

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ANKİLOZAN SPONDİLİTLİ HASTALARDA TNF α ,
sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 VE NEOPTERİN
DÜZEYLERİNİN HASTALIK AKTİVİTESİ İLE
İLİŞKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. NERGİZ ZORBOZAN

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SÜLEYMAN DEMİR**

DENİZLİ-2014

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ANKİLOZAN SPONDİLİTLİ HASTALARDA TNF α ,
sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 VE NEOPTERİN
DÜZEYLERİNİN HASTALIK AKTİVİTESİ İLE
İLİŞKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. NERGİZ ZORBOZAN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. SÜLEYMAN DEMİR

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 21.07.2009 tarih ve
2011TPF034 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2014

Prof. Dr. Süleyman DEMİR danışmanlığında Dr. Nergiz ZORBOZAN tarafından yapılan “Ankilozan Spondilitli Hastalarda TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 ve Neopterin Düzeylerinin Hastalık Aktivitesi ile İlişkilerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışması 27/10/2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN



Prof. Dr. Diler ASLAN

ÜYE



Prof. Dr. Süleyman DEMİR

ÜYE



Prof. Dr. Mehmet Hicri KÖSEOĞLU

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Hasan HERKEN
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında aldığım eğitimim boyunca ilgi ve desteğini aldığım, tez çalışmamın başlangıcından sonuna kadar her adımda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Süleyman DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tıp eğitimimin ilk gününden itibaren bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Prof. Dr. Diler ASLAN, Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU, Prof. Dr. Simin ROTA, Prof. Dr. Hülya AYBEK ve Doç. Dr. Yaşar ENLİ'ye eğitimime yaptıkları katkılar için, teşekkür ederim. Örneklerin toplanması için kliniğini bize açan Prof. Dr. Veli ÇOBANKARA'ya, tezimin istatistik çalışmaları konusunda bana destek olan sevgili hocam Prof. Dr. Mehmet ZENCİR'e, eğitimim süresince birlikte görev yaptığım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Didem TUNCER, Dr. Koray KORKMAZCAN, Dr. Emine KAVALCI, Dr. Fatih YAMAN, Dr. Mahmut ŞENYURT, Dr. Cafer GÖNEN, Dr. Dilek İREN EMEKLİ, Dr. Esin AVCI ÇİÇEK ve Dr. Elif BAŞAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda hep yanımda olan en değerli varlığım eşim Orçun ZORBOZAN ve doğumu ile hayatımızı daha da anlamlandıran, canım oğlumuz Demir ZORBOZAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ	VII
TABLOLAR ÇİZELGESİ.....	VIII
KISALTMALAR.....	IX
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
ANKİLOZAN SPONDİLİT	4
Tanım ve Epidemiyoloji	4
Etiyoloji	4
Patogenez.....	5
Klinik	6
Tanı ve Sınıflama.....	8
Fizik Muayene	10
Laboratuvar Bulguları.....	10
Radyolojik Bulgular.....	10
Hastalık Aktivitesinin Değerlendirilmesi	11
Neopterin	12
sIL2R	14
TNF α , sTNFR1, sTNFR2	16
IL6.....	17
GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
ÇALIŞMA GRUBU	19
Hasta Grubu	19
Kontrol Grubu.....	19
Etik kurul onayı	19
Hasta Örneklerinin Toplanması ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması.....	20
KULLANILAN CİHAZLAR VE MALZEMELER	20
BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER	21
Ölçülen analitler.....	21

Ölçüm Yöntemleri	21
İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	32
BULGULAR.....	33
TARTIŞMA.....	39
SONUÇLAR.....	50
KAYNAKLAR.....	51
EKLER	58
Ek 1	

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil 1. Neopterin.....	12
Şekil 2. Neopterin türevlerinin biyosentezi.....	13
Şekil 3. IL2 reseptörleri	15
Şekil 4. IL6 JAK-Stat sinyal yolağı.....	18
Şekil 5. TNF α kalibrasyon eğrisi.....	23
Şekil 6. IL6 kalibrasyon eğrisi.....	25
Şekil 7. Neopterin kalibrasyon eğrisi	27
Şekil 8. sTNFR1 kalibrasyon eğrisi.....	29
Şekil 9. sTNFR2 kalibrasyon eğrisi.....	30
Şekil 10. AS'li hastalar ve kontrol grubunda TNF α düzeyleri	34
Şekil 11. AS'li hastalar ve kontrol grubunda sTNFR2 düzeyleri	34
Şekil 12. AS'li hastalar ve kontrol grubunda sIL2R düzeyleri	34
Şekil 13. AS'li hastalar ve kontrol grubunda IL6 düzeyleri	34
Şekil 14. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda TNF α düzeyleri ...	35
Şekil 15. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda sTNFR2 düzeyleri	35
Şekil 16. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda sIL2R düzeyleri ...	35
Şekil 17. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda IL6 düzeyleri	35
Şekil 18. IL6 ile CRP arasındaki regresyon eğrisi	37
Şekil 19. sIL2R ile CRP arasındaki regresyon eğrisi	38
Şekil 20. IL6 ile ESH arasındaki regresyon eğrisi	38

TABLÖLAR ÇİZELGESİ

Tablo 1. Roma, New York ve Modifiye New York kriterleri.....	9
Tablo 3. AS'li hastalar ve kontrol grubunda ölçülen analitlerin düzeyleri.....	33
Tablo 4. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda ölçülen analitlerin düzeyleri.....	36
Tablo 5. Aktif ve inaktif AS'li hastalarda ESH ve CRP düzeyleri.....	36
Tablo 6. CRP ve ESH ile serum sitokin düzeyleri arasındaki ilişki	37

KISALTMALAR

ADAM	: Disintegrin ve metalloenzim (<i>A disintegrin and metalloenzyme</i>)
AS	: Ankilozan spondilit
BASDAI	: Bath ankilozan spondilit hastalık aktivite indeksi
BASFI	: Bath ankilozan spondilit fonksiyonel indeksi
BASGI	: Bath ankilozan spondilit global indeksi
BASRI	: Bath ankilozan spondilit radyoloji indeksi
BASMI	: Bath ankilozan spondilit metroloji indeksi
CRP	: C-reaktif protein
EASIA	: Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay
ELISA	: Enzyme linked immune sorbent assay
ER	: Endoplazmik retikulum
ESH	: Eritrosit sedimentasyon hızı
HLA	: Human lökosit antijen
HRP	: Horseradish peroksidaz
IFN γ	: İnterferon γ
IgA	: İmmünglobulin A
IL	: İnterlökin
JAK	: Janus kinaz
MHC	: Major histokompatibilite kompleks
MR	: Magnetik rezonans
NFkβ	: Nükleer faktör kappa beta
NK	: Natural killer
PIAS	: Protein inhibitor of activated Stat
RA	: Romatoid artrit
SFI:DFI	: Dougados spondilit fonksiyonel indeksi
sIL2R	: Soluble interlökin2 reseptör
SLE	: Sistemik lupus eritamatozus
SOCS	: Suppressor of cytokine signalling
sTNFR	: Soluble tümör nekrozis faktör reseptör
Tac	: T hücre aktivatörü
TNF	: Tümör nekroz faktör

ÖZET

Ankilozan spondilitli hastalarda TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 ve neopterin düzeylerinin hastalık aktivitesi ile ilişkilerinin değerlendirilmesi

Dr. Nergiz ZORBOZAN

Ankilozan spondilit (AS) sık görülen, primer olarak aksiyel iskeleti ve sakroiliak eklemi tutan ilerleyici bir inflamatuvar romatolojik hastalıktır. Doğrudan ya da dolaylı olarak ciddi fonksiyonel ve sosyoekonomik kayıplara yol açmaktadır. AS patogenezi ile ilgili bilinenler sınırlıdır. Patogeneizde çevresel ve genetik faktörler yanında, son yıllarda sitokinlerin rolü incelenmektedir. Altta yatan patofizyolojik sürecin anlaşılması, tanının doğrulanması, prognozun öngörülmesi ve hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi için yeni biyobelirteçlere olan gereksinim artmıştır. Neopterin, hücrel immün reaksiyona bağlı hastalıklarla ilişkilidir ve hastalığın şiddeti, gelişimi ve klinik gidişi ile neopterin düzeyleri arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Soluble interlökin2 reseptör (sIL2R), IL2'yi düşük afinite ile bağlayan en önemli immün sistem düzenleyicilerinden biridir. Tümör nekroz faktör (TNF) α ve çözünebilir reseptörleri (soluble tümör nekrozis faktör reseptör 1 ve 2) (sTNFR1 ve sTNFR2) AS proinflamatuvar sürecinde kilit bir rol oynamaktadır. Artmış interlökin (IL)6 düzeyleri de periferal artritli hastalarda hastalık aktivitesi ile ilişkilidir.

Çalışmaya Modifiye New York tanı kriterlerine uyan, 160 AS'li hasta ve 80 sağlıklı kontrol alındı. Bath ankilozan spondilit hastalık aktivite indeksi (BASDAI) skor ölçümleri yapıldı. Tüm bireylerden alınan serumlardan TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 ve neopterin düzeyleri çalışıldı.

TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 düzeyleri AS'li hastalarda kontrol grubuna göre yüksek bulundu (tümünde p=0.0001). Hastalar BASDAI'ya göre aktif ve inaktif olarak gruplandırıldığında aktif ve inaktif hasta gruplarında, kontrol grubuna kıyasla TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 düzeyleri yüksekti (tümünde p<0.05). Aktif AS'li hastalarda

inaktif AS'li hastalara göre sTNFR2 düzeyi düştü (p=0.042). Geleneksel olarak kullanılan belirteçler olan eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) (p=0.0001) ve C-reaktif protein (CRP) (p=0.041) düzeyleri aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara göre yüksekti. AS'li hastalarda IL6 ile CRP (r=0.451, p=0.0001) ve ESH (r=0.297, p=0.0001) arasında, ayrıca sIL2R ile CRP (r=0.173, p=0.029) arasında zayıf pozitif ilişki bulundu

Sonuç olarak, AS'li hastalarda yüksek bulunan TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 AS immünopatogenezinde önemli bir role sahip olabilir ve AS'de inflamasyonu değerlendirmede kullanılabilir. sTNFR2 düzeyinin aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla düşük bulunması AS'de hastalık aktivitesini belirlemede sTNFR2'nin yararlı bir parametre olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ankilozan spondilit, hastalık aktivitesi, neopterin, TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6

ABSTRACT

The evaluation of the relationship between levels of TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 and neopterin with disease activity in ankylosing spondylitis

Dr. Nergiz ZORBOZAN

Ankylosing spondylitis (AS), primarily involving the axial skeleton and sacroiliac joint is a common, progressive inflammatory rheumatic disease and directly or indirectly leads to serious functional and socioeconomic losses. The current understanding of the pathogenesis of this disorder is limited. In addition to genetic and environmental factors in the pathogenesis, the roles of cytokines in recent years are investigated. Need for new biomarkers is increasing to understanding pathophysiologic processes that are underlying the disease; and to predict prognosis, to confirm diagnosis and to assess the disease activity and response to treatment. Neopterin is related to diseases associated with cellular immune reactions and there is strong correlation between the levels of neopterin and the severity, development and clinical outcomes of the disease. Soluble interleukin 2 receptor (sIL2R), one of the most important immune system regulators, binds IL2 with low affinity. Tumour necrosis factor (TNF) α and its soluble receptors (soluble tumour necrosis factor receptor 1 ve 2) (sTNFR1 and sTNFR2) play a key proinflammatory role in AS. Increased interleukin (IL) 6 levels in patients with peripheral arthritis has also correlated with measures of disease activity.

One hundred sixty patients diagnosed as AS according to the Modified New York Criteria and 80 healthy controls were included in the study. Patients were evaluated with Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) score. TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 and neopterin levels were measured in all of the sera obtained from participants and compared with traditional biomarkers, Erythrocyte sedimentation rate (ESH) and C-reactive protein (CRP).

Serum TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 levels were found higher values in AS patients than in controls (p=0.0001, in all). When the AS patients were grouped as active or inactive according to the BASDAI, serum TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 levels were higher in active and inactive patients than in control group (p<0.0001, in all) while serum sTNFR2 levels were found lower values in active group than in inactive group (p=0.042). Levels of traditionally used markers, ESH (p=0.0001) and CRP (p=0.041) were higher in patients with active AS than in patients with inactive AS. In patient with AS, sIL2R levels were weakly correlated with CRP (r=0.173, p=0.029). IL6 levels were weakly correlated with ESH and CRP (r=0.297, p=0.0001 and r=0.451, p=0.0001, respectively).

In conclusion, the high values of TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 in AS patient may have important roles in the immunopathogenesis of disease and they may be used to assess of activity of disease.

Key words: Ankylosing spondylitis, disease activity, neopterin, TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6

GİRİŞ

Ankilozan spondilit (AS) aksiyal iskelet tutulumu veya periferik oligoartriti içeren klinik tablolardan oluşan hastalık grubudur. Genellikle sinovial zarla ilişkisi olmayan vertebral cisim gibi bölgelerde inflamasyon bulunmaktadır. Sakroileit ana tanısal belirtidir. T lenfositlerin iskelet ve kalça eklemindeki akut inflamatuvar lezyonların gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Patogenezi ile ilgili bilgiler artmış olsa da henüz tam olarak aydınlatılmış değildir (1).

Son yıllarda inflamatuvar artrit patogenezinde sitokinlerin rolü incelenmiş ve sinovial doku ve serumda sitokin düzeylerinin arttığı bulunmuştur (2). Tanının konulması, dokulara verdiği hasarı da içeren hastalığın aktivitesinin değerlendirilmesi, prognozun öngörülmesi gibi hastalığın farklı yönleri için biyobelirteçler yararlıdır. AS tanısı için human lökosit antijen (HLA)-B27, hastalık aktivitesi için ise eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve C reaktif protein (CRP) kullanılmaktadır. Son gelişmeler altta yatan patofizyolojik sürecin anlaşılması, tanının doğrulanması, prognozun öngörülmesi, hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi ve tedaviye yanıtın öngörülmesi için biyobelirteçlere olan gereksinimi artırmıştır (3).

Spondiloartropatilerin prototipi olan AS proinflamatuvar sürecinde tümör nekroz faktör (TNF) alfa kilit bir rol oynamaktadır (4). Aşırı TNF α ekspresyonu ile karakterize bir transgenik fare modelinde insandaki hastalığa çok benzeyen bir spondilit geliştiği gösterilmiştir (5). Spinal inflamasyon, etkilenen eklem ve kemik yapılarında artmış TNF α mRNA ve proteinlerinin varlığı ile ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle TNF α inhibisyonunun AS semptom ve bulgularını önemli ölçüde iyileştirdiği saptanmıştır. Benzer şekilde TNF α inhibisyonu tedavisinden altı hafta sonra inflamatuvar lezyonlarda öncesine göre belirgin azalma ve 2 yıl devam eden tedaviyle spinal inflamasyonda düzelme bildirilmiştir (4).

TNF α primer olarak aktive olmuş makrofajlarda üretilmektedir (6). Başlıca etkilerini soluble tümör nekroz faktör reseptör (sTNFR) 1 (55 kDa) ve sTNFR2 (75 kDa) olan 2 spesifik reseptöre bağlanarak göstermektedir. sTNFR1 ve sTNFR2, biyolojik TNF α aktivite düzenleyicileri olarak rol oynar (7). Her iki reseptör hücre yüzeyinden TNF için ligand olarak membranda bulunan TNFR'leri ile rekabet eden sTNFR1 ve sTNFR2 formunda ortama salınır ve böylece TNF'nin etkilerini inhibe eder. Bu nedenle TNF'nin doğal antagonisti olarak kabul edilirler (6).

Neopterin 2-amino 4-hidroksi-(1', 2', 3' trihidroksipropil) pteridin olarak adlandırılan pirazino-pirimidin türevidir ve guanozin trifosfat (GTP)'ın biopterin sentez yolunda oluşan bir metabolitidir. Aktive olmuş T hücrelerinde oluşan interferon gama (IFN γ)'ya yanıt olarak aktive olmuş makrofajlar tarafından sentezlenir (8). Serum ya da idrar gibi vücut sıvılarındaki neopterin konsantrasyon artışı, enfeksiyon, otoimmün hastalıklar, organ transplantasyon rejeksiyonu ve bazı maligniteler gibi hücrel immün reaksiyona bağlı hastalıklarla ilişkilidir (9-13). Hastalığın şiddeti, gelişimi ve klinik gidişi ile neopterin düzeyleri arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Neopterin aktive olmuş makrofajların sitotoksik potansiyelini artırır, redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve çeşitli hücre serilerinde apoptozisi indükler (14,15). İmmün sistemin aktivasyonu enfeksiyon, otoimmün ve malign hastalıklar ya da allograft transplantasyon olgularında önemli bir rol oynamaktadır (9-13). Bu hastalıkların patogenezinin aydınlatılması ve uygun tedavileri için hastalarda immünolojik değişikliklerin erken ve duyarlı bir şekilde izlenmesi önemlidir (16). Vücut sıvılarında neopterin ölçümü hücrel immün aktivasyonun izlenmesini sağlayabilir (17).

İnterlökin (IL) 6 çoğunlukla monofagositer hücreler ve aktive olmuş T hücreleri tarafından sekrete edilen sitokindir. Spondiloartritli hastalarda IL6 ekspresyonunun artmış olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır (1). AS'li hastalarda sağlıklı kişilere göre düzeyi yüksek bulunmaktadır ve periferal artritli hastalarda artmış IL6 düzeyi ile hastalık aktivitesi arasında ilişki saptanmıştır (16).

Soluble interlökin 2 reseptör (sIL2R) IL2'yi düşük afinite ile bağlayan en önemli immün sistem düzenleyicilerinden biridir. Spondiloartritlerin prototipi olan AS'li hastalarda yapılan bir çalışmada IL6 düzeyleri CRP ile ve sIL2R, IL6, TNF α ESH ile ilişkili bulunmuştur (2).

Ankilozan spondilitte hastalık aktivitesinin ve hastanın fonksiyonlarının değerlendirilmesi, hastaya planlanan tedavinin seçimi, hastanın izlemi ve tedaviye yanıtının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu amaçla çeşitli ölçüm indeksleri geliştirilmiştir: "Bath ankilozan spondilit hastalık aktivite indeksi (BASDAI)", "Bath ankilozan spondilit fonksiyonel indeksi (BASFI)", "Dougados fonksiyonel indeksi", "Bath ankilozan spondilit metroloji indeksi (BASMI)", "Bath ankilozan spondilit global (genel değerlendirme) indeksi" ve "Dougados spondilit fonksiyonel indeksi (SFI:DFI)". Ayrıca omurga ve kalçadaki radyolojik hasarın değerlendirilmesini amaçlayan "Bath ankilozan spondilit radyoloji indeksi (BASRI)" geliştirilmiştir. BASDAI hastalık aktivitesinin belirlenebilmesi için ağrı, halsizlik, hassasiyet, sabah tutukluluğu ile ilgili toplam altı sorudan oluşan skorlamadır. BASDAI AS hastalık aktivitesinin belirlenmesinde altın standart olarak kullanılmaktadır (3).

Tüm bu bilgilerin doğrultusunda, bu çalışmanın amacı ankilozan spondilitli hastalarda TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 ve hücrel immüitenin göstergesi olan neopterin düzeylerini değerlendirerek tam olarak aydınlatılmamış AS patogenezinde hücrel immüitenin rolünü sorgulamaktır. Ayrıca bu parametrelerin hastalık aktivitesi ile olan ilişkisi ortaya çıkarılmaya çalışılacaktır. Böylece hastalığın aktif olup olmadığının belirlenmesinde geleneksel olarak kullanılan CRP ve ESH'nın yerini alıp almayacağını araştırılacaktır. Bu konuda yapılmış çalışmalar kısıtlıdır.

GENEL BİLGİLER

ANKİLOZAN SPONDİLİT

Tanım ve Epidemiyoloji

Spondiloartritler asimetrik tutulumla giden sinoviyal eklem inflamasyonu ile karakterize hastalıklar grubudur. Bu hastalıklar AS, psöriatik artrit, reaktif artrit, inflamatuvar barsak hastalığı ile ilişkili artrit ve farklılaşmamış spondiloartrit olmak üzere beş farklı fenotipten oluşur (18). AS kronik inflamatuvar hastalıklar olarak bilinen spondiloartropatilerin ana alt tipidir (19).

Ankilozan spondilit sıklıkla genç erişkinleri etkilemektedir. Başlangıç yaşı çoğunlukla 20-30 yaş arasındadır. Hastaların yaklaşık %80'inde semptomlar otuzlu yaşlardan önce görülür. Erkekler kadınlara göre daha sık etkilenmektedir (20). Türkiye'de erkek/ kadın oranı 1.2/1'dir. (21). Avrupa verilerine göre, genel olarak AS prevalansı %0.1-1.4 arasında iken yıllık insidansı 100000'de 0.5-14'tür (22). Türkiye'de ise AS prevalansı %0.49'dur (21). Bu değer etnik kökene, seçilen popülasyona, HLA-B27 sıklığına ve tanı için kullanılan tarama kriterlerine bağlı olarak değişmektedir (20).

Etiyoloji

Yoğun araştırmalara rağmen AS ve diğer spondiloartritlerin kesin nedeni bilinmemektedir fakat patogeneizde genetik ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir (20). Hastalığın oluşması için gerekli genetik etkinin payı %80-90 arasında değişmektedir. Monozigotik ikizlerde birlikte görülme oranı %50-75 iken dizigotik ikizlerde bu oran %15 olarak bulunmuştur. Bu durumun monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlere göre daha güçlü olması hastalık oluşumundaki ailesel etkinin çevresel faktörlerden ziyade genetik faktörlere bağlı olduğunu göstermektedir (23).

HLA-B27 ile AS arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. HLA-B27 major histokompatibilite kompleks sınıf 1 molekülünün HLA-B allelidir ve AS oluşumu için en etkili genetik belirleyicidir (20). AS'deki genetik riskin %20-30'una katkıda bulunmaktadır. Beyaz ırktan olan AS olgularının %90-95'inde pozitifdir (5). HLA-B27'nin Batı Avrupa'daki prevalansı %3-18 arasında değişmektedir (24). HLA geni 6. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır ve HLA-B27 geninin alt tipleri olarak bilinen ve en az 31 adet birbiriyle yakından ilişkili allel ailesini belirlemektedir. HLA-B27'nin bütün alt tipleri AS'ye yatkınlık oluşturmamaktadır. HLA-B27 genine sahip birçok kişide AS gelişmediği gösterilmiştir (20). Örneğin Güneydoğu Asya'da sık görülen HLA-B2706 ve Sardunya'da görülen HLA-B2709 varlığında AS'ye yatkınlık oluşmamaktadır (25). Bu ailenin en yaygın alt tipleri olan HLA-B2705, HLA-B2702, HLA-B2704 ve HLA-B2707 ise AS ile ilişkili HLA-B27 alt tipleridir. HLA-B27 dışı genler de AS gelişiminde rol oynayabilmektedir (20,26).

Patogenez

Patogenez hakkında bilinenler sınırlıdır. Hastalık mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar hastalığı başlatan faktörlerin belirlenmesi, inflamasyon mediatörleri ve hastalık süreç düzenleyicileri üzerine odaklanmıştır. AS gelişme riski yaklaşık olarak % 90 kalıtsal etmenlere bağlıdır ve genetik risk faktörlerinin en bilineni HLAB27 molekülüdür. HLAB27 molekülün AS patogenezindeki etkisi ile ilgili çeşitli olası mekanizmalar öne sürülmektedir fakat bu konu ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmasına rağmen henüz nasıl yatkınlık oluşturduğuna dair fikir birliğine varılamamıştır. Çevresel faktörlerin AS oluşumuna katkısı ise bilinmemektedir (20).

Hücre içi patojenlere karşı konak savunmasında etkin ana sitokinler arasında TNF α , IFN γ ve IL10 öne çıkmaktadır. TNF α ve IFN γ potent antibakteriyel Th1 sitokini iken IL10, Th2 sitokini'dir. HLAB27 pozitif AS'li hastalarda Th1 sitokin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Reaktif artrit başlangıcında kanda TNF α miktarında azalma gözlenmektedir. Bozulmuş Th1 sitokin üretimi bakterilerin

ortadan kaldırılması geciktirerek persistan enfeksiyona neden olmaktadır. TNFR1 elimine edilmiş farelerde yersinia enfeksiyonu sonrası daha ciddi artrit meydana gelmektedir. Reaktif artrit hem CD4 hem de CD8 pozitif hücrelerin daha fazla TNF α ve IFN γ üretimine neden olan TH1 profiline neden olduğu bu durumun reaktif artritte T hücrelerinin Th1 sitokinlerinin üretimini arttırarak patogeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir (25).

Klinik

Temel klinik özellikler sakroiliak ekleme ve aksiyel iskeletin diğer alanlarındaki inflamasyon nedeniyle oluşan sırt ağrısı, periferik artrit, entezit ve anterior üveittir. Kalp gibi diğer organlara ait belirtiler daha nadir görülmektedir. Spinal tutukluk, spinal inflamasyon ve yapısal hasar nedeniyle oluşan spinal hareket kaybı AS'nın karakteristik semptomlarıdır (22).

Ekleme Tutulumu

İlk semptomlar genellikle kronik bel ağrısı ve bel tutukluğudur. Hastaların %75'i bel ağrısı ile başvurmaktadır. Ağrı yavaş başlangıç göstermektedir ve künt karakterdedir. Bel ağrısının ve bel tutukluğunun sabah belirgin olması, istirahat ile artması ve egzersiz, fizik aktivite ile azalması karakteristiktir. Sabah tutukluğu 3 saate kadar uzayabilmektedir. Hastaların yaklaşık %40-60'ında periferik artrit ve entezit gibi diğer belirtiler ortaya çıkmaktadır (27). Periferik eklem tutulumu olanların %86'sında kalça eklemi etkilenmiştir.

İnflamatuvar süreç öncelikle entezislerde görülmektedir. Süreç yeni kemik oluşumu ve fibrozis ile devam etmektedir (28). Tendonların kemiğe yapışma bölgesinde meydana gelen bu inflamasyon oluşumu nedeniyle; kostosternal bileşke, spinöz çıkıntı, ilial kanat, büyük torakanter, iskiyal ve tibial tüberkül, aşil tendonun ve plantar fasyanın kemiğe tutunduğu bölgelerde hassasiyet ortaya çıkabilmektedir (29). Kalkaneusta değişiklik hastaların %63'ünde saptanmıştır (28). Kostovertebral,

kostosternal ve manibriosternal eklem tutulumu nedeniyle göğüs ağrısı oluşabilmekte, göğüs ekspansiyonunda azalma meydana gelebilmektedir (29).

Eklem Dışı Tutulum

Yorgunluk, kilo kaybı ve ateş genellikle ilk belirtilerdir. Hastaların %50-65'inde yorgunluk ana yakınmadır (28).

Göz Tutulumu: Anterior üveit ya da iridosiklit olarak tanımlanan iris ve silier cismin inflamasyonu AS'nin en yaygın artrit dışı bulgusudur. Tek taraflıdır ve akut başlangıçlıdır (29). Tipik bulgular ani başlangıçlı ağrı, kızarıklık ve fotofobidir. Makuler ödem olabilir, ancak kalıcı körlük nadirdir. HLA-B27 ile ilişkilidir (28). Üveitin şiddeti ile artiküler hastalık şiddeti arasında ilişki bulunmamaktadır (30).

Kardiak Tutulum: AS'li hastalarda kardiyak tutulum %5 oranında bildirilmiştir (28). Tutulum iletim bozukluğu, aort yetmezliği, asendan aortit, kardiyomegali ve perikardit şeklinde görülebilmektedir (29). Uzun süreli ve periferik eklem tutulumlu hastalığı olanlarda daha sık görülmektedir (28).

Akciğer Tutulumu: Akciğerde intertisyel anormallikler, amfizem, interlobüler septa, bronş duvarı ve plevrada kalınlaşma tespit edilebilmektedir (31). AS tanısından yaklaşık yirmi yıl sonra üst loblarda yavaş, ilerleyici fibrozis oluşabilmektedir (29).

Renal Tutulum: AS'li hastalarda özellikle immünglobulin A (IgA) içeren immün komplekslerin ve renal amiloid birikimi ile ilişkili glomerülofrit nedeniyle renal anormalliklerin görülme sıklığı artmaktadır (28). IgA glomerülofriti, mikroskopik hematüri, mikroalbuminüri, kreatinin klirensinde azalma gibi renal anormalliklerin görülme sıklığı %10-35 arasında değişmektedir (31).

Nörolojik tutulum: Hastalığın komplikasyonları sonucu oluşan spinal sinir kompresyonu nedeniyle gelişmektedir (20).

Gastrointestinal sistem tutulumu: Hastaların %60'ında proksimal kolon ve terminal ileumda makroskobik ve mikroskobik inflamasyon gösterilmiştir (28).

Tanı ve Sınıflama

Erken evrede sakroileit ayırıcı bir özelliktir (22). Özellikle genç erkeklerde inflamatuvar sırt ağrısı ve fizik muayenedeki tipik spinal anormallikler bulunması AS tanısını destekler. Buna karşın en spesifik tanısal bulgu karakteristik radyografik değişikliklerdir. AS tanısı persistan bel ağrısı ve tutukluğu, azalmış spinal hareketlilik ve en azından sakroiliak eklemi içeren radyografik değişiklik varlığına dayanılarak konulmaktadır (32).

1961 Roma kriterleri AS sınıflandırılması için geliştirilen ilk kriterdir (33). Romatologların klinik deneyimlerine dayanılarak önerilmiştir (32). 1966 yılında, düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip torasik ağrı ve üveitin belirtilen tanı kriterlerinden çıkartılması, New York sınıflandırma kriterleri ile sonuçlanmıştır. 1977 yılında inflamatuvar bel ağrılarını diğer kronik bel ağrısı nedenlerinden ayırmaya yardımcı olan kronik inflamatuvar bel ağrısı kriterleri önerilmiştir (33). Kronik inflamatuvar bel ağrısı kriterleri %95 duyarlılık ve % 85 özgüllüğe sahiptir (34).

Calin ve arkadaşlarına göre aşağıda belirtilen beş özellikten dördünün varlığı inflamatuvar bel ağrısını diğer sebeplere bağlı bel ağrısından ayırt etmektedir; başlangıç yaşı <40 yaş, sinsi başlangıç, egzersizle düzelme, sabah tutukluğu ve 3 aydan uzun süren bel ağrısı (35).

1984 yılında inflamatuvar bel ağrısı kavramı ile birleştirilmiş Modifiye New York kriterleri oluşturulmuştur (33). Tablo 1'de Roma, New York ve Modifiye New York kriterleri gösterilmiştir (36,37).

Tablo 1. Roma, New York ve Modifiye New York kriterleri

1961 Roma Kriterleri

Evre 3-4 sakroiliit ve en az 1 klinik ölçüt veya en az 4 klinik ölçüt kesin tanı koydurur

Klinik kriter

- Üç aydan uzun süren ve istirahatle azalmayan bel ağrısı ve tutukluk
- Torakal bölgede ağrı ve tutukluk
- Lomber bölgede hareket kısıtlılığı
- Göğüs ekspansiyonunda azalma
- İritis öyküsü veya belirtisi

Radyolojik kriter

- Bilateral sakroiliite ait radyolojik bulgular
-

1966 New York Kriterleri

Kesin AS

- Evre 3-4 bilateral sakroiliit ve en az 1 klinik kriter
- Evre 3-4 unilateral veya evre 2 bilateral sakroileit ve 1. klinik kriter veya 2. ve 3. klinik kriter

Olası AS

- Evre 3-4 bilateral sakroileit, klinik kriter yok
-

Klinik Kriter

- Lomber hareketin üç planda kısıtlı olması (fleksiyon, ekstansiyon ve lateral fleksiyon)
 - Lomber omurgada veya dorsolomber bölgede ağrı
 - Göğüs ekspansiyonunun 2.5 cm'den az olması (4. İnterkostal aralıktan)
-

Modifiye New York Kriterleri

Tek taraflı 3 ya da 4. derece sakroileit veya iki taraflı 2 veya 4. derece sakroileit ve herhangi bir klinik ölçüt kesin tanı koydurur

Klinik Kriter

- Egzersiz ile düzelen ve dinlenme ile azalmayan en az 3 ay süreli bel ağrısı
- Lomber omurganın sagittal ve frontal düzlemde hareket kısıtlılığı
- Göğüs ekspansiyonunda yas ve cins için normal değerlere göre azalma

Radyolojik Kriter

- İki taraflı 2 ya da 4. derece sakroileit
 - Tek taraflı 3 ya da 4. derece sakroileit
-

Fizik Muayene

Erken tanı için ayrıntılı bir fizik muayene yapılmalıdır. İlk patolojik fizik muayene bulgusu sakroiliak eklemden hassasiyet ve ağrıdır. Lomber lordozda düzleşme, lomber omurga hareketlerinde her yöne tutukluk bulunmaktadır. Servikal tutulum genellikle geç ortaya çıkmakta, özellikle ekstansiyon kısıtlanmaktadır. Atlantoaksiyal eklem subluksasyon riski romatoid artrit (RA)'ten fazladır. Kostovertebral eklem tutulumuna bağlı olarak göğüs ekspansiyonunda azalma beklenmektedir. Hastalarda genellikle lomber lordoz düzleşmekte, dorsal kifoz artmakta ve omuzlar düşmektedir. Boyun ve torakal tutulum nedeniyle ağırlık merkezini korumak için kalça ve dizler fleksiyona getirilmiştir. Zamanla boy kısalmaktadır. Abdomen çıkıntılı durmaktadır (28).

Laboratuvar Bulguları

Ankilozan spondilit için tanısal laboratuvar testi bulunmamaktadır. Aktif hastalıklı bireylerin sadece %50-70'inin CRP ve ESH düzeyleri artmıştır. İlimli düzeyde normokrom normositer anemi tespit edilebilmektedir. Ciddi hastalıkta alkalin fosfataz düzeylerinde artış görülebilmektedir. Serum IgA düzeyleri sıklıkla normal değerlerin altındadır (35). Trombosit sayısında hafif-orta derecede artış olabilmektedir. Romatoid faktör ve antinükleer antikor negatiftir. Serum kompleman düzeyleri normal veya artmıştır (28). Etkilenen eklemlerden alınan sinoviyal sıvının görünümü herhangi bir inflamatuvar eklem hastalığındakinden farklıdır (35).

Radyolojik Bulgular

Sakroileit hastalığın işaretidir. Başlangıç olarak eklem bulanık görülürken takip eden süreçte erozyon, skleroz ve eklem genişliğinde artma gözlenmektedir. Uzun süreli hastalıkta eklemlerde füzyon görülebilmektedir. Spinal radyografik değişiklikler marjinal vertebral cisim erozyonu, vertebra gövdesinde kareleşme ve komşu omurlar arasında kemik köprü ve sindesmofit oluşumudur. Şiddetli uzun

sürelî hastalıkta omurganın tam füzyonu (bambu omurga) oluşabilmektedir. Düz grafi hastalığın erken döneminde normal olabilmektedir. Bu nedenle MR görüntüleme AS'nin erken tanısında önemli bir rol oynamaktadır (38).

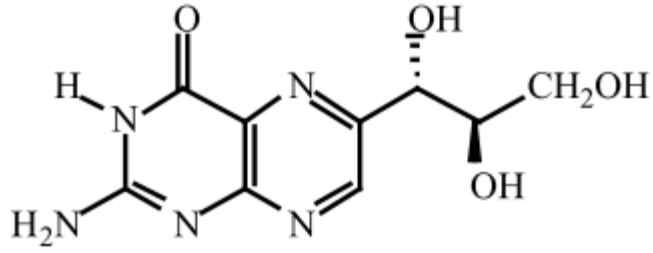
Hastalık Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Geleneksel laboratuvar testleri AS'li hastalarda klinik aktiviteyi ve radyolojik ilerlemeyi yansıtmamaktadır. Radyografik değişiklikler oluşan hasarı gösterdiği için AS'de tanısız özelliğe sahiptir. Buna karşın hastalık aktivitesine duyarlı değildir. Bu nedenle hastalık aktivitesinin değerlendirmesi için hasta tarafından doldurulan BASDAI, BASFI, BASMI, BASRI, BASGI ölçekleri kullanılmaya başlanmıştır (39).

Bath ankilozan spondilit hastalık aktivite indeksi hastalığın ilerlemesi ve prognoz hakkında bilgi vermektedir (28). Yorgunluk, spinal ağrı, eklem ağrısı veya şişliği, hassas bölgeler ve sabah tutukluluğunu içeren beş major semptomla ilgili altı sorudan oluşmaktadır. Sabah tutukluğu kalitatif ve kantitatif olarak sorgulanmaktadır. 10 cm'lik vizüel analog skala kullanılmakta, 0 = semptom yok, 10 = çok ciddi semptom, anlamına gelmektedir. Toplam BASDAI skoru 0-50 skalasının 0-10 skalasına çevrilmesiyle hesaplanmaktadır (40,41). Hasta tarafından uygulanması kolay, yaklaşık bir dakikada cevaplanabilir, güvenilir ve duyarlı bir ölçümdür (28). BASDAI AS tanısının konulmasında ve hastalık aktivitesinin belirlenmesinde altın standart olarak kullanılmaktadır (3).

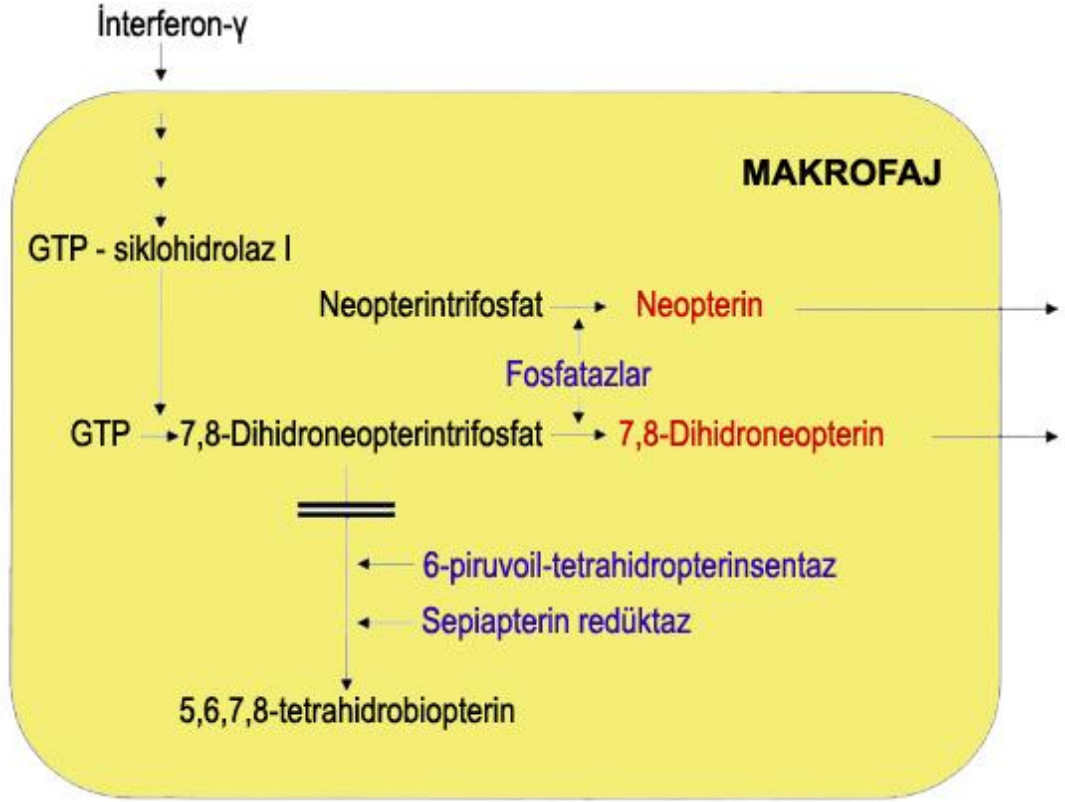
NEOPTERİN

Neopterin pteridin sınıfına ait, GTP'den sentezlenen 2-amino-6-(1,2',3'trihidroksipropil)-1*H*-pteridin-4-on bileşiğidir. Neopterinin molekül yapısı şekilde gösterilmiştir (Şekil 1) (17).



Şekil 1. Neopterin (17)

GTP-biopterin yolağının yan zincir ürünüdür (42). GTP, GTP siklohidrolaz I enzimi tarafından parçalanarak 7,8-dihidroneopterin trifosfat oluşturulmaktadır (17). Bu basamak hız sınırlayıcı basamaktır (43). Oluşan ara ürün 6-piruvoyl-tetrahidropterin sentaz ve sepiapterin redüktaz enzimleri aracılığı ile 5,6,7,8-tetrahidrobiopterine dönüştürülmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Neopterin türevlerinin biyosentezi (17).

Endotel hücreleri, fibroblastlar gibi pek çok hücrede, GTP siklohidrolaz I enzimi aracılığı ile tetrahydrobiopterin sentezi gerçekleşmektedir. Neopterin türevlerinin sentezi ise çok az miktarda olmaktadır (17).

İnterferon γ , GTP siklohidrolaz I enziminin güçlü aktivatörüdür. Antijenik uyarı sonrasında aktive olan T lenfosit ve natural killer (NK) hücrelerinden salıverilerek tetrahydrobiopterinin üretiminin artmasına neden olmaktadır. İnsan monosit ve makrofajlarında ise 6-piruvoil-tetrahydropterin sentaz enzim aktivitesi düşüktür. Bu nedenle GTP siklohidrolaz I enzim aktivitesinin artması durumunda, üretimi artan 7,8-dihidroneopterin trifosfat, fosfataz enzimi ile neopterin ve 7,8-dihidroneopterinine dönüştürülmektedir ve vucut sıvılarında neopterin ve 7,8-dihidroneopterin düzeylerinin artışına neden olmaktadır (42). Neopterin ve 7,8-dihidroneopterin vucut sıvılarıdaki artışıyla ilgili öne sürülen bir diğer mekanizma

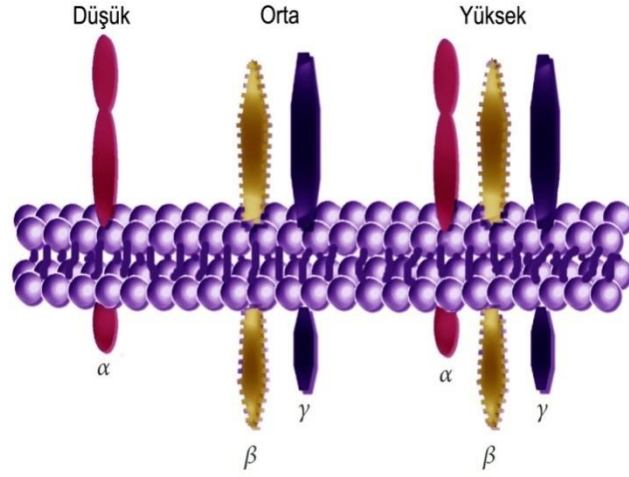
ise sentezi artan 7,8-dihidroneopterin trifosfat nedeniyle 6-piruvoil-tetrahidropterin sentaz enzim aktivitesinin göreceli olarak yetersiz kalmasıdır (17).

Neopterin türevlerinin biyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır fakat redoks sistemi ile ilişki olduğu bulunmuştur. Neopterin türevleri aktive makrofajlardan oksidatif patlama ile üretilen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırmaktadır ve sitotoksitelerini etkilemektedir (17). Nitrik oksit sentezini arttırmaktadır (44). Aktive makrofajların sitotoksik potansiyelini arttırmaktadır. Redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir ve çeşitli hücre serilerinde apoptozisi uyarmaktadır (15).

Neopterin, yüksek floresan doğası gereği immün aktivasyonun güçlü ve önemli bir belirteçidir. Özellikle otoimmün hastalıklar, transplant rejeksiyonu ve bazı maligniteler gibi hücrel immün yanıtla ilişkili hastalıklarda neopterin düzeylerinde artış tespit edilmiştir. Sepsis ve ateroskleroza içeren sayısız hastalıklarda ve enfeksiyonda artmış serum ve üriner neopterin düzeyleri tespit edilmiştir. Çoğu durumda hastalığın evresi ve prognozu neopterin üretimi ile ilişkili olabilmektedir (9-13,43,45).

SIL2R

İnterlökin 2, T helper, sitotoksik T hücre, B hücre, NK hücre ve makrofajları içeren immün sistem hücrelerini aktive eden potent bir immün düzenleyicidir. Biyolojik etkilerini hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile sağlamaktadır (46). 1984 yılında Rubin ve arkadaşları kültüre edilmiş insan T lenfosit virüs pozitif T lenfositlerde ve periferal mononükleer hücrelerde sIL2 reseptör varlığını bildirmiştir (47). Düşük, orta ve yüksek afiniteli olmak üzere bilinen 3 çeşit IL2 reseptör bulunmaktadır (46) (Şekil 3).



Şekil 3. IL2 reseptörleri (47)

Yüksek afiniteli reseptör alfa, beta ve gama zincirlerinden oluşan bir trimer, orta afiniteli reseptör beta ve gama zincirinden oluşan dimer ve düşük afiniteli reseptör ise alfa zincirinden oluşmuş monomerdur. Çeşitli polipeptid alt birimlerin farklı fonksiyonları bulunmaktadır. Alfa alt birimi IL2R sensivitesinde azalmaya, beta ve gama alt birimler janus kinaz (JAK)1 ve 3 yolağı ile hücre içi sinyal iletimine aracılık etmektedir. Yüksek afiniteli reseptörün alfa polipeptidi Tac (T hücre aktivatörü) antijen ya da CD25 olarak bilinmektedir ve reseptörün ekspre edildiği hücreden enzimatik olarak ayrılarak salıverilmektedir. 45 kDa'lık s-Tac ya da sIL2R serumda bulunmaktadır.

Sağlıklı insanlarda uyarılmamış T hücreler tarafından az miktarda sIL2R eksprese edilmektedir. Hücrel aktivasyon durumunda IL2R alfa ekspresyonunda hızlı bir artış olmaktadır. Otoimmün hastalıklar, organ transplantasyon rejeksiyonu ve bazı T ve B hücre kanserlerinde sIL2R düzeylerinde anlamlı artış görülmektedir (46). sIL2R, T hücre aktivasyon belirteci olarak kabul görmektedir (47). sIL2R düzeyleri RA'lı hasta serum ve sinovial sıvılarında hastalık aktivitesi ve tedavi cevabı ile ilişkili bulunmuştur (46).

TNFA, STNFR1, STNFR2

Tümör nekrozis faktör, α ve β formu bulunan bir lenfokindir. TNF α 157 aminoasit içermektedir. Makrofaj, eozinofil ve NK hücreleri tarafından, yaklaşık 25 kDA'lık nonglikozile protein olarak sentezlenmektedir. Sentezi primer olarak aktive olmuş monosit ve makrofajlar tarafından yapılmaktadır. TNF α için öncü molekül olan latent pro-TNF α , sentez sonrasında monosit ve diğer hücre yüzeyinde depolanmaktadır. *A disintegrin and metalloenzyme* (ADAM)-17 aracılığı pro-TNF α 'nin proteolitik ayrılması sonucunda çözünebilir ve aktif form olan 17 kDA'lık TNF α meydana gelmektedir. ADAM-17 enzimi TNF reseptörlerinin hücre yüzeyinden ayrılmasını da sağlamaktadır.

Tümör nekrozis faktör α immünoinflamatuvar reaksiyonlarda potent parakrin ve endokrin mediatör molekülü olarak görev yapmaktadır. TNF β 'nin sentezi TNF α 'ya göre daha azdır. Dolaşımda az miktarda bulunmaktadır. Sistemik hasar yerine lokal hasarlarda parakrin faktör olarak görev almaktadır. TNFR1'i tetikleme yeteneğinin düşük olması ve TNFR2 yolağını kullanamaması nedeniyle TNF α 'dan daha az potenttir.

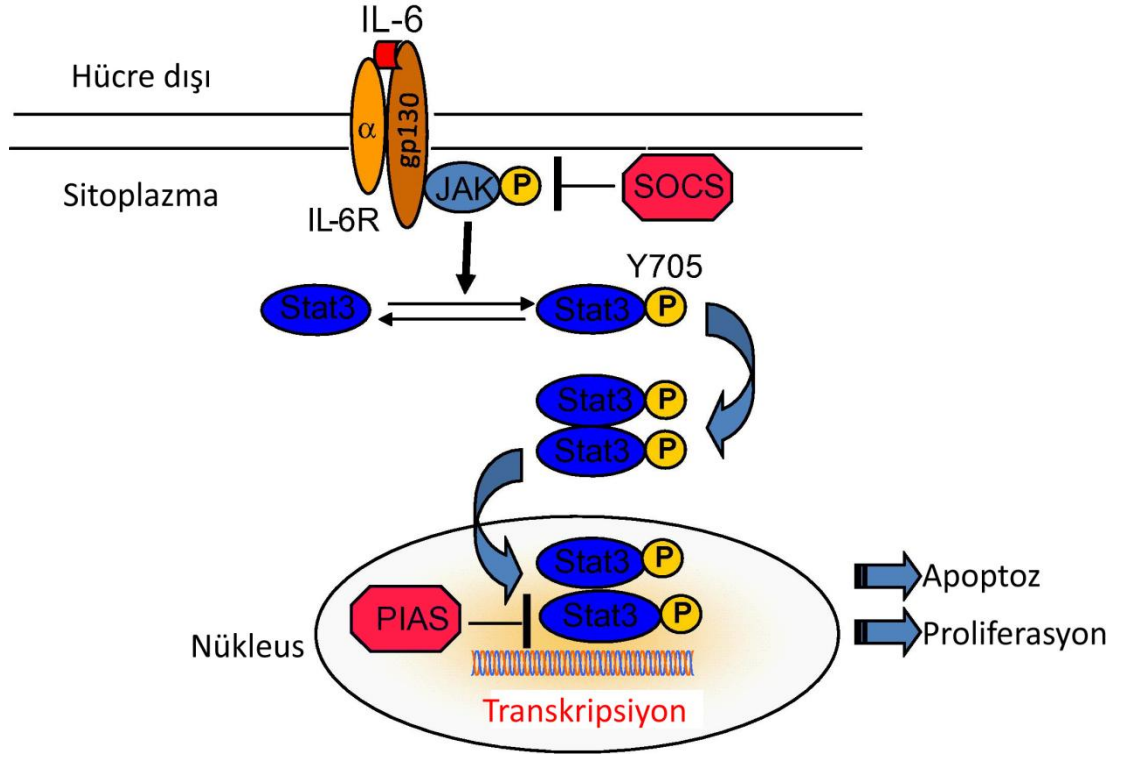
Tümör nekrozis faktör'ün TNFR1 ve TNFR2 olarak adlandırılan sırasıyla 55 ve 75 kDA'lık 2 reseptörü bulunmaktadır. TNFR2 baskın olarak hematopoetik hücrelerde eksprese edilebilirken, TNFR1 birçok hücrede eksprese edilmektedir. TNF α ve TNF β her iki reseptöre bağlanabilmektedir. TNFR1, TNF α aktivitesinin asıl mediatörüdür. Reseptörlerin her biri büyük bir sitoplazmik alt birime sahiptir ve intrasellüler kısımları arasında anlamlı benzerlik bulunmamaktadır. TNFR2'nin aksine TNFR1'in sitoplazmik kısmında *death domain* olarak adlandırılan, apoptoziste rol alan FAS proteininde de bulunan 80 aminoasitlik dizi bulunmaktadır (48,7). TNFR reseptörleri inhibe edilmiş fareler ile yapılan çalışmalar ve hücre kültürü çalışmalarına göre TNF ile aktive edilmiş proinflamatuvar ve programlanmış hücre ölümü yolları ve TNF ile ilişkili hücre hasarının oluşmasına büyük ölçüde TNFR1 aracılık etmektedir (49).

Reseptörler hücre içi farklı sinyal iletimi oluşturmaktadır. İmmünolojik etkilerin birçoğu NF- κ B yolağı sinyal iletimi ile sağlanmaktadır. Sinyal iletimi için TNF'in reseptörle ilişkisi önemlidir. TNF reseptör etkileşimi sonrasında fosfolipaz C'nin aktivasyonu ile diaçilgliserol oluşmaktadır. Diaçilgliserol sfingomyelinazı aktive ederek sfingomyelininden seramid oluşumuna neden olmaktadır. Böylelikle Mg^{+2} bağımlı protein kinaz aktive olmaktadır. Protein kinaz aktivasyonu, hücresel yanıtta çeşitli yolların aktiflenmesine aracılık etmektedir (48). Aktive hücre yüzeyinde bulunan ve ayrılarak seruma salınan sTNFR'ler, yüzeyde bulunan reseptörün yarışmalı inhibitörü olarak hareket etmektedir (50).

IL6

İnterlökin 6 aktive T hücre, fibroblast ve makrofajlar tarafından sentezlenmektedir. Molekül ağırlığı 26 kDA'dır. B hücre ve timosit için farklılaşma faktörü olarak görev yapmaktadır. T ve B hücre fonksiyonunu düzenleme, Ig sekresyonu, akut faz inflamatuvar reaksiyon ve hematopozi uyarma gibi görevleri bulunmaktadır. TNF α gibi, enfeksiyona karşı oluşturulan immün inflamatuvar cevap ve konak savunmasında önemli rolü bulunmaktadır (48). Geleneksel olarak akut faz düzenleyicisi ve lenfosit uyarıcı faktör olarak kabul görmektedir. Lökosit göçü, farklılaşması, aktivasyonu ve canlılığının kontrolünden sorumludur (51). Endotoksin, IL1 ve TNF α , IL6 salınımını arttırmaktadır (48).

İnterlökin 6 reseptörü 60 kD'luk bağlayıcı bir protein ile 130 kD'luk sinyal ileten gp130 alt biriminden oluşmaktadır. IL6 öncelikle IL6 reseptör ya da CD126 olarak da bilinen ve gp130 ile dimerizasyonu sonucunda hücredeki reseptörle ilişkili kinazların (JAK1, JAK2, tirozin kinaz 2) aktivasyonuna yol açan sinyal iletmeyen alfa reseptörüne bağlanarak hücre aktivasyonunu başlatmaktadır (52) (Şekil 4).



Şekil 4. IL6 JAK-Stat sinyal yolağı (53)

IL6, IL6 reseptörüne bağlanır ve Stat3 aktivasyonuna neden olan JAK kinaz fosforilasyon kaskadını uyarır. Aktive Stat3, apoptozis proliferasyon gibi hedef genlerin bulunduğu nükleusa doğru yer değiştirir. SOCS (*Suppressor of cytokine signalling*) ve PIAS (*Protein inhibitor of activated Stat*) proteinler IL6, JAK-Stat yolak aktivitesini baskılar.

İnterlökin 6 düzeyleri AS, sistemik lupus eritematozus (SLE), RA gibi otoimmün hastalıklarda yüksek olarak bulunmaktadır (48-52).

GEREÇ VE YÖNTEM

ÇALIŞMA GRUBU

Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen katılımcı sayısı güç analiz yöntemi ile belirlenmiştir.

Akut veya subakut viral/bakteriyel enfeksiyon, sistemik hastalık varlığı (AS dışı otoimmün hastalık, vasküler hastalık, trombotik olay, malignite varlığı, diabetes mellitus, hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği gibi), gebelik ve 18 yaş altı 65 yaş üzeri olma durumu dışlama kriterleri olarak kabul edilmiş, bu özelliklere sahip olmayan bireylerden hasta ve kontrol grubu oluşturulmuştur.

Hasta Grubu

Haziran 2011 – Nisan 2012 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Romatoloji Bilim Dalı tarafından AS tanısı konulan 18-65 yaş arası 91 erkek, 69 kadın toplam 160 hasta çalışmaya dahil edildi. Hasta grubuna, hastalık aktivitesini belirlemek için ağrı, halsizlik, hassasiyet, sabah tutukluluğu ile ilgili toplam altı sorudan oluşan BASDAI anketi (EK 1) yapıldı.

Kontrol Grubu

Kontrol grubu, hasta grubuna yaş ve cinsiyet olarak benzer, klinik şikayet ve bulgusu olmayan, sağlıklı 80 bireyden oluşturuldu.

Etik kurul onayı

Çalışma öncesi Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 14.06.2011 tarih ve 11 sayı no ile Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu onayı alındı. Ayrıca

çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılara “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” ile yapılacaklar hakkında bilgi verildi ve gönüllü olduklarına ilişkin imzaları alındı.

Hasta Örneklerinin Toplanması ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan sabah 8.30-10.30 saatleri arasında, 8-12 saatlik açlık sonrası ikisi jelli vakumlu (Vacutest, İtalya) ve birisi sedimentasyon tüpü (Berkhun, Türkiye) olmak üzere 3 tüpe venöz kan örnekleri alındı.

Kanlar alındıktan hemen sonra laboratuvara ulaştırıldı. Vakumlu jelli tüpe alınan kan pıhtılaşması için 20 dakika oda ısısında bekletildi. Bekletilen kan 2000 g’de 7 dakika santrifüj edildi. Bir tüpe serum CRP düzeyi çalışıldı. İkinci tüpün serumu TNF α , sTNFR1, sTNFR2, sIL2R, IL6 ve neopterin düzeylerinin ölçümü için kullanılmak üzere 6 ayrı ependorf tüpe ayrılarak analize kadar -20 derecede saklandı. Sedimentasyon aynı gün çalışıldı.

KULLANILAN CİHAZLAR VE MALZEMELER

Çalışmamızda laboratuvarda bulunan masa üstü santrifüj (NF 1215, Nüve, Türkiye), -20 °C Derin dondurucu (Beko, Türkiye), buzdolabı (Vestel, Türkiye), ayarlanabilir otomatik pipet seti (1-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L) (Eppendorf, ABD), çok kanallı otomatik pipet (30-300 μ L) (CAPP, Almanya), Enzim Linked Immün Sorbent Assay (ELISA) okuyucu (RT-2100C, Rayto, Çin), ELISA mikropate yıkayıcı (RT-3100, Rayto, Çin), otoanalizör (Roche Cobas 6000, Roche-Hitachi Diagnostics, Japonya), otoanalizör (Immolute 2000, Siemens, Japonya), sedimentasyon cihazı (SDM-100, Berkhun, Türkiye), 10-100 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L’lik pipet uçları (CLP, ABD), 1.5 mL’lik Eppendorf mikro tüpler (ISOLAB, Almanya), jelli vakumlu düz tüpler (VACUTEST, İtalya), sedimentasyon tüpü (Berkhun, Türkiye) kullanıldı.

BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Ölçülen analitler

Çalışmaya alınan bireylerin serumlarından CRP, neopterin, TNF α , sTNFR1, sTNFR2, IL6, sIL2R ölçümü yapıldı. Kan örneğinden ESH ölçümü yapıldı.

Ölçüm Yöntemleri

CRP

CRP kiti (Roche-Hitachi Diagnostics, Japonya) kullanılarak serumdan immüntürbidimetrik yöntem ile tespit edildi. Lateks partiküllere kaplı olan monoklonal anti-CRP antikorları ile örnekteki CRP arasında antijen-antikor reaksiyonu meydana gelir. Oluşan antijen-antikor kompleksi çöker. Bu çökme absorbans değişimi olarak belirlenir. 572 nm dalga boyunda absorbansdaki değişikliğin büyüklüğü ile örnekteki CRP düzeyi orantılıdır.

Kullanılan kitin ölçüm aralığı 0.1 - 25 mg/dL, en düşük saptama sınırı 0.1 mg/dL, referans aralığı 0 - 0.5 mg/dL idi.

ESH

Sitratlı tüplere alınan kan örneği karıştırılır ve cihaza yerleştirilir. 20 dakika boyunca optik sensör tarafından okuma yapılır. Bulunan değerler Westergren metodu ile oranlanarak 1 ve 2 saatlik sedimentasyon değerleri hesaplanır.

TNF α

“Invitrogen Human TNF α ELISA (ABD)” kiti kullanılarak serumdan Sandwich ELISA yöntemi ile tespit edildi. Standartlar, kalite kontrol ve hasta

örneklerinin, monoklonal TNF α antikoruna ile kaplı mikropakta inkübasyonunun ardından yıkama yapılarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı ve biyotinle işaretli anti-insan TNF α antikoruna eklenerek tekrar yıkama gerçekleştirildi. Streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) konjugat solüsyonunun ilave edilmesinin ardından son yıkama basamağı gerçekleştirilerek, yıkamanın ardından kalan konjugat ile reaksiyona giren substrat solüsyonu eklendi. Reaksiyona asidik durdurma solüsyonu eklendi. Mavi rengin sarıya dönüştüğü görüldü. Spektrofotometrede 450 nm’de absorbanlar elde edildi.

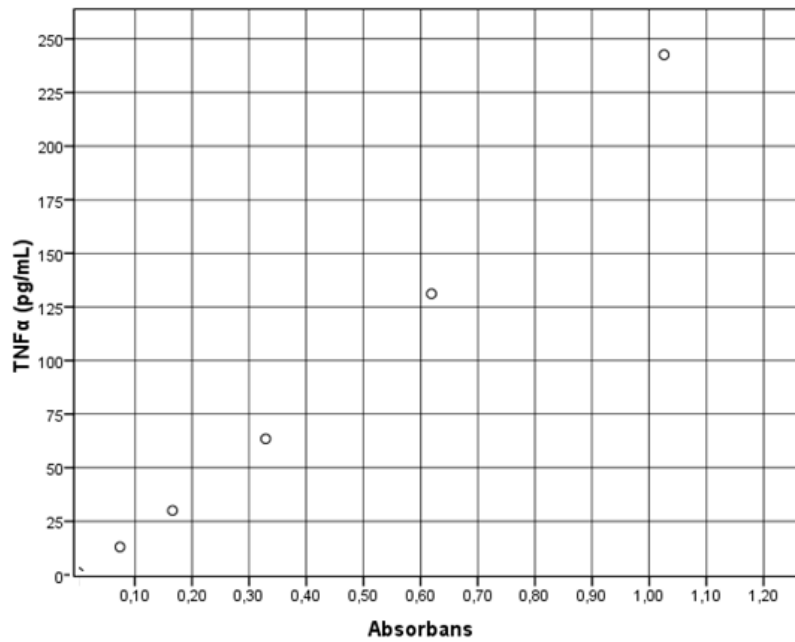
Reaktiflerinin Hazırlanması

Kit analiz öncesi 2-8°C’ de saklandığı için analiz öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Liyofilize standart, standart dilüent tamponu ile 2000 pg/mL konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. Hafifçe çalkalanarak 10 dakika bekletildi. Bu çözümden 300 μ L alınarak 300 μ L standart dilüent tamponu içeren tüpe aktarıldı ve bu tüp 1000 pg/mL human TNF α olarak etiketlendi. 500, 250, 125, 62.5, 31.2 ve 15.6 pg/mL human IL6 olarak etiketlenen 6 boş tüpe 300’er μ L standart dilüent tamponu eklendi ve şekilde tariflendiği gibi 300 μ L ile seri dilüsyon yapıldı. Konsantre halde bulunan streptavidin peroksidazın 120 μ L’si 12 mL streptavidin peroksidaz dilüenti ile 100 kat sulandırıldı ve kullanıma hazır streptavidin peroksidaz haline getirildi. 40 mL 25x konsantre yıkama tamponu distile su ile dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

TNF α Çalışma Basamakları

1. Dondurularak saklanmış olan hasta serumları oda ısısına getirildi.
2. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 50 μ L inkübasyon buffer eklendi.
3. Sıfır standart kuyucuğuna 100 μ L standart dilüent tamponu pipetlendi.
4. Standartlar ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara 100’er μ L pipetlendi.
5. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
6. Kuyucuklar boşaltılıp 400 μ L yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.

7. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 100'er μL biyotin konjugat pipetlendi ve plak hafifçe çalkalandı.
8. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
9. Kuyucuklar boşaltılıp 400 μL kullanıma hazır yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
10. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 100'er μL kullanıma hazır streptavidin peroksidaz pipetlendi.
11. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
12. Kuyucuklar boşaltılıp 400 μL kullanıma hazır yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
13. Tüm kuyucuklara 100'er μL stabilize kromojen pipetlendi.
14. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.
15. Tüm kuyucuklara 100'er μL durdurma çözeltisi eklendi ve hafifçe çalkalandı.
16. Kuyucukların absorbanı durdurma çözeltisinin eklenmesini takiben en geç 2 saat içinde 450 nm dalga boyunda kromojen körüne karşı elde edildi.
17. Çalışılan $\text{TNF}\alpha$ standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.
18. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki $\text{TNF}\alpha$ düzeyleri belirlendi (Şekil 5).



Şekil 5. $\text{TNF}\alpha$ kalibrasyon eğrisi

IL6

“Invitrogen Human IL6 ELISA (ABD)” kiti kullanılarak serumdan Sandwich ELISA yöntemi ile tespit edildi. Standartlar, kalite kontrol ve hasta örneklerinin, monoklonal IL6 antikoru ile kaplı mikropakta inkübasyonunun ardından yıkama yapılarak bağlanmayan antikolar uzaklaştırıldı ve biyotinle işaretli anti-insan IL6 antikoru eklenerek tekrar yıkama gerçekleştirildi. Streptavidin-HRP konjugat solüsyonunun ilave edilmesinin ardından son yıkama basamağı gerçekleştirilerek, yıkamanın ardından kalan konjugat ile reaksiyona giren substrat solüsyonu eklendi. Reaksiyona asidik durdurma solüsyonu eklendi. Mavi rengin sarıya dönüştüğü görüldü. Spektrofotometrede 450 nm’de absorbanslar elde edildi.

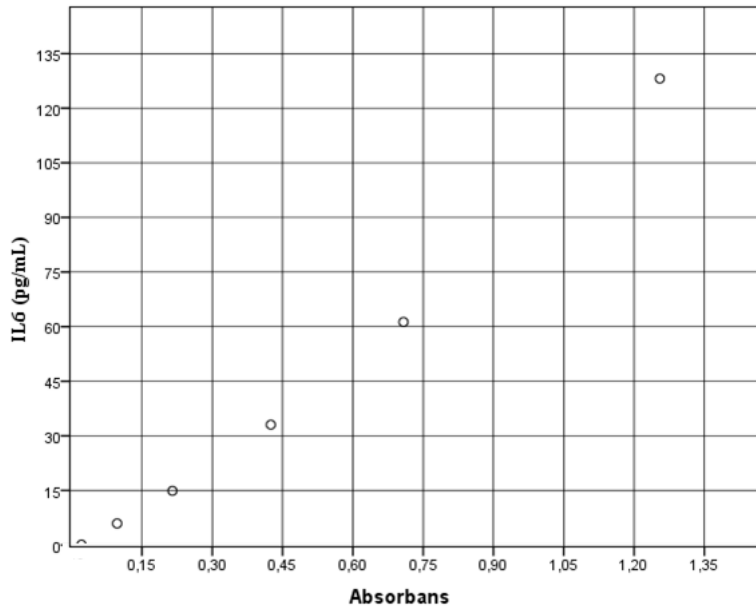
Reaktiflerinin Hazırlanması

Kit analiz öncesi 2-8°C’ de saklandığı için analiz öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Liyofilize standart, standart dilüent tamponu ile 2500 pg/mL konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. Hafifçe çalkalanarak 10 dakika bekletildi. Bu çözeltilerden 200 µL alınarak 800 µL standart dilüent tamponu içeren tüpe aktarıldı ve bu tüp 500 pg/mL human IL6 olarak etiketlendi. 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ve 7.8 pg/mL human IL6 olarak etiketlenen 6 boş tüpe 300’er µL standart dilüent tamponu eklendi ve şekilde tariflendiği gibi 300 µL ile seri dilüsyon yapıldı. Konsantre halde bulunan streptavidin peroksidazın 120 µL’si 12 mL streptavidin peroksidaz dilüenti ile 100 kat sulandırıldı ve kullanıma hazır streptavidin peroksidaz haline getirildi. 40 mL 25x konsantre yıkama tamponu distile su ile dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

IL6 Çalışma Basamakları

1. Dondurularak saklanmış olan hasta serumları oda ısısına getirildi.
2. Sıfır standart kuyucuğuna 100 µL standart dilüent tamponu pipetlendi.
3. Standartlar ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara 100’er µL pipetlendi.
4. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 50’şer µL biyotin konjugat pipetlendi ve plak hafifçe çalkalandı.
5. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

6. Kuyucuklar boşaltılıp 400 µL yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
7. Kromojen körü haricindeki tüm kuyucuklara 100'er µL kullanıma hazır streptavidin - HRP solüsyonu pipetlendi.
8. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
9. Kuyucuklar boşaltılıp 400 µL kullanıma hazır yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
10. Tüm kuyucuklara 100'er µL stabilize kromojen pipetlendi.
11. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.
12. Tüm kuyucuklara 100'er µL durdurma çözeltisi eklendi ve hafifçe çalkalandı.
13. Kuyucukların absorbansı durdurma çözeltisinin eklenmesini takiben en geç 2 saat içinde 450 nm dalga boyunda kromojen körüne karşı elde edildi.
14. Çalışılan IL6 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.
15. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki IL6 düzeyleri belirlendi (Şekil 6).



Şekil 6. IL6 kalibrasyon eğrisi

Neopterin

Neopterin düzeyleri “DRG Neopterin (EIA-1476) (ABD)” kiti kullanılarak serumdan ELISA yöntemi ile çalışıldı. Bu kit yarışmalı bağlanma temeline dayalı olarak ölçüm yapmaktadır. Mikroplak, monoklonal antikor ile kaplıdır. Hasta serumundaki endojen neopterin ile eklenen neopterin-biyotin konjugat, kaplı antikorlar için yarışmaya girer. İnkübasyon sonrası bağlı olmayan konjugat yıkama ile uzaklaştırılır. Neopterin-HRP enzim kompleksi ile inkübasyonun ardından ikinci yıkama basamağı uygulanır. Substrat solüsyonunun eklenmesi ile renk değişimi gözlenir. Rengin yoğunluğu hastadaki neopterin düzeyleri ile ters orantılıdır.

Reaktiflerinin Hazırlanması

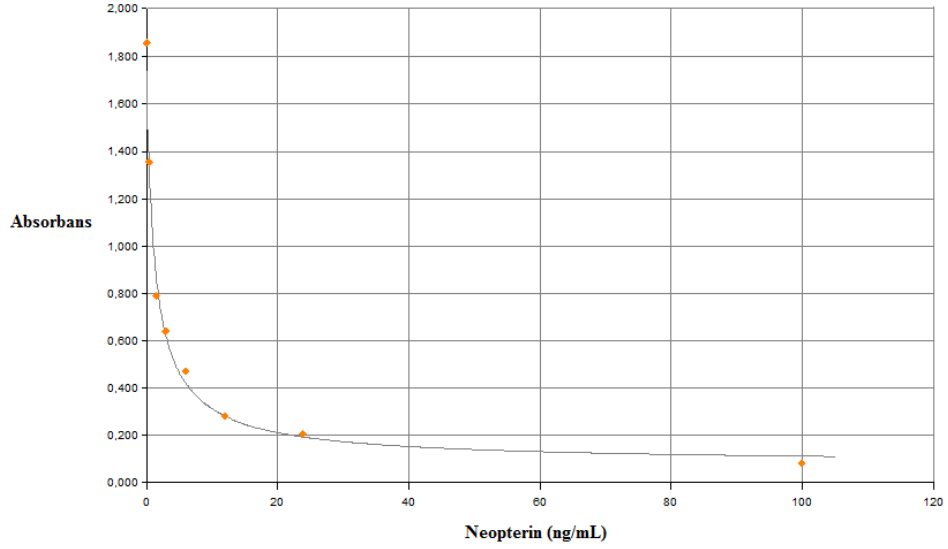
Analiz öncesi neopterin kontrol ve standartları -15°C 'de, kit içerisindeki diğer reaktifler $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklandığı için analiz öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.

Konsantre halde bulunan neopterin-HRP enzim konjugatının $100\ \mu\text{L}$ 'si $9.9\ \text{mL}$ neopterin enzim dilüenti ile 100 kat sulandırıldı ve kullanıma hazır neopterin-HRP enzim haline getirildi. $10\ \text{mL}$ 10x konsantre yıkama tamponu distile su ile sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

Neopterin Çalışma Basamakları

1. Dondurularak saklanmış olan hasta serumları oda ısısına getirildi.
2. Standart, kontrol ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara $25'$ er μL pipetlendi.
3. Kör kuyucuğuna $25\ \mu\text{L}$ "0" ng/mL standart ve $100\ \mu\text{L}$ neopterin enzim dilüenti eklendi.
4. Kör kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara $100\ \mu\text{L}$ dilüe enzim konjugatı eklendi.
5. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

6. Kuyucuklar boşaltılıp 300 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
7. Tüm kuyucuklara 100' er µL renklendirici substrat pipetlendi.
8. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
9. Tüm kuyucuklara 100 mikrolitre stop solüsyonu eklendi.
10. Kuyucukların absorbansı 450 nm dalga boyunda elde edildi.
11. Çalışılan neopterin standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.
12. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki neopterin düzeyleri belirlendi.



Şekil 7. Neopterin kalibrasyon eğrisi

sTNFR1

“Invitrogen Human sTNFR1 Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay (EASIA) (ABD)” kiti kullanılarak serumdan çalışıldı. Bu kit sTNFR1'nin farklı epitoplarına karşı yönlendirilmiş monoklonal antikorların karışımından oluşan oligoklonal sisteme dayalı olarak ölçüm yapmaktadır. Farklı sayıda monoklonal antikor kullanımı geniş bir aralıkta yüksek duyarlılıkta ölçüm ve kısa inkübasyon süresi sağlamaktadır. sTNFR1 içeren standart ve örnekler mikropakta kaplı

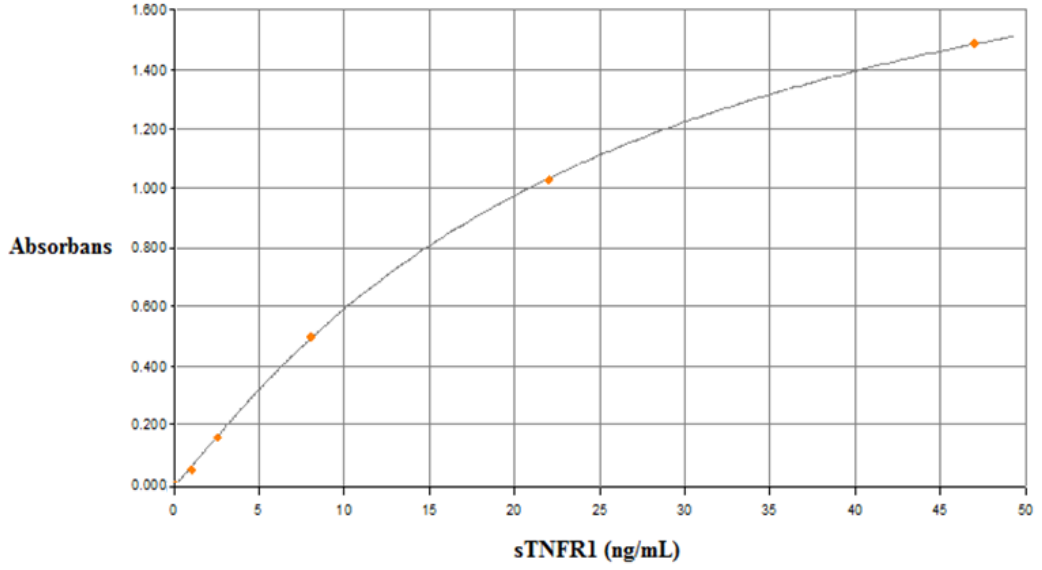
monoklonal antikorlar ve HRP'ye bağlı monoklonal antikorlar ile reaksiyona girer. İnkübasyon sonrası bağlı olmayan enzim bağlı antikorlar yıkama ile uzaklaştırılır. Substrat solüsyonunun eklenmesi ile renk değişimi gözlenir. Rengin yoğunluğu hastadaki sTNFR1 düzeyleri ile doğru orantılıdır.

Reaktiflerinin Hazırlanması

Kit analiz öncesi 2-8°C'de saklandığı için analiz öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Liyofilize standart ve kontroller 0.5 mL distile su ile sulandırıldı. Hafifçe çalkalanarak 10 dakika bekletildi. 10 mL 200x konsantre yıkama tamponu distile su ile dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

sTNFR1 Çalışma Basamakları

1. Dondurularak saklanmış olan hasta serumları oda ısısına getirildi.
2. Standart, kontrol ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi.
3. Tüm kuyucuklara 200 mikrolitre anti-sTNFR1-HRP konjugatı eklendi.
4. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
5. Kuyucuklar boşaltılıp 400 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
6. Tüm kuyucuklara 15 dk içinde 50'şer mikrolitre kromojen solüsyonu pipetlendi.
7. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
8. Tüm kuyucuklara 200 mikrolitre stop solüsyonu eklendi.
9. Tüm kuyucukların absorbansı 450 ve 490 nm dalga boyunda elde edildi.
10. Çalışılan sTNFR1 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.
11. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki sTNFR1 düzeyleri belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. sTNFR1 kalibrasyon eğrisi

sTNFR2

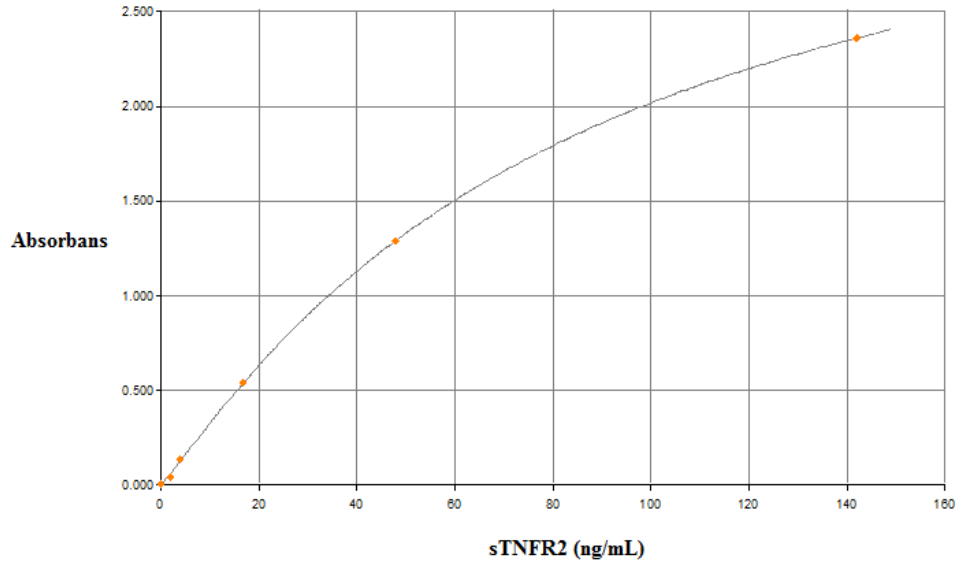
“Invitrogen Human sTNFR2 (EASIA) (ABD)” kiti kullanılarak serumdan çalışıldı. Bu kit sTNFR2'nin farklı epitoplarına karşı yönlendirilmiş monoklonal antikorların karışımından oluşan oligoklonal sisteme dayalı olarak ölçüm yapmaktadır. Farklı sayıda monoklonal antikor kullanımı geniş bir aralıkta yüksek duyarlılıkta ölçüm ve kısa inkübasyon süresi sağlamaktadır. sTNFR2 içeren standart ve örnekler mikropıakta kaplı monoklonal antikorlar ve HRP'ye bağılı monoklonal antikorlar ile reaksiyona girer. İnkübasyon sonrası bağılı olmayan enzim bağılı antikorlar yıkama ile uzaklaştırılır. Substrat solüsyonunun eklenmesi ile renk değışimi gözlenir. Rengin yoğunluğı hastadaki sTNFR2 düzeyleri ile doğıru orantılıdır.

Reaktiflerinin Hazırlanması

Kit analiz öncesi 2-8°C'de saklandığı için analiz öncesi tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Liyofilize standart ve kontroller 0.5 mL distile su ile sulandırıldı. Hafifçe çalkalanarak 10 dakika bekletildi. 10 mL 200x konsantrasyon yıkama tamponu distile su ile dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

STNFR2 Çalışma Basamakları

1. Dondurularak saklanmış olan hasta serumları oda ısısına getirildi.
2. Standart, kontrol ve hasta serumlarından uygun kuyucuklara 50'er μL pipetlendi.
3. Tüm kuyucuklara 200 mikrolitre anti-sTNFR 2-HRP konjugatı eklendi.
4. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
5. Kuyucuklar boşaltılıp 400 μL yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı ve kurutma kağıdına hafifçe vurarak kurutuldu.
6. Tüm kuyucuklara 15 dk içinde 50'şer mikrolitre kromojen solüsyonu pipetlendi.
7. Plağın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
8. Tüm kuyucuklara 200 mikrolitre stop solüsyonu eklendi.
9. Kuyucukların absorbansları 450 ve 490 nm dalga boyunda elde edildi.
10. Çalışılan sTNFR2 standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.
11. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta serumlarındaki sTNFR2 düzeyleri belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. sTNFR2 kalibrasyon eğrisi

sIL2R

“Immulite 2000, Siemens (Japonya)” cihazında sIL2R kiti ile serumdan çalışıldı. Solid faza kaplı olan monoklonal anti-IL2R antikoru ile alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş poliklonal anti-IL2R antikoru ve örnek karıştırılır. İnkübasyon sırasında örnek içinde bulunan sIL2R solid fazda bulunan monoklonal anti-IL2R antikoru bağlanır. Alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş poliklonal anti-IL2R antikoru oluşan bu komplekse bağlanarak sandiwich formasyonunu oluşturur. Bağlanmayan antikoru yıkama yapılarak ortamdan uzaklaştırılır. İnkübasyon sonrası kemilüminesan substrat eklenir. Sinyal değişimi örnekte bulunan sIL2R ile orantılıdır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesinde SPSS 17.0 (IBM, Chicago, ABD) paket programı kullanıldı. Çalışmadaki değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uymayan ölçümsel değişkenler, AS ve kontrol grubu arasındaki fark Mann-Whitney U testi ile analiz edildi ve ortanca (1. ve 3. çeyrek yüzdellikler) olarak ifade edildi. Aktif AS, inaktif AS ve kontrol grubu arasında parametrik koşulları sağlamayan değişkenlerde fark olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için, parametrik koşulları sağlamayan değişkenlere post-hoc testlerden (çoklu karşılaştırma testleri) Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı.

Değişkenler arasındaki ilişkinin gücü dağılımlar non-parametrik olduğundan spearman korelasyon testi ile gerçekleştirildi. ($y=b+ax$). Korelasyon analizinde rho (Spearman korelasyon katsayısı) değeri 0.000-0.49 aralığında iken zayıf ilişki, 0.50-0.69 aralığında iken orta ilişki, ≥ 0.70 olanlar ise güçlü ilişki olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

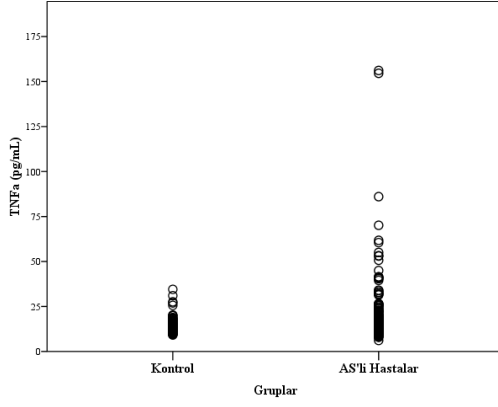
AS'li hastalar ve kontrol grubu yaş ve cinsiyet açısından birbirine benzer idi. AS'li hastalarda ve kontrol grubunda ortalama yaş (1. ve 3. çeyreklik) sırasıyla 38 (30-45) ve 39.5 (32.25-44.75)'ti. AS'li hastaların %56.8'i erkek, %43.2'i kadın iken, kontrol grubunda bu oran sırasıyla %61.25 ve %38.75'ti. AS'li hastalar inaktif AS ve aktif AS olarak gruplandırıldığında ortalama yaş (1. ve 3. çeyreklik) sırasıyla 38 (32-44) ve 38 (28-48)'di. İnaktif AS'li hastaların %63.7 erkek, %36.3'ü kadın iken bu oran aktif AS'li hastalarda sırasıyla %47.8 ve %52.2 idi.

AS'li hastalarda, kontrol grubu ile kıyaslandığında TNF α (p=0.0001) (Şekil 10), sTNFR2 (p=0.0001) (Şekil 11), sIL2R (p=0.0001) (Şekil 12), IL6 (p=0.0001) (Şekil 13) düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Neopterin (p=0.708) ve sTNFR1 (p=0.463) düzeylerinde ise anlamlı fark yoktu (Tablo 3).

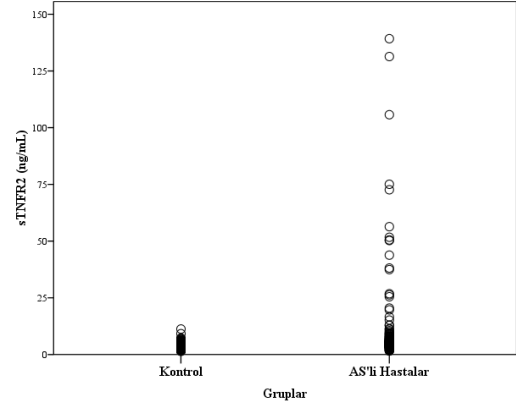
Tablo 2. AS'li hastalar ve kontrol grubunda ölçülen analitlerin düzeyleri

Değişken	Kontrol (n=80)		AS (n=160)	
	Ortanca	1. ve 3. çeyreklik	Ortanca	1. ve 3. çeyreklik
TNF α (pg/mL)	13.11	11.98-16.28	16.06	12.39-22.01 ^a
sTNFR1 (ng/mL)	1.55	1.23-2.02	1.58	1.30-1.94
sTNFR2 (ng/mL)	3.75	3.01-4.78	5.03	4.20-6.93 ^a
sIL2R (U/mL)	309	245-387	389	313-512 ^a
IL6 (pg/mL)	2.3	1.64-2.74	7.28	5.99-13.18 ^a
Neopterin (ng/mL)	1.16	0.89-1.32	1.08	0.89-1.41

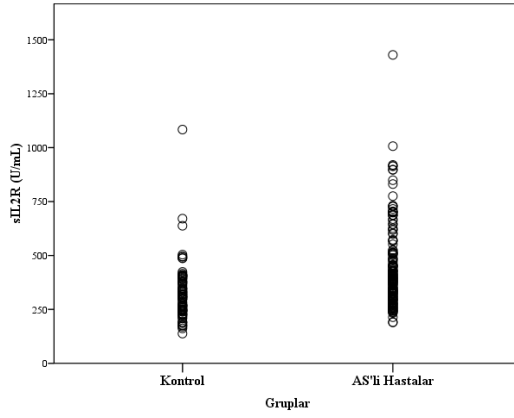
a: p=0.0001 Kontrol grubuna karşı



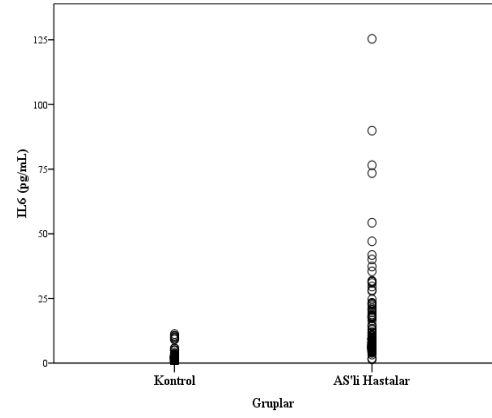
Şekil 10. AS'li hastalar ve kontrol grubunda TNFα düzeyleri



Şekil 11. AS'li hastalar ve kontrol grubunda sTNFR2 düzeyleri



Şekil 12. AS'li hastalar ve kontrol grubunda sIL2R düzeyleri

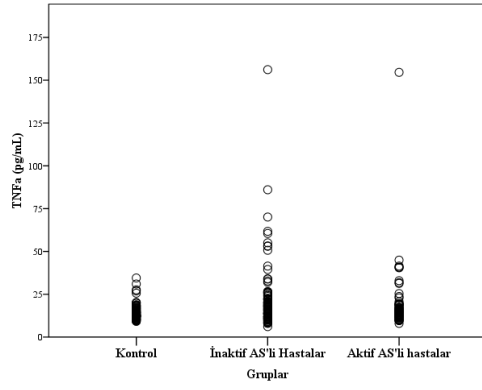


Şekil 13. AS'li hastalar ve kontrol grubunda IL6 düzeyleri

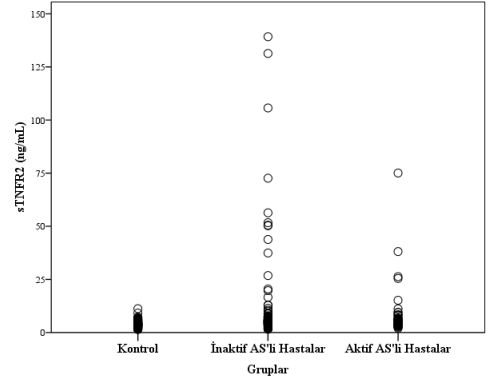
Hastalar aktif ve inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubu olarak gruplandırıldığında üç grup arasında TNFα (p=0.0001), sTNFR2 (p=0.0001), sIL2R (p=0.0001), IL6 (p=0.0001) düzeyleri açısından farklılık vardı.

İnaktif AS'li hastalar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TNFα (p=0.0001) (Şekil 14), sTNFR2 (p=0.0001) (Şekil 15), sIL2R (p=0.0001) (Şekil 16), IL6 (p=0.0001) (Şekil 17) düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu.

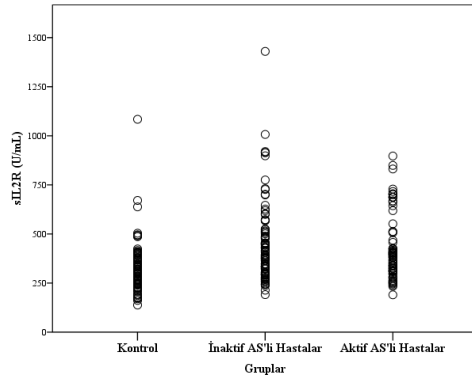
Aktif AS'li hastalar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TNFα (p=0.020) (Şekil 14), sTNFR2 (p=0.0001) (Şekil 15), sIL2R (p=0.0001) (Şekil 16), IL6 (p=0.0001) (Şekil 17) düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4).



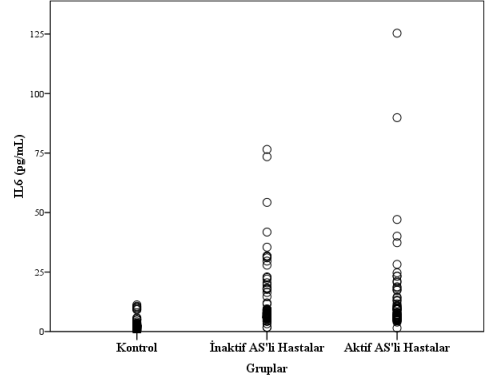
Şekil 14. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda TNFα düzeyleri



Şekil 15. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda sTNFR2 düzeyleri



Şekil 16. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda sIL2R düzeyleri



Şekil 17. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda IL6 düzeyleri

sTNFR2 ($p=0.042$), aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla anlamlı olarak düşük saptanırken (Şekil 15), TNFα ($p=0.095$), sIL2R ($p=0.821$), IL6 ($p=0.846$) düzeylerinde anlamlı farklılık bulunmadı.

Tablo 3. Aktif, inaktif AS'li hastalar ve kontrol grubunda ölçülen analitlerin düzeyleri

Değişken	Kontrol (n=80)		İnaktif AS (n=91)		Aktif AS (n=69)	
	Ortanca	1. ve 3. çeyreklik	Ortanca	1. ve 3. çeyreklik	Ortanca	1. ve 3. çeyreklik
TNF α (pg/mL)	13.11	11.98-16.28	17.82 ^a	12.36-24.28	14.8 ^a	12.4-19
sTNFR1(ng/mL)	1.55	1.23-2.02	1.58	1.34-1.97	1.57	1.27-1.88
sTNFR2(ng/mL)	3.75	3.01-4.78	5.43 ^a	4.38-7.90 ^a	4.92 ^{a*}	4.05-5.97
sIL2R (U/mL)	309	245-387	389 ^a	304-511	389 ^a	313-512
IL6 (pg/mL)	2.3	1.64-2.74	7.22 ^a	6.06-12.06	8 ^a	5.87-13.72
Neopterin (ng/mL)	1.16	0.89-1.32	1.11	0.98-1.50	1.01	0.83-1.35

^a:p<0.05 Kontrol grubuna karşı^{*}:p=0.042 İnaktif AS grubuna karşı

Geleneksel olarak kullanılan belirteçler olan ESH ve CRP aktif ve inaktif AS'li hastalarda bakıldığında, ESH (p=0.0001) ve CRP (p=0.041) düzeyleri aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 5).

Tablo 4. Aktif ve inaktif AS'li hastalarda ESH ve CRP düzeyleri

Değişken	İnaktif AS (n=91)		Aktif AS (n=69)	
	Ortanca	1. ve 3. çeyreklik	Ortanca	1. ve 3. çeyreklik
ESH (Bir saat)	12	7-25	22 [*]	11-33
CRP (mg/dL)	0.25	0.08-0.96	0.62 [*]	0.16-1.16

^{*}:p<0.05 İnaktif AS'li hastalara karşı

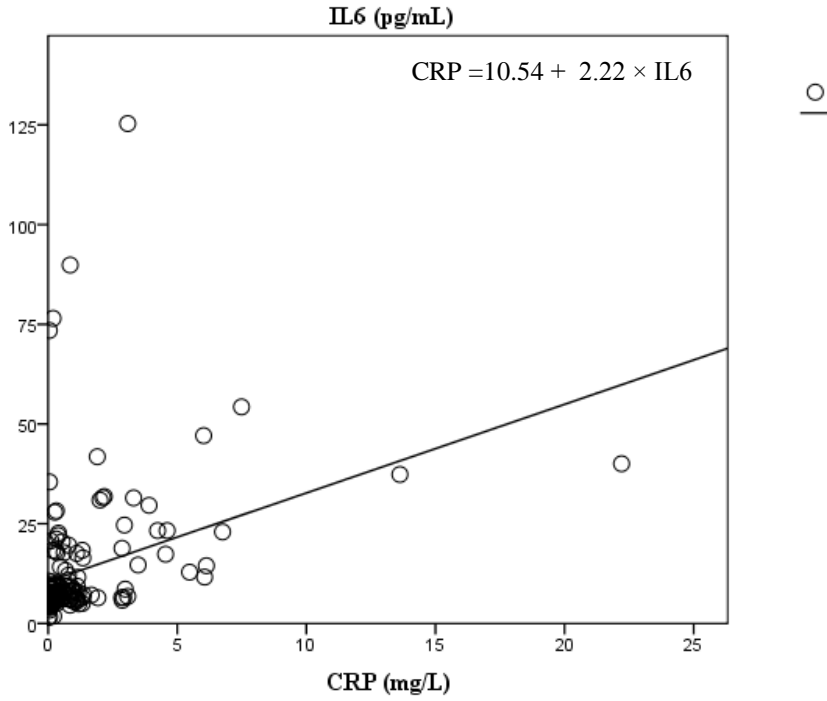
AS'li hastalarda TNF α , sTNFR2, sIL2R ve IL6 ile CRP arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde IL6 (r=0.451 p=0.0001) ve sIL2R (r=0.173 p=0.029) ile CRP arasında zayıf pozitif korelasyon bulunurken, TNF α (p=0.339) ve sTNFR2 (p=0.501) ile CRP arasında anlamlı ilişki bulunmadı. AS'li hastalarda TNF α , sTNFR2, sIL2R ve IL6 ile ESH arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde IL6 (r=0.297 p=0.0001) ile ESH arasında zayıf pozitif korelasyon saptanırken TNF α (p=0.085), sTNFR2 (p=0.716) ve sIL2R (p=0.748) ile ESH arasında anlamlı ilişki gözlenmedi (Tablo 6).

Tablo 5. CRP ve ESH ile serum sitokin düzeyleri arasındaki ilişki

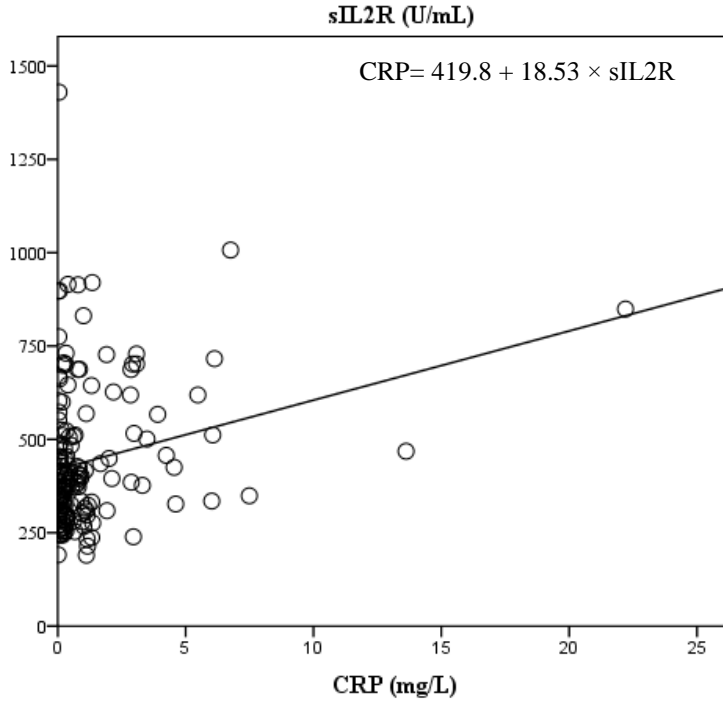
	<u>TNFα</u>		<u>sTNFR2</u>		<u>sIL2R</u>		<u>IL6</u>	
	r	p	r	p	r	p	r	p
CRP (mg/dL)	-0.076	0.339	0.054	0.501	0.173*	0.029	0.451*	0.000
ESH (Bir saat)	0.137	0.085	-0.029	0.716	0.026	0.748	0.297*	0.000

*:p<0.05

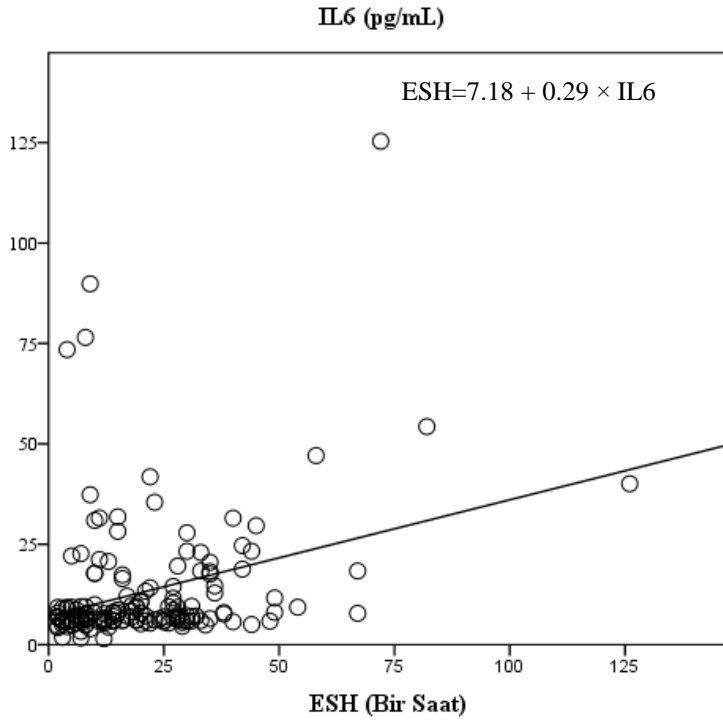
Regresyon analizine göre $CRP = 10.54 + 2.22 \times IL6$ (Şekil 18), $CRP = 419.8 + 18.53 \times sIL2R$ (Şekil 19) ve $ESH = 7.18 + 0.29 \times IL6$ (Şekil 20) denklemi bulundu.



Şekil 18. IL6 ile CRP arasındaki regresyon eğrisi



Şekil 19. sIL2R ile CRP arasındaki regresyon eğrisi



Şekil 20. IL6 ile ESH arasındaki regresyon eğrisi

TARTIŞMA

AS toplumunda en az romatoid artrit kadar sık görülmektedir. Doğrudan ya da dolaylı olarak ciddi fonksiyonel ve sosyoekonomik kayıplara yol açması nedeniyle AS önemli bir hastalıktır (59).

AS patogenezinde her ne kadar tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da genetik, çevresel, immünolojik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Son yıllarda inflamatuvar artrit patogenezinde sitokinlerin rolü araştırılmış, sinovial sıvı ve serumda bulunan sitokin düzeyleri değerlendirilmiştir. Romatolojik hastalıklarda uygulanan anti TNF α tedavileri ile ilgili veriler göz önüne alındığında bu hastalıklardaki sitokin ağları daha iyi anlaşılmasına başlanmıştır; fakat AS'de sitokinlerin serum düzeyleri hakkındaki veriler halen tartışmalıdır (2,3)

Çalışmamızda sağlıklı olgularla karşılaştırıldığında AS'li hastalarda TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiştir. Neopterin ve sTNFR1 düzeyinde ise anlamlı farklılık saptanmamıştır. TNF α , sTNFR2, sIL2R ve IL6 düzeyleri aktif, inaktif hastalar ve kontrol grubu arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Aktif ve inaktif AS'li hastalarda, kontrol grubuna göre TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla sTNFR2 düzeyi düşük saptanırken; TNF α , sIL2R, IL6 düzeylerinde anlamlı farklılık bulunmamıştır. Aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla geleneksel belirteçler olan ESH ve CRP düzeyleri anlamlı olarak yüksekti.

AS'li hastalarda CRP ile IL6 (p=0.000 r=0.451) ve sIL2R (p=0.029 r=0.173), arasında zayıf pozitif korelasyon bulunmuş; TNF α (p=0.339) ve sTNFR2 (p=0.501) ile anlamlı ilişki bulunamamıştır. ESH ile IL6 (p=0.000 r=0.297) arasında zayıf pozitif korelasyon saptanırken TNF α (p=0.085), sTNFR2 (p=0.716) ve sIL2R (p=0.748) arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir.

Sitokinler inflamatuvar cevapta spesifik rol oynayan çözünebilir proteinlerdir. Doğal ve spesifik immün reaksiyonlarda immün sistemde bulunan hücreler arası etkileşimi kontrol etmektedirler (60). IL6, TNF gibi sitokinlerin artmış seviyeleri inflamatuvar durumun göstergesi olarak yorumlanmaktadır. Hastalık aktivitesi ile ilgili olarak insanlardaki sitokin düzeyleri ile ilgili veriler halen sınırlıdır (61). Sitokinler AS'de inflamatuvar hücrelerin proliferasyonu ve maturasyonu aracılığı ile morbidite ile sonuçlanabilen durumlarda önemli bir rol üstlenmektedir. Bu öneme rağmen AS'de hem serum hem de inflamatuvar hücrelerdeki sitokin profilleri büyük ölçüde bilinmemektedir (62). RA'nın aksine spondiloartrit hastalığında serum proinflamatuvar sitokin düzeyleri ilgili veriler sınırlıdır (63). AS'de sitokinlerin rolünün açıklığa kavuşturulması, AS tanı ve tedavisi açısından büyük önem taşımaktadır. Serum sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi AS'li hastalarda tedaviye yanıt ve akut hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi gibi önemli bilgileri aydınlatma potansiyeline sahiptir (62).

Ming Huang ve arkadaşlarının AS tanısı konmuş 81 hasta ve 49 sağlıklı katılımcı ile yaptıkları çalışmada AS'li hastaların hastalık aktiviteleri BASDAI ve BASFI'ya göre değerlendirilmiştir. Buna göre AS'li hastalar aktif ve inaktif olarak gruplandırılmıştır. AS'li hastalarda sağlıklı katılımcılara göre TNF α düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. TNF α düzeylerinin hastalık aktivite parametreleri olan ESH ve BASDAI ile pozitif korelasyon gösterdiği görülmüştür. Buna göre Çin'de yapılan bu çalışmada AS'li hastalarda TNF α düzeylerinin hastalık aktivitesini yansıttığı düşünülmüştür. TNF α düzeylerinin AS tanı ve tedavisinde hastalık aktivite belirteci olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (60). Lange ve arkadaşlarının AS'li hastalar ve kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada, TNF α düzeyi Ming Huang ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde AS'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş, AS hastalık aktivite parametreleri olan BASDAI skorlaması ve CRP düzeyi ile pozitif ilişki gösterdiği belirlenmiştir (64). Bizim çalışmamızda benzer şekilde AS'li hastalarda TNF α düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunurken Ming Huang, Lange ve arkadaşlarının çalışmalarının aksine

TNF α düzeyleri aktif ve inaktif AS'li hastalar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. TNF α düzeyi ile CRP ve ESH arasında ilişki bulunmamıştır.

Sonel ve arkadaşları spondiloartritli 42 hasta ve 22 sağlıklı kontrolde TNF α düzeylerini değerlendirmişlerdir. Spondiloartritli hastalar en az bir şiş eklem, aktif tendinit ya da daktilit varlığı, tipik gece ağrısı ve iki saatten fazla süren sabah tutukluluğu semptomlarının bulunması gibi klinik kriterlere göre aktif ve inaktif hastalar olarak gruplandırılmıştır. TNF α düzeyi kontrol grubuna kıyasla aktif ve inaktif spondiloartritli hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunmuşken bizim çalışmamızdakine benzer olarak, aktif ve inaktif hastalar arasında farklılık göstermemiştir. Buna karşın, serum CRP düzeyi aktif spondiloartritli hastalarda inaktif hastalara kıyasla yüksek bulunmuştur. Serum CRP düzeyi ile TNF α düzeyi arasında da anlamlı ilişki bulunmamıştır (63). Biz de çalışmamızda Sonel ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde AS'li hastalarda CRP düzeyi ile TNF α düzeyi arasında anlamlı ilişki bulamadık.

Taylan ve arkadaşlarının 127 AS'li hasta ve 38 sağlıklı katılımcı ile yaptıkları çalışmada katılımcılarda IL6 düzeyleri ölçülmüştür. Buna göre AS'li hastalarda IL6 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. AS'li hastalar BASDAI skorlaması ile aktif ve inaktif AS'li hasta olarak gruplandırıldığında ise, IL6 düzeyleri aktif ve inaktif AS'li hastalarda çalışmamızdakine benzer şekilde, anlamlı farklılık göstermemiştir (65).

Gratacos ve arkadaşlarının AS'li 69 hasta ve inflamatuvar olmayan bel ağrılı 39 hastada yaptıkları, sitokin düzeylerinin incelendiği çalışmada AS'li ve inflamatuvar olmayan bel ağrılı hastalarda farklı sitokin düzeyleri ile AS hastalık aktivite parametreleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Buna göre bizim çalışmamıza benzer şekilde IL6 ve TNF α düzeyleri aktif ve inaktif AS'li hastalarda inflamatuvar olmayan bel ağrılı hastalara kıyasla yüksek bulunmuştur. IL6 düzeyleri ESH, CRP ve klinik hastalık aktivite parametreleri ile korele bulunmuştur. TNF α düzeyleri ile

ESH, CRP ve klinik hastalık aktivite parametreleri arasında ise ilişkili bulunmamıştır (66). Bizim çalışmamızda da IL6 ile hem ESH hem de CRP düzeyleri arasında anlamlı ilişkili gösterilirken, TNF α ile ESH ve CRP arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Bal ve arkadaşlarının AS tanısı konmuş 70 hasta ve 29 sağlıklı katılımcı ile yaptıkları çalışmada AS'li hastalarda sağlıklı katılımcılara göre sIL2R, IL6 ve TNF α düzeyleri yüksek bulunmuştur. Ayrıca sIL2R, IL6 ve TNF α ile CRP ve ESH düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, IL6 ile hem CRP hem de ESH pozitif ilişki göstermiştir. Bal ve arkadaşlarının çalışmasında bizim çalışmamızın aksine sIL2R ve TNF α ile ESH düzeyleri arasında da pozitif ilişki gözlenmiştir. Buna göre sIL2R, IL6 ve TNF α düzeylerinin AS patogeneğinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Dahası, bu parametrelerin tanı, hastalık aktivite parametresi ve AS'li hastaların tedavi takibi için bir araç olarak kullanılabilmesi yorumu yapılmıştır. IL6 ile CRP ve ESH arasında ilişki olup klinik aktivite parametreleri arasında korelasyon bulunmaması hastaların medikal tedavi altında olmaları ile açıklanmıştır (2). Bizim çalışmamızda da AS'li hastalar medikal tedavi almaktadır. 160 hastadan 155'i medikal tedavi aldığı için hastalar medikal tedavi alan ve almayan şeklinde gruplandırılıp değerlendirilememiştir.

Çapkın ve arkadaşlarının 108 AS'li hasta ve 65 kontrol ile yaptıkları çalışmada katılımcıların IL6, TNF α , ESH ve CRP düzeylerine bakılmış ve AS'li hastalarda bizim çalışmamızdakine benzer şekilde kontrol grubuna göre IL6 ve TNF α düzeyleri yüksek bulunmuştur. AS'li hastalar BASDAI'ya göre aktif ve inaktif AS'li hastalar olarak gruplandırıldığında gruplar arasında IL6, TNF α , CRP ve ESH arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (67). Biz de çalışmamızda aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla IL6 ve TNF α düzeylerinde anlamlı farklılık bulmadık fakat CRP ve ESH düzeyleri bizim çalışmamızda aktif ve inaktif hastalar arasında anlamlı olarak farklılık gösterdi.

Visvanathan ve arkadaşlarının yürüttüğü randomize kontrollü çalışmada 279 AS'li hastada biyobelirteç düzeyleri ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Hastalarda aktivite göstergelerinden biri olan spinal inflamasyon varlığı magnetik görüntüleme ile tespit edilmiştir. Çalışmada 0, 2, 6 ve 12. haftalarda TNF α inhibitörü verilen 201 AS'li hastada 0, 2, 6 ve 12. haftalarda alınan serum örneklerinde 78 plasebo grubuna kıyasla IL6 ve CRP düzeylerinde önemli ölçüde azalma gözlenmiştir. İnfliksımab verilen gruptaki IL6 düzeylerindeki azalma MR aktivitesi ve BASDAI skorundaki azalma ile ilişkili bulunmuştur. Bu azalmanın hastalık aktivitesi ve MR ile belirlenen spinal inflamasyondaki azalma ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (68). Bizim çalışmamızda ise hastalık aktivitesi ile IL6 düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Claudepierre ve arkadaşlarının spondiloartritli 21 hastada yaptıkları çalışmada spondiloartritli hastalarda proinflamatuvar sitokinler olan TNF α ve IL6 düzeyleri ve bu sitokinlerin spondiloartrit hastalık aktivitesi ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Spondiloartritli hastalarda hastalık aktivitesi sabah tutukluğu süresi, ağrı skorlaması, schober testi, ESH ve CRP ile belirlenmiştir. Buna göre çalışmada TNF α düzeyleri ile hastalık aktivite kriterleri arasında ilişki bulunmamıştır. IL6 düzeyleri ile hem ESH hem de CRP arasında korelasyon bulunmuş diğer hastalık aktivite parametreleri arasında ilişki gözlenmemiştir (69).

IL6 düzeylerinin AS dışında SLE, RA gibi otoimmün hastalıklarda da yükseldiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (48-52). Madhok ve arkadaşlarının RA'li 93 hasta ve 70 sağlıklı katılımcı ile yaptıkları çalışmada hasta ve kontrol grubunda IL6 düzeylerine bakılmıştır. RA'lı hastaların klinik ve geleneksel hastalık aktivite indeksleri olan CRP, ESH düzeyleri ve Ritchie artiküler indeksi değerlendirilmiştir. RA'lı hastalarda IL6 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca IL6 ile CRP arasında anlamlı ilişki gözlenmiştir. IL6 ile Ritchie artiküler indeks arasında korelasyon bulunurken, IL6 ile ESH arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (70). Peterson ve arkadaşlarının SLE'li 56 hasta ve sağlıklı 32 katılımcı ile yaptıkları çalışmada ise serum ve üriner IL6 düzeylerinin

SLE hastalık aktivite göstergesi olup olmadığı değerlendirilmiş, SLE'li hastaların hastalık aktiviteleri standart klinik indeks olan sistemik lupus aktivite indeksi ile belirlenmiştir. Çalışmada serum IL6 düzeyleri ile SLE hastalık aktivitesi arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır fakat üriner IL6 düzeyi SLE hastalık aktivitesi ile ilişkili bulunmuş, üriner IL6'nın aktif SLE nefritinde biyobelirteç olabileceği, SLE hastalık aktivitesinin olası bir belirleyicisi olabileceği ve tedaviye yanıtın ölçüsü olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür (58).

TNF α farklı hücre tiplerinden hasar ya da enfeksiyona cevap olarak salınan bir sitokindir ve doğal immün sistemde erken proinflamatuvar sinyalleri koordine etmektedir. İmmün sistemin neden olduğu sistemik etkilerin büyük çoğunluğundan sorumludur (63). AS'li hastalarda serum TNF α düzeylerinin arttığı çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (2,67). TNF α , kollajen üretimini artırıp, kemik ve kartilaj resorpsiyonuna neden olarak artrit patogenezinde rol almaktadır (71). Bizim çalışmamızda da TNF α düzeyleri AS'li hastalarda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur.

TNF α etkisini TNFR1 ve TNFR2 olan iki yüksek afiniteli reseptörüne bağlanarak göstermektedir. Bu reseptörlerin hücre dışı bölümleri çözünür formları oluşturmaktadır ve dolaşımında tespit edilebilmektedir (72). RA ve diğer artrit türleri gibi kronik inflamatuvar hastalıklara yol açan mekanizmaların çoğu aşamasında rol almaktadır (63). AS'de hastalık aktivite belirteci olarak sTNFR'ler ile ilgili az bilgi bulunmaktadır.

Paramalingam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada RA'lı 64 hasta 40 sağlıklı katılımcıda TNF α , IL6, sTNFR1 ve sTNFR2 düzeylerine bakılmıştır. RA'lı hastalar aktif ve inaktif hastalar olarak gruplandırılmıştır. Buna göre RA'lı hastalarda kontrol grubuna göre TNF α , IL6, sTNFR1 ve sTNFR2 düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. RA'lı hastalar aktif ve inaktif olarak değerlendirildiğinde aktif RA'lı hastalarda inaktif RA'lı hastalara kıyasla sTNFR1 ve sTNFR2 düzeyleri anlamlı

olarak düşük bulunmuştur (50). Biz çalışmamızda AS'li hastalarda kontrol grubuna göre TNF α ve sTNFR2 düzeylerini yüksek bulduk. AS'li hastaları gruplandırdığımızda ise, aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla sTNFR2 düzeyini anlamlı olarak düşük bulduk.

TNF'nin sinyal iletim yolları karmaşıktır ve hala tam olarak anlayamamıştır. TNFR reseptörleri inhibe edilmiş fareler ile yapılan çalışmalar ve hücre kültürü çalışmalarına göre, TNF ile aktive edilmiş proinflamatuvar süreç ile programlanmış hücre ölümü yolları ve TNF ile ilişkili hücre hasarının oluşmasına büyük ölçüde TNFR1 aracılık etmektedir. TNFR2 ise doku onarımı ve anjiogenezi uyarıcı sinyalleri teşvik etmektedir. TNFR2, TNFR1 yanıtına da katkıda bulunmaktadır (49). TNF α 'nın çözünür form reseptörleri olan sTNFR1 ve sTNFR2 hücre ile ilişkili TNF α reseptörleri için TNF α ile rekabet edebilmektedir ve bu durum çözünür reseptör formlarının TNF α aktivitesinin inhibitörü olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir (72). Çalışmamızda AS'li hastalarda kontrol grubuna göre TNF α ve sTNFR2 düzeyleri yüksek bulunmuştur. Buna karşın, aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla sTNFR2 düzeyi düşük bulunmuştur. Bu durum çözünür form TNF α reseptörü olan sTNFR2'nin, TNF α aktivitesinin inhibitörü olarak işlev gördüğünü desteklemektedir. Böylece TNF α aktivitesinde artma ile ilişkili olarak AS hastalık aktivitesinde artma olduğu düşünülebilir.

Neopterin, hücrel bağışıklık sisteminin aktivasyonu sonucu primer olarak IFN γ stimülasyonu ile monosit ve makrofajlarca üretilen bir pteridin türevidir. Neopterin üretiminin hücrel immün aktivasyonla ilişkisi kanıtlanmış, neopterin düzeyleri ile infeksiyöz ve inflamatuvar hastalıkların gelişimi ve şiddeti arasında güçlü bir bağlantının olduğu gösterilmiştir (73). Günümüze kadar yapılan çok sayıda klinik ve deneysel çalışmada infeksiyonlarda, otoimmun hastalıklarda, malignansilerde, allograft rejeksiyonlarında neopterin düzeyleri yüksek bulunmuştur (9,10,12,13). Neopterin düzeyleri kardiyak ve renal yetmezlikte, koroner arter hastalıklarında arttığı için bu hastalıklar çalışmamızda dışlama kriteri olarak kullanılmıştır (11). Neopterinin fizyolojik rolü henüz tam olarak aydınlatılamamakla

birlikte, sadece Th1 aracılı hücrel immün sistemin bir göstergesi değil, konak savunma reaksiyonlarının akışında da fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları olan bir sitokin olduğu gösterilmiştir (73).

Otoimmün hastalıkların oluşumunda hücrel immün sistem önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle otoimmün hastalıklarda neopterin düzeylerinin artması beklenmektedir. RA'lı hastalarda (74), SLE'de (75), diyabette (76), inflamatuvar barsak hastalıklarında (77), wegener granüloomatosisinde (78) ve polimiyozit / dermatomiyozitte (79) yükselmiş neopterin düzeyleri gösterilmiştir. Asıl önemlisi otoimmün paterni olan bu tür hastalıkların takibinde neopterin düzeylerinin bir aktivasyon belirteci olarak kullanılabilirliğidir. Yapılan çalışmalarda RA ve SLE hastalarında hastalığın aktivitesine bağlı olarak neopterin düzeylerinin yükseldiği ve bir aktivasyon belirteci olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (74,11,42).

Arshadi ve arkadaşlarının 418 RA'lı ve 398 sağlıklı katılımcı ile yaptıkları çalışmada serum neopterin düzeyleri değerlendirilmiştir. Serum neopterin düzeyleri RA'lı hastalarda sağlıklı katılımcılara göre yüksek bulunmuştur. RA'lı hastalar DAS-28 ile aktif ve inaktif hastalar olarak gruplandırıldığında aktif RA'lı hastalarda inaktif RA'lı hastalara kıyasla serum neopterin düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca diğer RA hastalık aktivite kriterleri ile serum neopterin düzeylerinin ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna göre neopterin düzeylerinin RA hastalık aktivitesini ve tedavi etkinliğini belirlemede hassas bir belirteç olarak kullanılabilceği yorumu yapılmıştır (80).

Nassonov ve arkadaşları sTNFR1, sIL2R ve neopterin düzeylerini 35 RA'lı hastada kontrol grubuna kıyasla artmış olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca ESH ile sIL2R, neopterin ve sTNFR1 arasında ilişki bulunmuştur. Serum neopterin konsantrasyonlarının RA hastalık aktivitesi ve hastalığın şiddeti ile ilişki gösterdiği bulunmuştur (74). Bizim çalışmamızda AS'li hastalar ve kontrol grubu arasında sTNFR1 ve neopterin düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunmadı. sIL2R

düzeylei ise AS'li hastalarda kontrol grubuna kıyasla yüksek bulundu. ESH düzeylei ile sIL2R arasında anlamlı ilişki yoktu.

Hagihara ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada RA'li, SLE'li hasta ve kontrol grubunda serum neopterin düzeylerine baktıkları çalışmada serum neopterin düzeyleri SLE'li hastalarda kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak yüksek bulunmuştur. RA'lı hasta grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Aynı çalışmada sinovyal sıvıda neopterin konsantrasyonunu, RA'li hastalarda noninflamatuar bir hastalık olan osteoartrit hastalarına göre belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. RA'lı hastalarda neopterin sinovyal sıvı konsantrasyonu serum konsantrasyonuna göre de oldukça yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Buna göre bu çalışmada sinovyal sıvıdaki neopterin yüksekliğinin, inflamasyonlu eklemlerde neopterin lokal üretimini desteklediği ve lokal immün reaksiyon ile üretilen neopterin lokal T hücre aktivasyonunun bir belirteci olabileceği ileri sürülmüştür (75).

Rho ve arkadaşlarının 148 SLE'li ve 166 RA'lı hasta ve 177 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada katılımcıların serum neopterin, TNF α ve ESH düzeylerine bakılmıştır. Serum neopterin düzeyleri SLE'li ve RA'lı hasta gruplarında sağlıklı katılımcılara göre ve SLE'li hastalarda RA'lı hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca SLE'li hastalarda neopterin düzeylerinin ESH ve TNF α ile korelasyon gösterdiği; RA'lı hastalarda ise sadece neopterin ile ESH arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (11).

Altındag ve arkadaşlarının 36 RA'lı ve 20 sağlıklı katılımcı ile yaptıkları çalışmada üriner neopterin konsantrasyonları değerlendirilmiş ve RA'lı hastalarda üriner neopterin atılımı sağlıklı gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada neopterin düzeylerinin RA'lı hastaların hastalık evresi ve aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (42).

AS'li hastaların serum neopterin düzeylerinin kontrollü karşılaştırılması, klinik ve laboratuvar bulguları ile ilgili az bilgi bulunmaktadır. AS'li 27 hasta ve 20 kontrol ile yapılan çalışmada katılımcıların serum neopterin, ESH ve CRP düzeyleri ile idrar neopterin düzeyleri değerlendirilmiştir (81). Çalışmada AS hastalığında RA'daki gibi hastalığın kliniğini yansıtabilecek laboratuvar parametresinin varlığı henüz gösterilemediği için AS'li hastalarda neopterin düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. AS'li hastaların klinik durumu BASFAI ile değerlendirilmiş hastalar BASDAI'ya göre aktif ve inaktif hastalar olarak gruplandırılmıştır. Çalışmada kontrol grubuna göre AS'li hastalarda neopterin düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Hastaların idrar ve serum neopterin düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ayrıca idrar ve serum neopterin düzeyi ile klinik parametreler olan BASDAI ve BASFI arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. ESH ve serum neopterin arasında anlamlı ilişki bulunurken CRP ile neopterin arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Aktif ve inaktif AS'li hastaların neopterin, ESH ve CRP düzeyleri anlamlı farklılık göstermemiştir. Elde edilen verilere göre AS kliniğini ESH, CRP ve diğer akut faz reaktanları gibi neopterin de net yansıtmadığı, klinik muayene yöntemlerinin ve spesifik sorgulamaların laboratuvarından daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır. Neopterin düzeylerinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunması AS patogenezinde hücrel immünitinin önemli derecede rol oynayabileceği fakat bu konu ile daha fazla ve daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç olduğu yorumu yapılmıştır (81).

Bizim çalışmamızda neopterin düzeyleri AS'li hastalar ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. AS'li hastalarda neopterin düzeyleri CRP ile ilişkili bulunurken ESH ile anlamlı ilişki göstermemiştir. Neopterin özellikle IFN γ olmak üzere TNF α 'nın sinerjistik uyarısı ile sentezlenmektedir. Bizim çalışmamızda AS'li hastalarda TNF α düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna rağmen neopterin düzeylerinin AS'li hastalar ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermemesinin nedeni AS'li hastaların tamamına yakınının medikal tedavi altında olması olabilir.

Sonuç olarak; doğrudan ya da dolaylı olarak ciddi fonksiyonel ve sosyoekonomik kayıplara yol açması nedeniyle AS önemli bir hastalıktır. Bu nedenle AS hastalığında tanının konulması, hastalığın aktivitesinin değerlendirilmesi önemlidir. AS’de hastalık aktivitesini değerlendirmede klinik bulgular ile laboratuvar tetkikler arasında uyumsuzluk olabilmektedir, bu da tedaviyi belirlemede ve tedaviye yanıtı değerlendirmede sorun oluşturmaktadır. Son gelişmeler altta yatan patofizyolojik sürecin anlaşılması, tanının doğrulanması, prognozun öngörülmesi, hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi için biyobelirteçlere olan gereksinimi arttırmıştır. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilere göre, TNF α , sTNFR2, sIL2R, IL6 düzeyleri AS’li hastalarda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Bulgularımıza göre bu belirteçler AS immünopatogenezinde önemli bir role sahip olabilir ve AS’de inflamasyonu değerlendirmede kullanılabilir. sTNFR2 düzeyinin aktif AS’li hastalarda inaktif AS’li hastalara kıyasla anlamlı olarak düşük bulunması AS’de hastalık aktivitesini belirlemede sTNFR2’nin yararlı bir parametre olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇLAR

- AS'li hastalarda kontrol grubuna kıyasla $TNF\alpha$, sTNFR2, sIL2R, IL6 düzeyleri (tümünde, $p=0.0001$) artmış bulundu.
- Aktif ve inaktif AS'li hastalarda kontrol grubuna kıyasla $TNF\alpha$, sTNFR2, sIL2R, IL6 düzeyleri (tümünde, $p=0.0001$) artmış bulundu.
- Aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla sTNFR2 ($p=0,042$) düzeyi düşüktü; ESH ve CRP (sırası ile $p=0.0001$, $p=0.041$) düzeyleri ise yüksek bulundu.
- AS'li hastalarda kontrol grubuna kıyasla neopterin ve sTNFR1 düzeylerinde anlamlı fark bulunmadı.
- Aktif ve inaktif AS'li hastalarda kontrol grubuna kıyasla neopterin ve sTNFR1 düzeylerinde anlamlı fark bulunmadı.
- Aktif AS'li hastalarda inaktif AS'li hastalara kıyasla $TNF\alpha$, sIL2R, IL6, neopterin ve sTNFR1 düzeylerinde anlamlı fark bulunmadı.
- AS'li hastalarda (Aktif + inaktif AS'li hastalar) CRP ile IL6 ($p=0.0001$ $r=0.451$) ve sIL2R ($p=0.029$ $r=0.173$) zayıf ilişkili (ρ , 0.000-0.49 aralığında) bulundu, $TNF\alpha$, sTNFR2 (sırası ile $p=0.339$, $p=0.501$) ile anlamlı ilişki bulunmadı.
- AS'li hastalarda (Aktif + inaktif AS'li hastalar) ESH ile IL6 ($p=0.0001$ $r=0.297$) zayıf ilişkili (ρ 0.000-0.49 aralığında) bulundu, $TNF\alpha$, sTNFR2 ve sIL2R (sırası ile $p=0.085$, $p=0.716$, $p=0.748$) arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

KAYNAKLAR

1. Sieper J, Poddubnyy D, Appel H. Investigation of involved tissue in axial spondyloarthritis – what have we learnt from immunohistochemical studies? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(5):715-9.
2. Bal A, Unlu E, Bahar G, Aydog E, Eksioglu E, Yorgancioglu R. Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2007;(26):211-5.
3. Vlam K de. Soluble and tissue biomarkers in ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(5):671-82.
4. Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Sieper J, Braun J. The relationship between inflammation and new bone formation in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):1-7.
5. Sivrioğlu K. Ankilozan Spondilitte Sınıflama, Etiyopatogenez ve Değerlendirme. *Turk J Phys Med Rehab.* 2005;(51):44-50.
6. Dai H, Guzman J, Chen B, Costabel U. Production of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors and Tumor Necrosis Factor- alpha by Alveolar Macrophages in Sarcoidosis and Extrinsic Allergic Alveolitis. *Chest.* 2005;(127):251-6.
7. Grassi-Oliveira R, Brietzke E, Pezzi JC, Lopes RP, Teixeira AL, Bauer ME. Increased soluble tumor necrosis factor-alpha receptors in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009;63(2):202-8.
8. Kaleli I, Demir M, Cevahir N, Yilmaz M, Demir S. Serum neopterin levels in patients with replicative and nonreplicative HBV carriers. *BMC Infect Dis.* 2006;6(157):1-6.
9. Ciprandi G, Amici M De, Tosca M, Fuchs D. Tryptophan metabolism in allergic rhinitis: the effect of pollen allergen exposure. *Hum Immunol.* 2010;71(9):911-5.
10. Bociąga-Jasik M, Cieśla A, Kalinowska-Nowak A, Skwara P, Garlicki A, Mach T. Role of IL-6 and neopterin in the pathogenesis of herpetic encephalitis. *Pharmacol Rep.* 2011;63(5):1203-9.
11. Rho YH, Solus J, Raggi P, Oeser A, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Macrophage Activation and Coronary Atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res.* 2012;63(4):535-41.
12. Chin GK, Adams CL, Carey BS, Shaw S, Tse W-Y, Kaminski ER. The value of serum neopterin, interferon-gamma levels and interleukin-12B polymorphisms in predicting acute renal allograft rejection. *Clin Exp Immunol.* 2008;152(2):239-44.

13. Kawasaki H, Watanabe H. Prognostic Neopterin Hepatocellular Significance Levels Carcinoma of Urinary with in Patients. *Tohoku J Exp Med.* 1988;(155):311-8.
14. Wirleitner B, Neurauter G, Schrocksnadel K. Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr Med Chem.* 2003;10(16):1581-91.
15. Mahmoud RA, El-Gendi HI, Ahmed HH. Serum neopterin, tumor necrosis factor-alpha and soluble tumor necrosis factor receptor II (p75) levels and disease activity in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem.* 2005;38(2):134-41.
16. Smith J, Märker-Hermann E, Colbert R. Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20(3):571-91.
17. Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metab.* 2002;3(2):175-87.
18. Davis JC, Mease PJ. Insights into the pathology and treatment of spondyloarthritis: from the bench to the clinic. *Semin Arthritis Rheum.* 2008;38(2):83-100.
19. López de Castro JA. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthropathies. *Immunol Lett.* 2007;108(1):27-33.
20. Dakwar E, Reddy J, Vale FL, Uribe JS. A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Neurosurg Focus.* 2008;24(1):1-5.
21. Onen F, Akar S, Bırlık M, Sarı I, Khan M, Gürler O, Ergor A, Manisalı M, Akkoç N. Prevalence of ankylosing spondylitis and related spondyloarthritides in an urban area of Izmir, Turkey. *J rheumatol.* 2008;35(2):305-9.
22. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2007;(369):1379-90.
23. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet.* 2011;377(9783):2127-37.
24. Wang M, Li X, Chen J, Zhou Y, Cao H, Wu X, Jiang H. Screening and evaluating the mimic peptides as a useful serum biomarker of ankylosing spondylitis using a phage display technique. *Rheumatol Int.* 2011;31(8):1009-16.
25. Kim T, Uhm W, Inman RD. Pathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17(4):400-5.
26. Pham T. Pathophysiology of ankylosing spondylitis: what's new? *Joint Bone Spine.* 2008;75(6):656-60.

27. Rudwaleit M, Taylor WJ. Classification criteria for psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis/axial spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(5):589-604.
28. Çeliker R. Ankilozan Spondilit: Klinik Özellikleri. *J Rheumatol*. 2000;15(1):15-21.
29. Kiratiseavee S, Brent LH. Spondyloarthropathies : Using. *Cleve Clin J Med*. 2004;71(3):184-206.
30. Maksymowych WP, Chou C, Russell AS. Matching prevalence of peripheral arthritis and acute anterior uveitis in individuals with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 1995;54(2):128-30.
31. Elewaut D, Matucci-Cerinic M. Treatment of ankylosing spondylitis and extra-articular manifestations in everyday rheumatology practice. *Rheumatology*. 2009;48(9):1029-35.
32. Keat A. Ankylosing spondylitis. *Medicine*. 2010;38(4):185-9.
33. Elyan M, Khan MA. Diagnosing ankylosing spondylitis. *J Rheumatol Suppl*. 2006;33(78):12-23.
34. Haroon N, Inman RD. Ankylosing Spondylitis New Criteria, New Treatments. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2010;68(3):171-4.
35. Cornell T. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(3):8-18.
36. Moll JMH, Wright V. New York clinical criteria for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 1973;32(4):354-63.
37. Malaviya A. Classification of spondyloarthritis: A journey well worth. *J Indian Rheumatol*. 2013;8(3):122-29.
38. Mcveigh CM, Cairns AP. Diagnosis and management of ankylosing spondylitis. *BMJ*. 2006;(333):581-85.
39. Ay S, Kutlay Ş, Kurtaiş Y, Yanık B. Ankilozan Spondilitli Hastalarda BATH Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksinin (BASHAI) Türkçe Versiyonunun Geçerlilik ve Güvenilirlik Çalışması. *Romatizma*. 2004;19(3):139-46.
40. Karapolat H, Atamaz F, Akkoç Y, Gürgün A, Savaş R, Kırazlı Y, Akkoç N. Ankilozan Spondilite Bağlı Pulmoner Tutulumun Bath İndeksleri , Yaşam Kalitesi ve Psikolojik Semptomlar Üzerine Etkisi. *Turk J Rheumatol*. 2009;(24):183-9.

41. El Miedany Y, Youssef S, Mehanna A, Shebrya N, Abu Gamra S, El Gaafary M. Defining disease status in ankylosing spondylitis: validation and cross-cultural adaptation of the Arabic Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), and the Bath Ankylosing Spondy. *Clin Rheumatol*. 2008;27(5):605-12.
42. Altındağ ZZ, Sahin G, Inanici F, Haşçelik Z. Urinary neopterin excretion and dihydropteridine reductase activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 1998;18(3):107-11.
43. Hrciarikova D, Hyspler R, Vyroubal P, Klemera P, Hronek M, Zadak Z. Serum lipids and neopterin in urine as new biomarkers of malnutrition and inflammation in the elderly. *Nutrition*. 2009;25(3):303-8.
44. Pourakbari AB, Mamishi S, Zafari J, Khairkhah H, Abedini M, Afsharpaiman S, Rad SS. Evaluation of procalcitonin and neopterin level in serum of patients with acute bacterial infection. *Braz J Infect Dis*. 2010;4(3):252-55.
45. Firth C a, Laing AD, Baird SK, Pearson J, Giese SP. Inflammatory sites as a source of plasma neopterin: measurement of high levels of neopterin and markers of oxidative stress in pus drained from human abscesses. *Clin Biochem*. 2008;41(13):1078-83.
46. Morris JC, Waldmann TA. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(1):109-14.
47. Witkowska AM. On the role of sIL-2R measurements in rheumatoid arthritis and cancers. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(3):121-30.
48. Rosa MS, Pinto AM. Cytokines. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editor(s). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 2005. p. 645-744.
49. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008;(214):149-60.
50. Sivalingam SP, Thumboo J, Vasoo S, Thio ST, Tse C. In vivo Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Normal and Patients with Rheumatoid Arthritis. *Ann Acad Med*. 2007;36(2):96-9.
51. Nowell MA, Williams AS, Carty SA, Hayes AJ, Jones GW, Peter J, Slinn S, Ernst M, Jenkins BJ, Topley N, Rose-john S, Jones SA, Richards PJ. Therapeutic Targeting of IL-6 Trans Signaling Counteracts STAT3 Control of Experimental Inflammatory Arthritis. *JnImmunol*. 2009;(182):613-22.
52. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6 / gp130 signaling. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3375-83.

53. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer IL-6. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(7):904-910.
54. Choi ST, Kim JH, Kang EJ, Lee SW, Park MC, Park YB, Lee SK. Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* 2008;47(12):1775-9.
55. Bal A, Unlu G, Bahar E, Aydog E, Eksiogllu E. Comparison of serum IL-1 β , sIL-2R , IL-6 , and TNF- α levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheum.* 2007;(26):211-5.
56. Oranskiy SP, Yeliseyeva LN, Tsanaeva AV, Zaytseva NV. Body composition and serum levels of adiponectin, vascular endothelial growth factor, and interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis. *Croat Med J.* 2012;53(4):350-356.
57. Madhok R, Crilly a, Watson J, Capell H a. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis.* 1993;52(3):232-4.
58. Peterson E, Robertson A, Emlen W. Serum and urinary interleukin-6 in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1996;5(6):571-75.
59. Braun J, Brandt J, Listing J, Zink a, Alten R, Golder W, Gromnica-Ihle E, Kellner H, Krause a, Schneider M, Sörensen H, Zeidler H, Thriene W, Sieper J. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet.* 2002;359(9313):1187-93.
60. Huang C, Huang P, Chen C. Interleukin-1-beta, Interleukin-10, and Tumor Necrosis Factor-alpha in Chinese Patients with Ankylosing Spondylitis. *Mid Taiwan J Med.* 2009;(14):10-15.
61. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* 2014;(2014):1-24.
62. Keller C. Cytokines in the seronegative spondyloarthropathies and their modification by TNF blockade: a brief report and literature review. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(12):1128-32.
63. Sonel B. Serum levels of IL-1beta, TNF-alpha, IL-8, and acute phase proteins in seronegative spondyloarthropathies. *Joint Bone Spine.* 2002;69(5):463-67.
64. Lange U, Teichmann J, Stracke H. Correlation between plasma TNF-alpha, IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis. *Eur J Med Res.* 2000;5(12):507-11.

65. Taylan A, Sari I, Kozaci DL, Yuksel A, Bilge S, Yildiz Y, Sop G, Coker I, Gunay N, Akkoc N. Evaluation of the T helper 17 axis in ankylosing spondylitis. *Rheumatology Int.* 2012;32(8):2511-5.
66. Gratacos J, Collado A, Filella X, Sanmarti R, Canete J, Llana J, Molina R, Ballesta A, Munoz-Gomez J. Serum cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β and IFN- γ) in ankylosing spondylitis: A close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Rheumatology.* 1994;33(10):927-31.
67. Capkin E, Karkucak M, Akyüz A, Alver A, Turkyilmaz AK, Zengin E. The relationship between plasma homocysteine level and different treatment modalities in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology Int.* 2012;32(8):2349-53.
68. Visvanathan S, Wagner C, Marini JC, Baker D, Gathany T, Han J, Heijde D van der, Braun J. Inflammatory biomarkers, disease activity and spinal disease measures in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab. *Ann Rheumatic Dis.* 2008;67(4):511-7.
69. P Claudepierre, J C Rymer, F J Authier, Y Allanore, B Larget-Piet, R Gherardi XC. A relationship between TGF-beta 1 or IL-6 plasma levels and clinical features of spondyloarthropathies. *Br J Rheumatol.* 1997;36(3):403-4.
70. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis.* 1993;52(3):232-4.
71. Rooney M, Varsani H, Martin K, Lombard PR, Dayer JM, Woo P. Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors in juvenile chronic arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2000;39(4):432-8.
72. Bessa TF, Cordeiro CA, Gonçalves RM, Young LH, Campos WR, Oréfice F, Teixeira AL. Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor-2 (sTNFR2) in patients with active toxoplasmic retinochoroiditis. *Braz J Infect Dis.* 2012;16(6):540-4.
73. Hoffmann G, Wirleitner B, Fuchs D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. *Inflamm Res.* 2003;52(8):313-21.
74. Nassonov EL, Samsonov MY, Chichasova NV, Nikiphorova EL, Tilz GP, Demel U, Widner B, Fuchs D. Soluble adhesion molecules in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2000;39(7):808-10.
75. Hagihara M, Nagats T, Ohhashi M, Miura T. Concentrations of Neopterin and Biopterin in Serum from Patients with Rheumatoid Arthritis or Systemic Lupus Erythematosus and In Synovial Fluid from Patients with Rheumatoid or Osteoarthritis. *Clinical Chemistry.* 1990;36(4):705-6.

76. Melicharova K, Kusalova M, Smahelova A, Hyspler R, Solichova D, Melichar B. Urinary Neopterin in Patients with Diabetes Mellitus and Foot Ulcers. *Pteridines*. 2007;18(1):128-31.
77. Ertuğrul İ, Yolcu ÖF, Cesur S, Dağlı Ü, Başar Ö, Yüksel İ, Çakal B, ÖzİN YÖ, İbİş M, Ataseven H, Tunç B, Ülker A, Şaşmaz N. İnflamatuvar barsak hastalıkları aktivitesi ile serum neopterin düzeyi arasındaki ilişki. *Akademik Gastroentroloji Dergisi*. 2007;6(2):56-61.
78. Kobold ACM, Kallenberg CGM, Tervaert JWC. Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis*. 1999;(58):237-45.
79. Benedetti F, Amici M, Aramini L, Ruperto N, Martini A. Correlation of serum neopterin concentrations with disease activity in juvenile dermatomyositis. *Arc Dis Child*. 1993;(69):232-35.
80. Arshadi D, Nikbin B, Shakiba Y, Kiani A, Jamshidi AR, Boroushaki MT. Plasma level of neopterin as a marker of disease activity in treated rheumatoid arthritis patients: association with gender, disease activity and anti-CCP antibody. *Int immunopharmacol*. 2013;17(3):763-7.
81. Zengin F. Ankilozan spondilitli hastalarda serum idrar ve neopterin düzeyleri ve klinik parametrelerle ilişkisi (Tıpta Uzmanlık Tezi). Elazığ, Fırat Üniversitesi, 2003.

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 ?



