: 126-7.
81. Kubi J (1992). Major Histocompatibility Complex. Immunology Chapter 9: 187-214.
82. Çevirgen T (2005). Multipl Myelomlu Hastalarda HLA sınıf I ve sınıf II Allel Sıklığının Araştırılması. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
83. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2000). The Major Histocompatibility Complex. Cellular and Molecular Immunology (Eds: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS). WB Saunders Company: Philadelphia, 63-78.
84. The HLA Facts Book (2000). Human Leukocyte antigens determine Histocompatibility intransplantation (Eds: Marsh SGE, Parham P, Barber LD). Academic Press, 5-6.
85. Villadangos JA, Schnorrer P (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. Nature Reviews Immunology 7: 543-555.
86. Dorak T. Statistical Analysis in HLA and Disease Association Studies. Available from: [online] [http:// dorak.mt.tripod.com](http://dorak.mt.tripod.com) [Accessed 13 November 2012].
87. Serin E (1995). Kronik Hepatit B ve HLA Fenotip İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana.
88. Schwartz BD (1991). The Human Major Histocompatibility. Human Leucocyte Antigen (HLA) Complex. Basic And Clinical İmmünology. 7th ed. Medical Publications, 45-60.
89. Stites DP, Terr Abba (1991). Basic and Cilinical Immunology. 7th ed. Medikal Publications, 51: 45-60.
90. Mullis K, Falaona F, Scharf S (1986). Specific enzymatic amplication of DNA in vitro the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbour Symposium of Quantitative Bilology 51: 263-273.

91. Excoffier, L.G. Laval, and S. Schneider (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
92. Akkoç N, Khan AM (2005). Etiopathogenic role of HLA-B27 alleles in Ankylosing Spondylitis. *Aplara J Rheumatol* 8: 146-53.
93. Khan MA (2000). HLA-B27 polymorphism and association with disease . *J Rheumatol* 27: 1110-4.
94. Acar M (2005). Ankilozan Spondilit' li hastalarda, HLA-B*27 antijeninin alt tiplerinin sıklığının belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Konya.
95. Birinci A, Bilgici A, Kuru O, Durupinar M (2006). HLA-B27 polymorphism in Turkish patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 26: 285–287.
96. Diyarbakir E, Eyerci N, Melikoğlu M, Topcu A, Pirim I (2012). HLA B27 subtype distribution among patients with ankylosing spondylitis in eastern Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers* 16: 456-8.
97. Oguz FS, Ocal L, Diler AS, Ozkul H, Asicioglu F, Kasapoglu E, Bozkurt G, Konice M, Carin M (2004). HLA B-27 subtypes in Turkish patients with spondyloarthropathy and healthy controls. *Dis Markers* 20: 309-12.
98. Lee S, Choi I, Lee Y, Park E, Kim Y, Kim K, Hong S, Yoo M, Yang H (2008). Human leukocyte antigen-B*2705 is the predominant subtype in the Korean population with ankylosing spondylitis, unlike in other Asians. *Rheumatol Int* 29: 43–46.
99. Lopez de Castro JA (2010). HLA-B27 and ankylosing spondylitis: tales from China. *Tissue Antigens* 75: 9–11.
100. Liu X, Hu LH, Li YR, Chen FH, Ning Y, Yao QF (2010). The association of HLA-B*27 subtypes with ankylosing spondylitis in Wuhan population of China. *Rheumatol Int* 30:587-90.
101. Fouladi S, Adib M, Salehi M, Karimzadeh H, Bakhshiani Z, Ostadi V (2009). Distribution of HLA-B*27 alleles in patients with ankylosing spondylitis in Iran. *Iran J Immunol* 6: 49-54.

102. Paladini F, Cocco E, Cauli A, Cascino I, Vacca A, Belfiore F, Fiorillo MT, Mathieu A, Sorrentino R (2008). A functional polymorphism of the vasoactive intestinal peptide receptor 1 gene correlates with the presence of HLA-B*2705 in Sardinia. *Genes Immun* 9: 659-67.
103. Pazár B, Sáfrány E, Gergely P, Szántó S, Szekanecz Z, Poór G (2010). Association of ARTS1 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in the Hungarian population: the rs27044 variant is associated with HLA-B*2705 subtype in Hungarian patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 37: 379-84.
104. Varnavidou-Nicolaidou A, Karpasitou K, Georgiou D, Stylianos G, Kokkofitou A, Michalis C, Constantina C, Gregoriadou C, Kyriakides G (2004). HLA-B27 in the Greek Cypriot Population: Distribution of Subtypes in Patients With Ankylosing Spondylitis and Other HLA-B27-related Diseases. The Possible Protective Role of B*2707. *Human Immunology* 65: 1451–1454.
105. Alaez C, Gazit E, Ibarrola B, Yaron M, Livneh A, Avishai O, Gorodezky C (2007). Distribution of HLA-B27 subtypes in ankylosing spondylitis in an Israeli population. *Arch Med Res* 38: 452-5.
106. Grubić Z, Kerhin-Brkljacić V, Perić P, Cecuk E, Kastelan A (2001). Variation in HLA-B27 gene subtypes and susceptibility of ankylosing spondylitis in the Croatian population. *Reumatizam* 48: 7-11.
107. Baech J, Schmidt-Olsen S, Steffensen R, Varming K, Grunnet N, Jersild C (1997). Frequency of HLA-B27 subtypes in a Danish population and in Danish patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 49: 499-502.
108. Fernández-Sueiro JL, Alonso C, Blanco FJ, Rodríguez-Gómez M, Galdo F, González-Ga MA (2004). Prevalence of HLA-B27 and subtypes of HLA-B27 associated with ankylosing spondylitis in Galicia, Spain. *Clin Exp Rheumatol* 22: 465-8.
109. Cipriani A, Rivera S, Hassanhi M, Ma´rquez G, Herna´ndez R, Villalobos C, Montiel M (2003). HLA-B27 subtypes determination in patients with ankylosing spondylitis from Zulia, Venezuela. *Hum Immunol* 64: 745-9.
110. Van Gaalen FA (2012). Does HLA-B*2706 protect against ankylosing spondylitis? A meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 15: 8-12.

111. Martínez B, Caraballo L, Hernández M, Valle R, Avila M, Iglesias Gamarra A (1999). HLA-B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis (As) in Colombia. *Rev Invest Clin* 51: 221-6.

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YEREL
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

Sayı : 636
Konu:

Tarih: 26.06.2009

Sayın; Doç.Dr.Fahri UÇAR,
Tıbbi Biyoloji AbD.

“Bölgemizde Ankilozan Spondilitli Hastalarda HLA-B27 Subtiplemesi ve Hastalık Aktivasyonu İle İlişkisi” başlıklı etik kurul 2009/61 olan çalışmasının raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Akif CİNEL
Etik Kurul Başkanı

Eki : 1 onay belgesi



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı: "Bölgemizde Ankilozan Spondilitli Hastalarda HLA-B27 Subtiplemesi ve Hastalık Aktivasyonu İle İlişkisi"

Çalışmacılar: Doç.Dr.Fahri UÇAR, Y.Doç.Dr.Murat KARKUCAK, Y.Doç.Dr.Erhan ÇAPKIN, Yük.Lis.Öğr.Emel ALAMDAROĞLU

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji Abd.

Etik Kurul Dosya No 2009/61	Etik Kurul Toplantı Tarihi 24.06.2009	Etik Kurul Toplantı No 2009/16	Etik Kurul Karar No 5
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Akif CİNEL'in başkanlığında: "Bölgemizde Ankilozan Spondilitli Hastalarda HLA-B27 Subtiplemesi ve Hastalık Aktivasyonu İle İlişkisi" başlığını taşıyan çalışmasının, KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Etik Kurul üyelerinin oybirliğiyle karar vermiştir. (24.06.2009)


Prof.Dr. Akif CİNEL

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

11. ÖZGEÇMİŞ

Sibel MOLLAMEHMETOĞLU, 04.12.1985' de Çanakkale' de doğdu. 2003 yılında İstanbul Bahçelievler Adnan Menderes Anadolu lisesinden mezun oldu. 2003-2008 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji öğretmenliğini bitirdi. Maçka Anadolu İmam Hatip Lisesinde Biyoloji öğretmeni olarak görev yapıyor. 2010 KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.