

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**PROJE BAŞLIĞI:ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALARINDA
TEDAVİDE KULLANILAN İLAÇLARA GÖRE MDR1
GEN POLİMORFİZM VE EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Proje No: TTU-2013-4758

TIPTA UZMANLIK TEZİ

SONUÇ RAPORU

**Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Çetin SAATÇI**

Tıbbi Genetik Anabilimdalı

Araştırmacı:

Dr. Fatma Çolak

Tıbbi Genetik Anabilimdalı

Kasım 2014

KAYSERİ

Bu proje Erciyes üniversitesi bap birimi tarafından 4758 proje numarasıyla desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince olduğu gibi tezimin her aşamasında da değerli görüş ve katkılarını esirgemeyen, tezimin neticelenmesi için sınırsız destek veren değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Çetin SAATÇİ' ye

Eğitimime katkılarından ve gösterdikleri güler yüzden dolayı Prof. Dr. Yusuf Özkul ve Prof. Dr. Munis Dünder' a,

Tezimin planlanmasındaki teşvik ve gayretlerinden dolayı ve hasta temini konusunda yardımlarını aldığım Prof. Dr. Mehmet Kırnar'a , Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon anabilim dalı asistan doktor ve çalışanlarına,

Tezimin laboratuvar çalışmalarının yapılmasındaki destek, teşvik ve gayretlerinden dolayı, Bio. Kezban Korkmaz'a, Bio. Hamiyet Eciroğlu 'na, ilk başladığım andan bitirene kadar gösterdikleri yakınlık ve bilgi paylaşımlarından dolayı tüm bölüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme,

Bana huzurlu ve mutlu bir yuvanın tadını hissettiren, tezin tüm stresini benimle birlikte yaşayan ve tezimin yazımında katkıları olan sevgili eşim İsmail'e, kızım Ayşe Begüm'e

En içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.ANKİLOZAN SPONDİLİT	4
2.1.1.Tanım	4
2.1.2.Tarihçe	5
2.1.3.Epidemiyoloji	6
2.1.4.Etyoloji	6
2.1.5.Patogenez	7
2.1.6.Klinik Bulgular	8
2.1.7.Tanı Kriterleri	11
2.1.8.Laboratuvar Bulguları	12
2.1.9.Görüntüleme:	13
2.1.10.Ayırıcı Tanı	16
2.1.11.Tedavi	17
2.2.GENETİK POLİMORFİZM	22
2.2.1.Tanım	22
2.2.2.İlaç Direnci	23
2.2.3.ABCB1	26
2.2.4.Multi Drug Resistance Gene (MDR1/P-gp)	26
2.2.5.MDR1 gen ürünü; P glikoprotein	27
2.2.6.Normal Dokularda P-gp Ekspresyonu	28
2.2.7.MDR1 Gen polimorfizmleri	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1.Hasta ve Kontrol Grubu	34
3.1.1.Hasta Grubu	34
3.1.2. Kontrol Grubu	35
3.2.Kullanılan ölçekler	35
3.2.1. Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksi (BASDAI)	35
3.3. Kullanılan Aletler	35
3.3.1.MDR1 gen polimorfizm ve ekspresyonu için kullanılan aletler	35
3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.4.1.Polimorfizm için kullanılan kimyasallar	36
3.4.2.Ekspresyon için kullanılan kimyasallar	37

3.5.Yöntemler	37
3.5.1. DNA İzolasyonu.....	37
3.5.2.Lökosit izolasyonu.....	39
3.5.3. RNA izolasyonu	39
3.5.4. cDNA Sentezi (ROCHE HIGHFIDELITY-QUANTATİF).....	41
3.5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-PZR (Polymerase Chain Reaction -PZR):.....	42
3.6. RT- PZR Yöntemi İle MDR1 Geni c.3435C>T, c.1236C>T, c.2677G>A/T Polimorfizmlerinin Araştırılması:	52
3.7. RT- PZR Yöntemi İle MDR1 geni ekspresyonunun araştırılması	53
3.8 İstatistiksel analiz	55
4.BULGULAR	56
4.1. Moleküler Analiz Sonuçları.....	56
4.1.1.Polimorfizm Sonuçları.....	56
4.1.2. MDR1 Ekspresyon Sonuçları	65
5.TARTIŞMA.....	68
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	74
7.KAYNAKLAR	76
EKLER.....	92

KISALTMALAR

ABCB1	: ATP binding cassette super ailesi
Anti TNF	: Anti tümör nekrozis faktör
AS	: Ankilozan spondilit
ASAS	: Ankilozan Spondilit Değerlendirme Çalışma Grubu
BASDAI	: Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivitesi İndeksi
BASFI	: Bath Ankilozan Spondilit Fonksiyonel İndeksi
BASMI	: Bath Ankilozan Spondilit Metroloji İndeksi
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CRP	: C reaktif protein
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DMARD	: Hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç
EA	: Enteropatik artrit
ESH	: Sedimentasyon hızı
EULAR	: Avrupa Romatizma Savaş Derneği
FABERE	: Fleksiyon-Abduksiyon-Eksternal rotasyon-Ekstansiyon
FADIR	: Fleksiyon-Adduksiyon-İnternal rotasyon
HLA	: Human Lökosit Antigen
IgA	: İmmünglobulin A
IgG	: immünglobulin G
İBA	: İnflamatuar bel ağrısı
İBH	: İnflamatuar barsak hastalığı
KS	: Kortikosteroid
MASES	: Maastricht AS entezit skoru
MDR1	: Multi drug resistance 1
MEİ	: Mander Entezit İndeksi
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
NSAİİ	: Nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar
P-gp	: P glikoprotein
PsA	: Psöriatik artrit
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RE	: Restriksiyon enzimi
ReA	: Reaktif Artrit
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm

RT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SİE	: Sakroiliak eklem
SNP	: Single nücleotide polymorphism
SNSA	: Seronegatif spondiloartropati
SpA	: Spondiloartropati
SSZ	: Sulfasalazin
STIR	: Short tau- inversion recovery
USG	: Ultrasonografi
uSpA	: undiferansiye spondiloartropati
VAS	: Vizuel analog skala
VNTR	: Variable number tandem repeat

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 İnflamatuvar bel ağrısı kriterleri.....	9
Tablo 2 Sakroiliitin radyografik evrelemesi	15
Tablo 3 AS tedavisinde ASAS/EULAR 2010 güncellenmiş önerileri	17
Tablo 4: MDR1 geninin kodlayıcı bölgesinde yaygın olarak gözlenen SNP örnekleri.....	29
Tablo 5: LightCycler Fast Start DNA Master Probe seti içeriği.....	37
Tablo 6: cDNA sentez için hazırlanan reaksiyon karışımı	41
Tablo 7 :cDNA sentezi için reaksiyona eklenen karışım.....	41
Tablo 8: LightCyler 1,5 sistem ve 480 sistem cihazlarında RT- PZR yönteminde analiz aşamaları.....	53
Tablo 9: Ekspresyon çalışması için hazırlanan karışım.....	54
Tablo 10:Lightcycler 480 II software programında ayarlanan sıcaklıkları ve süreleri göstermektedir.	54
Tablo 11: MDR1 geni için polimorfizmleri araştırılan üç SNP (C.1236C>T, C.2677G>A=T ve C.3435C>T) birlikte ele alındığında tespit edilen genotipler ve sıklıkları	64
Tablo 12:MDR1 geni için polimorfizmleri araştırılan üç SNP (C.1236C>T, C.2677G>A=T ve C.3435C>T) birlikte ele alındığında tespit edilen haplotipler ve sıklıkları	65
Tablo 13:MDR1 ekspresyonunun cinsiyete göre karşılaştırması	65
Tablo 14:MDR1 ekspresyonunda biyolojik tedavi kullanımının karşılaştırması	66
Tablo 15:İstatistiksel olarak verilerin karşılaştırılması.....	66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Spondiloartropatiler	5
Şekil 2:HLA-B27 molekülünün spondiloartrit patogenezinde olası rolüne ait mekanistik yaklaşım	7
Şekil 3: İlaç direncinin biyokimyasal mekanizması	25
Şekil 4: MDR1 geninin lokalizasyonu	27
Şekil 7: P -gp ve bilinen SNPlerinden bazılarının protein yapısıyla ilişkisini gösteren şematize şekil	32
Şekil 8: Santrifüj sonrası görülen faz ayrımı	40
Şekil 9: PZR döngüsünün sıcaklık aşamaları	43
Şekil 10:RT-PZR cevap eğrileri	44
Şekil 11:SYBR Green 1 varlığında PZR	45
Şekil 12: Hidroliz problemleri varlığında PZR çalışması.....	46
Şekil 13: Hibridizasyon problemleri varlığında PZR	47
Şekil 14: SimpleProb Analiz Prensipleri	48
Şekil 15: SimpleProbe formatı ile SNP tespiti	49
Şekil 16: SimpleProbe' nin erime eğrisini davranışının LightCycler cihazındaki görünümü.....	49
Şekil 17: Simple Problemlerin dizaynı	51
Şekil 18: c.3435C>T polimorfizmi için CC, TT ve heterozigot CT genotipine sahip bir bireyin 'melting curve' analizi sonucu.....	57
Şekil 19:MDR1 c.3435C>T polimorfizmi için % allel sıklıkları	58
Şekil 20:MDR1 c.3435C>T polimorfizmi için gözlenen ve beklenen % genotip sıklıkları	58
Şekil 21: c.1236C>T polimorfizmi için CC, TT ve heterozigot CT genotipine sahip bir bireyin 'melting curve' analizi sonucu.....	59
Şekil 22:MDR1 c.1236C>T polimorfizmi için % allel sıklıkları	60
Şekil 23: MDR1 c.1236C>T polimorfizmi için gözlenen ve beklenen % genotip sıklıkları	60
Şekil 24: c.2677G>A/T polimorfizmi için GG, AA, TT ve heterozigot GT genotipine sahip bir bireyin ' melting curve' analiz sonucu.....	61
Şekil 25: MDR1 c.2677G>A/T polimorfizmi için % allel sıklıkları	62
Şekil 26:MDR1 c.1236C>T polimorfizmi için gözlenen ve	

beklenen % genotip sıklıkları	62
Şekil 27: Çalışmamızın RT PZR cevap eğrileri.....	65

ÖZET

ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALARINDA TEDAVİDE KULLANILAN İLAÇLARA GÖRE MDR1 GEN POLİMORFİZM VE EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Ankilozan spondilit sakroiliit ve spondilitten dolayı inflamatuvar sırt ağrısı ile karakterize kronik, inflamatuvar romatizmal hastalıktır. AS sıklıkla hayatın 3. dekadında başlayan ve erkeklerde kadınlardan biraz daha sık (2.4 kat) görülen bir hastalıktır. Hastaların %80'inde 30 yaşından önce ilk semptomlar gelişir ve %5'den daha az hastada semptomlar 45 yaşın üzerinde ortaya çıkar. Ankilozan spondilit ve diğer SpA'lerin kesin sebebi henüz bilinmemektedir. Fakat patogeneizde genetik ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir.

P glikoproteini 7.kromozomdaki 28 ekzon içeren MDR1(Multi drug resistance 1) geni kodlamaktadır. Bu bölgede en yaygın çalışılan alleller c.1236C>T, c.2677G>T/A ve c.3435C>T allelleridir. Bu üç allel genomda lokus olarak birbirine yakın olarak yerleştiğinden alleller aynı anda kodlanmaktadır. Bu nedenle tüm geni incelemek yerine 3 allelinde olduğu haplotipler analiz edilerek AS hastalarında c.1236C>T, c.2677G>T/A ve c.3435C>T allellerindeki polimorfizm sıklığını ve bu polimorfizmlerle MDR1 gen ekspresyonu arasında bağlantıyı araştırdık.

34 biyolojik tedavi , 32 diğer tedavileri alan toplam 66 AS hastası ve 32 sağlıklı herhangi bir ilaç kullanmayan bireyden oluşan grup karşılaştırıldı. DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. RNA izolasyonu trizolle yapıldı. Kantitatif gerçek zamanlı PCR, Roche LightCycler FastStart DNA Master HybProbe cihazında gerçekleştirildi.

Çalışmamızın sonucunda AS hastalarında c.1236C>T, c.2677G>T/A ve c.3435C>T polimorfizmleri ile MDR1 geni ekspresyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Biyolojik tedavileri kullanan AS grubunun MDR1 gen ekspresyonu anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0.001$).

Anahtar kelimeler: Ankilozan spondilit, MDR1 , polimorfizm, anti TNF,

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF MDR1 GENE POLYMORPHISM AND ITS EXPRESSION AFTER DRUG USE FOR TREATMENT OF PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

Ankylosing Spondylitis (AS) is a chronic inflammatory, rheumatological disease of the axial skeleton, with variable involvement of peripheral joints and nonarticular structures. AS is a disease which often starts in the 3rd decade of life and its incidence is a little more in men than women (2.4 times). 80% of patients develop symptoms before age 30 and less than about 5% of patients' symptoms revealing occur over 45 years. The exact cause of ankylosing spondylitis and other spondyloarthropathies is not yet known. But in the pathogenesis of AS, genetic and environmental factors are known to play an important role.

P-glycoprotein encoding MDR1 (Multi drug resistance 1) gene located on 7. Chromosome and contains exon 28. In this gene, the most widely studied alleles are c.1236C>T, c.2677G>T/A and c.3435C>T. These three alleles are positioned in close proximity in the genome and are coded at the same time. Therefore, instead of analyzing complete gene, only three alleles of the gene were analyzed in patients with AS to see allele frequency and connection between these polymorphisms and MDR1 gene expression.

Study group was formed from 34 patients with biological therapy, 32 patients with other treatments (in total 66 AS patients) and 32 healthy individuals without any medication were compared.

DNA isolation done with using High Pure PCR Template Preparation Kit. RNA isolation was performed with Trizol manual isolation. For Quantitative real-time PCR, Roche LightCyclerFastStartDNA Master device HybProbe was used.

As a result of our study, there was no statistically significant difference between AS patients with c.1236C>T, c.2677G>T/A and c.3435C>T polymorphisms and MDR1 gene expression. On the other hand, in group of biological therapies, significant differences were found in the MDR1 gene expression ($p < 0.001$) and c.1236C>T, c.2677G>T/A and c.3435C>T polymorphisms.

Keywords: Ankylosing Spondylitis, MDR1, polymorphism, anti-TNF

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Spondiloartropati (SpA), spinal tutulum, periferik eklem artrit ve kas-iskelet dışı tutulum ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır (1). Hastalığın ilerleyen dönemlerinde dorsal kifozda artış ve gelişen hareket kısıtlılıkları sonucunda hastalarda esneklik azalmakta ve tipik bir postür gelişmektedir (2,3). Vertebral ankilozla sonuçlanan anatomik değişiklikler AS'li hastalardaki karakteristik kifotik deformiteye yol açmaktadır (4).

AS sıklıkla hayatın 3. dekadında başlayan ve erkeklerde kadınlardan biraz daha sık (2.4 kat) görülen bir hastalıktır. Hastaların %80'inde 30 yaşından önce ilk semptomlar gelişir ve %5'den daha az hastada semptomlar 45 yaşın üzerinde ortaya çıkar (5). Ankilozan spondilitin cinsiyete bağlı eğiliminden dolayı şüphelenilen bir gen olan X kromozomuyla herhangi bir bağlantısı olmadığı bildirilmiştir (6). Ankilozan spondilit ve diğer SpA'lerin kesin sebebi henüz bilinmemektedir. Fakat patogeneizde genetik ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir (7).

Hastalara uygulanan standart ilaç tedavileri sırasında, ilaca ve ilacın dozuna karşı cevap farklılıkları geliştirildiği bilinmektedir. Bazı hastalarda uygulanan ilaca ve dozuna etkin cevap, düşük yan etki olurken, bazı hastalarda ise ilaca cevapsızlık veya toksik reaksiyonlar sonucu ölüme kadar gidebilen yan etkiler görülebilmektedir. Kişiye uygulanan tedavinin etkinliği, hastanın genel sağlık durumu ile birlikte, birçok faktörü içinde barındıran çevresel etmenler ile de şekillenmektedir. Hastanın genotipik yapısının tedavi sırasında kullanılan ilacın farmakokinetiğini ve farmakodinamiğini etkilediği göz ardı edilmemelidir. Farmakokinetik ve farmakodinamik temelli olan ilaç yanıtındaki farklılıklar, ilaçların metabolizmasından sorumlu enzimlerde, ilaç taşıyıcılarında (transporter), reseptörlerinde

veya kofaktörlerindeki genetik varyasyonlardan etkilenebilmektedir (8). Bugüne kadar ilaç metabolize edici enzimlerin farmakogenetikleri üzerinde yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiş olmakla birlikte ilaç taşıyıcılarında gözlenen genetik çeşitlilik yakın geçmişte popülerlik kazanmıştır (9).

Hastalara uygulanan ilaç tedavilerinin ve moleküler genetik incelemelerin bir arada yürütüldüğü bir bilim dalı olan Farmakogenetik , bireyin genetik yapısındaki varyasyonlara bağlı olarak ilaca verdiği yanıtta değişimleri inceler. Hastanın genetik yapısını temel aldığı için, uygulanan tedaviyi bireyselleştirir ve en doğru ilacın, en doğru dozda, en az yan etki ile kullanılmasını amaçlar.

Yapılan çalışmalar farmakogenetik testler sonucunda yapılan tedavilerin çok daha etkili ve ucuz olduğunu göstermiştir. Hastanın tedavi maliyetinin en aza indirilmesi ve tedaviden en iyi sonucun alınması gibi kazanımlar sağlar. Hastanın, yaşam kalitesini artırmanın yanı sıra hastanede yatış süresi ile mortalite oranını azaltır.

Yaklaşık her 1000 nükleotidde bir gözlenen ve bireyler arası genetik çeşitliliğe yol açabilen tek nokta polimorfizmlerine “single nucleotide polymorphism” (SNP)denir. Belirli bir toplumda herhangi bir karakter için genetik varyasyonlara bağlı iki veya daha fazla fenotip bulunuyorsa ve bu fenotiplerden herbiri %1’den daha fazla sıklıkta gözleniyorsa bu durumda genetik polimorfizmden söz edilebilir. Bir diğer deyişle genin variant allel sıklığının toplumda %1’den fazla olmasına gen polimorfizmi denir. İlaç etkisinin veya eliminasyonunun bireyler arasında değişiklik göstermesinde polimorfizmlerin etkisi bilinmektedir. Polimorfik enzim ve reseptörlerin, ilaç yanıtı üzerindeki etkilerinin aydınlatılması cesitli nedenlerle önemlidir. Bunlar arasında; uygulanacak tedaviye yanıtın öngörülerek, uygun doz ve türünün ayarlanmasıyla sağlanabilecek “tedavinin bireyselleştirilmesi” tedavi etkinliğinde en önemli konulardan biridir (10).

MDR1 geni, 7 numaralı kromozom üzerine yerleşmiş olup, 170-kDa’luk bir protein olan P-glikoproteini (P-gp) kodlar. P-gp, “ATP Binding Cassette (ABC) transporter” adı verilen taşıyıcı proteinler süper ailesinin bir üyesidir ve kanser hücrelerinden ilaçların dışarıya atılmasını sağlayan ATP-bağımlı bir pompanın çalışmasından sorumludur (11,12) .

MDR1 geninde çeşitli tekli nükleotid değişimi (SNP) belirlenmiş ve bu durumun P-gp ekspresyonunu etkilediği gözlenmiştir (13). Hattori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MDR1 geninin regülatör bölgesindeki polimorfizmlerin ise çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

MDR1 geninde incelenen tekli nükleotid değişimleri (SNP) arasında en fazla ilgiyi, P-gp'nin azalan ekspresyon ve aktivitesinden sorumlu, genin 26. ekzonunda bulunan sessiz c.3435C>T polimorfizmi çekmektedir (14). c.2677G>T ve c.2677G>A polimorfizmleri 21. ekzonda lokalize olmuştur. 2677. pozisyondaki G→T ve G→A dönüşümleri anlamsız mutasyonlardır ve P-gp intrasellüler kısmında yer almaktadırlar (15).

Çalışmamızda, Ankilozan spondilit tanısı almış ve biyolojik tedavi alan grup ile biyolojik olmayan tedaviler arasında MDR1 geni ekspresyonu ve c.3435C>T, c.1236C>T, c.2677G>A/T polimorfizmleri arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

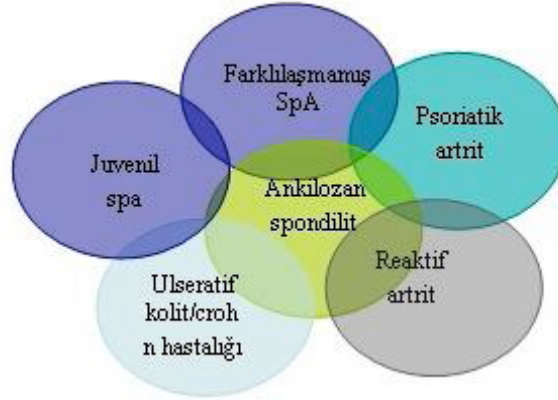
2.GENEL BİLGİLER

2.1.ANKİLOZAN SPONDİLİT

2.1.1.Tanım

Spondiloartropati (SpA), spinal tutulum, periferik eklem artrit ve kas-iskelet dışı tutulum ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır (1). Hastalığın ilerleyen dönemlerinde dorsal kifozda artış ve gelişen hareket kısıtlılıkları sonucunda hastalarda esneklik azalmakta ve tipik bir postür gelişmektedir (2,3). Vertebral ankilozla sonuçlanan anatomik değişiklikler AS'li hastalardaki karakteristik kifotik deformiteye yol açmaktadır (4). Spondiloartitler (SpA); Ankilozan spondilit (AS), reaktif artrit (ReA), psöriatik artrit (PsA), inflamatuvar barsak hastalıkları ile ilişkili artrit (enteropatik artrit; EA), juvenil SpA ve undiferansiye spondiloartritleri (uSpA) içeren büyük ve kısmen heterojen bir hastalık grubudur (16). AS, etyolojisi henüz bilinmeyen HLA-B27 geni ile ilişkili, erken dönemde sakroiliak eklemi tutan, geç dönemde omurgayı tutan ve ankiloza yol açan kronik, sistemik inflamatuvar bir hastalıktır (17). Seronegatif spondiloartropatiler (SNSA) ve dolayısıyla AS hastalarında, uzun dönemde sakroiliak eklem (SİE) ve tutulan diğer eklem yapılarını korumaya yönelik kimyasal ve biyolojik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesiyle bu hastalıklarda erken tanı, progresyon ve terapötik yanıtı değerlendirmek için efektif inceleme yöntemlerine ihtiyaç artmıştır (18-19). Bu grubun diğer üyeleri reaktif artrit,

psöriyatik artrit, juvenil spondiloartropati ve inflamatuvar barsak hastalığı ile ilişkili spondiloartropatiler şekil 1’de gösterilmiştir (20).



Şekil 1: Spondiloartropatiler

2.1.2.Tarihçe

İsimlendirme olarak ankilozan spondilit; Yunanca ankylos (eğilmiş veya birleşmiş, kaynamış anlamında) ve spondylos (vertebra diski) kelimelerinden köken alır (21-28). AS'nin ilk klinik tanımını İrlandalı bir klinisyen olan Bernard Connor (1666-1698) 1693 yılındaki bir yazısında yapmıştır. Ankiloze olmuş bir omurgayı tarif etmiş , sakroiliak eklem ve kostovertebral eklemide içine alan füzyonu belirtmiştir (29). 1850 yılında Benjamin Brodie, 31 yaşında ankiloze omurgası olan bir erkek hastada ara sıra olan göz inflamasyonu ile üveitin hastalığın komplikasyonu olduğunu tanımlamıştır (30). 1893 yılında Von Bechterew, 1897 yılında Strümpell ve 1898 yılında Marie tarafından AS vakaları bildirilmiştir. İlerleyen yıllarda X ışınının keşfedilmesiyle Krebs ve Forestier tarafından sakroiliit, Robert ve Forestier tarafından tipik sindesmofitler tanımlanmıştır (31). SpA konsepti ilk defa 1974 yılında Moll ve arkadaşları tarafından (32,33) birbirleriyle ilişkili bu hastalık grubunu vurgulamak üzere “seronegative spondarthritides” ismiyle ortaya konulmuştur. Bu hastalıkların aynı ailede gruplandırılmalarının en önemli nedeni ortak bazı genetik, klinik ve radyolojik özellikleri paylaşıyor olmalarıdır (16). Öte yandan aynı hastada veya ailesinde, aynı zamanda veya zaman içerisinde birden fazla aynı gruptan hastalık ortaya çıkabilmektedir (33). Bu durumu destekleyen diğer bir güçlü kanıtta hayvan çalışmalarından gelmiştir. HLA-B27 transgenik sıçanlarda, SpA’li insanlarda gözlenen değişik klinik bulguların gelişmiştir (34).1961 yılında Roma, 1966 yılında New York AS sınıflama kriterleri geliştirilmiştir. 1973 yılında HLA-B27 ile AS ilişkisi

gösterilmiş (35). 1984 yılında daha önce var olan kriterlerin karşılaştırıldığı çalışmalar baz alınarak modifiye New York kriterleri ortaya konmuştur (36).

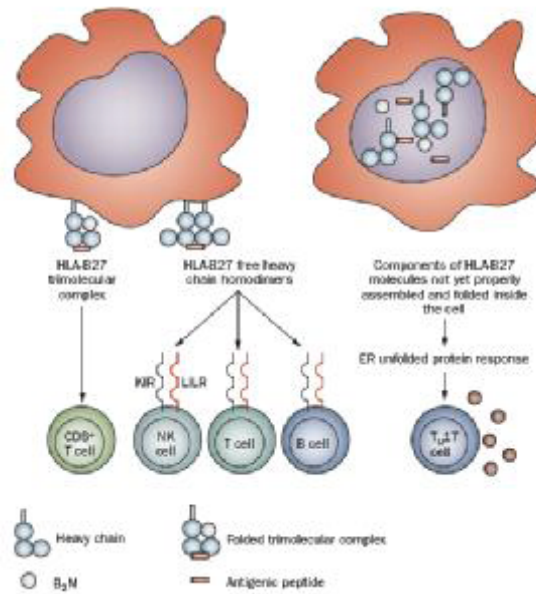
2.1.3.Epidemiyoloji

AS sıklıkla hayatın 3. dekadında başlayan ve erkeklerde kadınlardan biraz daha sık (2.4 kat) görülen bir hastalıktır. İlk semptomlar hastaların %80'inde 30 yaşından önce gelişir ve semptomlar %5'den daha az hastada 45 yaşın üzerinde ortaya çıkar (5). Ankilozan spondilitin cinsiyet eğiliminden dolayı şüphelenilen bir kromozom olan X kromozomuyla herhangi bir bağlantısı olmadığı bildirilmiştir (6). Prevalans ırk ve coğrafik dağılıma göre farklılık göstermektedir. Bu farklılık HLA-B27 antijeninin popülasyonlar arası farklı oranda bulunmasından kaynaklanabilir (37). AS prevalansı HLA-B27 sıklığı ile yakın paralellik gösterir. Afrikalı siyah popülasyonda HLA-B27 son derece nadirdir bu nedenle de AS bu popülasyonda nadir görülür (38). Birleşik Devletlerde, AS prevalansı % 0.2-0.5, genel SpA prevalansı ise %1 den yüksek bulunmuştur (39). Almanyada yapılan bir çalışmada AS prevalansı %0.86, SpA prevalansı ise %1.9 olarak bulunmuştur (40). HLA-B27 en sık kuzey ülkelerinin bazı kabilelerinde (olguların %50'sinden fazlasında), Haida Hintlilerinde ve Eskimo popülasyonunda gözlenmektedir. Orta Avrupa'da, AS için %0,3- 0,5 ve bütün SpA'ler için %1-2 prevalans olası görünmektedir. Sonuçta, verilerin büyük çoğunluğunun Avrupa'dan gelmesi nedeniyle AS'nin prevalansı %0,1 ve %1,4 arasındadır (40,41).Türkiye'de 20 yaş üzeri 2835 kişiyle yapılan çalışmada ise AS ve SpA prevalansları sırasıyla %0.49 ve %1.09 olarak bildirilmiştir (42). Fonksiyonel kısıtlanma fiziksel çaba gerektiren işlerde çalışma öyküsü olanlarda, eşlik eden ek hastalıkları olanlarda, sigara içenlerde ve 20 senenin üzerinde hastalık süresi olanlarda daha ciddi gözlenirken, hastalıkla ilgili aile öyküsü olanlarda ve eğitim seviyesi yüksek olanlarda daha az görülmektedir (43).

2.1.4.Etyoloji

Ankilozan spondilit ve diğer SpA'lerin kesin sebebi henüz bilinmemektedir.Fakat patogeneizde genetik ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. İngiltere'de yapılan bir ikiz çalışmasında, genetik faktörlerin hastalığın oluşumundaki rolünün %97 olduğunu düşündürmüştür (7). Bir başka çalışmada hastalığın monozigotik ikizlerde dizigotik olanlara göre 5 kat daha fazla birliktelik gösterdiği saptanmıştır (44). Bu bulgular hastalığın oluşumunda genetik faktörlerin çevresel faktörlerden daha önde geldiğini göstermektedir.

HLA-B27 AS'li hastaların %70-90'ında pozitif bulunurken, genel popülasyona bakıldığında HLA-B27 pozitif bireylerde AS gelişme oranı %5-6 bulunmuştur. AS'li hastaların HLA-B27 pozitif birinci derece akrabalarında AS gelişme riskinin %10-20 olması ve HLA-B27 pozitif tek yumurta ikizlerinde riskin %75, çift yumurta ikizlerinde ise %27 bulunması HLA dışı genlerinde etiolojide rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (7). AS' de HLA-B27 antijeni total genetik riskin % 16'sını oluştururken 6. kromozomda lokalize olan MHC (major histocompatibility complex, büyük doku uygunluk kompleksi) hastalığın genetik riskinin yaklaşık % 50' sini oluşturmaktadır (45-49).



Şekil 2:HLA-B27 molekülünün spondiloartrit patogenezinde olası rolüne ait mekanistik yaklaşım (50)

2.1.5.Patogenez

Sakroiliak eklemi ve aksiyel iskeleti etkileyen AS'nin tanı ve tedavisindeki önemli gelişmelere rağmen hastalığa sebep olan spesifik genetik faktörler ve çevresel tetikleyici etkenlerle ilgili birçok bilinmeyen nokta mevcuttur. Hastalıkta sinoviyal eklemler (apofizer ve sakroiliak eklemler), kartilajinöz eklemler (manubriosternal eklemler, intervertebral diskler ve simfizis pubis), ligamanların kemiğe tutunma noktaları, eklem kapsülleri ve ligamentöz yapılar etkilenir. Klasik olarak sakroileit bilateral ve simetriktir. Sakroiliak eklem tutulumunu takiben genellikle lumbal bölgeden başlayarak yukarı doğru ilerleyen vertebra tutulumu gerçekleşir. Eş zamanlı inflamatuvar değişiklikler apofiziyel eklemlerde ankiloza ve bazı spinal ligamanların ossifikasyonuna neden olur. Vertebral kolonun tam füzyonuyla "bambu kamışı" görünümü ortaya çıkar. Uzun süreli AS'te motilitede azalma sonucu spinal osteoporoz görülür (51).

Erken dönemde dokulara T hücre ve makrofajların infiltrasyonu ve sonrasında TNF- α ve diğer sitokinlerin salınımı olur. Bu hücre infiltrasyonu fibroblast proliferasyonuna ve neovaskülarizasyona yol açar ve inflamasyon bölgesinde kemotaktik sitokinler, adezyon molekülleri artar. Sinovyal dokuda CD4+ baskın T hücreleri, CD68+ makrofajlar B lenfositler ve natural killer hücreleri bulunur (52). En erken ve tipik bulgular sakroiliak eklemde görülür. Erken lezyon olarak subkondral kemik iliği ödemi gözlenir, bunu sinovit izler ve sonrasında yeni kemik oluşumu ve pannus gelişebilmektedir. Yapısal hasara uğramış olan eklem kenarlarının yerini fibrokartilaj rejenerasyonu ve kemikleşme almaktadır. En sonunda ankiloz gelişebilmektedir (53).

2.1.6.Klinik Bulgular

AS sistemik inflamatuvar bir hastalık olduğu için sistemik etkileri sıktır. AS'nin klinik bulgularını kas iskelet sistemine ait ve kas iskelet dışı tutulum olarak 2 grupta inceleyebiliriz.

2.1.6.1.Kas iskelet sistemi tutulumu

Ankilozan spondilit genellikle sinsi başlar ve hastalar çoğu zaman şikayetlerinin başladığı yeri ve zamanı tam olarak belirleyemezler (54). AS nin en karakteristik ve en sık ortaya çıkan belirtisi inflamatuvar bel ağrısı (İBA) ve tutukluktur. İnflamatuvar bel ağrısı tanısı koyabilmek için bugüne kadar birkaç İBA kriterleri düzenlenmiştir (54-56).

Tablo 1 İnflamatuvar bel ağrısı kriterleri (54-56)

Calin İBA kriterleri	Berlin İBA kriterleri	ASAS İBA kriterleri
Başlama yaşı<40	30 dakikadan fazla sabah tutukluğu	Sinsi başlangıç
3 aydan fazla süren bel ağrısı	Bel ağrısının egzersile düzelmesi, istirahatle düzelmemesi	Gece ağrısı (kalkmakla ağrıda iyileşme)
Sinsi başlangıç	Gece uyandıran ağrı (gecenin 2. Yarısında)	Başlama yaşı <40
Sabah tutukluğu	Yer değiştiren kalça ağrısı	Egzersizle düzelme
Egzersizle iyileşme		Egzersizle düzelmemesi
5 kriter den 4'ünün mevcudiyeti gerekir	(4 kriterden 2'si mevcutsa) %70 sensitivite, %81 spesifite	(5 kriterden 4'ü mevcutsa) %77 sensitivite, %91,7 spesifite

Sakroileit ve spondilit şeklinde aksiyel iskelet tutulumu SpA'ların en önemli ortak klinik özellikleridir. Bu nedenle çoğu hasta klinik olarak bel veya kalça ağrısı ile başvurmaktadır (57). AS'li olguların %89'unda simetrik sakroileit gözlenir (58). Periferik eklem tutulumu daha az görülür ve genellikle alt ekstremitelerde asimetrik oligoartrit şeklindedir (59). Tendon, ligament ve eklem kapsülünün kemiğe tutunduğu bölgelerdeki (entezis noktaları) enflamasyona entezit denir. Entezit ligaman ve tendonların kemiğe tutundukları yerlerde olduğundan tutulan yerler aşıl tendonu, plantar fasya, patellar tendon, iliak krest ve göğüs ön duvarı olarak sıralanabilir. Entesopatik lezyonlar özellikle sabahları ağrılıdır (60).

2.1.6.2.Kas-İskelet Sistemi Dışı Tutulumlar

Ankilozan spondilite bağlı kardiyak komplikasyonlar genellikle uzun yıllar sonra meydana gelir. Tutulumun en sık bulguları; kalp kapak hastalıkları, iletim defektleri, perikardit, kardiyomegalidir (61,62). Akut anterior üveit en sık görülen ekstraartiküler bulgudur. Hastalarda fotofobi, kızarıklık ve ağrı şikayeti olur. AS olan HLA-B27 pozitif hastalarda üveit daha sık görülür, hatta bazı hastalarda üveit hastalığın ilk bulgusu olabilmektedir. Üveitin şiddeti ile artiküler hastalık şiddeti arasında korelasyon yoktur (63). Üveit erken tanı konulup tedavi edilirse 4-8 haftada sekelsiz iyileşir ve prognozu iyidir. Gecikme durumunda sineşiler ve glokom gibi komplikasyonlar gelişebilir (64). Pulmoner tutulumun prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte nadirdir. En yaygın bulgu bilateral apikal fibrozistir. Hastalar genellikle asemptomatiktir, ilerleyen dönemde kavitasyon meydana gelebilir ve mantar ve bakteriler tarafından kolonize olurlarsa semptomatik hale gelirler. Kostovertebral ve kostosternal

tutuluma bağı göğüs ekspansiyonu kısıtlanabilir ve restriktif tipte havalanma bozukluğu gelişebilir (65). Ankilozan spondilitli hastalarda böbrek tutulumu nadirdir. En yaygın renal bulgu sekonder amiloidozdur (66). Ayrıca IgA nefropatisi ve analjezik nefropatisi de diğer önemli renal bulgulardır (67,68). İnflamatuvar barsak hastalığı (İBH) ankilozan spondilitli hastaların %5-10'unda görülebilirken, %50-60'ında subklinik intestinal inflamasyon vardır. İnflamasyon genellikle ileum ve kolonu etkiler. Hastaların büyük bir çoğunluğu semptomatik hale gelmezler, az bir kısmı ilerleyerek İBH özellikle de Crohn hastalığı geliştirirler (69). Nörolojik bulgular vertebra kırıklarına bağı spinal kord veya sinirlere bası sonucu meydana gelebilir. Bu oran %15 civarındadır. Atlantoaksiyel subluksasyon ve uzun süreli hastalığa sahip olanlarda muhtemelen araknoidite bağı cauda equina sendromu görülebilir (70).

2.1.6.3.Muayene bulguları

Hastalara omurga ve sakroiliak eklemleri kapsayan ayrıntılı bir fizik muayene yapılmalıdır. Muayenede sakroiliak eklem (SİE), spinal mobilite ölçümleri, entez bölgeleri, periferik eklem muayenesi ve postür değerlendirilmelidir. Fleksiyon-Abduksiyon-Eksternal-Rotasyon-Ekstansiyon (FABERE) ve Fleksiyon-Adduksiyon-İnternal Rotasyon (FADIR) testleride hem SİE hem de kalça eklemi değerlendirir. Ganslen testinde sırt üstü yatan hastanın test edilecek SİE tarafındaki bacağı aşağıya doğru sarkıtılır ve kalça ekstansiyona zorlanır, o taraf sakroiliak eklemde ağrı olması testi pozitif yapar. Sakroiliak eklem muayenesinde, hasta sırt üstü yatar pozisyonda iken spina iliaka anterior superiorlar üzerine aşağıya ve yanlara doğru basınç uygulanır ve eklemdeki hassasiyet değerlendirilir. Hasta yüz üstü yatarken sakrum üzerine basınç uygulandığında da ağrı duyulabilir (71).

İnspeksiyonla lomber lordozun kaybolduğu saptanabilir. Belin üç düzlemdeki hareketleri incelenmelidir. Öne fleksiyon yer-parmak uzaklığı ölçülerek değerlendirilebilir, ancak yer-parmak uzaklığı kalça eklemde kısıtlılık yoksa normal bulunabilir. Hastalığın erken dönemlerinden itibaren göğüs ekspansiyonunda kısıtlanma saptanabilir. Birkaç zorlu inspiryum ve ekspiryum sonrasında, 4. interkostal aralık seviyesinden göğüs çevresi ölçülerek derin inspiryum ve ekspiryum arasındaki fark belirlenebilir. Bu farkın 5 cm'nin altında olması anlamlıdır (72). Tuber iskiadikumlara, büyük torakanterler, spinöz çıkıntılar, kostakondral ve manubriosternal bileşkeler, iliak kanatlar, simfizis pubis, topuklar ve tibial tüberküllerde entezit nedeniyle palpasyonda hassasiyet saptanabilir (45). Sakroiliak eklem ağrısı hastalığın akut döneminde olabilir ve direkt basınçla veya hareket ile ortaya çıkarılabilir. Periferik eklemlerde inflamasyon da gözlenebilir. Schober testi 1937 yılında Alman hekim Paul Schober tarafından ortaya atılmış ve zamanla çeşitli modifikasyonlara uğramıştır, lomber

omurganın fleksiyonunun dolaylı olarak ölçüldüğü bir yöntemdir ve ASAS önerilerine göre ise; hasta ayakta dik dururken posterior superior iliak çıkıntılar birleştirilerek bu çizginin 10 cm üzeri işaretlenerek hastanın yapabileceği kadar öne eğilmesi istenir, aradaki mesafe ölçülür (73). Oksiput duvar mesafesi ve tragus duvar mesafesi servikal mobilite ve artmış kifoza göstermesi açısından oldukça değerli bir ölçümdür. Pozisyonlamada hastanın düz bir duvara sırtını yaslaması, ayaklar arası mesafenin uygun ve topuğun mümkün olduğunca duvara yakın olması ve çenenin nötral pozisyonunda olup gözlerin ufuk çizgisine bakması istenir. Oksiput ile duvar arası ve tragus ile duvar arası mesafe ölçülür (56).

Entezit muayenesinde Mander Entezit İndeksi (MEI) ve Maastricht AS Entezit Skoru (MASES) kullanılır. Aşil tendonu, plantar fasya, patellar tendon, krista iliakalar, spinöz çıkıntılar ve kostokondral bileşkeler muayene edilmelidir (74).

AS de ağrı ve tutukluğun değerlendirilmesinde Vizüel Analog Skala (VAS) en etkili yöntemdir. Hastalık aktivitesini değerlendirmek için Bath Ankylosing Spondylitis Activity Index (BASDAI) kullanılabilir. Yorgunluk, spinal ağrı, periferik ağrı ve şişlik, entezal ağrı ve sabah tutukluğundan oluşan 6 adet VAS içermektedir. Skor 4 ün üzerinde ise yüksek hastalık aktivitesi olduğunu gösterir. Fonksiyonel değerlendirme için Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), metrolojik değerlendirme için Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI) kullanılabilir (75).

2.1.7.Tanı Kriterleri

AS de tanı yaşı literatürde 17-34 yaş aralığındadır (76). Tanı için kronolojik olarak Roma Tanı Kriterleri (1961), Newyork (1966) ve son olarak Modifiye Newyork (1984) kriterleri geliştirilmiştir (51,77).

2.1.7.1. ROMA Tanı Kriterleri (1961)

- 1.Üç aydan uzun süreli varolan ve istirahatle düzelmeyen bel ağrısı ve tutukluğu
- 2.Torakal bölgede ağrı ve tutukluk
- 3.Lomber omurgada hareket kısıtlılığı
- 4.Göğüs ekspansiyonu kısıtlılığı
- 5.İritis veya sekelinin öyküsü veya bulgusu
- 6.Radyografik incelemede bilateral AS`ye özgü sakroiliyak eklem değişiklikleri
(Sakroiliyak eklemlerin bilateral osteoartritik değişiklikleri hariç)

2.1.7.2. NEWYORK Tam Kriterleri (1966)

1.Lomber omurganın sagital, frontal, transvers anterior fleksiyon, lateral fleksiyon ve ekstansiyon hareket kısıtlılığı

2.Dorsolomber bileşkede veya lomber omurgada ağrı

3.Dördüncü interkostal aralıktan ölçülen göğüs ekspansiyonunun 2,5 cm veya daha az olması

Radyografi Evreleme

Normal:0, şüpheli:1, minimal sakroileit:2, orta derecede sakroileit:3, ankiloz:4

Kesin Ankilozan Spondilit

1.En az bir klinik kriterle birlikte evre 3-4 bilateral sakroileit

2.Evre 3-4 unilateral veya evre2 bilateral sakroileitle birlikte 1 klinik kriter veya 2. ve 3. klinik kriterler

Olası Ankilozan Spondilit

Hiçbir klinik kriter aranmaksızın evre3-4 bilateral sakroileit

2.1.7.3. MODİFİYE NEWYORK Tam Kriterleri (1984)

1.En az üç aydır var olan egzersizle düzelişle istirahatle düzelmeyen bel ağrısı

2.Lomber omurganın sagital ve frontal düzlemlerde hareket kısıtlılığı

3.Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinse göre normal değerlerin altında olması

4.Evre 2-4 bilateral sakroileit

5.Evre 3-4 unilateral sakroileit

Kesin Ankilozan Spondilit:

Klinik kriterlerden herhangi birisi ile birlikte unilateral evre 3-4, bilateral evre 2-4 sakroileit (78).

2.1.8.Laboratuvar Bulguları

Rutin kan testlerinde genellikle anlamlı bir değişme yoktur. Hastalık aktivitesiyle korele olmamakla birlikte C reaktif protein (CRP) ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) yüksek olabilir (79). Serum CRP düzeyleri hastalık aktivitesi için iyi bir göstergedir (80). Artmış eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) veya C-reaktif protein (CRP) düzeyleri hastalarda %75'e

varan oranlarda bildirilmekle birlikte normal ESH veya CRP değerleri aktif hastalığın varlığını dışlayamaz (81-83). Sadece aksiyel tutulumla giden hastalara göre periferik artriti olan hastalarda ESH ve CRP değerleri daha yüksek saptanmıştır (56). HLA-B27 antijeni hastaların % 90'ında veya fazlasında yüksektir. HLA-B27 erken spondiloartrit tanısında önemli bir faktördür (30).

Hastaların %15'inde normokrom normositer anemi olabilir ve hastalık aktivitesi ile uyumlu olarak hafif-orta trombositoz görülebilir. Serum alkalen fosfataz ve kreatin kinaz seviyelerinde artış olabilir ve hastalık aktivitesi ve süresiyle ilgili değildir. Akut faz reaktanlarıyla ilişkili serum IgA seviyesinde yükselme olabilir (84).

2.1.9.Görüntüleme:

Ankilozan spondilitin tanı ve takibinde görüntüleme çok önemli bir yere sahiptir. AS'in en tipik bulgusu; sakroiliak eklemden inflamasyon, sakroileit, sindesmofit ve ankiloza yol açan vertebralarda yeni kemik oluşumudur. Standart yaklaşım konvansiyonel radyografidir, ancak erken dönem lezyonları değerlendirebilmek açısından MRG ve Ultrasonografinin (USG) de önemi vardır (85).

Sakroileit en erken ve sık görülen radyolojik bulgudur, genellikle bilateralidir. Direkt radyografiler sağlık merkezlerinde yaygın olarak bulunabilmesi, ucuz olması, uygulama tekniğinin basit ve çabukluğu nedeniyle spondiloartropati düşünülen hastalarda sakroiliak eklem ve aksiyel tutulumu araştırmak amacıyla sıklıkla ilk başvuru radyolojik tetkiktir (86).

2.1.9.1.Konvansiyonel Radyografi:

Direkt grafilerde belirgin sakroileitin görülebilmesi zaman alabilir. En karakteristik özelliği SİE'lerde erozyon ve ankilozdur. En erken bulgular SİE'in iliak yüzünde ortaya çıkan subkondral erozyon ve sklerozdur, yalancı bir genişleme olur, daha sonra SİE açıklığında silinme ve bant tarzında skleroz meydana gelir. İlerleyen dönemde eklem aralığı ortadan kalkar ve ankiloz meydana gelir. AS'de sakroileit genellikle bilateral ve simetriktrir (85). Hastaların hastalık süresi uzadıkça omurga tutulumuna bağlı radyografik değişiklikler de saptanmaya başlar. Erken dönemde vertebra korpus köşelerinde düzensizlik ve erozyon görülür ve köşelerin parlamasına neden olur (Romanus Belirtisi). Başka bir bulgu olan sindesmofit spinal tutulumun karakteristik özelliğidir. Anulus fibrozusun dış kısmının kalsifikasyonu sonucu oluşur ve diğer vertebra korpusuna doğru dikey olarak uzanır. Bunların vertebra korpuslarını lateralden yaygın biçimde tutması 'bambu kamışı' görünümünü ortaya

ıkarır. Omurgada kemik erozyonu ve yeni kemik oluşumuna bağlı ‘kare vertebra’ görüntüsü oluşur (87) .Apofizer eklemlerin sklerozu, interspinoz ligamentlerin ve eklem ligamentlerinin kalsifikasyonu ile oluşan radyolojik görünüm ise "l ray belirtisi" olarak adlandırılır (88).Ayrıca disk aralığında daralma, düzensiz dansite artışı, komşu omurlarda destrüktif lezyon bulguları olan Anderson lezyonu olarak adlandırılan steril spondilodiskit ilerleyen zamanla grafide görülebilir (30).

Tablo 2 Sakroiliitin radyografik evrelemesi

Evre 0	normal
Evre 1	şüpheli değişiklikler
Evre 2	minimal anormallik-eklem mesafesinde değişiklik olmaksızın, erozyon ve skleroz olan küçük lokalize alanlar bariz anormallik- erozyon ve skleroz bulguları, genişleme, daralma veya parsiyel ankiloz gibi
Evre 3	bulgulardan birinin veya daha fazlasının da eşlik ettiği orta veya ileri sakroiliit
Evre 4	şiddetli anormallik-total ankiloz

2.1.9.2.Manyetik Rezonans Görüntüleme

Ankilozan spondilitte hastalık aktivasyon derecesini saptamak ve erken tanı için kullanılabilir. Erken dönem sakroiliiti ve aktif inflamasyonu saptamada oldukça duyarlı bir yöntemdir (89). MRG de T1 ağırlıklı sekanslar kullanılarak yapısal değişiklikler, T2 ağırlıklı yağ baskılı sekanslar ve short-tau inversion recovery (STIR) kullanılarak kemik iliği ödemi, sinovit, entezit, kapsülit gibi aktif inflamatuvar lezyonlar değerlendirilebilir (30,90).

MRG’de sakroileit, tek bir kesitte birden fazla lezyonun ya da bir lezyonun en az iki kesitte bulunması olarak tanımlanmıştır (91).Omurganın MRG’de ise kemik iliği ödemi görülebilmektedir (31).

SİE hastalıklarında MR'nin BT'ye birkaç üstünlüğü vardır. Bunlar;

1. Eklemdeki ödemi ve inflamasyonu göstermesi,
2. Kıkırdak patolojilerini göstermesi,
3. Komşu kemik iliğini ve yumuşak dokuyu göstermesi,
4. İyonizan ışın kullanılmamasıdır (92,93)

2.1.9.3.Ultrasonografi:

AS de özellikle periferik eklem tutulumu ve entezitin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (94).

2.1.9.4.Bilgisayarlı Tomografi:

Erken sakroileit vakalarında BT, düz grafiye göre çok daha duyarlıdır. BT ile süperpozisyonlar ortadan kalkar. Bu nedenle BT, SİE patolojilerini değerlendirmede eskiden ideal yöntem olarak gösterilirdi (95). BT'de sakroileit bulguları, erken evrede kortikal erozyon ve subkondralskleroz, geç evrede ise eklem aralığında daralma ve intraartiküler ankilozdur (96). Skleroz, erozyon, eklem aralığındaki değişiklikler ve düz grafideki şüpheli bulgularda BT ile çok iyi değerlendirilebilir.

BT'de de düz grafideki evreleme sistemi kullanılabilir (97).BT ile erozyon gibi özellikle kronik değişiklikler saptanabilir. Ancak kemik yapı dışında bilgi vermemesi, radyasyon kullanımı ve erken dönemde oluşan kemik iliği ödemi saptayamaması kullanımını kısıtlamıştır (98).

2.1.9.5.Sintigrafi:

Hastalığı değerlendirmede ek bir yöntemdir. Morfolojik değişikliklerin olmadığı zamanda inflamasyonu saptayabilir ancak spesifitesi düşüktür (87).

2.1.10.Ayırıcı Tanı

Ankilozan spondilit ayırıcı tanısında, toplumda sık karşılaşılan bel ağrısı ve nedenlerinin iyi gözden geçirilmesi gerekir. Bu sebeple ağrının karakteri önemlidir. Ağrı inflamatuvar mıdır? Yoksa mekanik midir? AS'de inflamatuvar karakterde ağrı mevcuttur. Daha önce tablo 2.'de inflamatuvar bel ağrısının özellikleri bahsedilmiştir. Mekanik bel ağrılarında ESH normaldir ve istirahatle rahatlar.

Radyolojik olarak değerlendirildiğinde sakroileit ile karışabileceği durumlar:

- a) Diğer SpA'lar
- b) Enfeksiyonlar
- c) Hiperparatiroidi
- d) Sarkoidoz
- e) Parapleji'dir.

Omurga hareketlerini kısıtlayan önemli bir diğer hastalıkta diffüz idiyopatik iskelet hiperostozudur. Diabetes mellitus ve diğer bazı metabolik hastalıklarla birlikte sık bulunur fakat HLA B-27 negatiftir (99).

2.1.11.Tedavi

AS tedavisi; semptom ve bulgular, hastalık aktivitesi ve şiddeti, işlevsel durum, deformiteler, genel sağlık durumu, eşlik eden durumlar ve hastanın isteklerine bağlı olarak bireye göre düzenlenmelidir. En uygun tedavi farmakolojik ve farmakolojik olmayan tedavilerin kombinasyonunu gerektirmektedir. Semptomlara, hastalığın şiddetine ve ilaç tedavisine göre uygun izlemde önemlidir (90). ASAS ve EULAR 2006 yılında AS'nin tedavisi için bilimsel kanıt ve uzman düşüncelerine dayanan 10 anahtar öneri yayınlamıştır (100). 2011 yılında da bu önerilerin 2010 güncellenmiş hali yayınlandı. Tablo 3'de gösterilmiştir (101).

Tablo 3: AS tedavisinde ASAS/EULAR 2010 güncellenmiş önerileri (101)

1. Genel tedavi

AS tedavisi hastalığın mevcut bulgularına (aksiyel, periferik, entezial, eklem dışı semptom ve belirtiler), mevcut semptomların düzeyine, klinik bulgulara ve prognostik belirleyicilere, hastalık aktivitesine/inflamasyona, ağrıya, fonksiyona, dizabiliteye, engeliliğe, yapısal hasara, kalça tutulumuna, spinal deformitelere, genel klinik duruma (yaş, cinsiyet, komorbidite, eş zamanlı tedavi, hastanın istekleri ve beklentileri) göre uyarlanmalıdır.

2. Hastalık takibi

AS'li hastalarda hastalığın takibi ASAS çekirdek setinde olduğu gibi tüm klinik gösterime göre hasta öyküsünü (örneğin anketler), klinik parametreleri, laboratuvar testlerini ve görüntüleme metodlarını kapsamalıdır.

3.Farmakolojik olmayan tedavi

AS'li hastaların farmakolojik olmayan tedavilerinin köşe taşı eğitim ve düzenli egzersizdir. Ev egzersizleri etkindir. Bireysel ya da grupla, su ya da zemin egzersizleriyle birlikte yapılan fizik tedavi evde yapılan egzersize göre daha etkindir. Hasta toplulukları ve kişisel destek grupları yararlı olabilir.

4. Eklem dışı tutulum ve komorbidite

Psoriasis, üveit ve İBH gibi sıklıkla gözlenen eklem dışı tutulumlar her biri kendi alanında uzman ile işbirliği içinde tedavi edilmelidir. Romatolog kardiyovasküler hastalık ve osteoporoz risk artışının da farkında olmalıdır.

5. NSAİİ

Coksibleri içeren NSAİİ'ler ağrısı ve tutukluluğu olan AS'li hastalarda ilk seçenek ilaç olarak tavsiye edilir. NSAİİ ile devamlı tedavi; sürekli aktif ve semptomatik hastalığı olan

hastalarda tercih edilmelidir. NSAİİ reçete edildiğinde kardiovasküler, gastrointestinal ve renal risk göz önüne alınmalıdır.

6. Parasetamol ve opioidler gibi NSAİİ'lerin başarısız olduğu, kontrendike olduğu ve/veya zayıf tolere edildiği hastalarda ağrı kontrolü için başvurulabilir.

7. Muskuloskeletal inflamasyona lokal olarak doğrudan kortikosteroid enjeksiyonları düşünülebilir. Aksiyel hastalıkta sistemik kortikosteroidlerin kullanımı kanıtlanmamıştır.

8. Aksiyel hastalığı tedavi etmede salazopyrin ve metotreksat dahil DMARD'ların yararını gösteren kanıt yoktur. Periferik artriti olan hastalarda salazopyrin düşünülebilir.

9. Anti-TNF tedavi

ASAS tavsiyelerine göre diğer tedavilerin başarısız olduğu ve sürekli yüksek hastalık aktivitesi olan hastalara verilmelidir. Aksiyel hastalığı olan kişilerde anti-TNF tedavinin öncesinde veya eş zamanlı DMARD'ların zorunlu kullanımı için kanıt yoktur. Eklem/entezit ve aksiyel tutulumda değişik TNF inhibitörü ile farklı etkinlik sağladığını destekleyen kanıt yoktur, fakat IBH varlığında gastrointestinal etkinliği olan tercih edilmelidir. Cevapsızlık olan hastalarda ikinci TNF inhibitörüne geçiş yapmak yararlı olabilir. AS'de TNF inhibitöründen farklı bir biyolojik ajan kullanımını destekleyen kanıt yoktur.

10. Cerrahi

Eklem replasmanı; refrakter ağrısı ve dizabilitesi olan, ileri evre kalça tutulumuna ait radyografik kanıt olan hastalarda genç olsalar bile dikkate alınmalıdır. Spinal düzeltme osteotomisi şiddetli sakatlığa yol açan deformitesi olan hastalara düşünülebilir. Akut vertebral fraktürü olan AS'li hastalar spinal cerraha konsulte edilebilir.

11. Hastalık seyrinde değişiklik

Eğer hastalık seyrinde anlamlı bir değişiklik olduysa; enflamasyondan farklı sebepler (spinal fraktür gibi) düşünülmeli ve görüntülemeyi de içeren uygun değerlendirme yapılmalıdır.

2.1.11.1. Farmakolojik Olmayan Tedaviler:

Farmakolojik olmayan tedavilerin en önemlileri hasta eğitimi ve düzenli egzersizdir. Ev egzersizleri etkindir ve bireysel ya da grupta, su ya da zemin egzersizleriyle birlikte yapılan fizik tedavi evde yapılan egzersize göre daha etkin bulunmuştur (101).

Yaşam tarzı modifikasyonlarını destekleyen az sayıda delil vardır. Sigarayı bırakmanın faydalı olabileceğini destekleyen çalışmalar olmasına rağmen bu gözlemi destekleyen karşılaştırmalı çalışmalar bulunmamaktadır. Ayrıca bir vaka çalışması da karbonhidrattan fakir diyetin ağrıyı azaltmada etkili olduğunu göstermiştir (102).

2.1.11.2.Farmakolojik Tedaviler:

2.1.11.2.1.Non-Steroid Antiinflatuar İlaçlar (NSAİİ):

Non- Steroid Antiinflatuar İlaçlar AS'li hastalarda sıklıkla kullanılan birinci basamak tedavidir. ASAS/EULAR önerilerinde ise coxib içeren NSAİİ'lar ağrı ve tutukluğu olan AS'li hastalarda ilk seçenek ilaç olarak tavsiye edilmiştir (101). Farklı NSAİİ'ların çalışmalarında diğerlerine göre daha üstün bir ilaç gösterilememiştir. Aralıklı ve düzenli NSAİİ tedavisinin karşılaştırıldığı çalışmada düzenli kullanımın 2 yılda radyolojik progresyonu geriletmediği gösterilmiştir (103). NSAİİ seçimi ve kullanım şekli hastada gastrointestinal, kardiyovasküler ve renal yan etkiler oluşma riskine göre yapılmalı ve sürekli NSAİİ kullanımından kaçınılmalıdır (104).

2.1.11.2.2.Kortikosteroidler (KS):

Kortikosteroidler antiinflatuar ve immunsupresif etkilerinden dolayı birçok romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılırken AS'de oral ve intravenöz KS'in etkisini gösteren fazla sayıda çalışma yoktur (105). Tek eklemde kronik artriti olan ve entezopatili hastalarda lokal KS enjeksiyonu önerilmektedir. SİE'e KS enjeksiyonunun etkili olduğunu gösteren çalışma mevcuttur (30,106).

2.1.11.2.3.Hastalık Modifiye Edici Antiromatizmal İlaçlar (DMARD):

2.1.11.2.3.1.SÜLFASALAZİN (SSZ):

Oral olarak alınır ve salisilik asit ve sülfapiridinden oluşmaktadır (90) AS tedavisinde en çok çalışılan DMARD'dır. Yapılan bir derlemede yüksek ESH ve periferik artriti olan erken dönem AS'li hastalarda SSZ'in faydalı olabileceği gösterilmiştir (107). ASAS/EULAR önerilerinde aksiyel tutulumlu AS tedavisinde yeri olmadığı ve periferik tutulumlu AS tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Döküntü, bulantı, ishal ve nadir olarak agranülositoz gibi yan etkiler görülebilir (108).

2.1.11.2.3.2.METHOTREKSAT:

Folik asit analogudur. Yapılan çalışmalarda aksiyel tutulumu etkisinin olmadığı, periferik eklem hastalığında ise etkinliğiyle ilgili yeterli kanıt olmadığı gösterilmiştir (109). Haibel ve ark. (110), NSAİİ'ye dirençli AS'si olan hastalara 16 hafta süre ile haftada bir subkutanöz 20 mg metotreksat uyguladıkları çalışmalarında aksiyel tutulumda hiçbir yararının olmadığını bildirmişlerdir.

2.1.11.2.3.3.LEFLUNOMİD:

AS'in aksiyel bulguları üzerine etkili değildir ancak periferik tutulumda fayda sağlayabilir. Leflunomid ile yapılmış çok fazla çalışma yoktur (111).

2.1.11.2.3.4.TALİDOMİD:

Nöropati ve teratojenik etki nedeniyle kullanımı kısıtlı olan ve TNF alfa inhibisyonu yapması nedeniyle AS tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (112).

2.1.11.2.3.5.BİFOSFANATLAR:

Bifosfanatlardan olan pamidronat antiinflamatuvar ve osteoklastlar üzerine inhibitör etkisinden dolayı romatizmal hastalıklarda kullanılmıştır. Pamidronatın osteoporozu önlemenin yanı sıra AS hastalarında klinik ve radyolojik iyileşme sağladığını gösteren çalışma mevcuttur (113).

2.1.11.2.4.Biyolojik tedaviler

Ankilozan spondilitli hastalarda TNF alfanın serumda ve sakroiliak eklemden artmış ekskresyonu gösterilmiştir (114). TNF alfa AS'deki inflamasyon ve eklem hasarından sorumlu olan en önemli sitokinlerdendir. Bu sitokinin engellenmesiyle inflamasyon ve eklem hasarının azaltılabildiği öngörüsüyle antiTNFalfa tedaviler geliştirilmiştir (111).

Önceki çalışmalar infliximab, etanercept ve adalimumabın iyi güvenlik profiliyle klinik olarak eşit derecede etkili olduğunu göstermiştir (115-117). Şuanda AS'li hastaların tedavisinde infliximab, adalimumab, etanercept ve golimumab kullanılmaktadır. 2010 yılında ASAS önerileri; AS'li hastalarda anti TNF tedavi kullanımı için güncellenmiştir (118).

2.1.11.2.4.1.İNFLİXİMAB:

Monoklonal kimerik formda bir antikordur. TNF alfaya yüksek duyarlılık ve özgüllükle bağlanır. İntravenöz yoldan 3-5 mg/kg dozda 6-8 haftada bir uygulanmaktadır [52]. ASSERT çalışma grubu tarafından infliximab ile tedavi edilen hastalarda ağrıda, fonksiyonda, hastalık aktivitesinde ve MR ile belirlenmiş spinal inflamasyonda iyileşme gösterilmiştir (115).

2.1.11.2.4.2.ADALİMUMAB:

İnsan monoklonal antikorudur. TNF alfaya yüksek affiniteyle bağlanarak TNF alfanın reseptörleriyle etkileşmesini önler. 15 günde bir 40 mg subkutan olarak uygulanmaktadır (90).. 2009 yılında yapılan bir çalışmada spinal füzyon gelişmiş AS'li hastalarda adalimumabın olumlu etkileri bildirilmiştir (119).

2.1.11.2.4.3.ETANERCEPT:

TNF alfayı ve lenfotoksin alfayı bağlayan dimerik solubl TNF reseptörüdür (90). Haftada 2 kez 25 mg ya da haftada 1 kez 50 mg subkutan olarak uygulanmaktadır. Etanerceptin ileri-şiddetli spinal spondiliti olan AS'li hastalarda BASDAI, BASFI, BASMI ve CRP üzerinde iyileşme yaptığı gösterilmiştir (120).

2.1.11.2.4.4.GOLİMUMAB:

TNF alfa spesifik insan IgG monoklonal antikorudur. Aylık 50 mg subkutan olarak uygulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada aylık 50 mg golimumab ile ASAS 20, ASAS 40 yanıtlarında, SF36, BASDAI ve BASFI'de anlamlı iyileşme bulunmuştur (121).

Biyolojik tedavilere AS'li hastalarda yanıt hızlıdır. Tedaviden yanıt alınamayan ya da yan etki nedeniyle kesilen hastalarda ikinci bir anti TNF tedavi etkili bir strateji olabilir.

Kısa hastalık süresi, genç yaş, daha iyi fonksiyonel durum, yüksek inflamatuvar belirteçler, HLA-B27 pozitifliği ve yüksek spinal MR skorları anti TNFalfa tedaviye yanıtı artıran faktörlerdir (122).

Anti TNF alfa tedavisi yan etkieri de olan bir tedavidir. En sık yan etki enjeksiyon yeri reaksiyonudur. Ayrıca infliximab alan hastalarda infüzyon reaksiyonuda görülebilir. Her iki

yan etki de çok az hastada tedavinin kesilmesini gerektirir . Bakteriyel, mantar enfeksiyonları ve latent tuberküloz reaktivasyonu gibi yan etkiler görülebilir (123).

Lupus benzeri sendrom gibi otoimmün sendromlara yol açabilir. Nadir de olsa demyelinizan hastalık bildirilmiştir (124).

2.1.11.2.4.5. Anti TNF alfa tedavisinin kontrendike olduğu durumlar :

Hamile ya da emziren kadın hasta, aktif enfeksiyon, lupus, multiple skleroz, malignite ve kronik bacak ülseri, önceki tuberküloz öyküsü, geçmiş bir yıl içinde geçirilmiş septik artrit veya protez enfeksiyonu, devamlı ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonu öyküsü gibi yüksek enfeksiyon riski olan durumlardır (124). Anti TNF tedavinin başarısız olduğu durumlarda abatacept, rituximab, secukinumab ve tocilizumab ile yapılan çalışmalar mevcuttur ve sonuçlara göre daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır (122).

2.2. GENETİK POLİMORFİZM

2.2.1. Tanım

İnsan Genom Projesi'nin sonuçlanmasını izleyen yıllarda bilimsel ilgi daha çok genetik varyasyonların haritalarının çıkarılması üzerine yoğunlaşmıştır (125). Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel adı verilir. Alleller genel popülasyonda %1'den daha fazla sıklıkta bulunuyorsa, bu durum “genetik polimorfizm (genetik çeşitlilik)” olarak adlandırılır. Aksine, alleller %1'den daha az sıklıkta ise ‘nadir değişimler’ olarak isimlendirilir. Genetik hastalığa neden olan zararlı mutasyonların birçoğu nadir değişimlerdir.

Genetik polimorfizm teriminden toplumda yaygın olarak rastlanan ve genellikle hastalık etkeni olmayan genom değişiklikleri anlaşılır. Genetik polimorfizm, Mendel kurallarına göre aktarılır. Genetik polimorfizm, kodlanan veya kodlanmayan DNA dizilerinde meydana gelebilir. İntronlarda ve genler arasındaki DNA dizilerinde meydana gelen değişikliklerin genellikle etkisi yoktur. Ancak intron bölgelerindeki bazı polimorfizmlerin gen ekspresyonunu etkileyerek fenotipik değişiklikler meydana getirebileceği belirtilmektedir. Genlerin kodlanan bölgelerindeki (ekzon) polimorfizmler ise protein fonksiyonuna etki edebilir. Promotor bölgede meydana gelen polimorfizm ise transkripsiyon düzeyinde değişikliğe neden olabilir.

Polimorfik değişiklikler çok çeşitli tiplerde olabilir. DNA dizisinde her 1000 bazda bir tek baz farklılığı gözlenir. Bu da aynı tür içerisinde genom farklılığının bir göstergesidir. SNP insan genomundaki en basit ve en yaygın genetik polimorfizm çeşitidir. Tüm polimorfizmlerin %90'ını oluşturur (126). İkinci sıklıkta görülen polimorfik değişiklik ise genomda ardışık olarak tekrarlayan DNA dizilerinin sayısında görülen değişikliklerdir. İnsan genomunda ardışık tekrarlayan DNA dizileri vardır (Minisatellite ya da VNTR; “Variable number of tandem repeats” 5-50 tekrar dizisi içeren 10-60 baz uzunluğunda; kısa DNA dizileridir. Microsatellite ya da “short tandem repeats”; STR; 1-6 bazlık tekrarlardan oluşan kısa DNA dizileridir). Bu dizilerin tekrar sayıları her bireyde farklıdır (127). SNP'lerin bazı alt grupları vardır. SNP'leri; Amino asit değişimine neden olmayan SNP'ler (synonymous) veya amino asit değişimine neden olan SNP'ler (nonsynonymous) olarak ikiye ayırabiliriz. Amino asit değişimine neden olan SNP'ler, protein fonksiyonuna etki ederek fenotip üzerinde etki meydana getirebileceği öne sürülmektedir. SNP'ler DNA dizisinde restriksiyon enzim (RE) kesim bölgesi meydana getirebilir veya mevcut kesim bölgesini ortadan kaldırabilir. Bu değişiklikler RE'lerince DNA'nın farklı uzunlukta kesilmesine yol açar. DNA bantlarının uzunluğu ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) denir. Genetik polimorfizmler, membran proteinlerinin ekspresyonu, enzimlerinin katalitik aktivitesini, yapısını veya ekspresyon düzeyini etkileyebilir ve fonksiyonel değişimlere yol açabilir.

2.2.2.İlaç Direnci

İlaç direnci çeşitli biyokimyasal mekanizmaların bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir (128). Şekil 3' de gösterilen biyokimyasal mekanizmalar:

- a)** İlaç alınımında ve etkinliğinde azalma
- b)** İlacın hücre dışına atılımındaki artış,
- c)** İlacın azalan metabolik aktivasyonu,
- d)** İlaç deaktivasyonunda artış,
- e)** Hedef bölge ile etkileşimini önleyen ilaç sekestrasyonu,
- f)** Hedef bölge konsantrasyonlarının intrasellüler artışı,
- g)** Hedef bölgedeki yapısal değişiklikler,
- h)** Hedef bölge fonksiyonunda duplikasyon,

i) Hasarlı hedef bölgenin onarımıdır.

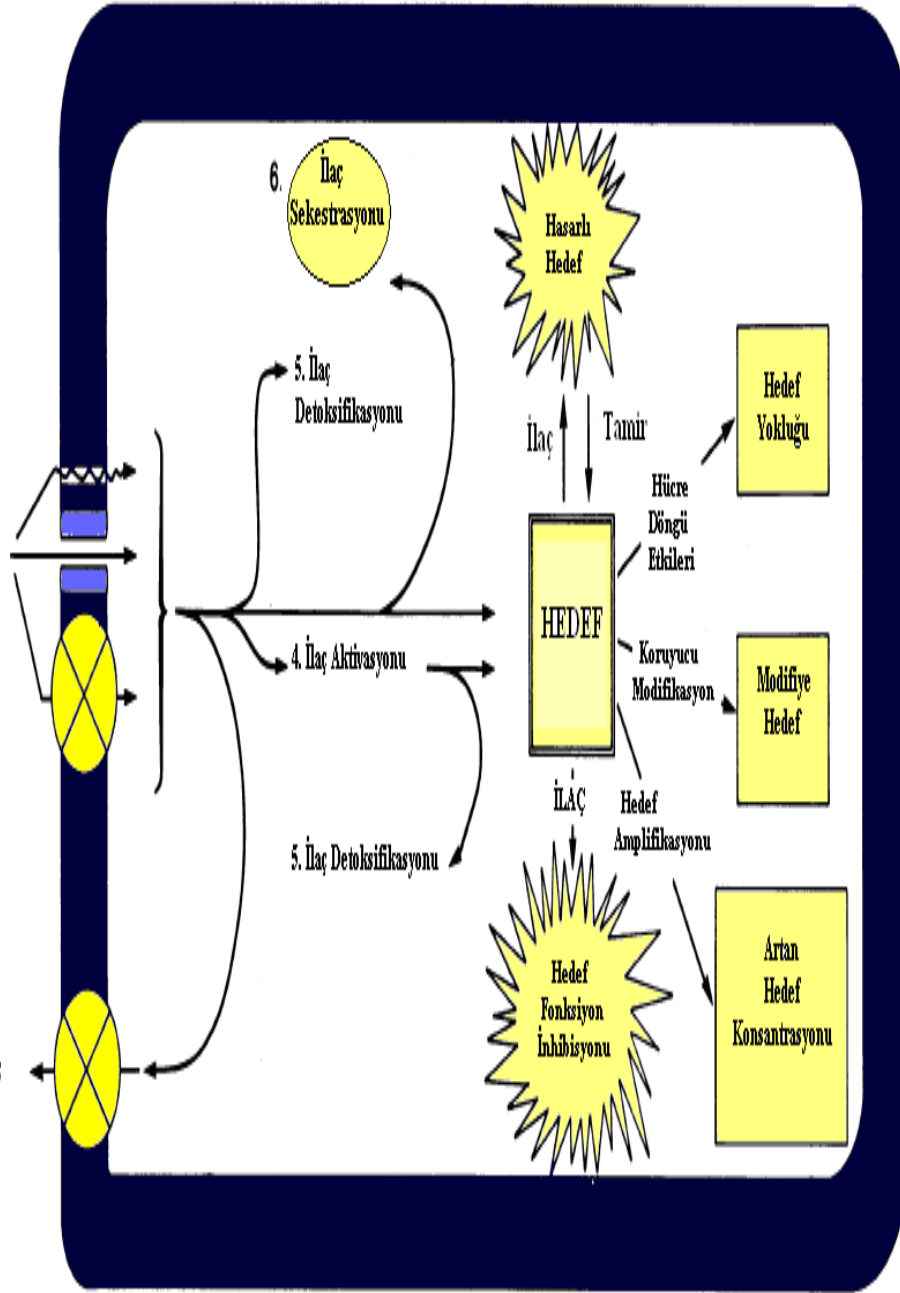
Klasik olarak direnç, ekstrinsik ve intrinsik olarak ikiye ayrılmaktadır. Ekstrinsik direnç ilaçların tümör hücresine ulaşamamasından, intrinsik direnç ise tümör hücrelerinin özelliğinden kaynaklanmaktadır. İntrinsik direnç in vitro olarak gözlenmekte olup 2 gruba ayrılır: Hücreler eğer tek bir ilaca karşı direnç gösterirse basit direnç, farklı biyokimyasal hedeflere sahip kemostatik ilaçlara karşı çapraz direnç gösterirlerse çoklu ilaç direnci (Multi Drug Resistance, MDR) olarak adlandırılmaktadır (129).

1. İlaç Dağılımı



2. Hücreye Giriş

3. Hücreden Çıkış



Şekil 3: İlaç direncinin biyokimyasal mekanizması (128)

2.2.3.ABCB1

“ATP- binding cassette” (ABC) süper ailesi, P-glikoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1), çoklu ilaca dirençle ilgili protein 1 (MRP1, ABCC1), kanalikular multiorganik anyon taşıyıcısı (cMOAT, ABCC2), ve meme kanserine direnç protein/mitoksantron direnç (BCRP/MXR, ABCG2) proteinlerini kapsamaktadır (130). ABC, zar boyunca metabolik ürün, lipid, sterol ve ksenobiyotik gibi birçok maddeyi taşıyan integral membran proteinleridir. İnsan genomunda A'dan G' ye 7 alt aileye ayrılan 48 adet ABC proteini kodlanmaktadır (131). Kültüre edilmiş hücrelerde A, B, C ve G gruplarının ilaca gösterilen dirençten sorumlu olduğu açıkça belirtilmektedir. Her biri benzer ABC yapısına sahip olmasına rağmen, transmembran bölgelerinin farklı sayıda ve lokalizasyonda olması ile birbirlerinden ayrılmaktadırlar (132).

2.2.4.Multi Drug Resistance Gene (MDR1/P-gp)

1976 yılında Juliano ve Ling, kolşisine dirençli olan hamster overinde 170 kDa luk bir proteinin eksprese olduğunu ve aynı proteinin ilaca-hassas olan hücrelerde eksprese olmadığını bildirmişlerdir . Kolşisinin hücresel geçirgenliğini değiştirdiği için bu proteine P-gp adını vermişlerdir (133). Aynı geni taşıyan bakterilerle göstermiş olduğu yüksek homolojiden dolayı, P-gp' in hücre içi ksenobiyotik konsantrasyonunu belirleyen bir atılım pompası olduğu belirtilmiştir. (134)

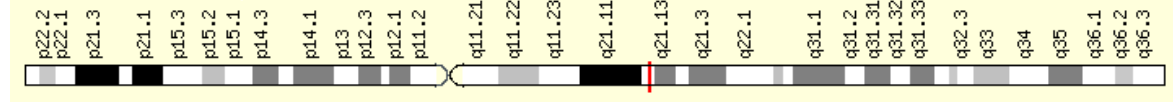
İlk olarak tümör hücrelerinde P-gp' in ekspresyon seviyesinin arttığı ve yapısal ve mekanik olarak birbiriyle ilgili olmayan ilaçların, gösterdikleri çapraz dirençten sorumlu oldukları belirtilmiştir (135). P-gp' i kodlayan gen 1986 yılında keşfedilmiş ve MDR1 geni (NG_011513.1, NM_000927.3, NP_000918.2) diğer bir adıyla ABCB1 7.kromozomun q21.12 bölgesinde yerleşim gösterir. 209623 baz uzunluğunda olup 29 ekzona sahiptir (şekil 4). MDR 1 geni 4827 bazlık bir mRNA' yı kodlar ve P-gp (p170 glikoproteini) oluşur. Genin kodlayan bölgesi tamamının sadece %5 kadarlık kısmını oluşturur (136). MDR1 insan 7. inci kromozomunda 600 kb' lık Nrul fragmenti üzerinde p21-21.1 bantları arasında yer almaktadır (123). 28 intron ve 29 ekzona sahip olup, gen uzunluğu 209 kb' dır (137). Promotor bölgesinde TATA kutusu bulunmamaktadır. MDR1 mRNA'sı 4,7 kb' dır ve genin toplam boyutunun %5' i mRNA olarak kodlanmaktadır (138,139).

Bu alt gruplardan ABCB nin bir üyesi olan P-glikoprotein (P-gp),ya da Mdr1

proteini; 170 kDa büyüklüğünde olup hepatositlerde, safra kanalı endotel hücrelerinde, böbreklerde proksimal tübüllerin apikal yüzeyinde, barsak epitel hücrelerinde, beyin ve testiste kapiller endotelial hücrelerde bulunmaktadır. P-gp, MDR1 (Multi Drug Resistance 1)

geninin ürünüdür. 7q21 kromozom bölgesinde bulunan, MDR-1 geninin 21.eksonundaki c.2677G>A/T ve 26. eksonundaki c.3435C>T tek nükleotid polimorfizmleri, P-glikoprotein ekspresyonunun değişimine neden olur. P-gp'nin substratı olan ilaçların klinik etkinliğinin MDR1 genotipi ile ilişkili olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır. MDR1 gen ekspresyonunda artışın hücre içinde P-gp'nin çoğalmasına ve böylelikle hücre içi ilaç düzeyinin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (140-142).

7. Kromozom 7q21.1



Şekil 4: MDR1 geninin lokalizasyonu (143)

2.2.5.MDR1 gen ürünü; P glikoprotein

İlaçların emilme, dağılma ve atılma süreçlerinde taşıyıcı moleküller rol oynar. Bunlar arasında en önemli grup, Atp-Binding Casette (Abc) Ailesi Proteinleri'dir. Günümüze kadar 48 adet ABC geni izole edilmiş ve ABCA-ABCG olmak üzere 7 grupta sınıflandırılmıştır.

ABC taşıyıcıları hücre membranlarında yerleşip ATP kullanarak ilaçların, fosfolipidlerin, iyonların, peptidlerin, steroidlerin, polisakkaritlerin, aminoasitlerin, organik anyonların, safra asitlerinin ve diğer ksenobiyotiklerin hücre içinden dışına taşınmasında görev alırlar (144). Hücre içi ilaç düzeyini azaltarak ilaç direncine sebep olurlar. Buna ek olarak ilaçların membran veziküllerinde sekestre olmalarına yol açarlar. İlaç direnci oluşturması dışında hücrelerde eksprese olan MRP1, MRP2, P-gp ve BCRP; hücreleri ksenobiyotik birikiminden ve dolayısıyla toksisiteden korur. ABC taşıyıcıları içinde yer alan ABCE ve ABCF gerçekte taşıyıcı olmayıp, transmembran bölgesine sahip değildirler. Genel olarak protein sentez ve ekspresyonunu düzenlerler. P-gp (MDR1) nötral ve organik hidrofobik bileşikleri taşıırken, ABCC1 (MRP1) ve ABCG2 (BCRP), hidrofobik maddelerin yanında ilaç konjugatları gibi büyük anyonik bileşikleri taşırlar (145). ABC taşıyıcı ailesi içinde P-gp (ABCB1), MRP1 (ABCC1), MRP 2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3) ve BCRP (ABCG2) nin antikanser ilaçlara karşı olan direnç ile ilişkili olduğu bulunmuştur (142,146).

ABCB taşıyıcı protein ailesinin üyesi olan P-glikoprotein (P-gp), 170 kDa büyüklüğünde ve 1280 aminoasitten oluşmuş olup memelilerde tek zincirli protein yapısındadır. P-gp'nin iki ATP bağlayıcı bölgesi ve iki transmembran bölgesi bulunmaktadır (146). Bu glikolize membran proteini ilaç direncini, geçirgenliği değiştirerek oluşturduğundan “permeability”

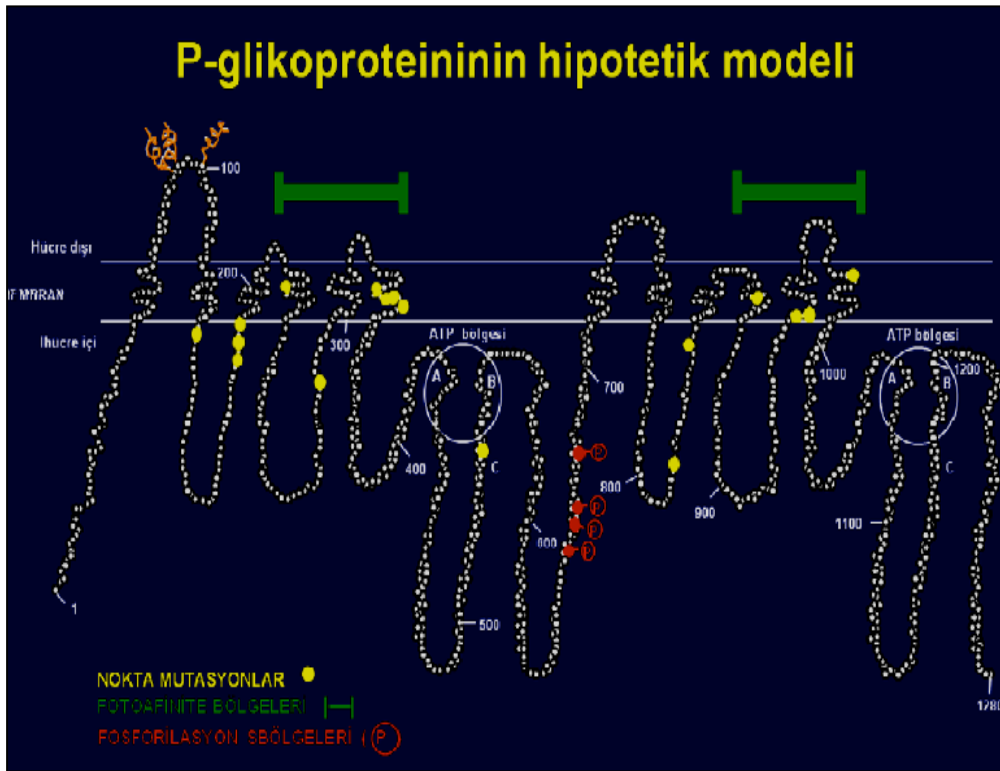
geçirgenlik kelimesinin kısaltması olan P ile isimlendirilerek P-glikoprotein olarak adlandırılmıştır (147,148).

P-gp; hepatositlerde safra kanalı endotel hücrelerinde, böbreklerde, proksimal tübüllerin apikal yüzeylerinde, barsak epitel hücrelerinde, beyin ve testisteki kapiller endotelial hücrelerinde bulunmaktadır. Bazı hastalıklarda ilaç direncine neden olduğu gibi toksik ksenobiyotiklerin safra, idrar ve barsak lümenine atılmalarında; beyin ve testiste birikmelerinin önlenmesinde katkısı olduğu bilinmektedir (149-151).

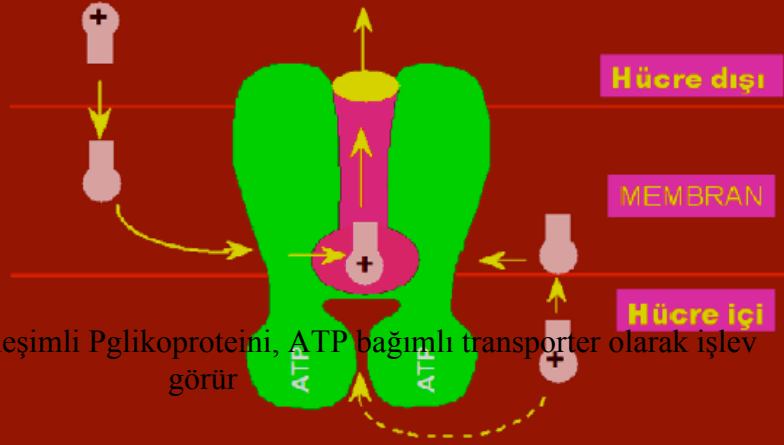
2.2.6.Normal Dokularda P-gp Ekspresyonu

P-glikoprotein normal dokulardaki ekspresyonu hücreleri toksik maddelerden korumaktadır.

P-gp insanda böbreküstü bezlerinde yüksek oranda eksprese olurken, akciğer (solunum epiteli), mide, kolon, pankreas, plasenta ve prostatta orta seviyede, beyin, kemik iliği, özofagus, kalp, düz kas, timus ve deride ise düşük seviyede eksprese olmaktadır (152).



P-glikoprotein, hidrofobik maddeleri plazma membranından doğrudan uzaklaştırır.



Şekil 6: Transmembran yerleşimli P-glikoproteini, ATP bağımlı transporter olarak işlev görür

2.2.7.MDR1 Gen polimorfizmleri

MDR1 geninde, günümüze kadar birçoğu SNP olmak üzere 105 varyant tespit edilmiştir. Bu SNP lerin 48'i intronik, 29'u kodlanmayan bölgelerde bulunup aminoasit değişimine yol açmaktadır. Kodlanan bölgelerde bulunan 28 adet varyantın 10'u aminoasit değişimine yol açarken bunlar arasından sadece 4'ü %1'den daha fazla sıklıkta görülürler, bir başka deyişle polimorfizm kabul edilirler (153).

Alternatif olarak, P-gp ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkileyen polimorfizmler, ABCB1 geninin dışında da lokalize olabilir. Literatürde ABC genlerini kodlayan sekanslarının, komşu ABC genlerinin regülatör bölgeleri olabileceği ileri sürülmüştür ve böylece bir gendeki polimorfizmin diğerinin regülasyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir (154). MDR1 genindeki polimorfizmlerin belirlenmesi ile ilgili bir çalışmada, ekzon ve intronlarda 15 farklı tek nükleotid polimorfizminin ("single nucleotide polymorphism", SNP) olduğu belirtilmiştir (134). Sonraki çalışmalarda 50 adet SNP ve üç adet insersiyon/ delesyon polimorfizminin varlığı bildirilmiştir (155-158).

Tablo 4: MDR1 geninin kodlayıcı bölgesinde yaygın olarak gözlenen SNP örnekleri (138)

Nükleotid değişimi	Ekzon	Amino asit değişimi
A61G	2	Asn21Asp
T307C	5	Phe103Leu
A548G	7	Asn183Ser
G1199A	11	Ser400Asn
C1236T	12	Sinonim/Sessiz

Literatürde yaygın olarak bildirilen ve üzerinde en çok araştırma yapılan SNP ler koyu harfle yazılmıştır.

MDR1 geninin kodlayan bölgelerinden, 12. ekzonda yer alan sinonim polimorfizm c.1236 C>T (rs1128503), 21. ekzonda yer alan c.2677 G>T/A (Ala893Ser/Thr) (rs2032582) ve 26. ekzonda yer alan sinonim polimorfizm c.3435 C>T (rs1045642) gibi bazı SNP 'ler araştırmacılar için primer odak noktasıdır (159). c.3435 C>T polimorfizmi gibi, bu SNP'lerden sadece birkaç tanesinin P-gp' nin biyokimyasal fenotipi ve ilaç duyarlılığı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (160,161).

MDR1 geninin 26. ekzonunda yer alan c.3435C>T polimorfizmi herhangi bir amino asit değişikliğine yol açmayan sessiz bir polimorfizmdir (Ile-Ile). Normal dokularda homozigot T/T genotipinin düşük P-gp ekspresyon seviyesi ile ilgili olduğu önceki çalışmalarda belirtilmektedir (162,15,163). Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada, C allel sıklığı %40, T allel sıklığı %60 olarak bildirilmektedir . T allel sıklık yüzdesinin fazla oluşu ile Türk popülasyonun bazı sitotoksik ajanlara karşı daha hassas olabileceği düşünülmektedir (152). c.3435C>T polimorfizmi ile ilaç kullanımı/dağılımı arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bir hipoteze göre, c.3435C>T polimorfizminin alternatif splicing oluşturduğu ve bunun sonucunda yabancı tip P-gp ile kıyaslandığında daha kısa bir protein meydana geldiği belirtilmiştir. Bazı popülasyonlarda çoğunlukla c.3435C>T pozisyonundaki polimorfik allelin, P-gp ekspresyonunu etkileyen başka polimorfizmlerle (c.2677G>A/T ve T-129C) bağlantılı olduğu gözlenmiştir (132). c.3435C>T polimorfizminin, mRNA işlenmesi ile ilgili diziler, promotor veya enhansör bölgeler gibi ekspresyonu kontrol eden MDR1 gen bölgelerinde gözlenen değişimlerle ilişkili

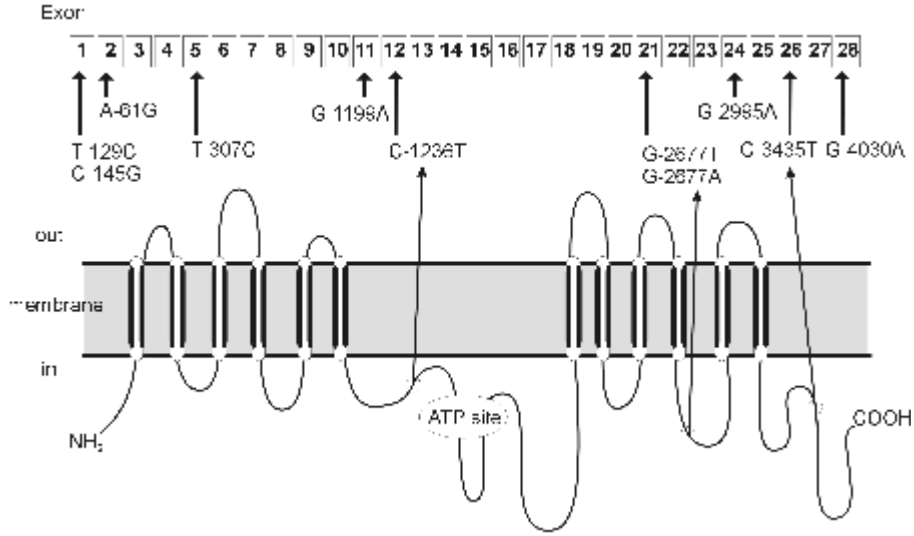
olduğu, posttranskripsiyonel modifikasyonları etkilediği ve mRNA' nın translasyonel kontrolünü değiştirdiği düşünülmektedir (13,164).

Çesitli ırklarda yapılan populasyon çalışmalarında MDR1 geni üzerinde saptanan polimorfizmler arasında en iyi bilinenleri ekzon 13'de c.1236C>T (rs1128503), ekson 22'de c.2677G>A/T (rs2032582) ve ekson 27 de bulunan c.3435C>T (rs1045642) polimorfizmleridir. c.1236C>T (p.Gly412Gly) ve c.3435C>T (p.Ile1145Ile) sessiz polimorfizmler olup ve aminosit değişimine yol açmazken, c.2677G>T polimorfizmi 893.pozisyondaki Alanin aminoasidinin Serin aminoasidine dönüşümüne (p.Ala893Ser), c.2677G>A polimorfizmi ise aynı pozisyondaki Alanin aminoasidinin Treonin aminoasidine (p.Ala893Thr) dönüşümüne yol açmaktadır (132,153).

c.3435C>T polimorfizmine ilişkin Hoffmeyer ve arkadaşlarının (13) yaptığı çalışmada, TT genotipine sahip bireylerde intestinal P-gp ekspresyonunun azaldığı ve dolayısıyla digoksin ilaç alımının arttığı, CC genotipindeki bireylerde ise P-gp ekspresyonunun arttığı ve dolayısıyla digoksin ilaç alımının da azaldığı gözlenmiştir.

c.2677G>T ve c.2677G>A polimorfizmleri 21. inci ekzonda lokalize olmuştur. 2677. pozisyondaki G→T ve G→A dönüşümleri anlamsız mutasyonlardır ve P-gp intrasellüler kısmında yer almaktadırlar. 2677. inci pozisyonda alaninin threonin veya serin ile yer değiştirmesi nedeniyle, lipofilik rezidü hidrofilik rezidüye dönüşmektedir ve alanin yapısal olarak nötral bir aa olduğu için, yeni oluşan serin aa' i geometrik yapıyı değiştirmektedir. Bu polimorfizm için homozigot T/T genotipine sahip bireylerin, P-gp ekspresyon seviyelerinin düşük olduğu belirtilmektedir (15). Önceki çalışmalarda, Türk populasyonunda G allel sıklığının fazla olduğu bildirilmiştir (15,165). Bu da bazı sitotoksik ajanlara karşı daha dirençli olunabileceğini düşündürmektedir (152).

c.1236C>T polimorfizmi 12. ekzonda lokalize olan bu polimorfizm Pgp molekülünde 412. amino asidi kodlayan GGC kodonunun GGT'ye değişimine neden olmaktadır (166). Ancak her iki kodonda glisin'i kodladığı için bu polimorfizmde c.3435C>T polimorfizmi gibi sinonimdir. Daha önceden belirtildiği gibi c.1236C>T polimorfizmi sinonim olmasına karşın P-gp aktivitesin de fonksiyonel öneme sahiptir. Bu polimorfizmin de nadir kodon kullanımına neden olarak Pgp fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir (158).



Şekil 7: P -gp ve bilinen SNPlerinden bazılarının protein yapısıyla ilişkisini gösteren şematize şekil (167)

Yukarıda sözü edilen c.3435C>T ve c.2677G>A/T polimorfizmlerine benzer şekilde, c.1236C>T polimorfizmi de allel ve genotip sıklıkları açısından toplumlar arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Avrupa toplumlarıyla mukayese edildiğinde TT genotipinin Asya toplumlarında daha sık gözlemlendiği, bunun aksine CC genotipinin ise Avrupa toplumlarında daha sık gözlemlendiği dikkati çekmektedir (168-170). Türk populasyonunda c.1236C>T polimorfizmi için allel sıklıkları C:%45.5, T: %54.5 ve genotip sıklıkları CC: %20, CT: %51, TT:%29 olarak bildirilmiştir (171).

Yapılan bağlantı analizleri sonucunda c.3435C>T, c.2677G>A/T ve c.1236C>T SNP'leri arasında güçlü bir bağlantı dengesizliği bulunduğu farklı populasyonlar da gösterilmiştir. Örneğin, Tang ve ark. Çinli, Malay ve Hint populasyonların da bu polimorfizmler arasında sıkı bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir (9). Benzer şekilde Kim ve ark. da c.3435C>T, c.2677G>A/T ve c.1236C>T SNP'leri arasında güçlü bir bağlantı bulunduğunu Avrupa kökenli Amerikalılarda ve Afrika kökenli Amerikalılarda rapor etmişlerdir (172). Bazı çalışmalarda ise söz konusu üç SNP'den ikisi arasında kuvvetli bir bağlantı dengesizliği bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin, Tanabe ve ark. 65 Japon bireye ait örneklerin %94'ünde 3435T alelinin 2677T veya 2677A aleli ile birliktelik gösterdiğini bildirmişlerdir (15). Benzer şekilde Türk populasyonunda da üç SNP arasında anlamlı derecede bağlantı dengesizliği bulunduğu, ancak bunlardan yalnızca 2677 ve 3435 lokusları arasında nispeten güçlü bir bağlantı varlığı tespit edilmiştir (173). MDR1 geni ile ilgili olarak Hap Map veri tabanının da farklı toplumlar için bildirilmiş olan bağlantı dengesizliği verilerine bakıldığında, bu gende varolan SNP'leri arasında tespit edilen bağlantı gücü ve derecesinin bir toplumdan diğerine geniş ölçüde değişkenlik gösterdiği dikkati çekmektedir (174).

c.1236C>T, c.2677G>A/T, c.3435C>T SNP'leri açısından Afrika kökenli toplumlarda yabancı tip CGC haplotipi sık ve TTT haplotipi nispeten daha seyrek gözlenirken; beyaz ırkta CGC ve TTT haplotip sıklıklarının birbirlerine hemen hemen eşit oldukları görülmektedir (175,168,172).Türk popülasyonu için CGC ve TTT haplotip sıklıkları sırasıyla %25 ve %33.7 olarak tespit edilmiştir (173).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Hasta ve Kontrol Grubu

Bu çalışmada temmuz 2013 ile temmuz 2014 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine ayaktan başvuran ve klinikte yatarak tedavi olan Modifiye New York Kriterlerine göre AS tanısı alan 66 hasta ve 32 sağlıklı gönüllü değerlendirildi. Çalışma öncesi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurul onayı alındı. Çalışmamızda MDR1 gen ekspresyonu ile c.3435C>T, c.1236C>T, c.2677G>A/T polimorfizmi arasında tedavide kullanılan biyolojik ajanlarla diğer ilaçlar arasında fark olup olmadığını araştırdık.Hastalara ve sağlıklı gönüllülere çalışmanın amacı ve kapsamı hakkında ön bilgi verildikten sonra çalışmaya katılmayı kabul eden 66 AS' li hastaya ve sağlıklı gönüllülere “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” esas alınarak çalışma ile ilgili ayrıntılı bilgiler verildi ve imzaları alındı.

3.1.1.Hasta Grubu

Temmuz 2013 ile temmuz 2014 tarihleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine ayaktan başvuran ve klinikte yatarak tedavi olan Modifiye New York Kriterlerine göre AS tanısı alan 38 erkek ve 28 kadın olmak üzere toplamda 66 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. AS tanısı almış ilk grup hastaların 20 erkek ve 14 kadın hasta tedavide biyolojik ajan kullanmaktadır. İkinci

grup 18 erkek ve 14 kadın hastada biyolojik olmayan tedavileri kullanmaktadır. Her bir hastanın 10 ml kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır.

3.1.2. Kontrol Grubu

Temmuz 2013 ile temmuz 2014 tarihleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine ayaktan başvuran herhangi bir kronik hastalığı olmayan ve düzenli ilaç kullanmayan benzer yaş ortalamasına sahip 18 erkek ve 14 kadın kontrol grubunu oluşturmaktadır. . Bu kişiler çalışmaya katılmayı onaylamış ve 10 ml kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır.

3.2.Kullanılan ölçekler

3.2.1. Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksi (BASDAI)

Hastalık aktivitesini değerlendirmek için Garet ve ark. tarafından geliştirilen BASDAI kullanılmaktadır. BASDAI Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik çalışması yapılmış olan, tüm dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan bir aktivite ölçeğidir. Bu skalada yorgunluk, spinal ve periferik eklem tutulumuna bağlı ağrı, entezitis bölgelerindeki lokalize hassasiyet, sabah tutukluğunun süre ve şiddeti değerlendirilmektedir. Bu amaçla hastaya 6 soru sorulur ve geçen haftaki semptomlarının şiddetini derecelendirmesi istenir. Sorular 10 cm uzunluğundaki bir horizontal visüel analog skala (VAS) üzerine işaret konarak yanıtlanır. Sabah tutukluğu üzerine sorulan son iki sorunun ortalama skoru hesaplanır ve diğer sorularınkiyle toplanır. Elde edilen sonuç 5'e bölünür. 4 ve üzerindeki sonuçlar hastalığın aktif süreçte olduğunu gösterir (176).

3.3. Kullanılan Aletler

3.3.1.MDR1 gen polimorfizm ve ekspresyonu için kullanılan aletler

Derin Dondurucu

LightCycler Real Time PZR Cihazı 480 sistem

Mikropipet seti (0,5-10 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl ölçüm aralığında)

Vorteks (IKA Vortex Genius 3)

Santrifüj Cihazı Mikro 22 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany)

-20 Buzdolabı (Beko)

+4 Buzdolabı (Ariston)

LabCycler (Sensoquest, Göttingen, Germany)

Distile Su Cihazı (Diret-Q.UV Millipore)

Isıtıcı Blok (Cleaver-Elite)

LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)

NanoDrop 2000- Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre Cihazı (ThermoScientific, U.S.A.)

Mikro Dalga Fırın (Arçelik 581)

Plate Perfect Spin (Pepqlab, Erlangen, Germany)

3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.4.1.Polimorfizm için kullanılan kimyasallar

3.4.1.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu İçin High Pure PZR Template Preparation Kit’inde Bulunan Kimyasal Maddeler

Bağlayıcı (binding) tampon (buffer), (6 M guanidine-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH:4,4)

Proteinaz K (Liyofilize Proteinaz K)

İnhibitor uzaklaştırıcı (removal) tampon (5 M guanidine-HCL, 20 mM Tris-HCl, pH:6,6)

Yıkama (wash) tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH:7,5)

Elüsyon tamponu (10 mM Tris-HCl, pH:8,5)

3.4.1.2.Gerçek zamanlı PZR Cihazında (LightCycler) Kullanılan LightCycler Fast Start DNA Master Probe Setinde Bulunan Kimyasal Maddeler

PZR ve tek nükleotid polimorfizmini belirlemek için, LightCycler Fast Start DNA Master Probe seti kullanılmıştır. Kit içeriği Tablo 5’de verilmektedir.

Tablo 5: LightCycler Fast Start DNA Master Probe seti içeriği

Etiket adı	İçeriği
LightCycler® Fast-Start Enzim-1a LightCycler® Fast-Start Reaksiyon Karışımı HybProbe-1b	Fast Start Taq DNA Polimeraz, Reaksiyon tamponu, d NTP karışımı ve 10Mm MgCl ₂
MgCl₂ stok solüsyon (mavi kapak)	25Mm MgCl ₂
PZR-grade (renksiz kapak)	H ₂ O

3.4.2.Ekspresyon için kullanılan kimyasallar

cDNA Sentez kitinde bulunan kimyasal maddeler (transcriptor roche high fidelity-quantatif)

-Random Primer

-Oligo primer

-dH₂O

-Reaction Buffer

-Protector RNase İnhibitör

-Deoxynucleotide Mix

-DTT

-Reverse Transcriptase

İlgili genlere göre dizayn edilmiş primerler ve proplar (RealTime ready Catalog Assays, Roche; RealTime ready Designer Assays, Roche)

Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Prob master miks (LightCycler 480 Probes Master).

3.5.Yöntemler

3.5.1. DNA İzolasyonu

Kandan genomik DNA eldesi için High Pure PZR Template Preparation Kit'i (Ref#

11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılmıştır.

Çalışma grubuna dahil olan 34 biyolojik ajan kullanan AS hastası, 32 biyolojik ajanlar dışındaki ilaçları kullanan AS hastası ve 32kontrol grubu bireylerinden, çalışma anına kadar -

20° C’de saklanan 3ml kan EDTA’lı tüplere alındı ve DNA eldesi için aşağıda sıralanan aşamalar uygulandı.

Liyofilize haldeki Proteinaz K’ya 5 ml distile su ilave edildi. Inhibitör Removal Buffer (Ref# 11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) 20 ml etanol eklenerek, yıkama solüsyonu (wash buffer) (Ref# 11 796 828001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) 80 ml etanol eklenerek hazırlandı. Ön hazırlık aşamasından sonra aşağıdaki işlem sıralaması uygulandı;

1. 1,5 ml lik ependorf tüplere 200 µl kan örneği alındı.
2. Üzerlerine 200 µl Binding Buffer (Ref# 11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve 40 µl Proteinaz K (Ref# 11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) eklenerek iyice karıştırıldı.
3. Karışım 10 dakika 70 °C’de inkübasyona bırakıldı.
4. DNA’ ların çökmesini sağlamak için, daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.
5. Hasta sayısı kadar toplama tüpü çıkartıldı ve her birine filtreli tüp yerleştirildi. Hazırlanan bu karışım toplama tüplerine aktarıldı.
6. Tüplerdeki karışım 8000x g’ de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
8. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklendi ve 8000x g’ de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
10. Her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi ve 8000x g’ de 1 dk. santrifüj edildi.
11. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
12. Her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi ve 8000x g’ de 1 dk santrifüj edildi.
13. Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve tekrar 13000x g’ de 10 saniye karıştırıldı.
14. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1,5ml’ lik ependorf tüplerine alındı.
15. Her tüpe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 70 °C’de bekleyen elution buffer dan (Ref# 11 796 828 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) 200 µl eklendi.

16. Ependorf tüplerindeki karışım 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
17. Elde edilen DNA örneklerini nano drop ta konsantrasyonu ölçüldü her bir örneğin üzerine yazıldı
18. DNA örnekleri sonra çalışılmak üzere -20 derecede saklandı.

3.5.2.Lökosit izolasyonu

1. EDTA 'lı tüplere alınan kanlar Falcon Tüplere alındı
2. Kan miktarının üç katı kadar Red Cell Lysis eklendi (Red Cell Lysis eritrositleri parçalamak için kullanılmaktadır).
3. +4 °C de 20dk bekletildi
4. 2000rpm 10 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant atıldı.
6. Pellet üzerine kan miktarının iki katı kadar Red Cell Lysis eklendi.
7. +4 °C de 10dk bekletildi
8. 2000rpm 10 dk santrifüj edildi
9. Süpernatant atıldı.
10. Lökositlerin üzerinde kalan kısım mikropipet yardımı ile temizlendi.
11. 1ml trizol eklendi.
12. Enjektör ile homojen hale getirildi ve -80°C de saklandı.

3.5.3. RNA izolasyonu

1. Örnekler (lökositler) -20 °C çıkarılıp 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Isıtıcı 37 °C 'ye ayarlandı.
2. Örnekler enjektör yardımıyla (2 ml) ile homojenize hale getirildi.
3. 37 °C de 5 dk bekletildi.
- Amaç: Nükleoprotein komplekslerin tamamen ayrışması için
4. 300 µl kloroform eklendi. (faz ayrımı)
- Fenol kloroform ile çok çabuk etkileşimi geçer, fenol protein ve lipidleri denature eder.

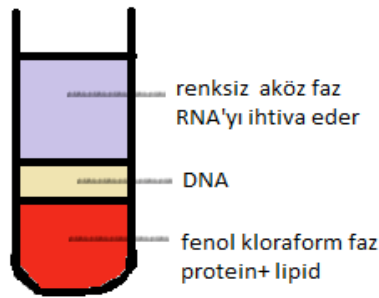
Guanidin DNA'yı bağlar ve santrifüjün ardından faz ayrımı olur.

5.Homojen hale gelene kadar vortexlendi. (çilekli süt rengine dönüşür)

10 dk oda sıcaklığında bekletildi.

7.12000 rcf (g) 15 dk +8 °C santrifüj yapıldı.

8.Santrifüjden sonra 3 tabaka oluşur.



Şekil 8: Santrifüj sonrası görülen faz ayrımı

9.Yeni ependorf tüpüne renksiz saydam aköz faz kısmı pipet ile aktarıldı.

10.Üzerine 500 µl % 100 isopropanol eklendi.

11.Vortexlendi. Böylece RNA aköz fazdan ayrılıp dibe çöker.

12.-20 °C 30 dk bekletildi (+ 4°C olabilir).

13.12000 rcf (g) 10 dk +8 °C santrifüj yapıldı. (Amaç: RNAları çökertmek)

14.Süpernatant kısmı döküldü.Kalan kısım mikropipetle çekildi.

15.Soğuk blok üzerine alındı.

16.% 75 etanol eklendi.

17.Vortexlendi.

18.7500 rcf (g) 5 dk +8 °C santrifüj yapıldı.

19.Süpernatant kısmı döküldü. Mikropipetle alkol iyice alındı.

20.Kalan alkol damlacıkları ya oda sıcaklığında ya da 37 °C ısıtıcı blokta 1-2 dk kurutuldu.

21.Üzerine 40-100 µl arasında alttaki çökeltiye göre RNase free water eklendi.

(Eklenen RNase free water miktarı not edilir.)

22. Alttaki pellet el yardımıyla dağıtıldı.

23. Kısa bir santrifüj yapıldı.

24. Örnekler +4 °C bloğa alınıp 15-30 dk +4 °C 'ye kaldırıldı.

25. Elde edilen RNA lar nanodropla ölçülüp her bir tüpün üzerine konsantrasyonu not edildi.

26. RNA lar çalışılmak üzere -80 °C buzdolabında saklandı.

3.5.4. cDNA Sentezi (ROCHE HIGHFIDELITY-QUANTATİF)

Elde edilen RNA lardan Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti (Roche Diagnostics. GmbH, Mannheim) kullanılarak cDNA sentezlendi. cDNA sentezi, aşağıda tarif edilen protokole göre gerçekleştirildi:

Tablo 6: cDNA sentez için hazırlanan reaksiyon karışımı

Random Hexamer Primer 600 µM	1 µl
Anchored-oligo (dT)18Primer 50µM	1 µl
dH₂O	4,4 µl
RNA	5 µl

Her bir tüpe 6,4 µl mix üzerinede 5 µl RNA dağıtıldı.

Yukarıda hazırlanan reaksiyon 65°C'de 10 dakika inkübe edildikten

sonra her bir tüpe aşağıda içeriği verilen karışım eklenmiştir.

Tablo 7 : cDNA sentezi için reaksiyona eklenen karışım

Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Buffer, 5x	4 µl
Protector RNase Inhibitor 40 U/ µl	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix	2 µl
DTT	1 µl

Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 µl
Toplam Mix	8,6 µl

Her bir tüpe 8,6 µl mix dağıtılır. Hazırlanan karışım PZR cihazında (LabCycler Sensoquest, Göttingen, Germany) 29°C’de 10 dakika , 48 °C de 60 dakika ve 85°C’de 5 dakika inkübe edildi.

3.5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-PZR (Polymerase Chain Reaction -PZR):

PZR DNA’da bulunan ve dizisi bilinen iki bölge arasındaki özgün bir segmenti enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan reaksiyonlara verilen ortak bir isimdir. İn vitro ortamda nükleik asitlerin çoğaltılması, bir başka deyişle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonunun, bir tüp içinde taklit edilmesidir. DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir.

Yöntemin temeli çoğaltılmak istenen bölgenin 2 ucuna özgü olan ve buradaki dizilerle eşleşebilen (hibridize olabilen) sentetik oligonükleotidler yani ileri ve geri primerler kullanarak bu kısmın enzimatik olarak sentezlenmesidir. Bir PZR reaksiyonu için gerekli temel bileşenler;

-Oligonükleotidler: Bölgeye özgü ileri ve geri primerler

-Kalıp DNA

-Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dNTP)

-DNA polimeraz enzimi: İlk ve en sık kullanılanı Taq DNA polimeraz enzimidir.

-Tampon çözelti: Tris-HCL, pH 8.8, (NH₄)₂SO₄, Tween® 20

-MgCl₂

Kullanım Alanları:

Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında, prenatal tanıda, klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında, adli tıpta, onkogenesinin araştırılmasında, problemlerin oluşturulmasında / klonlamada / gen ekspresyon araştırmalarında, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında, Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) Analizinde kullanılmaktadır.

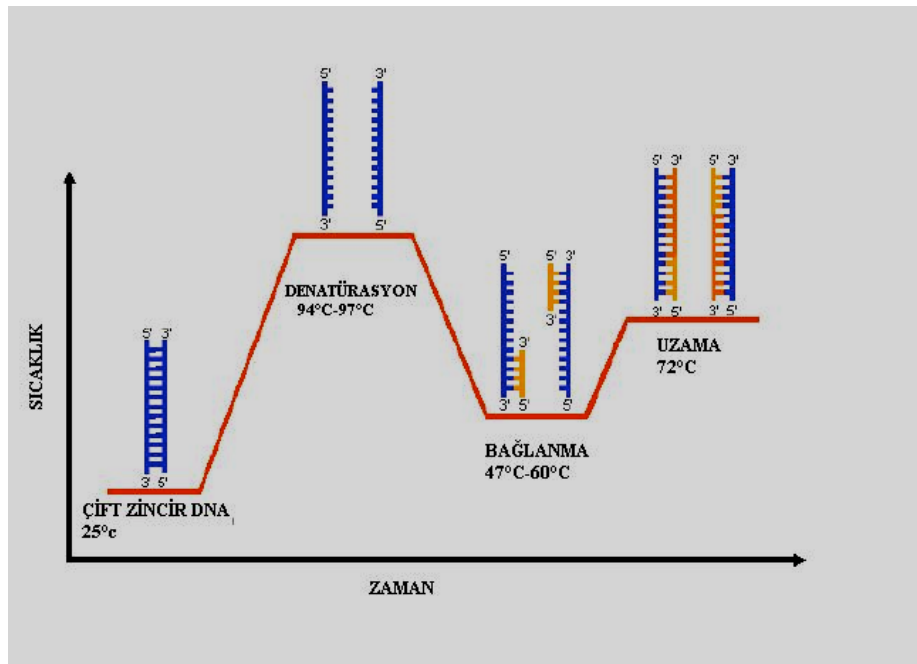
3.5.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Basamakları:

PZR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. DNA çift sarmalının birbirinden ayrılması (denatürasyon), ileri ve geri primerlerin hedef dizilere bağlanması (annealing), primerlerden itibaren zincirin uzatılması (extension) aşamalarından oluşur.

1-İlk basamak denatürasyondur ve yaklaşık 94 °C' ye ısıtılan DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması söz konusudur.

2-İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 45-60°C arasındadır.

3-Üçüncü basamak zincirin uzatılması aşamasıdır. Reaksiyon karışımı sıcaklığa dirençli DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72 °C' ye getirildiğinde, primerlere bağlanan enzim molekülleri dizinin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılarak başlangıçtaki DNA miktarı her döngüde geometrik olarak çoğaltılır. Çoğaltılan DNA parçalarının (amplikon) gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) yapılır. Bir PZR döngüsünün her bir aşaması belirli sıcaklıklarda gerçekleşir.

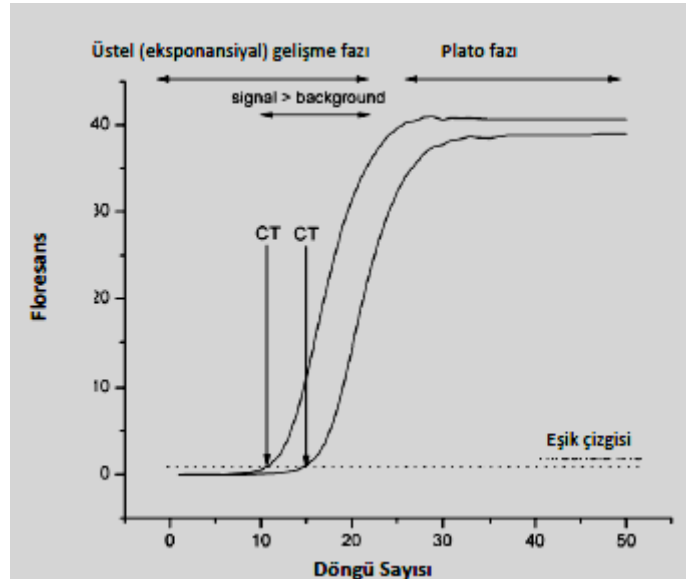


Şekil 9: PZR döngüsünün sıcaklık aşamaları

3.5.5.2. Real-Time PZR: (RT-PZR)

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç verebilen PZR yöntemidir. Bu yöntemle agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Bu teknoloji “kinetik PZR”, “homojen PZR” “kantitatif Real-time PZR” isimleriyle de tarif edilmektedir. Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PZR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PZR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeye alınır. En sık kullanım alanlarını DNA’nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme, mRNA’nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme, tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi alanlardır

RT- PZR, oluşan ürüne bağlanan ve ışıma veren raportöre gereksinim duyar. Bu oluşan ürün miktarını yansıtan floresans sinyal oluşturur. PZR siklusları neticesinde oluşan kısa dizilere ampikon denir. Başlangıç PZR sikluslarında, RT- PZR’da sinyal zayıftır. Bu sinyalin güçlenmesi ampikonların artışı ile olur. Sinyalin eşik değere ulaşması için gereken siklus sayısına CT (threshold cycle = eşik değer döngü) değeri adı verilir. Amplifikasyon cevap eğrileri CT değeri aşıldıktan sonra logaritmik olarak artar.



Şekil 10:RT-PZR cevap eğrileri

Gerçek zamanlı PZR’da floresans raportörler kullanılmaktadır. Hedef bölgenin kopyası sayısı arttıkça floresan raportörlerden alınan sinyal miktarıda artmaya başlar. Bütün RT-PZR

sistemleri floresan boyaları algılar ve sonrasında floresan sinyalleri ile oluşan PZR ürün miktarını korele ederler. Bunun için çeşitli metodlar kullanılır. En sık kullanılan floresan formatları 2 sınıfa ayrılır.

1-Sekans bağımsız tarama analizleri:

-SYBR Green 1

-Ethidium Bromide

2-Sekans spesifik prob bağlanma analizleri

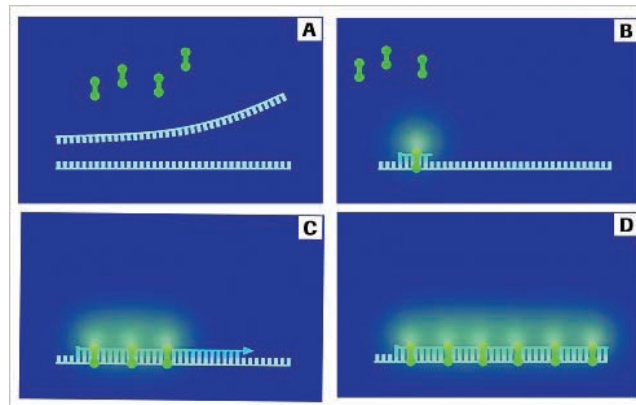
-Hidroliz Probe (TaqMan format)

-Hibridizasyon Probe

-Simple Probe

3.5.5.2.1. Sybr Green 1:

dsDNA'ya bağlanan floresan boya olup RT-PZR için basit ve pahalı olmayan bir yöntemdir. SYBR Green 1 solüsyon içinde serbest durumda zorlukla floresan verirken DNA'ya bağlayken ışıma miktarı büyük oranda artar. Sinyal miktarı oluşan ürün miktarı ile birlikte doğru orantılı olarak artar. Bu yöntem PZR' da kolaylıkla uygulanabilir çünkü ilaveten floresan işaretlenmiş oligonükleotidlere ihtiyaç duymaz. Ancak optimizasyonu iyi yapılmalıdır çünkü hem spesifik hem de non-spesifik PZR ürünlerinin algılanması gibi bir durum söz konusudur. Sybr Green herhangi bir dsDNA'ya bağlandığı zaman, boya farklı dsDNA türleri arasında ayırım yapmaz. Spesifik, non-spesifik ürünler, primer-dimerler aynı şekilde algılanır. Herhangi bir PZR artefaktı hedef sekansın konsantrasyonunun abartılı bir şekilde artmasına neden olabilir. Melting Curve analizi ile ürün ve primer-dimer arasında ayırım yapılabilir.



Şekil 11:SYBR Green 1 varlığında PZR

A-Denatürasyondan sonra DNA tek zincirli hale geliyor.

B-Annelling esnasında primerler hedef sekansla hibridize olur, SYBR Green 1 küçük bir bölgeye bağlanır. Böylece floresan ışımaya artar.

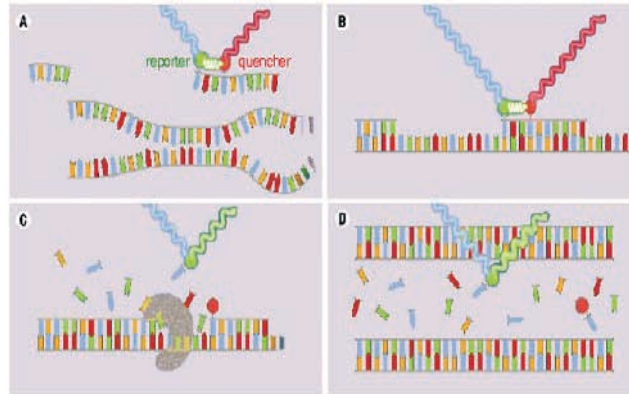
C-Elangasyon fazında primerler uzar ve daha fazla boya bağlanır.

D-Elangasyonun sonunda DNA çift zincirli hale gelir ve maksimum boya bağlıdır.

3.5.5.2.2. Hidroliz Problemleri:

cDNA örneğindeki hedef dizinin miktar tayini için Taq polimerazın floresan 5' ekzonükleaz aktivitesini kullanılır. TaqMan (PE Biosystem), Beacons, Scorpions. TaqMan problemleri 5' ucunda floresan işaret molekülü (Reporter) ve 3' ucunda quencher bulundurulur ve problemler primerlerden daha uzundur. Floresan molekül uyarıldığında zaman enerji transferi quencher molekülden daha fazla olduğu için ışınım oluşur. Problemler PZR ürününün iç bölgesine bağlanırlar. DNA'da replikasyon olurken TaqMan probun 5' ucuna geldiğinde zaman ekzonükleaz aktivitesi ile probu kırar. Böylece reporter molekülü serbest kaldığında ve quencher de uzaklaştığında için ışınım yapar. Işınım miktarı her siklusda kırılan prob sayısı ile orantılı olarak artar.

İyi dizayn edilmiş TaqMan problemleri çok az optimizasyon gerektirir. MDR1 ekspresyon çalışmamızda bu prob kullanılmıştır.



Şekil 12: Hidroliz problemleri varlığında PZR çalışması

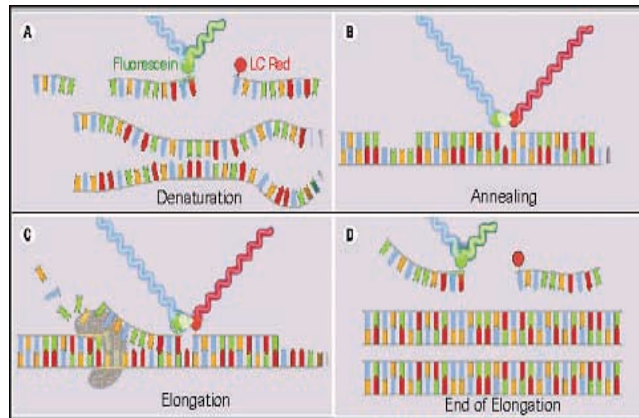
Prob 2 adet floresan boya taşır. Şekil A'da sıcaklık artışı ile hedef DNA zinciri ayrılmaya başlar. Annelling fazında ise (Şekil B) primer ve prob hedef sekansla spesifik olarak birleşir. Hidroliz probu 3' ucundan fosforillenir ve uzayamaz. DNA polimeraz primer gibi uzadığında, 5' nükleaz aktivitesi gösteren kısım ile birlikte probdan ayrılır (Şekil C).

Prob fragmanı hedeften ayrıldıktan sonra yeni ampikonların polimerizasyonu devam etmektedir (Şekil D).

TaqMan PZR analizi sonrasında tüm problemler sindirilir (Şekil D). Melting curve analizi yapılamaz. Bundan dolayı SNP veya mutasyon analizlerinde bu tip analizler başka yöntemlere de gereksinim doğururlar.

3.5.5.2.3. Hibridizasyon Problemleri:

Hedef DNA dizisi çoğaltılır (amplifikasyon), oluşan tüm ampikonlar yavaş yavaş ısıtılırken floresan sinyali toplanır. . Bu sayede SNP grupları birbirinden ayrılır. Bu problemler amplifikasyon sırasında, hidroliz problemlerinin aksine parçalanmazlar. Bu sayede amplifikasyonun hemen ardından ikinci bir işleme gerek olmaksızın melting curve analizi yapılabilir. Hibridizasyon prob kullanımında, PZR'ın amplifikasyon fazında amplifiye olmuş kısmın spesifik bir dizisine hibridize olması için özel olarak dizayn edilmiş iki tane işaretli oligonükleotid kullanılır. Bunlardan biri 3' ucundan floresin ile işaretlenmiş ve donör adı verilen bir prob, ikincisi ise akseptör adı verilen ve 5' ucundan LightCycler Red ile işaretlenen bir probdur. Bu etiketler, sadece oligonükleotidler hedef üzerinde doğru yerlere gelir ise birbirlerine çok yakın bulunurlar ve böylece floresan rezonans enerji transferini (FRET) mümkün kılarlar. Yayılan floresan miktarı, PZR sonucunda oluşturulan hedef DNA miktarı ile doğrudan orantılıdır.



Şekil 13: Hibridizasyon problemleri varlığında PZR

Donör boya probunun 3' ucunda bir floresan etiketi ve akseptör boya probu 5' ucunda bir LightCycler kırmızı etiket bulundurmaktadır. PZR denatürasyon fazında hibridizasyon görülmemektedir (Şekil A). Serbest boyalar arasındaki mesafe enerji transferini engellediği

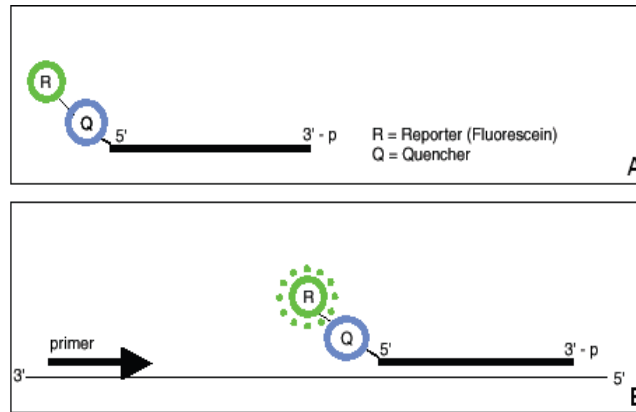
için bu aşamada kırmızı akseptör boyasından floresan alınamayacaktır. Problar amplifiye olan DNA fragmanına baş-kuyruk düzeni içinde bağlanırlar ve hibridizasyon olur ve böylece 2 floresan boyanın yaklaşması sağlanır (Şekil B). Fluorescein yeşil floresan ışınım vermesi için LED tarafından uyarılır.

Not: Amplifikasyon sonunda her iki HybProbe problar değişmemiştir, mutasyon ya da SNP taramalarında melting curve analizi yapılabilir.

3.5.5.2.4. Simpleprobe Problearı:

Bizim polimorfizm çalışmamızda kullandığımız rapörtör SimpleProbe problarıdır. Single-labeled problar, SNP ya da mutasyonları belirleyebilen basitleştirilmiş hibridizasyon problarının özel bir şeklidir. Bu yüzden simpleProbe olarak adlandırılan prob formatı, sekansa spesifik olmayı başarmak için yalnız bir floresan ile etiketli tek bir hibridizasyon probunu gerektirir. Genellikle bu tip problar özellikle SNP ile alakalı bölgeyi içeren bir hedef sekansa hibridize olması için tasarlanmıştır. Prob hedef sekans ile hibridize olduğunda SimpleProbe hibridize olmadığı zamankinden çok daha fazla floresans yayar. Sonuç olarak floresansdaki değişiklik yalnızca probun hibridizasyon durumundan köken alır.

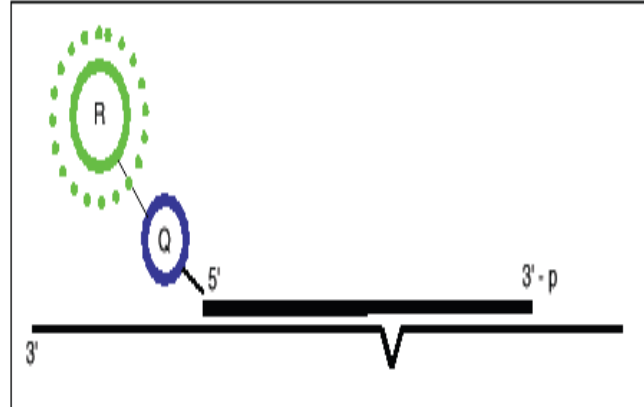
SimpleProbe probları mutasyon tespiti ve SNP genotiplendirmekte mükemmel materyallerdir, çünkü bu problar kolayca wild-type, mutant ve heterozigot örnekleri sadece tek iplikli kısa bir prob ile belirlerler.



Şekil 14: SimpleProb Analiz Prensibi

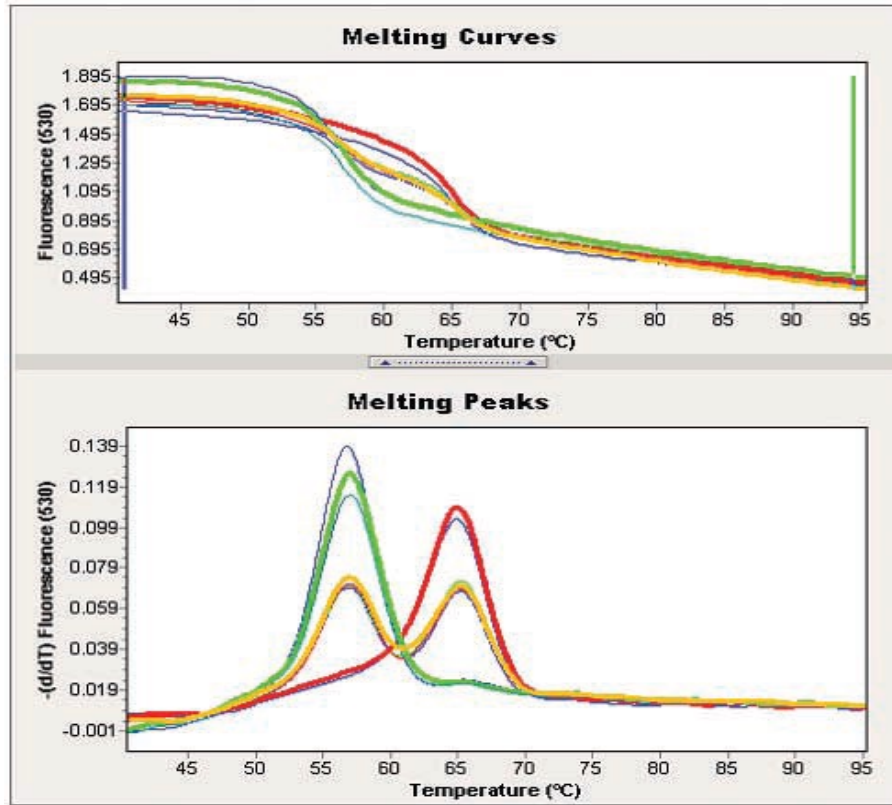
Şekilde SimpleProbe'un tespit yaparken nasıl çalıştığını göstermektedir. Bir SimpleProbe probu kendisinin ya 3' ya da 5' sonlarından etiketlenebilir. Eğer SimpleProbe çözelti içinde serbest ise, raporter boyanın floresan yayması non-floresan quencher tarafından baskılanır (Şekil A). Probe hedef bölge ile hibridize olduğu zaman yani baskılanma azaldığında ve Lightcycler cihazının LED'i tarafından algılandığında probe yeşil floresan yayar (Şekil B).

Ayrıca; probe hibridize olmadığı zaman bile, floresan 530nm’de arka planda tespit edilebilir, bundan dolayı sinyal düşüktür.



Şekil 15: SimpleProbe formatı ile SNP tespiti

SNP analizi için Lightcycler cihazı SimpleProbe’un erime davranışını ekranda gösterir (Şekil 16). Sıcaklık arttığı zaman, floresan ölçülerek; probe-hedef hibritlerinin erime sıcaklığı tespit edilebilir. Erime sıcaklığının daha yüksek olması, SimpleProbe ve hedef sekans arasında hibridizasyonun daha karalı olduğunu gösterir. SNP’ler gibi mutasyonlarda SimpleProbe bağlanma stabilitesini zayıflatırlar.



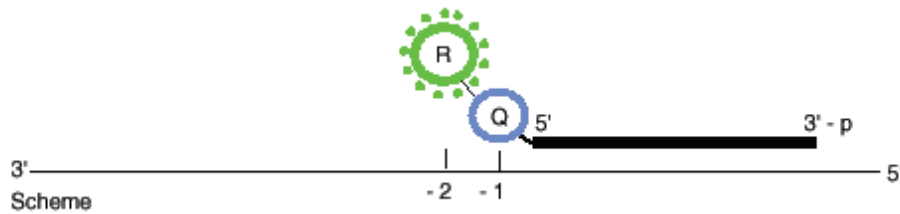
Şekil 16: SimpleProbe’ nin erime eğrisini davranışının LightCycler cihazındaki görünümü

A grafiği örnek floresan sıcaklığını gösterir (erime eğrisinin verisi). Her bir örnekte floresan sinyali açık bir şekilde sıcaklığın artmasıyla azalmaktadır. Probun yeri kendi hedefinden değiştirildiği zaman SimpleProbe’un baskılanışı yansır.

B grafiği her bir örneğin pik olarak erime sıcaklığını gösteren örnek floresan sıcaklığı ilk negatif türevini konu alır. Bu analiz, bu örnekle wild-type örnekleri (sekans ve prob arasındaki mükemmel eşleşmeyi yansıtan daha yüksek erime piki) açık bir şekilde mutant örneklerden (sekans ve prob arasındaki yanlış-eşleşmeyi yansıtan daha düşük erime piki) ayırabilir.

3.5.5.2.5. SimpleProbe Problemleri İçin Dizayn Faktörleri

Başarılı bir SimpleProbe dizaynı için özellikle ters komplementer bölgelere (probun bağlandığı DNA bölgesi) dikkat edilmelidir. Proben tespit kapasitesini test etmek için yapay bir ters komplementer oligo kullanılır. SimpleProbe probunun ön kısmının genellikle mutasyon bölgesini kapatması tavsiye edilir; probun hem 3' hem 5' son kısmının yakınında olan mutasyonu kapatan sekansa izin verilmemelidir. Direkt olarak floresan etiketin aşağısındaki hedef bölge (pozisyon -1, -2) C ya da T içerse iyi olur, bu pozisyonda G olmasına engel olunur (Şekil 17) Çünkü raporter moleküle komşu G ışınımı engeller. Çift-iplikli DNA ile floresan boyanın aynı hizada stabil kalması için 1-4 pozisyonları arasında harekete izin verilmez. Bazı durumlarda, ikincil yapılar single-labeled problemlerin özel fonksiyonlarını etkileyebilir. Bu gibi durumlarda SimpleProbe yerine Hybridization problemlerinin tercih edilmesi önerilir.



Şekil 17: Simple Problemlerin dizaynı

Amplifikasyonun sonunda SimpleProbe problemleri de hibridizasyon problemlerinde olduğu gibi ortamda parçalanmadan kalabildiği için SNP belirlenmesinde bu problemler erime (melting) eğrisi analizlerinde kullanılabilecek ve böylece SNP'lerin tanımlanması mümkün olacaktır.

Melting eğrisi analizi ile farklı alleller birbirinden ayrılabilir. PZR ile spesifik bölgenin çoğaltılmasının ardından, melting eğrisi analizi ile amplicon karakterize edilir. T_m değeri çift sarmal DNA'nın yarısının denatüre olduğu sıcaklık değeridir, buna göre her bir ampliconun melting değeri o ampliconun boyuna, sekansına, guanin-sitozin içeriğine bağlıdır ve karakteristiktir. Bu sayede melting eğrisi analizi PZR ürününün tanımlanmasına imkân sağlar. PZR'ın amplifikasyon aşamasının ardından sıcaklık önce düşürülür, bu sırada yüksek bir floresan sinyali alınır, sonra sıcaklık yavaş yavaş düşürülerek floresan miktarındaki düşüş izlenir ve PZR ürününün melting noktası belirlenir.

3.6. RT- PZR Yöntemi İle MDR1 Geni c.3435C>T, c.1236C>T, c.2677G>A/T Polimorfizmlerinin Araştırılması:

Kandan elde edilen DNA'lardan, RT-PZR yöntemi ile MDR1 geni c.3435C>T, c.1236C>T, c.2677G>A/T polimorfizmlerine neden olan mutasyonların olduğu gen bölgelerinin uygun RNA primerleri ile çoğaltılmasında kullanılan primerler ve baz değişimini belirlemek amacı ile kullanılan probalar (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Almanya) tasarlandı. Gerçek zamanlı PZR işlemi LightCycler® 480 cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Her bir mutasyon için ayrı ayrı tasarlanan problemlerin 5' ucunda raporter (floresin) boyası ve quencher (non-floresin) bulunur. Bizim problemlerimiz 5' ucunda LightCycler Red 640 ile işaretli olan problemlerdir. Analizde ilk aşamada enzimin aktive olması için 95 °C'de denatürasyon işlemi gerçekleştirilir. Bir sonraki aşama ise PZR döngüsüdür. Sırasıyla 95,55 ve 72 °C' de denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları gerçekleşir. Döngü sayısı 45'dir ve her döngü sonunda ürün miktarı logaritmik olarak artar. SNP' leri belirlediğimiz aşama olan 3. aşamada yeni oluşan çift zincirli DNA 95 °C'de denatüre edilir ve 40 dereceye kadar ısı yavaş yavaş düşürülür. Bu ısı düşürülme aşamasında LC Red 640 boyası ile etiketli olan probumuz hedef sekansa bağlanır. Wild tipe göre tasarlanan problemler eğer ki mutasyon yoksa hedef sekansla oldukça uyumlu şekilde ve sıkı bir bağ ile bağlanır. Ama mutasyon varlığında bu bağ zayıf şekilde oluşur. Son aşamada sıcaklık tekrar artırılırken (75 °C' ye kadar) ilk durumda bağların sıkılığından dolayı erime eğrisi analizinde daha yüksek bir sıcaklık elde edilirken ikinci durumda daha düşük bir sıcaklık elde edilir. PZR işlemi için PZR karışımı hazırlandı. Son hacmi 20 µl olan PZR karışımının içeriğinde; 10,4 µl H₂O, 1,0 Ml reaksiyon mix, 2,0 µl FastStart DNA Master (LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostic) 1,6 µl MgCl₂ ve 5µl kalıp DNA (1-5 µl) bulunmaktadır. PZR reaksiyonu için sıcaklık döngüleri Tablo 8' de verilmektedir.

Tablo 8: LightCycler 1,5 sistem ve 480 sistem cihazlarında RT- PZR yönteminde analiz aşamaları

Analiz Aşamaları	Döngü Sayısı		Sıcaklık (°C)	Süre
Denatürasyon	1		95	10 dk.
Cycling	45	Denatürasyon	95	10 sn
		Bağlanma	60	10 sn
		Uzama	72	15 sn
Melting (SNP belirlemek için)	1	Denatürasyon	95	30 sn
		Bağlanma	40	2 dk
		Melting	75	0
Cooling	1		40	30 sn

LightCycler 480 cihazı ise 610, 640 ve 670 nm dalga boylarında okuma yapma imkanına sahiptir. 96 veya 384'lük well plate kullanabilme avantajına sahip bir cihazdır (www.roche-appliedscience.com/sis/rtPZR/index.jsp?refer=slider).

Reaksiyon karışımı belirlenen polimorfizmi çalışmak üzere LightCycler 480 sistem 96'lık plate'lere yüklendi. Yüklemeden sonra plate'lerin üzeri LightCycler 480 Sealing Foil ile sıkıca kapatıldı. Daha sonra 2500 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi ve daha sonra LightCycler 480 cihazına yerleştirildi.

3.7. RT- PZR Yöntemi İle MDR1 geni ekspresyonunun araştırılması

MDR1 geninin ifadenme düzeyleri, housekeeping gen olarak β -aktin kullanılarak incelenmiştir. Her bir örnekten elde edilen cDNA'lar hibrid prob kullanılarak semikantitatif RT PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda, AS hastalarında MDR1 gen ekspresyon relatif kantitasyonda incelenmiştir. Bu amaçla LightCycler® FastStart DNA Master hyprobe kiti (Roche Diagnostics. GmbH, Mannheim) kullanıldı. Her bir örnek için aşağıda verilen reaksiyon hazırlanmış olup, Light Cycler 1.5 RT PZR cihazında analiz edilmiştir. Her hasta iki defa çalışılmıştır. Her çalışmada 2 adet negatif kontrol ve kalibratör koyulmuştur. Ürünler aşağıdaki protokole göre hazırlanıp cihaza yüklenmiştir. Elde edilen cDNA'lar 1'e 5 oranında sulandırıldı. Tablo 9 ' a göre karışım hazırlandı. Her kuyucuğa 15'er μ l dağıtıldı.

Tablo 9: Ekspresyon çalışması için hazırlanan karışım

Mastermix (LightCycler 480 Probes Master)	10 µl
PCR Grade water	4 µl
Prob (RealTime ready Catalog Assays, Roche; RealTime ready Designer Assays, Roche)	1 µl

Tablodaki miktarlar her çalışma grubundaki hasta sayısına göre hesaplanıp her kuyucuğa 15'er µl dağıtıldı. (Su miktarı, son hacim 20 µl olacak şekilde değişebilir.) Sulandırılmış cDNA'lar her kuyucuğa 5'er µl dağıtıldı. Plate'in üstü bant ile kapatıldı. Plate perfect spin ile santrifüj yapıldıktan sonra plate cihaza yüklendi. Lightcycler 480 Software açılarak tablo 10'daki programa göre çalışma başlatıldı.

Tablo 10:Lightcycler 480 II software programında ayarlanan sıcaklıkları ve süreleri göstermektedir.

	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Sıcaklık artış / azalış hızı (°C)	Süre (Saniye)
Preinkübasyon	1	95	4,4	600
Amplifikasyon	45	95	4,4	10
		60	2,2	30
		72	4,4	1
Soğutma	1	40	2,2	30

Rölatif Kantitasyon

Rölatif kantitasyon yönteminde hedef genin konsantrasyonu başka bir referans gene oranlanarak hesaplanır. Rölatif kantitasyon yöntemleri başlangıç örnek miktarından, cDNA sentez verimliliğinden ya da pipetleme hataları gibi faktörlerinden etkilenmez. Kullanılacak referans gen tüm hücrelerde eksprese olan, hücre canlılığı için gerekli, hücre içindeki değişimlerle ekspresyon düzeyi değişmeyen özellikte olmalıdır. Bu özellikteki genlere “House Keeping Gen”ler de denir. GAPDH, β -actin, HPRT ve TBP referans genlere örnek olarak verilebilir.

Bu çalışmada MDR1 hedef gen ve β -Actin referans gen ile çalışıldı. LightCycler 480 software programından Ct değerleri elde edildi.

3.8 İstatistiksel analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğunun değerlendirilmesinde histogram, qq grafikleri ve Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arası nicel verilerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi, Kruskal-Wallis H testi ve Mann-Whitney U testleri, nitel değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson kare analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey ve Tamhane T2 testleri kullanıldı. Veriler frekans ve yüzde, ortalama ve standart sapma veya ortanca ile 25. ve 75. yüzdeler ile ifade edildi. Verilerin analizi R 3.1.0 (www.r-project.org) yazılımı ile değerlendirildi. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi.

4.BULGULAR

Bu çalışmada, AS hastalarında MDR1 geni mRNA düzeyleri ile MDR1 geni c.3435C>T , c.1236C>T, c.2677G>A/T polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na başvuran modifiye new york kriterlerine göre AS tanısı konmuş ve tedavi görmekte olan toplam 66 birey alınarak hasta grubu oluşturuldu. Hasta grubundan biyolojik ajan kullanan 1. gruba ait bireylerin yaş ortalaması $40,94 \pm 9,44$ olarak , diğer tedavileri kullanan 2. gruba ait bireylerin yaş ortalaması $33,90 \pm 8,71$ olarak belirlendi. Kontrol grubunun yaş ortalaması $29,75 \pm 4,70$ bulundu. Cinsiyetler biyolojik tedavi alan grup 20 erkek, 14 kadın hasta ; diğer tedavileri kullanan AS grubunda 18 erkek 14 kadın hasta ; kontrol grubunda ise 18 erkek , 14 kadın gönüllü sağlıklı çalışmaya katılmıştır. Cinsiyet olarak homojen seçildiği istatistiksel olarak bulunmuştur. ($p>0,05$).

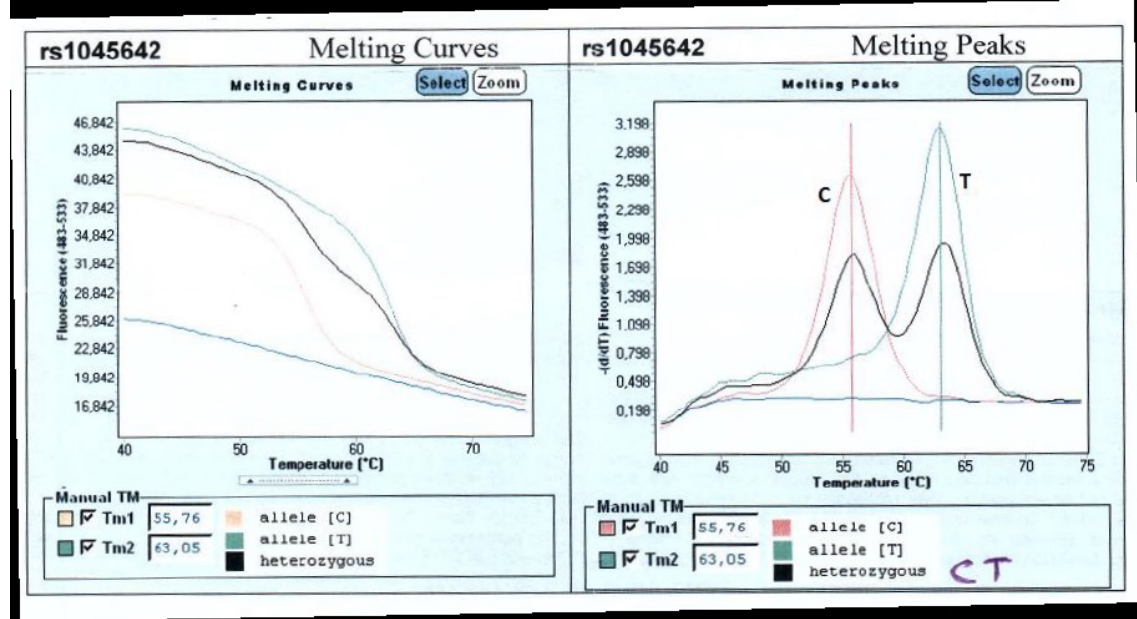
4.1. Moleküler Analiz Sonuçları

4.1.1.Polimorfizm Sonuçları

4.1.1.1.c.3435C>T Polimorfizm Sonuçları

Melting eğrisine göre floresans sinyali, C için 55 C°'de T için 63 °C'de alınmaktadır. Melting eğrisinde 55 C°'de tek bir pik varsa genotip CC, hem 55 hem de 63 C°'de iki pik varsa heterozigot, 63 C°'de tek bir pik varsa TT genotip olduğu sonucunu vermektedir. LightCycler

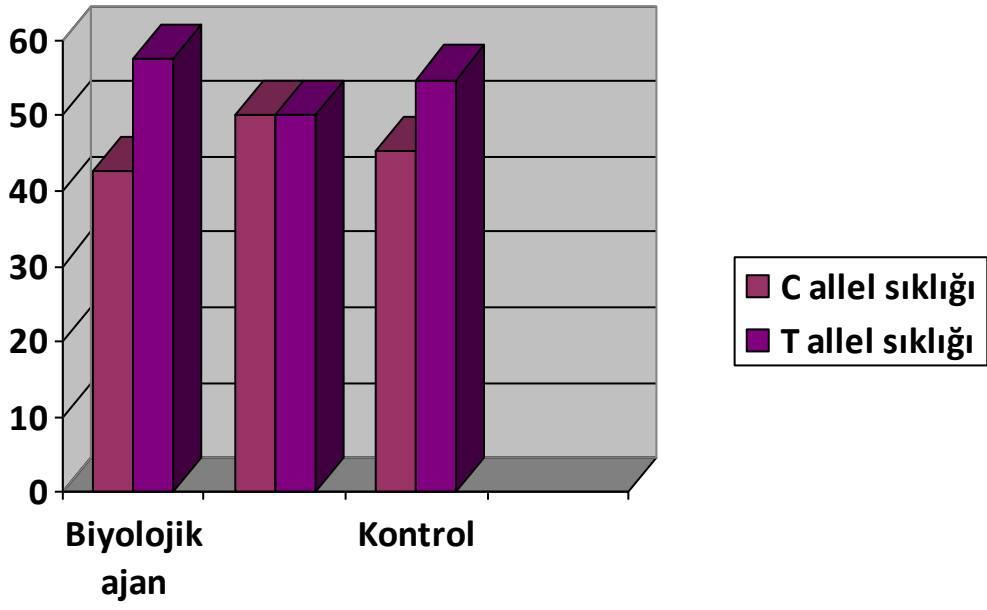
480 sistem cihazında gerçek zamanlı PZR yapıldıktan sonra elde edilen melting eğrisi analiz sonuçları şekil 18' de gösterilmektedir.



Şekil 18: c.3435C>T polimorfizmi için CC, TT ve heterozigot CT genotipine sahip bir bireyin 'melting curve' analizi sonucu

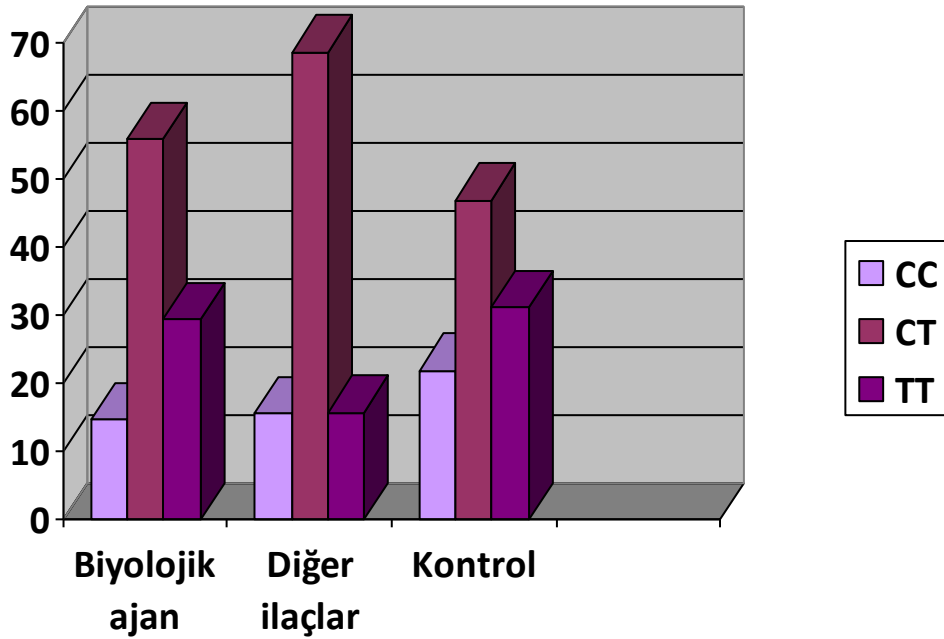
Çalışmaya dâhil edilen toplam 66 hasta ve 32 sağlıklı bireyin, LightCycler 480 sistem cihazında c.3435C>T polimorfizmine yönelik melting eğrisi analizi sonuçlarına göre 55 C° ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$) de tek bir pik , 63 C° ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$) de tek bir pik veya hem 55 C° hemde 63 C° de iki pik elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol ve hasta grubundaki kişilerin genotipleri belirlenmiştir.

AS hastalarından biyolojik ajan kullanan grupta C allel sıklığı %42.6 , T allel sıklığı % 57.4 olarak bulundu. AS hastalarından diğer tedavileri kullanan grupta C allel sıklığı %50, T allel sıklığı %50 bulundu. Kontrol grubunda ise C allel sıklığı %45.3, T allel sıklığı %54.7 olarak bulundu.



Şekil 19:MDR1 c.3435C>T polimorfizmi için % allel sıklıkları

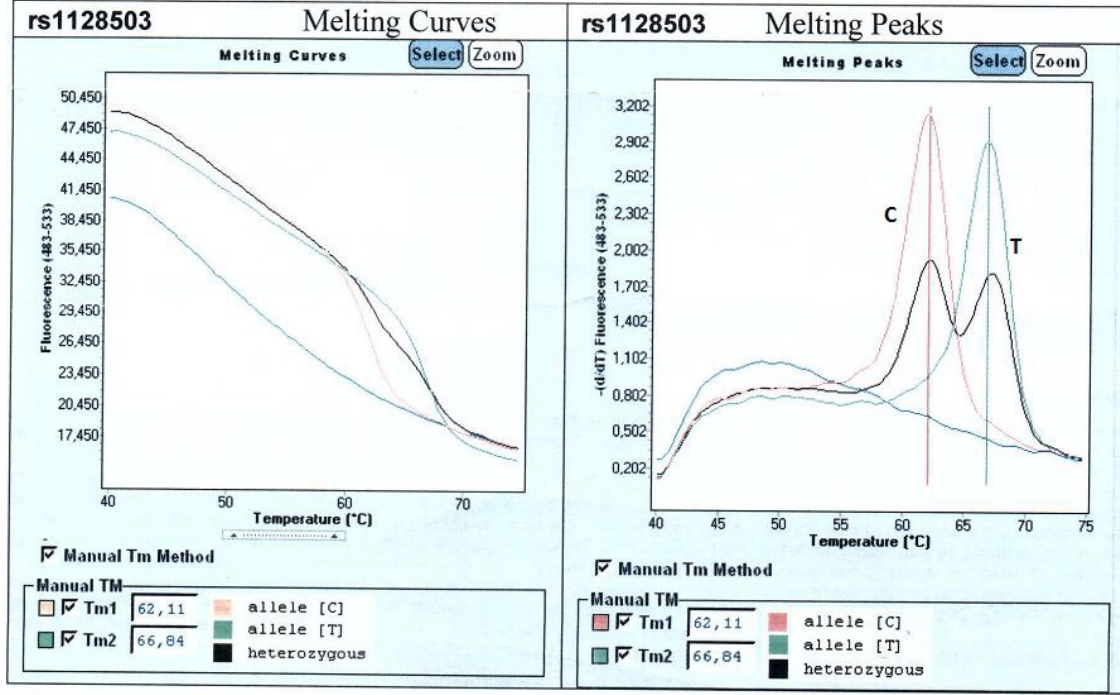
Genotip sıklığı ise ilk grupta CC 5 (%14.7), CT 19 (%55.9), TT 10 (%29.4); ikinci grupta CC 5 (%15.6), CT 22 (%68.7), TT 5 (%15.7) ; kontrol grubunda CC 7 (%21.9), CT 15 (%46.9), TT 10 (%31.2) olarak bulundu.



Şekil 20:MDR1 c.3435C>T polimorfizmi için gözlenen ve beklenen % genotip sıklıkları

4.1.1.2.c.1236C>T Polimorfizm Sonuçları

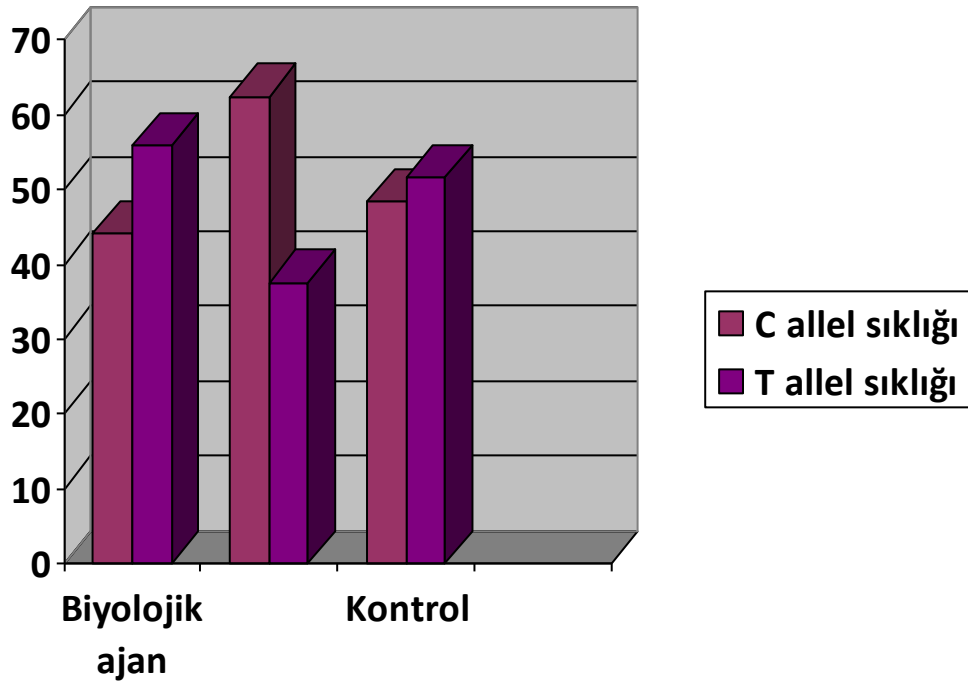
Melting eğrisine göre floresans sinyali, C için 62 C°'de T için 66 °C'de alınmaktadır. Melting eğrisinde 62 C°'de tek bir pik varsa genotip CC, hem 62 hem de 66 C°'de iki pik varsa heterozigot, 66 C°de tek bir pik varsa TT genotip olduğu sonucunu vermektedir. LightCycler 480 sistem cihazında gerçek zamanlı PZR yapıldıktan sonra elde edilen melting eğrisi analiz sonuçları şekil 21' de gösterilmektedir.



Şekil 21: c.1236C>T polimorfizmi için CC, TT ve heterozigot CT genotipine sahip bir bireyin 'melting curve' analizi sonucu

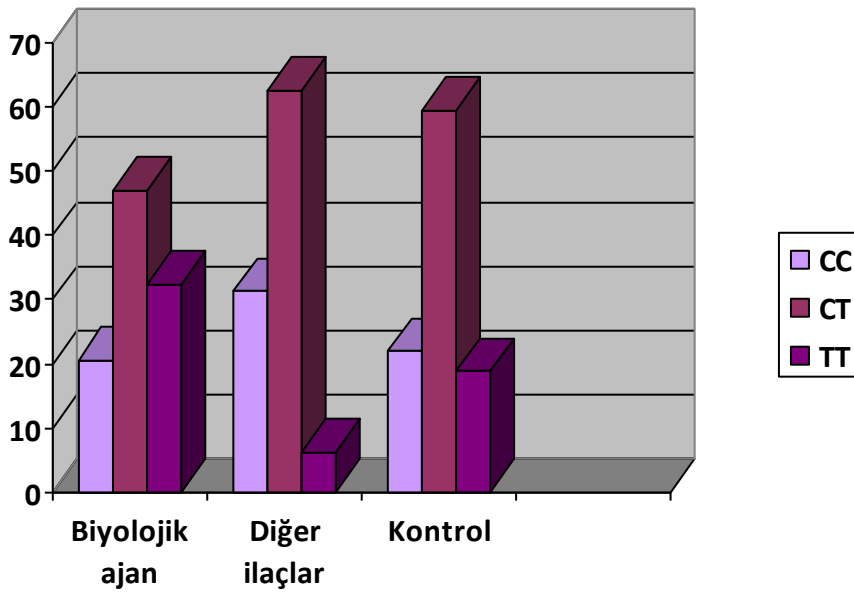
Çalışmaya dâhil edilen toplam 66 hasta ve 32 sağlıklı bireyin, LightCycler 480 sistem cihazında c.1236C>T polimorfizmine yönelik melting eğrisi analizi sonuçlarına göre 62 C° ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$) de tek bir pik , 66 C° ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$) de tek bir pik veya hem 62 C° hemde 66 C° de iki pik elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol ve hasta grubundaki kişilerin genotipleri belirlenmiştir.

AS hastalarından biyolojik ajan kullanan grupta C allel sıklığı %44.1 , T allel sıklığı % 55.9 olarak bulundu. AS hastalarından diğer tedavileri kullanan grupta C allel sıklığı %62.5, T allel sıklığı %37.5 bulundu.Kontrol grubunda ise C allel sıklığı %48.4, T allel sıklığı %51.6 olarak bulundu.



Şekil 22:MDRI c.1236C>T polimorfizmi için % allel sıklıkları

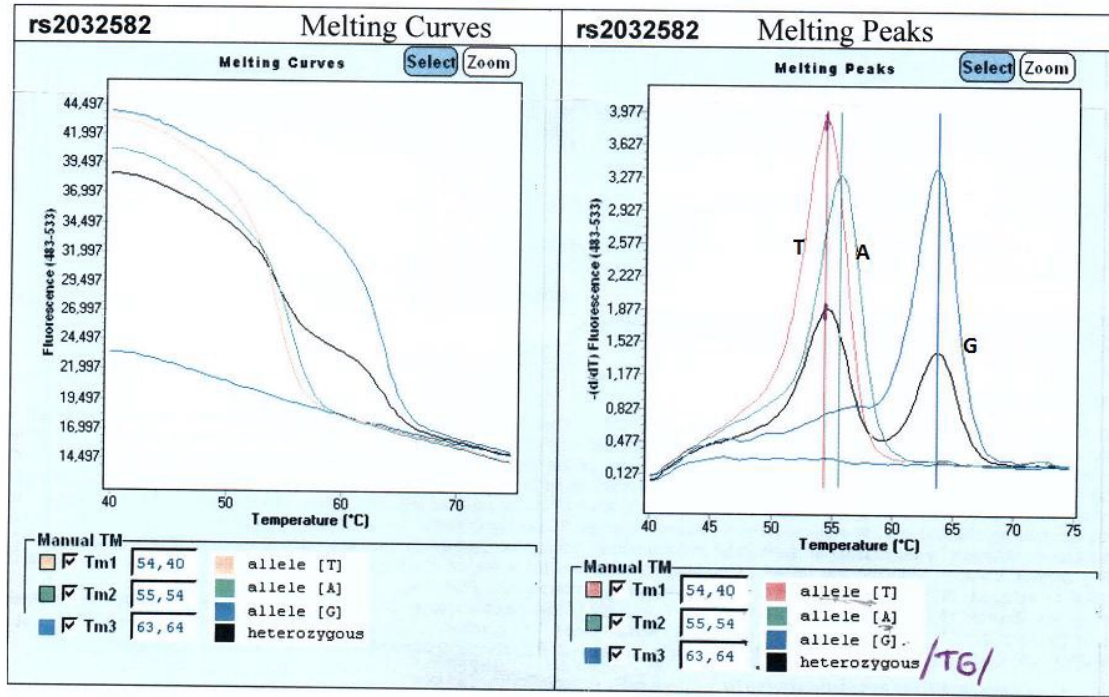
Genotip sıklığı ise ilk grupta CC 7 (%20.6), CT 16 (%47), TT 11 (%32.4); İkinci grupta CC 10 (%31.25), CT 20 (%62.5), TT 2 (%6.25) ; kontrol grubunda CC 7 (%21.9), CT 19 (%59.4), TT 6 (%18,8) olarak bulundu.



Şekil 23: MDRI c.1236C>T polimorfizmi için gözlenen ve beklenen % genotip sıklıkları

4.1.1.3.c.2677G>A/T Polimorfizm Sonuçları

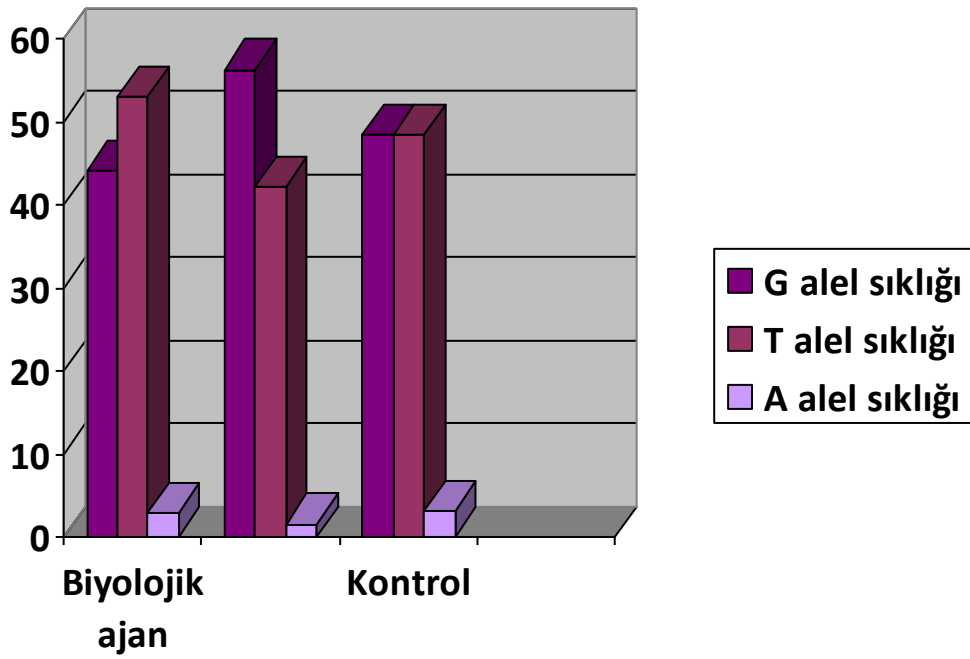
Melting eğrisine göre floresans sinyali, T için 54 C°'de, A için 55 °C'de ve G için 63C°'de alınmaktadır. Melting eğrisinde 54 C°'de tek bir pik varsa genotip TT, 55°C'de tek pik varsa AA, hem 54 °C'de hem de 63 C°'de iki pik varsa heterozigot GT, hem 55 °C'de hem de 63 C°'de iki pik varsa heterozigot GA, 63 C°de tek bir pik varsa GG genotip olduğu sonucunu vermektedir. LightCycler 480 sistem cihazında gerçek zamanlı PZR yapıldıktan sonra elde edilen melting eğrisi analiz sonuçları şekil 24' de gösterilmektedir.



Şekil 24: c.2677G>A/T polimorfizmi için GG, AA, TT ve heterozigot GT genotipine sahip bir bireyin 'melting curve' analiz sonucu

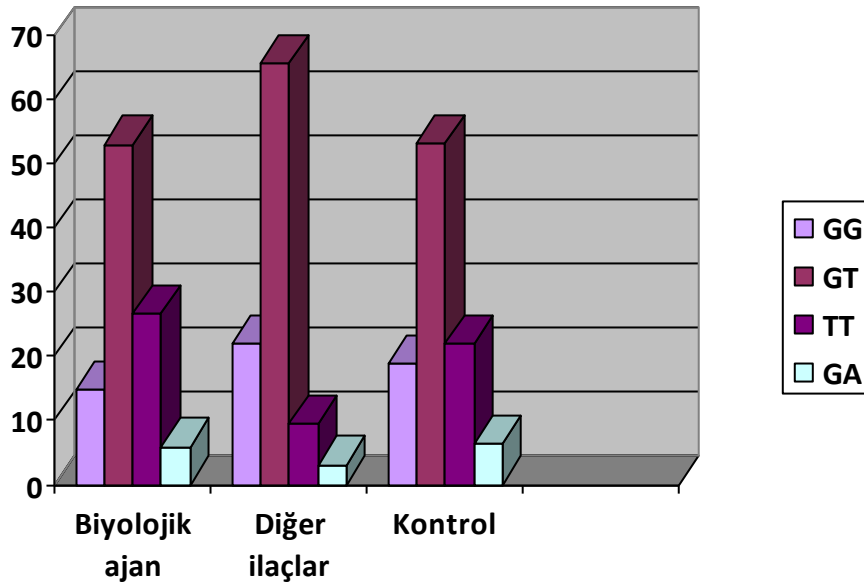
Çalışmaya dâhil edilen toplam 66 hasta ve 32 sağlıklı bireyin, LightCycler 480 sistem cihazında c.2677G>A/T polimorfizmine yönelik melting eğrisi analizi sonuçlarına göre 62 C° ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$) de tek bir pik , 66 C° ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$) de tek bir pik veya hem 62 C° hemde 66 C° de iki pik elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol ve hasta grubundaki kişilerin genotipleri belirlenmiştir.

AS hastalarından biyolojik ajan kullanan grupta G allel sıklığı %44.1 , T allel sıklığı % 53, A allel sıklığı %2.9 olarak bulundu. AS hastalarından diğer tedavileri kullanan grupta G allel sıklığı %56.2, T allel sıklığı %42.2, A allel sıklığı %1.6 bulundu. Kontrol grubunda ise G allel sıklığı %48.4, T allel sıklığı %48.4, A allel sıklığı %3.2 olarak bulundu.



Şekil 25: MDR1 c.2677G>A/T polimorfizmi için % allel sıklıkları

Genotip sıklığı ise ilk grupta GG 5 (%14.7), GT 18 (%52.9), GA 2 (%5.9), TT 9 (%26.5) ; İkinci grupta GG 7 (%21.9), GT 21 (%65.6), GA 1 (%3.1), TT 3 (%9.4) ; kontrol grubunda GG 6 (%18), GT 17 (%53.1), GA 2 (%6.25), TT 7 (%21.9) olarak bulundu.



Şekil 26:MDR1 c.1236C>T polimorfizmi için gözlenen ve beklenen % genotip sıklıkları
MDR1 geni için polimorfizmleri araştırılan üç SNP (c.1236C>T, c.2677G>A/T ve c.3435C>T) birlikte ele alındığında tespit edilen genotipler ve sıklıkları tablo 11’de

verilmiştir. Çalışma grubumuzda üç SNP itibariyle 14 farklı genotip tespit edilmiştir. AS hastalarında MDR1 geni için polimorfizm sonuçlarına göre en sık gözlenen genotipler CT-GT-CT (%43.9) , TT-TT-TT (%16.4) , CC-GG-CT (%9) olarak bulundu.

Tablo 11: *MDR1* geni için polimorfizmleri araştırılan üç SNP (c.1236C>T, c.2677G>A/T ve c.3435C>T) birlikte ele alındığında tespit edilen genotipler ve sıklıkları

No	Genotip (c.1236C>T- c.2677G>A/T- c.3435C>T)	Gözlenen kişi sayısı (1.grup/2.g rup)	Gözlene n kişi sayısı (Kontrol)	Görece sıklık (%) (1.grup/2.grup/kontrol)
1	CT-GT-CT	15/16	12	15.3/ 16.3/ 12.2
2	TT-TT-TT	9/1	6	9.2 / 1 / 6.2
3	CC-GG-CT	2/4	3	2 / 4 / 3
4	CC-GG-CC	3/3	1	3/ 3/ 1
5	CT-GT-TT	1/3	2	1 / 3 / 2
6	CC-GA-CC	2/1	1	2 / 1 / 1
7	TT-GT-CT	2/0	0	2/ 0 / 0
8	CT-TT-TT	0/1	1	0 / 1 / 1
9	CC-GT-CC	0/1	1	0 / 1 / 1
10	CT-GG-CC	0/0	2	0 / 0 / 2
11	CT-GT-CC	0/0	2	0 / 0 / 2
12	CC-GT-CT	0/1	0	0 / 1 / 0
13	TT-TT-CT	0/1	0	0 / 1 / 0
14	CC-GA-TT	0/0	1	0 / 0 / 1

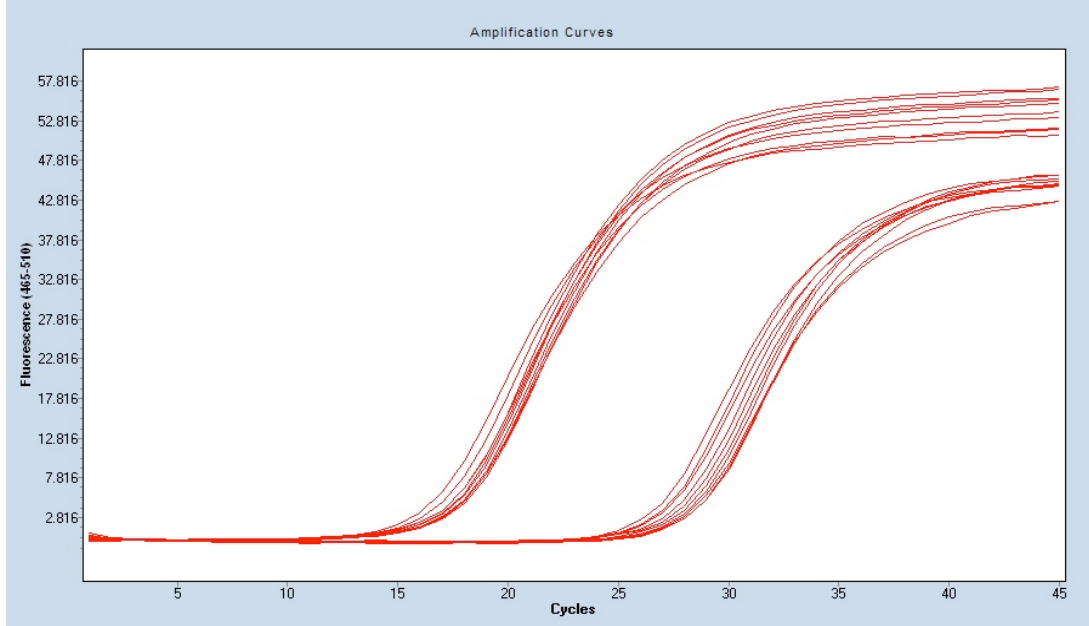
Çalışma grubumuzda üç SNP (c.1236C>T, c.2677G>A/T ve c.3435C>T) itibariyle tespit edilen haplotip sayısı 9 olarak bulunmuştur. Söz konusu haplotipler ve sıklıkları tablo 12’de gösterilmiştir. En sık gözlenen haplotipler sırasıyla TTT (% 43.9), CGC (% 38.8) ve CGT (% 8.2) olarak saptanmıştır. En nadir gözlen haplotip ise % 0.6 sıklıkla CAT olarak tespit edilmiştir.

Tablo 12:MDR1 geni için polimorfizmleri araştırılan üç SNP (c.1236C>T, c.2677G>A/T ve c.3435C>T) birlikte ele alındığında tespit edilen haplotipler ve sıklıkları

No	Haplotip (c.1236C>T-c.2677G>T/A- c.3435C>T)	Sıklık (N=196 kromozom)	Görece sıklık (%)
1	TTT	86	43,9
2	CGC	76	38,8
3	CGT	16	8,2
4	TGC	4	2
5	CAC	4	2
6	TTC	3	1,5
7	CTT	3	1,5
8	CTC	3	1,5
9	CAT	1	0,6

4.1.2. MDR1 Ekspresyon Sonuçları

MDR1 gen ekspresyon çalışmasının RT PZR cevap eğrileri şekil 27’de gösterilmektedir. İlk sıradaki eğri β actin housekeeping gene , ikinci görülen de MDR1 genine ait cevap eğrileridir.



Şekil 27: Çalışmamızın RT PZR cevap eğrileri

Cinsiyete göre MDR1 gen ekspresyonunun karşılaştırması tablo 13’ de verilmiştir. Sonuç olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0,005$)

Tablo 13:MDR1 ekspresyonunun cinsiyete göre karşılaştırması

Erkek	Median	25.persentil	75. persentil
	0,25	0,14	0,34
Kadın	0,22	0,15	0,33

P değeri 0,914

Ankilozan spondilit hasta grubunda biyolojik ilaç kullanan grup ile kontrol arasında MDR1 geni ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,01$). Diğer gruplar arası anlamlı bir sonuç alınamadı.

MDR1 ekspresyon değerlerini biyolojik ajanlarla karşılaştırdığımızda çalışmamıza katılan AS hastalarında kullanılan ilaçlar infliximab, adalimumab, galimumab, ve etanercept bulunmaktaydı. Sonuçlar tablo 14' de verilmiştir.

Tablo 14:MDR1 ekspresyonunda biyolojik tedavi kullanımının karşılaştırması

	Median	25.persentil	75. persentil
infliximab	0,13	0,09	0,19
adalimumab	0,13	0,07	0,36
galimumab	0,20	0,08	0,32
etanercept	1,00	0,20	1,80

4.2. İstatistiksel Karşılaştırma

Tablo 15:İstatistiksel olarak verilerin karşılaştırılması

Değişken	Kontrol	Diğer tedavileri kullanan AS	Tedavide biyolojik ajan kullanan AS	P değeri
Cinsiyet				0,970
erkek	18 (56,3)	18 (56,3)	20 (58,8)	
kadın	14 (43,8)	14 (43,8)	14 (41,2)	
MDR1 ekspresyon	0,32 (0,27-0,44)	0,25 (0,16-0,35)	0,14 (0,09-0,23)	<0,001
Kontrol grubunun MDR1 ekspresyon karşılaştırması			0,13±0,05	<0.001
CRP		7,80 (3,45-	3,30 (3,30-5,04)	0,04

		17,55)		
BASDAI		4 (2,80-5,50)	2,80 (1,80-4,55)	0,066
c.3435C>Tpol				0,439
CC genotip	7 (21,9)	5 (15,6)	5 (14,7)	
CT genotip	15 (46,9)	22 (68,8)	19 (55,9)	
TT genotip	10 (31,3)	5 (15,6)	10 (29,4)	
c.1236C>Tpol				0,112
CC genotip	7 (21,9)	10 (31,3)	7 (20,6)	
CT genotip	19 (59,4)	20 (62,5)	16 (47,1)	
TT genotip	6 (18,8)	2 (6,3)	11 (32,4)	
c.2677G>A/T pol				0,489
GG genotip	6 (18,8)	7 (21,9)	5 (14,7)	
GA genotip	2 (6,25)	1 (3,1)	2 (5,9)	
GT genotip	17 (53,1)	21 (65,6)	18 (52,9)	
TT genotip	7 (21,9)	3 (9,4)	9 (26,5)	

Veriler n (%) , ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (25. ve 75. Yüzdelik) olarak ifade edildi.

5.TARTIŞMA

AS sıklıkla hayatın 3. dekadında başlayan ve erkeklerde kadınlardan biraz daha sık (2.4 kat) görülen bir hastalıktır. Hastaların %80'inde 30 yaşından önce ilk semptomlar gelişir ve %5'den daha az hastada semptomlar 45 yaşın üzerinde ortaya çıkar (5) Ankilozan spondilitin cinsiyete bağlı eğiliminden dolayı şüphelenilen bir gen olan X kromozomuyla herhangi bir bağlantısı olmadığı bildirilmiştir (6).

Ankilozan spondilit ve diğer SpA'lerin kesin sebebi henüz bilinmemektedir. Fakat patogeneizde genetik ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. İngiltere'de yapılan bir ikiz çalışmasında, genetik faktörlerin hastalığın oluşumundaki rolünün %97 olduğunu düşündürmüştür (7). Bir başka çalışmada hastalığın monozigotik ikizlerde dizigotik olanlara göre 5 kat daha fazla birliktelik gösterdiği saptanmıştır (44). Bu bulgular hastalığın oluşumunda genetik faktörlerin çevresel faktörlerden daha önde geldiğini göstermektedir.

Çoklu ilaç dirençliliği birden çok ve birbirinden farklı ilaca direnç gelişimidir (129). Hücre içi yetersiz ilaç konsantrasyonunun nedeni membran geçirgenliğinin bozulmasıdır ve bundan sorumlu faktörün p-glikoprotein olduğu gösterilmiştir. Human P-glikoprotein hücre içine giren toksik maddeler, kemoterapötikler gibi bir takım kimyasalların hücre dışına ATP enerjisi ile atılmasını sağlamaktadır. P glikoproteini 7.kromozomdaki 28 ekzon içeren MDR1 geni kodlamaktadır (138). *MDR1* geninde yaygın olarak gözlenen ve literatürde en çok üzerinde durulan SNP'ler, c.3435C>T, c.2677G>A/T ve c.1236C>T'dir ve söz konusu SNP'ler yaygın bir haplotipin bileşenidirler (166). Bu polimorfizmlerden c.3435C>T ve c.1236C>T polimorfizmleri aminoasit değişimine neden olmayan sessiz (silent = synonym) polimorfizmlerdir. c.3435C>T her ne kadar sessiz bir polimorfizm olsa da diğer yaygın non-

sinonim polimorfizmlerle birlikte herhangi bir haplotipte bulunduğu zaman azalmış P-gp fonksiyonu ile ilişkili olarak bildirilmektedir (158). Kimichi-Sarfaty ve ark. (2007) Science dergisinde yayınladıkları çalışmalarında c.3435C>T, c.2677G>T ve c.1236C>T SNP'lerinin her birinin substrat özgünlüğünü değiştirdiğini, ancak her üç SNP'yi birden taşıyan haplotip söz konusu olduğunda bu etkinin en belirgin düzeye ulaştığını vurgulamaktadırlar. Bu veriler P-gp fonksiyonunu değiştirebilecek primer nedenin SNP farklılıklarından değil, bu polimorfizmlerin oluşturduğu haplotiplerden kaynaklandığı fikrini desteklemektedir (166). Bu nedenle biz de çalışmamızda tüm geni incelemek yerine 3 allelinde olduğu haplotipleri analiz ederek Türk toplumunda ankilozan spondilit hastalarında biyolojik tedavilerle biyolojik olmayan tedaviler arasında c.1236C>T, c.2677G>A/T ve c.3435C>T allellerindeki polimorfizm sıklığını araştırdık ve bu polimorfizmlerle MDR1 gen ekspresyonu arasında ilişki olup olmadığına baktık.

Yapılan bağlantı analizleri sonucunda c.3435C>T, c.2677G>A/T ve c.1236C>T SNP'leri arasında güçlü bir bağlantı dengesizliği bulunduğu farklı populasyonlarda gösterilmiştir. Örneğin, Tang ve ark. Çinli, Malay ve Hint populasyonlarında bu polimorfizmler arasında sıkı bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir (177). Benzer şekilde Kim ve ark.da c.3435C>T, c.2677G>A/T ve c.1236C>T SNP'leri arasında güçlü bir bağlantı bulunduğunu Avrupa kökenli Amerikalılarda ve Afrika kökenli Amerikalılarda rapor etmişlerdir (172).

Bazı çalışmalarda ise söz konusu üç SNP'den ikisi arasında kuvvetli bir bağlantı dengesizliği bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin, Tanabe ve ark. 65 Japon bireye ait örneklerin %94'ünde 3435T alelinin 2677T veya 2677A alleli ile birliktelik gösterdiğini bildirmişlerdir (15). Benzer şekilde Türk populasyonunda da üç SNP arasında anlamlı derecede bağlantı dengesizliği bulunduğu, ancak bunlardan yalnızca 2677 ve 3435 lokusları arasında nispeten güçlü bir bağlantı varlığı tespit edilmiştir (173).

MDR1 geni ile ilgili olarak veri tabanında farklı toplumlar için bildirilmiş olan bağlantı dengesizliği verilerine bakıldığında, bu gende var olan SNP'leri arasında tespit edilen bağlantı gücü ve derecesinin bir toplumdan diğerine geniş ölçüde değişkenlik gösterdiği dikkati çekmektedir (174). c.3435C>T, c.2677G>A/T ve c.1236C>T SNP'leri, aralarında var olan bağlantı nedeniyle yaygın bir haplotipin bileşeni olarak kabul edilmektedirler (166). c.3435C>T polimorfizmi başta olmak üzere diğer MDR1 polimorfizmleri ile ilgili olarak ortaya çıkan çelişkili sonuçların nedeni olarak söz konusu çalışmalarda her bir SNP'nin bireysel olarak değerlendirilmesi ve oluşturdukları haplotiplerin göz ardı edilmesi

gösterilmektedir (175). Bu sebeple çalışmamızda hem tek tek allel sıklığı hemde her 3 allelin oluşturduğu haplotip sıklığı değerlendirilmiştir.

MDR1 polimorfizmleri ile ilgili olarak son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığı zaman haplotip temelli analizlerin yer aldığı yayınların sayısının her geçen gün arttığı görülmektedir. Polimorfizmler arası bağlantı dengesizliğinde var olan varyasyonlara bakarak bu polimorfizmlerin oluşturdukları haplotip sıklıklarının da toplumlar arası geniş ölçüde değişkenlik göstermesi çok da şaşırtıcı değildir. c.1236C>T, c.2677G>A/T, c.3435C>T SNP'leri açısından Afrika kökenli toplumlarda yaban 52 tip CGC haplotipi en sık ve TTT haplotipi nispeten daha seyrek gözlenirken; beyaz ırkta CGC ve TTT haplotip sıklıklarının birbirlerine hemen hemen eşit oldukları görülmektedir (175, 168, 172). Türk popülasyonu için CGC ve TTT haplotip sıklıkları sırasıyla %25 ve %33.7 olarak tespit edilmiştir (173).

2003 yılında Siddiqui ve ark. tarafından yapılan çalışmada; ilaca yanıtı 115 hastanın ilaca dirençli 200 hasta ile karşılaştırıldığında, ilaca dirençli hastaların 3435 CC genotipini daha fazla taşıdıkları tespit edilmiştir (OR: 2.66; %95 CI:1.32-5.38; P=0.006). Ancak CT genotipi için iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmadığı saptanmıştır. İlaça dirençli hastalar ayrıca epilepsisi bulunmayan, kontrol grubuyla kıyaslanmış (n:200); ilaca dirençli hastaların CC genotipini anlamlı olarak daha fazla ve TT genotipini daha az taşıdığı saptanmıştır. Siddiqui ve ark. c.3435C>T polimorfizminin aminoasit değişimine yol açmadığından yola çıkarak bu polimorfizmin MDR1 geninde bulunan ve aminoasit değişimine yol açması olası polimorfizmlerle birlikte bağlantı dengesizliği içinde bulunabileceğini öne sürmüşlerdir (178).

Polimorfizmlerdeki allel frekansları ve genotip dağılımları etnik kökene göre farklılık göstermektedir. c.3435C>T polimorfizmi allel sıklıkları değerlendirildiğinde Beyaz ırkta yapılan bir çalışmada C allel sıklığı %52, T allel sıklığı ise %48 olarak bulunmuştur (13). Farklı etnik kökenlere ait bireylerde yapılan diğer çalışmalarda; Çek popülasyonunda C allel sıklığı %43.5 ve T allel sıklığı % 56,5 olarak saptanmıştır (71). Çin halkında C allel sıklığı %59.6, T allel sıklığı %40.4 (180), Uygurlarda C allel sıklığı %47.2 , T allel sıklığı %52.8; Kazaklarda C allel sıklığı %60.2, T allel sıklığı %39.8, Hun kökenlilerde C allel sıklığı % 62.1, T allel sıklığı %37.9 (74); Batı Afrikalılarda ise C allel sıklığı %90 ve T allel sıklığı ise %10 gibi yüksek bir oranda görüldüğü saptanmıştır (181). 2005 yılında Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada MDR1 c.3435C>T polimorfizmine ait C ve T allel sıklıklarını sırasıyla %51 ve %49; genotip sıklıkları ise; %25.8 TT, %28.2 CC, %46 CT olarak bulunmuştur. Toplumda polimorfik allelin taşıma oranı %72 olarak bildirilmiştir (182)

Çalışmamızda AS tanısı almış biyolojik tedavileri kullanan 1.grup hasta 14 kadın 20 erkek , biyolojik olmayan tedavileri kullanan 2. grup hasta 14 kadın ile 18 erkek ve sağlıklı 14 kadın ve 18 erkek kullanıldı.Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 11,5) Paket Programı ile değerlendirildi.

2008 yılında Türkiyede yapılmış MDR1 geninde gözlenen yaygın tek nükleotid değişimlerinin (c.3435C>T, c.2677G>T/A ve c.1236C>T) türkiye populasyonunda haplotip temelli analizi başlıklı çalışmada türk toplumunda allel sıklığı, genotip sıklığı, haplotip sıklığı gösterilmiştir. 102 örnek üzerinde yapılan çalışmada *MDR1* c.3435C>T polimorfizmi için C ve T alellerinin sıklıkları sırasıyla % 47.1 ve % 52.9 olarak hesaplanmıştır . Gözlenen genotipler ve sıklıkları CC: % 27.5, CT: % 39.2 ve TT: % 33.3 olarak bulunmuştur . *MDR1* c.2677G>A/T polimorfizmi için G, T ve A alellerinin sıklıkları sırasıyla % 47.1, % 48.5 ve % 4.4 olarak hesaplanmıştır. Gözlenen genotipler ve sıklıkları ise GG: % 22.6, GT: % 45.1, GA: % 3.9, TT: %23.5 ve TA: % 4.9 olarak bulunmuştur *MDR1* c.1236C>T polimorfizmi için C ve T alellerinin sıklıkları sırasıyla % 44.6 ve % 55.4 olarak hesaplanmıştır. Gözlenen genotipler ve sıklıkları ise CC: % 18.6, CT: % 52.0 ve TT: % 29.4 olarak bulunmuştur. *MDR1* geni için polimorfizmleri araştırılan üç SNP (c.1236C>T, c.2677G>A/T ve c.3435C>T) birlikte ele alındığında tespit edilen genotipler ve sıklıkları çalışmada üç SNP itibariyle 23 farklı genotip tespit edilmiştir. En sık gözlenen genotipler sırasıyla CT-GT-CT (%19.61), TT-TT-TT (% 15.69) ve CT-GG-CC (% 7.84) olarak saptanmıştır. Çalışma grubunda üç SNP (c.1236C>T, c.2677G>A/T ve c.3435C>T) itibariyle tespit edilen haplotip sayısı 10 olarak bulunmuştur. En sık gözlenen haplotipler sırasıyla TTT (% 36.8), CGC (% 27.9) ve TGC (% 9.3) olarak saptanmıştır. En nadir gözlen haplotip ise % 1 sıklıkla TAC olarak tespit edilmiştir. (173) Çalışmamızda 14 farklı genotip tespit edilmiştir. En sık gözlenen genotipler sırasıyla CT-GT-CT , TT-TT-TT olarak bulundu. Saptanan haplotip sayısı 9 dur. En sık TTT (%43.9), CGC (%38.8) ve CGT (%8.2) olarak tespit edilmiştir. En nadir gözlen haplotip ise % 0.6 sıklıkla CAT olarak tespit edilmiştir.

AS hastalarında c.3435C>T polimorfizmi için allel sıklığı 1. Grupta C ve T allel sıklıkları sırasıyla %42.6 , %57.4 ;2. Grupta C ve T alleli sırasıyla %50, %50 ; kontrol grubunda C alleli %45.3 , T alleli %54.7 bulundu. Ankilozan spondilit biyolojik tedavi alan grupta c.3435C>T polimorfizmi için genotip sıklığı CC (%14.7), CT (%55.9), TT (%29.4) ; diğer tedavileri alan AS grubunda CC (%15.6), CT (%68.8), TT (%15.6) ; kontrol grubunda CC (%21.9), CT (%46.9), TT (%31.3) olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0.439). Ancak kontrol grubunda belirgin bir şekilde CC ve TT genotipini

arttığı, biyolojik tedavi alan ve diğer tedavileri kullanan AS hastalarında CC genotipinin azaldığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda MDR1 geni c.1236C>T polimorfizmi için allel sıklığı 1. Grupta C alleli %44.1 ,T alleli %55.9 ; 2. Grupta C alleli %62.5 , T alleli %37,5; kontrol grubunda C alleli %48.4 , T alleli %51.6 olarak bulundu. Genotip sıklığı ise 1. Grupta CC %20.6, CT %47, TT %32.4; 2. Grupta CC %31.25, CT %62.5, TT %6.25; kontrol grubunda ise CC %21.9, CT %59.4, TT %18.8 olarak sonuçlandı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0.112). 2. Grupta C allel sıklığının artışı ve TT genotipinin belirgin azaldığı gözlenmektedir.

c.2677G>T/A AS hastalarından biyolojik ajan kullanan grupta G allel sıklığı %44.1 , T allel sıklığı % 53, A allel sıklığı %2.9 olarak bulundu. AS hastalarından diğer tedavileri kullanan grupta G allel sıklığı %56.2, T allel sıklığı %42.2, A allel sıklığı %1.6 bulundu. Kontrol grubunda ise G allel sıklığı %48.4, T allel sıklığı %48.4, A allel sıklığı %3.2 olarak bulundu. Genotip sıklığı ise ilk grupta GG %14.7, GT %52.9 , GA %5.9, TT %26.5; İkinci grupta GG %21.9, GT %65.6, GA %3.1, TT %9.4 ; kontrol grubunda GG %18, GT %53.1, GA %6.25, TT %21.9 olarak bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0,489).a Ancak 2.grupta TT genotipinin azaldığı gözlenmektedir.

MDR1 polimorfizmlerinin haplotip analizi ile incelendiği bir başka çalışmada temporal lob epilepsisi bulunan hastalarda MDR1 genindeki c.1236C>T, c.2677G>T, ve c.3435C>T polimorfizmleri araştırılmıştır. Çalışma Avrupa’da yapılmış olup, hastalar ilaç direncine göre 3 gruba ayrılmış; ilaç tedavisine en yüksek ilaç direnci gösteren bireylerin, bu üç polimorfizm için CGC haplotipini homozigot olarak taşıyanlar olduğu saptanmıştır (150). Çalışmamızda haplotip analizi incelendiğinde AS hastalarında en sık gözlenen haplotip TTT olarak bulundu.

Jamroziak ve arkadaşları (2005), 44 Kafkaslı ALL hastasıyla yaptığı başka bir çalışmada ise, c.3435C>T polimorfizminin MDR1 geni üzerinde fonksiyonel ve prognostik rolünü araştırmış ve kemoterapi sonucunda ALL blast hücrelerindeki MDR1 gen ekspresyonu, P-gp ekspresyonu ve aktivitesinin farklı MDR1 genotipi taşıyan hastalarda farklı olduğunu gözlemiştir. c.3435C>T polimorfizmine ait CT, TT ve CC genotiplerinin ekspresyon seviyeleri üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını gözlemiştir. Ayrıca çalışma sonuçları c.3435C>T polimorfizminin yetişkin ALL gelişimini belirlemede major bir belirleyici olmadığını göstermiştir (179). Çalışmamızda c.3435C>T polimorfizmi ile MDR1 ekspresyonu arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır.

Ankilozan spondilit hasta grubuna ilişkin MDR1 geni ekspresyonu karşılaştırıldığında kontrol grubu ile biyolojik tedavi alan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,001$). Diğer gruplar arasında fark bulunamamıştır.

Thörn ve arkadaşları (181), gastrointestinal sistemde MDR1 mRNA düzeylerine bakmışlardır. Cinsiyetle kıyasladıklarında mRNA düzeylerinin değişmediğini gözlemişlerdir.

Çalışmamızda, cinsiyete göre MDR1 geni ekspresyonu kıyaslandı. Cinsiyet ile MDR1 geni arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p= 0,914$).

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

AS sıklıkla hayatın 3. dekadında başlayan ve erkeklerde kadınlardan biraz daha sık (2.4 kat) görülen bir hastalıktır. Hastaların %80'inde 30 yaşından önce ilk semptomlar gelişir ve %5'den daha az hastada semptomlar 45 yaşın üzerinde ortaya çıkar. Ankilozan spondilit ve diğer SpA'lerin kesin sebebi henüz bilinmemektedir. Fakat patogeneizde genetik ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir.

Çalışmamızda mevcut bütçe doğrultusunda küçük bir grup AS hastasında, AS hastası olup biyolojik tedavi kullanan hasta ile diğer tedavileri kullanan hastalar arasında MDR1 geni c.3435C>T, c.1236C>T , c.2677G>A/T polimorfizmleri genotip dağılımları ile MDR1 geni ekspresyonu bakımından kıyaslandı. Ancak verilerin AS hastalarına genellenebilmesi için daha geniş ve kapsamlı projeler ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda istatistiksel olarak c.3435C>T, c.1236C>T, c.2677G>A/T polimorfizmleri arasında anlamlı bir fark çıkmaması ve polimorfizm ile MDR1 geni ekspresyonu arasında anlamlı bir fark olmaması hasta sayısının az olmasından kaynaklanmış olabilir. Daha önceden yapılmış ALL hasta grubunda MDR1 gen ekspresyonu ile c.3435C>T polimorfizm arasında anlamlı fark bulunmuştur. MDR1 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre biyolojik tedavi alan grupta anlamlı çıkmıştır. MDR1 gen ekspresyonunu biyolojik tedavide kullanılan ilaç türlerine göre kıyasladığımızda anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Ancak bu durumun bazı ilaç gruplarındaki hasta sayısının az olmasından kaynaklandığı düşüncesindeyim. Çalışmaya MDR1 geni açısından metilasyonda eklenebilirdi ancak bütçenin kısıtlı olması nedeniyle biz çalışmadık.. Çalışmamızın bazı kısımlarındaki sonuçların anlamlı çıkmamasında hasta

sayısının az olmasının etkili olduğunu düşünmekteyim. Daha büyük bir hasta popülasyonunda yapılması anlamlı bir sonuç çıkarabilir.

MDR1 geni ile ilgili olarak literatürde yaygın olarak bildirilen ve P-gp fonksiyonunda önemli rol oynadığı düşünülen 3 SNP'nin oluşturduğu haplotipler ve sıklıkları AS hasta popülasyonu için ilk defa belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen polimorfizm verileri *MDR1* geni ekspresyonu ile beraber değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın AS hastaları için haplotip veri tabanlarının oluşturulmasına öncülük edeceği düşünülmektedir. AS hastalarında kontrole göre MDR1 ekspresyonu için anlamlı bir fark çıkması AS hastalarını tedavisinin düzenlenmesi açısından ve daha fazla sayıda hasta grubuyla yapılması literatüre katkı sağlaması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

7.KAYNAKLAR

1. Akgul, O. and S. Ozgocmen, Classification criteria for spondyloarthropathies. *World J Orthop*, 2011. 2 (12): p. 107-15.
2. Davis JC. Ankylosing spondylitis. In: Koopman WJ, Moreland LW (eds). *Arthritis and Allied Conditions*. Philadelphia: LWW, 2005:1319-34.
3. Khan MA. Clinical features of ankylosing spondylitis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Winblatt ME, Weisman MH (eds). *Rheumatology*. Edinburgh: Mosby, 2003: 1161-82.
4. Vergara ME, O'Shea FD, Inman RD, Gage WH. Postural control is altered in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2012; 27 (4):334-40.
5. Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, van der Linden S, Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int*. 2003; 23: 61–6
6. Hoyle E, Laval SH, Calin A, Wordsworth BP, Brown MA. The X-chromosome and susceptibility to ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2000;43 (6):1353-5
7. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford J, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum*. 1997;40 (10):1823-8

8. Sayitoğlu M. [Cancer therapy and pharmacogenetic approach: scientific letter]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27 (3):434-41.
9. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS, et al. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics* 2002;12 (6):437-50.
10. Evans W. , (2001): Pharmacogenomics: The inherited Basis for Interindividual Differences in Drug Response, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 9-39.
11. Jiang EZ, Chang YJ, Lee JW, Lee WK, Kim JS, Sohn SK, Lee KB, Suh JS. Multi-drug resistance (MDR1) gene expression in de novo acute leukemia cells: correlations with CD surface markers and treatment outcome. *J Korean Med Sci.* 1998;13 (6): 617-22.
12. Baran Y, Gündüz U, Ural, AU. Expression of multi drug resistance (MDR1) gene in human promyelocytic leukemia cell line selected with vincristine. *Turk J Cancer* 2005; 35 (2): 88-92.
13. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug- resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97 (7): 3473-8.
14. Krzysztof J, Ewa B, Barbara C, Agnieszka J, Marek M, Tadeusz R. No Influence of 3435C>T ABCB1 (MDR1) Gene Polymorphism on Risk of Adult Acute Myeloid Leukemia and P-glycoprotein Expression in Blast Cells. *Ther Drug Monit.* 2006; 28: 707–711.
15. Tanabe M., Ieri I., Nagata N., ve ark. : Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR1) gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297 (3): 1137–1143
16. Cruzat V, Cuchacovich R, Espinoza LR. Undifferentiated spondyloarthritis: recent clinical and therapeutic advances. *Curr Rheumatol Rep.* 2010;12 (5):311-7.
17. Sieper, J., et al., Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61 Suppl 3: p. iii8-18.

18. Brandt J, Marzo-Ortega H, Emery P. Ankylosing spondylitis: New treatment modalities. *Best Pract Res Rheumatol* 2006;20:559-70.
19. Ryan LM, Carrera GF, Lightfoot R, Hoffman RG, Kozin F. The radiographic diagnosis of sacroiliitis. *Arthritis and Rheumatism* 1983;26:760-3.
20. Sieper J, Braun J, editor. Ankylosing spondylitis, Current medicine group, London 2009.
21. Khan MA. Ankylosing spondylitis: clinical features. In: Klippel JH, Dieppe PA, ed. *Rheumatology*. St Louis: Mosby; 1994. Section 6;16.1–10.
22. Russel AS. Ankylosing spondylitis: history. In: Klippel JH, Dieppe PA, eds. *Rheumatology*. St Louis: Mosby;1994. Section 6;14.1–2.
23. Yağlı NV. Ankilozan Spondilit ve osteoartrit hastalarında statik ve fonksiyonel dengenin karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2007. 50
24. Kaya T, Gelal F, Gunaydin R. The relationship between severity and extent of spinal involvement and spinal mobility and physical functioning in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol*. 2006;25 (6):835-9.
25. Murray HC, Elliott C, Barton SE, Murray A. Do patients with ankylosing spondylitis have poorer balance than normal subjects? *Rheumatology (Oxford)* 2000;39 (5): 497–500.
26. Jones G. Posture. In: Kandel E, Schwartz J, Jessel T (eds). *Principles of Neural Science*. New-York: McGraw-Hill, 2000:816-31.
27. Van der Linden S, van der Heijde D. Spondyloarthropathies. In: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB (eds). *Kelley's Textbook of Rheumatology* Philadelphia, WB Saunders, 2004 ; 1125-1141.
28. Spencer DG, Sturrock RD, Buchanan WW. Ankylosing spondylitis: yesterday and today. *Med Hist* 1980;24:60-9.
29. Pugh, M.T., Bernard Connor (1666-1698). *Rheumatology (Oxford)*, 2002. 41 (8): p. 942-3.
30. Arasıl T. Ankilozan Spondilit. Beyazova M, Kutsal YG (Editörler). *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon*. İkinci baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011. s. 2241-59.

31. Weisman M H., v.d.H.D., Ankylosing Spondylitis and the Spondyloarthropathies. Ankilozan Spondilit ve Spondiloartropatiler. 2008., Ankara Veri medikal yayıncılık.
32. Moll JM, Haslock I, Macrae IF, Wright V. Associations between ankylosingspondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behcet's syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 1974;53 (5):343-64.
33. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet*. 2011;377 (9783):2127-37.
34. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*. 1990;63 (5):1099-112.
35. Brewerton, D.A., et al., Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*, 1973. 1 (7809): p. 904-7.
36. Van der Linden, S.M., et al., The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum*, 1984. 27 (3): p. 241-9.
37. Reveille, J.D., E.J. Ball, and M.A. Khan, HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol*, 2001. 13 (4): p. 265-72.
38. Gouveia, E.B., D. Elmann, and M.S. Morales, Ankylosing spondylitis and uveitis: overview. *Rev Bras Reumatol*, 2012. 52 (5): p. 742-56.
39. Reveille, J.D., Epidemiology of spondyloarthritis in North America. *Am J Med Sci*, 2011. 341 (4): p. 284-6.
40. Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwalait M, Distler A, et al . Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum*. 1998; 41: 58–67
41. Akkoc N, Khan MA. Overestimation of the prevalence of ankylosing spondylitis in the Berlin study: comment on the article by Braun et al. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 4048–9
42. Onen, F., et al., Prevalence of ankylosing spondylitis and related spondyloarthritides in an urban area of Izmir, Turkey. *J Rheumatol*, 2008. 35 (2): p. 305-9.
43. Ward MM, Weisman MH, Davis JC Jr, Reveille JD. Risk factors for functional limitations in patients with long-standing ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2005;53 (5):710-7

44. Akar S, Önen F. Ankilozan Spondilit Epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci .2007;3 (25):1-12
45. Braun J, Sieper J. Ankylosing Spondylitis. Lancet 2007; 369: 1379-90.
46. Van Der Linden S, Van Der Heijde D, Braun J. Ankylosing spondylitis. In: Haris ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC ve ark editors. Kelley's textbook of rheumatology. 7 th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2005; 1125-1139.
47. Pham T. Pathophysiology of ankylosing spondylitis: What's new? Joint Bone Spine 2008; 75 (6):656-60
48. Vegvari A, Szabo Z, Szanto S, Glant TT ve ark. The genetic background of ankylosing spondylitis. Joint Bone Spine 2009;76 (6),623–8.
49. Andersan JM. Ankylosing spondylitis: inflammatory arthritis of the spine with strong genetic component. Journal of Controversial Medical Claims 2010; 16 (4).1-13
50. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. Nat Rev Rheumatol.2010;6 (7):399-405.
51. Arasıl T. Ankilozan spondilit. In: Beyazova M, Gökçe Kutsal Y, edt. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. Güneş Kitabevi, Ankara, 2000: 1577-91
52. Smith, J.A., E. Marker-Hermann, and R.A. Colbert, Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006. 20 (3): p. 571-91.
53. Francois, R.J., et al., Histopathologic evidence that sacroiliitis in ankylosing spondylitis is not merely enthesitis. Arthritis Rheum, 2000. 43 (9): p. 2011-24.
54. Calin, A., et al., Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. JAMA, 1977. 237 (24): p. 2613-4.
55. Rudwaleit, M., et al., Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria. Arthritis Rheum, 2006. 54 (2): p. 569-78.
56. Sieper, J., et al., New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). Ann Rheum Dis, 2009. 68 (6): p. 784-8.
57. Braun J, Grolms M, Sieper J. Three-colour flowcytometric examination of CD4/CD45 subsets reveals no differences in peripheral blood and synovial fluid between patients

- with reactive arthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1994;12 (1):17-22.
58. Battistone M MB, Reda DJ. Patterns of sacroiliitis among the spondyloarthropathies: Analysis of data from a large multicenter cohort [abstract] *Arthritis Rheum*, 1997. 40 (suppl):65.
 59. Gladman, D.D., Clinical aspects of the spondyloarthropathies. *Am J Med Sci*, 1998. 316 (4): p. 234-8.
 60. McGonagle, D., et al., Enthesitis in spondyloarthropathy. *Curr Opin Rheumatol*, 1999. 11 (4): p. 244-50.
 61. Han, C., et al., Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2006. 33 (11): p. 2167-72.
 62. Slobodin, G., et al., Aortic involvement in rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 2006. 24 (2 Suppl 41): p. S41-7.
 63. MA., A.N.K., Ankilozan spondilitin ve ilişkili spondiloartropatilerin epidemiyolojisi. *Ankilozan spondilit ve spondiloartropatiler*, ed. O. S. 2008, İstanbul: Veri Medikal. 117-131.
 64. PÇ, Ö., Üveit özel sayısı. *Türkiye Klinikleri J Ophtalmol-Special Topics*, 2008. 1: p. 27-37.
 65. Quismorio, F.P., Jr., Pulmonary involvement in ankylosing spondylitis. *Curr Opin Pulm Med*, 2006. 12 (5): p. 342-5.
 66. Singh, G., et al., Prevalence of subclinical amyloidosis in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 2007. 34 (2): p. 371-3.
 67. Gratacos, J., et al., Coincidental amyloid nephropathy and IgA glomerulonephritis in a patient with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 1993. 20 (9): p. 1613-5.
 68. Vilar, M.J., et al., Renal abnormalities in ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol*, 1997. 26 (1): p. 19-23.
 69. Rudwaleit, M. and D. Baeten, Ankylosing spondylitis and bowel disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006. 20 (3): p. 451-71.

70. Sant, S.M. and D. O'Connell, Cauda equina syndrome in ankylosing spondylitis: a case report and review of the literature. Clin Rheumatol, 1995. 14 (2): p. 224-6.
71. Elyan, M. and M.A. Khan, Diagnosing ankylosing spondylitis. J Rheumatol Suppl, 2006. 78: p. 12-23.
72. Bellamy N: Musculoskeletal Clinical Metrology. Kluwer Academic Publishers, Lancaster 1993, S.225-45.
73. Zochling J, Braun J. Assessments in ankylosing spondylitis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2007;21 (4):699-712.
74. Heuft-Dorenbosch, L., et al., Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis, 2003. 62 (2): p. 127-32.
75. Zochling, J., Measures of symptoms and disease status in ankylosing spondylitis: Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS), Ankylosing Spondylitis Quality of Life Scale (ASQoL), Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), Bath Ankylosing Spondylitis Global Score (BAS-G), Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI), Dougados Functional Index (DFI), and Health Assessment Questionnaire for the Spondylarthropathies (HAQ-S). Arthritis Care Res (Hoboken), 2011. 63 Suppl 11: p. S47-58.
76. Sayiner NÇ, Burnaz Ö, Akın T, Özgönenel L, Çetin E, Aytekin E, Örnek GT, Tütün Ş, Şener O; Ankilozan Spondilitli Hastalara Ait Demografik Veriler, Klinik Özellikler ve Medikal Tedavileri, İstanbul Tıp Derg - Istanbul Med J 2011;12 (1):19-24
77. Çeliker R; Ankilozan Spodilit: Klinik Özellikleri, Romatizma Cilt:15, Sayı:1,2000)
78. Van der Linden Sjef, ankylosing spondylitis; in:Kelley W, Ruddy S, Harris E, Sledge C; Textbook of Rheumatology, fifth edition, p:969-981,1997
79. Ruof, J. and G. Stucki, Validity aspects of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in ankylosing spondylitis: a literature review. J Rheumatol, 1999. 26 (4): p. 966-70.
80. Göksoy T. Romatizmal hastalıkların tanı ve tedavisi. Yüce Dağıtım, İstanbul 2002.
81. Spoorenberg A, van der Heijde D, de Klerk E, Dougados M, de Vlam K, Mielants H, van der Tempel H, van der Linden S. Relative value of erythrocyte sedimentation rate

- and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis. . J Rheumatol. 1999;26 (4):980-4.
82. Gueguen A, Nakache JP, Velicitat P, Zeidler H, Veys E, Calin A. Clinical relevance of C-reactive protein in axial involvement of ankylosing spondylitis. J Rheumatol. 1999;26 (4):971-4.
 83. Sheehan NJ, Slavin BM, Donovan MP, Mount JN, Mathews JA. Lack of correlation between clinical disease activity and erythrocyte sedimentation rate, acute phase proteins or protease inhibitors in ankylosing spondylitis. Br J Rheumatol. 1986;25 (2):171-4.
 84. Calin, A., Raised serum creatine phosphokinase activity in ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis, 1975. 34 (3): p. 244-8.
 85. Ostergaard, M. and R.G. Lambert, Imaging in ankylosing spondylitis. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2012. 4 (4): p. 301-11.
 86. Guglielmi G, Scalzo G, Cascavilla A, Carotti M, Salaffi F, Grassi W. Imaging of the sacroiliac joint involvement in seronegative spondyloarthropathies. Clin Rheumatol 2009; 28 (9):1007-19.
 87. Atagündüz P, A.S., Direskenli H, Ankilozan Spondilitte Radyografik Görüntüleme. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci, 2007. 3: p. 39-49.
 88. Linden SVD, Heijde DVD, Braun J. Ankylosing Spondylitis. In: Harris ED, JR. Kelley's text book of Rheumatology. Seventh Edition, 2005. p. 1125-1141.
 89. Vinson, E.N. and N.M. Major, MR imaging of ankylosing spondylitis. Semin Musculoskelet Radiol, 2003. 7 (2): p. 103-13.
 90. Van der Linden, S.V.d.H.D.B.J., Kelley's Textbook of Rheumatology. Kelley Romatoloji, ed. A. T. 2006, Ankara: Güneş Kitabevi.
 91. Rudwaleit, M., et al., Defining active sacroiliitis on magnetic resonance imaging (MRI) for classification of axial spondyloarthritis: a consensual approach by the ASAS/OMERACT MRI group. Ann Rheum Dis, 2009. 68 (10): p. 1520-7.
 92. Forrester DM, Hollingsworth PN, Dawkins RL. Difficulties in the radiographic diagnosis of sacroiliitis. Clin Rheum Dis 1983;9:323-32.

93. Jürgen B, Matthias B, Ulrich E, Hermann K, Armin D, Joachim S. Use of dynamic magnetic resonance imaging in the detection of early and advanced sacroiliitis in spondyloarthropathy patients. *Arthritis Rheum* 1994;37:1039-45
94. D'Agostino, M.A., et al., Assessment of peripheral enthesitis in the spondylarthropathies by ultrasonography combined with power Doppler: a cross-sectional study. *Arthritis Rheum*, 2003. 48 (2): p. 523-33.
95. De Smeth AA, Gardner JD, Lindsley HB, Goin JE, Fritz SL. Tomography for evaluation of sacroiliitis. *AJR* 1982;139:577-81.
96. Geijer M, Sihlbom H, Göthlin JH, Nordborg E. The role of CT in the diagnosis of sacroiliitis. *Acta Radiol.* 1998;39:265-8.
97. Carrera GF, Foley WD, Kozin F, Ryan L, Lawson TL. CT of sacroiliitis. *AJR* 1981;136:41-46.
98. Puhakka, K.B., et al., Imaging of sacroiliitis in early seronegative spondylarthropathy. Assessment of abnormalities by MR in comparison with radiography and CT. *Acta Radiol*, 2003. 44 (2): p. 218-29.
99. Gümüşdiş G, Doğanavşargil E. *Klinik Romatoloji, İzmir Güven Kitabevi İzmir*, 2003.
100. Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R, et al. ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:442-52.
101. Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, et al. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70 (6):896-904.
102. Zohling J, van der Heijde D, Dougados M, Braun J. Current evidence for the management of ankylosing spondylitis: a systematic literature review for the ASAS/EULAR management recommendations in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:423-32.
103. Wanders, A., et al., Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum*, 2005. 52 (6): p. 1756-65.

104. Lavie, F., et al., Pharmacotherapy (excluding biotherapies) for ankylosing spondylitis: development of recommendations for clinical practice based on published evidence and expert opinion. *Joint Bone Spine*, 2007. 74 (4): p. 346-52.
105. Dougados, M., et al., Conventional treatments for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61 Suppl 3: p. iii40-50.
106. Maugars, Y., et al., Assessment of the efficacy of sacroiliac corticosteroid injections in spondylarthropathies: a double-blind study. *Br J Rheumatol*, 1996. 35 (8): p. 767-70.
107. Chen, J. and C. Liu, Sulfasalazine for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005 (2): p. CD004800.
108. Clegg, D.O., et al., Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of ankylosing spondylitis. A Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Arthritis Rheum*, 1996. 39 (12): p. 2004-12.
109. Chen, J., et al., Methotrexate for ankylosing spondylitis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013. 2: p. CD004524.
110. Haibel H, Brandt HC, Song IH, et al. No efficacy of subcutaneous methotrexate in active ankylosing spondylitis: a 16 week open label trial. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:419-21.
111. Birlik, M.A.N., Ankilozan Spondilit özel sayısı. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 2007. 3 (Ankilozan Spondilitin Medikal Tedavisi): p. 56-64.
112. Huang, F., et al., One-year open-label trial of thalidomide in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 2002. 47 (3): p. 249-54.
113. Toussiot, E. and D. Wendling, Antiinflammatory treatment with bisphosphonates in ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol*, 2007. 19 (4): p. 340-5.
114. De Keyser, F., F. Van den Bosch, and H. Mielants, Anti-TNF-alpha therapy in ankylosing spondylitis. *Cytokine*, 2006. 33 (5): p. 294-8.
115. Van der Heijde, D., et al., Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT). *Arthritis Rheum*, 2005. 52 (2): p. 582-91.
116. Davis, J.C., Jr., et al., Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*, 2003. 48 (11): p. 3230-6.

117. Van der Heijde, D., et al., Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 2006. 54 (7): p. 2136-46.
118. Van der Heijde, D., et al., 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2011. 70 (6): p. 905-8.
119. Rudwaleit, M., et al., Adalimumab is effective and well tolerated in treating patients with ankylosing spondylitis who have advanced spinal fusion. *Rheumatology (Oxford)*, 2009. 48 (5): p. 551-7.
120. Dougados, M., et al., Efficacy of etanercept on rheumatic signs and pulmonary function tests in advanced ankylosing spondylitis: results of a randomised double-blind placebo-controlled study (SPINE). *Ann Rheum Dis*, 2011. 70 (5): p. 799-804.
121. Inman, R.D., et al., Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum*, 2008. 58 (11): p. 3402-12.
122. Goh, L. and A. Samanta, Update on biologic therapies in ankylosing spondylitis: a literature review. *Int J Rheum Dis*, 2012. 15 (5): p. 445-54.
123. Giles, J.T. and J.M. Bathon, Serious infections associated with anticytokine therapies in the rheumatic diseases. *J Intensive Care Med*, 2004. 19 (6): p. 320-34.
124. Braun, J., et al., First update of the international ASAS consensus statement for the use of anti-TNF agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65 (3): p. 316-20.
125. InternationalHapMapProject
(internet),Erisim:10.08.2008<http://www.hapmap.org/about/hapmap.html>
126. Turnpenny, P. & Ellard, S. 2005. *Emery's Elements of Medical Genetics*, 12th. ed. Elsevier, London
127. Minisatelliterepeats
(internet),erisim:04.03.2009<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> National Library of Medicine - Medical Subject Headings 2009 MeSH
128. Hayes JD, Wolf CR. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem J*. 1990; 272 (2): 281-95.

129. Marie JP, Legrand O. Drug Resistance in Acute Leukaemia and Reversion. *Turk J Med Sci.* 2003; 33: 271-9.
130. Ian P. Hall, Munir Pirmohamed: *Pharmacogenetics*, Taylor & Francis, 144
131. Szakacs G., Chen G.K., Gottesman M.M., : The molecular mysteries underlying P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance, *Cancer biology&therapy* 2004; 3:4, 382-384
132. Ambudkar S.V., Sarfaty C.K., Sauna Z.E. ve ark. : P-glycoprotein: from genomics to mechanism, *Oncogene* 2003; 22, 7468–7485
133. Juliano R.L., Ling, V. : A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1976; 455, 152–162
134. Gerlach, J.H. ve ark. : Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 1986;324, 485–489
135. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. : Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48–58
136. Chin JE., Soffir R., Noonan KE.,ve ark. (1989): Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3808-3820
137. Bodor M., Kelly E.J., ve Ho R.J.: Characterization of the Human MDR1 Gene, *The AAPS Journal* 2005; 7 (1) Article 1
138. Sakaeda T. : MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005; 20 (6): 391-414
139. Scotto K.W., Johnson R.A. :Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. *MolInterv.* 2001; 1 (2): 117-125
140. Seeling A., (1998): A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem*; 251: 252-261.
141. 141.MDR1 gene (internette), erişim: 10.08.2008 OMIM *171050 Online Mendelian Inheritance of Man Johns Hopkins University World Wide Web URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=171050>
142. Gottesman MM ve Pastan I. (1993): Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*; 62: 385–427
143. URL:<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB1&search=MDR1>

144. Klein I., Sarkadi B,Varadi A., (1999): An inventory of the human ABC proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1461 pp. 237–262.
145. Sarkadi B, Homolya L,Szakacks G, ve ark. (2006): Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters participation in a Chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86:1179- 1236
146. Richert, N.D., Aldwin, L., Nitecki, D., ve ark. (1988): Stability and covalent modification of Pglycoprotein in multidrug-resistant KB cells. *Biochemistry*, 27 (20):7607- 13
147. Chen, C., Chin, J.E., Ueda, K., ve ark., (1986): Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the Mdr1 (P-gp) gene from multi-drug resistant human cells. *Cell*, 47 (3):381- 389.
148. Ueda, K., Clark, D.P., Chen, C., ve ark. (1987): The human multi-drug resistance (mdr1) gene. *J Biol Chem*, 262 (2):505- 508.
149. Oude Elferink RP, Zadina J. (2001): MDR1 P-glycoprotein transports endogenous opioid peptides. *Peptides*. 22 (12):2015-20.
150. Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, ve ark. (2004): Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy *Neurology*. 2004 28;63 (6):1087-9.
151. Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, ve ark. (2002): Drug resistance in epilepsy expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy *Brain*. 125 (Pt 1):22-31
152. Kaya P, Gündüz U, Arpacı F, Ural AU, Guran S. Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. *Am J Hematol*. 2005; 80 (1): 26-34.
153. Kerb, R., (2006): Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett*, 234 (1):4-33.
154. Leschziner G.D., Andrew T., Pirmohamed M. ve ark. : ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research, *The Pharmacogenomics Journal* 2007; 7, 154–179

155. Brinkmann U., Roots I. ve Eichelbaum M. : Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy. *Drug Discov. Today*, 2001;6, 835–839
156. Saito S., Iida A., Sekine A., ve ark. : Three hundred twenty-six genetic variations in genes encoding nine members of ATP-binding cassette, subfamily B (ABCB/MDR/TAP), in the Japanese population. *J. Hum. Genet.*, 2002;47, 38–50
157. Evans W.E., McLeod H.L. : Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N. Engl. J. Med.*, 2003;348, 538–549
158. Schwab M., Eichelbaum M., Fromm M.F. : Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter.. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003;43, 285–307
159. Wang H., Ding K., Zhang Y. ve ark. : Comparative and evolutionary pharmacogenetics of ABCB1: complex signatures of positive selection on coding and regulatory regions, *Pharmacogenetics and Genomics* 2007, 17:667–678
160. Marzolini C., Paus E., Buclin T., ve ark. : Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 13–33
161. Chinn L.W., Kroetz D.L. : ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 265–269
162. Ameyaw M.M., Regaterio F., Li T., ve ark. : MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C.3435C>T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 217–221 85
163. Hitzl M., Drescher S., Kuip H., ve ark. : The c.3435C>T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the Pglycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001;11: 293–298
164. Li Y.H., Wang Y.H., Li Y., ve ark. : MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao*. 2006; 33 (2): 93-104
165. Cascorbi I., Gerloff T., Johne A., ve ark. : Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69 (3): 169–174

166. Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, Scavo D, Roma MI, et al. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics* 2007;8 (1):29-39.
167. Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I.-W., ve ark. (2007): A 'silent' polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315: 525-528.
168. Wasilewska A, Zalewski G, Chyczewski L, Zoch-Zwierz W. MDR-1 gene polymorphisms and clinical course of steroid-responsive nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 2007;22 (1):44-51.
169. Komoto C, Nakamura T, Sakaeda T, Kroetz DL, Yamada T, Omatsu H, et al. MDR1 haplotype frequencies in Japanese and Caucasian, and in Japanese patients with colorectal cancer and esophageal cancer. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006;21 (2):126-32.
170. Chowbay B, Cumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003;13 (2):89-95.
171. Gümüş-Akay G, Rüstemoğlu A, Karadağ A, Sunguroğlu A. Genotype and allele frequencies of MDR1 gene C.1236C>T polymorphism in a Turkish population. *Genet Mol Res* 2008;7 (4):1193-9.
172. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70 (2):189-99.
173. Gümüş-Akay G, Rüstemoğlu A, Karadağ A, Sunguroğlu A. Haplotype-based analysis of MDR1/ABCB1 gene polymorphisms in a Turkish population. *DNA Cell Biol* 2010;29 (2):83- 90.
174. Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008;112 (5):2024-7.
175. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, et al; Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and

- haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003;13 (8):481-94.
176. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A: A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: The Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994; 21: 2286-91
 177. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene.* 2006; 25: 5846-53
 178. Siddiqui A., Kerb R., Weale ME., ve ark. (2003): Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1” *N Engl J Med.* 10;348 (15):1442-8
 179. Pechandova K., Buzkova H., Slanar O., ve ark. (2006): Polymorphisms of the MDR1 Gene in the Czech Population *Folia Biologica (Praha)* 52, 184-189
 180. Tang K., Wong L. P., Lee P., ve ark (2004): Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus. *Hum. Molec. Genet.* 13: 783-797
 181. Schaeffeler E., Eichelbaum M., Brinkmann U. ve ark. (2001): Frequency of C.3435C>T polymorphism of MDR1 gene in African people. (Letter) *Lancet* 358: 383-384.
 182. Bebek N., Cine N., Oner G.O., Eskazan E., ve ark. (2005): Genotype and Allele Frequencies of MDR-1 C.3435C>T Polymorphism in Turkish Population. *Journal of Neurological Sciences (Turkish)* Volume 22, Number 3, Page (s) 261-266

EKLER

EK 1: BASDAI

Geçtiğimiz hafta ile ilgili olarak aşağıdaki her soruya yanıtınızı göstermek için, her bir çizgi üzerine lütfen bir işaret koyunuz.

ÖRNEK:



1. Halsizlik / yorgunluk düzeyinizi genel olarak nasıl tanımlarsınız?



2. Ankilozan spondilite bağlı boyun, sırt, bel veya kalça ağrılarınızın düzeyini genel olarak nasıl tanımlarsınız?



3. Boyun, sırt, bel ve kalçalarınız dışındaki diğer eklemlerinizdeki ağrı / şişliğin düzeyini genel olarak nasıl tanımlarsınız ?



4. Dokunmaya veya basıya karşı hassas olan bölgelerinizde duyduğunuz rahatsızlığın düzeyini genel olarak nasıl tanımlarsınız ?



5. Uyandıktan sonraki sabah tutukluğunuzun düzeyini genel olarak nasıl tanımlarsınız?



6. Uyandıktan sonraki sabah tutukluğunuz ne kadar sürüyor?



,