

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ANKİLOZAN SPONDİLİTLİ HASTALARIN NÖTROFİLLERİNDE TÜMÖR
NEKROZİS FAKTÖR ALFA İNHİBİTÖRÜ İNFLİXİMABIN KALSİYUM
SİNYALİ, OKSİDATİF STRES VE APOPİTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Yunus UGAN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ROMATOLOJİ BİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

1. DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN

2. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

2012 – ISPARTA
TÜRKİYE CUMHURİYETİ
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ANKİLOZAN SPONDİLİTLİ HASTALARIN NÖTROFİLLERİNDE TÜMÖR
NEKROZİS FAKTÖR ALFA İNHİBİTÖRÜ İNFLİXİMABIN KALSİYUM
SİNYALİ, OKSİDATİF STRES VE APOPİTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Yunus UGAN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ROMATOLOJİ BİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

1. DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN

2. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa NAZİROĞLU

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 3079-TU-12 proje numarasıyla desteklenmiştir.

2012 – ISPARTA

TEŞEKKÜR

Romatolojideki uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince verdiği yakın destek ve değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Ş. Ercan Tunç ve Doç. Dr. Mehmet Şahin başta olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Numan TAMER, Prof. Dr. Mehmet Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Muhammet Cem KOÇKAR, Yrd. Doç. Dr. Emine Güçhan ALANOĞLU, Doç. Dr. Banu KALE KÖROĞLU, Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Doç. Dr. Zeynep Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Murat KOÇER'e, ayrıca tez çalışması sırasında gösterdikleri yakın ilgi ve desteklerinden dolayı başta Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU ve Mehmet AYKUR olmak üzere tüm Biyofizik A.D. çalışanlarına, beni hiç yalnız bırakmayan ve her koşulda destekleyen eşim Aysun'a ve çocuklarım Yusuf Kerem ve Esat Eymen'e teşekkür ederim.

Dr. Yunus UGAN

2012 – ISPARTA

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER.....	IX
TABLolar.....	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ankilozan Spondilit.....	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Tarihçe.....	3
2.1.3. Epidemiyoloji.....	4
2.1.4. Etyoloji.....	5
2.1.5. Patogenez.....	6
2.1.6. Klinik Bulgular.....	8
2.1.6.1. Kas İskelet Sistemi Bulguları.....	8
2.1.6.2. İskelet Sistemi Dışı Bulgular.....	9
2.1.7. Tanı Kriterleri.....	10
2.1.8. Laboratuvar Bulguları.....	12
2.1.9. Radyolojik Bulgular.....	13
2.1.10. Tedavi.....	15

2.1.10.1. Farmakolojik Olmayan Tedavi.....	15
2.1.10.2. Farmakolojik Tedavi.....	15
2.1.11. Ankilozan Spondilitte Hastalık Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	18
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres.....	18
2.3. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri.....	19
2.3.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler.....	19
2.3.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler.....	19
2.3.3. Karbonhidratlarda Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler.....	20
2.4. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler.....	20
2.4.1. Nonenzimatik Antioksidanlar.....	20
2.4.2. Enzimatik Antioksidanlar.....	20
2.5. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali.....	21
2.5.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi.....	21
2.5.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu.....	22
2.6. Apoptoz.....	23
2.6.1. Apoptozun Başlatılması.....	23
2.6.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu.....	24
2.6.3. Hücrede Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler.....	24
2.6.4. Fagositoz.....	24
3. MATERYAL ve METOD.....	25
3.1. Hasta Grupları.....	25
3.2. Örneklerin Alınması ve Saklanması.....	26
3.2.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	26

3.2.2. Nötrofil İzolasyonu.....	27
3.2.3. Hücre Canlılığı (MTT Analizi).....	28
3.2.4. Hücre İçi Kalsiyumun Ölçülmesi.....	29
3.2.5. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	29
3.2.6. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Aktiviteleri Tayini.....	30
3.2.7. Nötrofil Sitozolüne Ca ⁺² akışının hangi kanaldan olduğunun belirlenmesi.....	31
3.3. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇLAR.....	44
ÖZET.....	45
SUMMARY.....	46
KAYNAKLAR.....	47
EKLER.....	65
EK 1: BASDAI.....	65
EK 2: BASFI.....	66

SİMGELER ve KISALTMALAR

AS	: Ankilozan Spondilit
ASAS	: Assessments in Ankylosing Spondylitis
BASDAI	: Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksi
BASFI	: Bath Ankilozan Spondilit Fonksiyonel İndeksi
BASMI	: Bath Ankilozan Spondilit Metroloji İndeksi
CRP	: C- Reaktif Protein
DMARD	: Hastalık-Modifiye Edici Anti-Romatizmal ilaçlar
ESH	: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
ER	: Endoplazmik Retikulum
GPKR	: G Proteini Kenetli Reseptör
GSH	: Glutasyon (indirgenmiş glutasyon)
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside (yükseltgenmiş) Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
CD4	: Yardımcı T Hücre
CD8	: Sitotoksik T Hücre
HLA	: Human Lökosit Antijen
IBH	: İnflamatuvar Barsak Hastalığı
İP3	: İnositol Trifosfat 3
KAT	: Katalaz
LPO	: Lipit Peroksidasyonu
LPS	: Lipopolisakkarit
MDA	: Malondialdehit

MHC	: Majör Histocompatibility Complex
MTX	: Methotrexate
NF-κB	: Nüklear Faktör Kappa-B
NSAİİ:	: Non Steroid Anti-inflamatuar İlaç
O₂	: Moleküler Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit Anyonu
RA	: Romatoid Artrit
SİE	: Sakroiliak eklem
SPA	: Spondiloartropati
SSZ	: Sulfasalazin
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-α
VAS	: Vizüel Analog Skala

ŞEKİLLER

Şekil 1. MTT test sonuçları.....	33
Şekil 2. İnfliximabın AS'li hastaların nötrofil apoptozis değerleri üzerindeki etkileri.....	35
Şekil 3. İnfliximabın AS'li hastaların nötrofil kaspas-3 değerleri üzerindeki etkileri.....	35
Şekil 4. İnfliximabın AS'li hastaların nötrofil kaspas-3 değerleri üzerindeki etkileri.....	36
Şekil 5. Gruplar arası sitozole kalsiyum akışı.....	37
Şekil 6. Hücre sitozolüne Ca ⁺² salınışının tüm gruplardaki zaman akım grafiği.....	38

TABLÖLAR

Tablo 1. Seronegatif spondiloartropatiler	3
Tablo 2. Spondiloartropati grubu hastalıkların ortak özellikleri	4
Tablo 3. Spondiloartropati grubu hastalıklarda HLA-B27 pozitifliği.....	5
Tablo 4. Roma tanı kriterleri (1961).....	10
Tablo 5. New York tanı kriterleri (1966).....	11
Tablo 6. Modifiye New York kriterleri (1984).....	11
Tablo 7. ASAS aksiyel spondiloartrit sınıflama kriterleri (2009).....	12
Tablo 8. Sakroiliitin evrelemesi	14
Tablo 9. Hasta ve kontrol gruplarında ESH, CRP, BASDAI ve BASFI skoru değerleri.....	33
Tablo 10. Nötrofillerde LPO, GSH ve GSH-Px düzeyleri.....	33

GİRİŞ ve AMAÇ

Ankilozan spondilit (AS) genellikle 20-40 yaş arası erkeklerde kadınlara göre 3 kat daha fazla görülen inflamatuvar romatizmal bir hastalıktır. Hastalığın seyrine baktığımızda hastalar bedensel olarak etkilenmekte ve yaşamlarının en verimli devrelerinde iş gücü kaybına uğramaktadırlar. Hastalığın günümüzde halen kesin bir tedavisi olmayıp kullanılan mevcut ilaçlar hastalığın gidişatını yavaşlatmak için kullanılmaktadır.

Hastalığın patogenezi aydınlatıldıkça kullanılan tedavilerde o yönde ilerlemektedir. Ankilozan spondilitli hastalarda hem aksiyel iskelette hemde periferik eklemlerde Tümör Nekrozis Faktör (TNF) molekülü yüksek oranda saptanmış ve bunun ışığında anti-TNF ilaçlar kullanıma girmiştir. Anti-TNF ilaçlardan olan infliximabın AS'li hastalarda inflamasyonun yapı taşlarından olan ve indüklediği sitokinlerle inflamasyonu daha da artıran nötrofiller üzerine etkisi net olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda TNF molekülünün hem apoptozu indükleyerek antiinflamatuvar etkisinin olduğu hemde apoptozu inhibe ederek inflamasyonu tetiklediği bildirilmiştir.

Ankilozan spondilit hastalarında özellikle hastalığın aktif dönemlerinde nötrofillerin aktivasyonun arttığı düşünülmektedir. Ayrıca birçok malignitede ve romatolojik hastalıkta olduğu gibi hastalığın aktivasyonunda serbest oksijen radikallerinin rolü olduğu düşünülmektedir. Nötrofiller yangısal olaylarda ilk savunma bariyerini oluştururlar. PMNL'ler bakteriler tarafından salgılanan N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) ile uyarılmakta ve hücre içi Ca^{+2} iyonu düzeyi artmakta ve bu artış serbest radikallerin üretimini indüklemektedir. Bu radikaller; fagozom içerisine alınan bakterileri öldürerek zararsız şekillere dönüştürmektedir. Ayrıca, serbest radikallerin arttığı durumlarda, DNA tahribi ve PMNL ADP-riboz (ADPR) düzeyleri de artmaktadır. PMNL'lerde ADPR düzeyi artışının kalsiyum kanallarının (özellikle transient reseptör potansiyel protein ailesi – TRP) aktivasyonunu geri bildirim mekanizması ile uyararak arttırdığı ve artan ADPR düzeyi ile nötrofillerin daha da uyarıldığı ileri sürülmektedir. Böylece nötrofiller serbest radikal üretimi ve konak doku ve hücrelerinde tahribata devam etmektedir.

TNF alfa antagonistlerinin in vivo apoptozu indükleyip indüklemeyeceği sorusuna yanıt bulmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu ilaçlarla tedavi edilen psöriasis, romatoid artrit (RA) ve Crohn hastalarında (CH) biyopsi materyalleri ve periferik kandaki apoptotik hücrelerin sıklığı ölçülerek incelenmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda anti-TNF ilaçların apoptozis üzerine olan etkileri incelendiğinde apoptozu indükleyip indüklemediği net olarak ortaya konulmamıştır. Ayrıca AS' li hastaların nötrofillerinde anti-TNF ilaçlar ile apoptozis ve oksidatif stres hiç çalışılmamıştır. Bizde bu açıktan yola çıkarak AS'li hastaların nötrofillerinin aktivasyonunda Ca²⁺ sinyalinin rolü ve bu rol üzerine TNF antagonisti ilaçlardan infliximabın etkisini, ayrıca bu nötrofillerde infliximabla ortaya çıkabilecek oksidatif stres ve apoptozun durumunu incelemeyi amaçladık. Bu amaçla AS'li hastaların in vitro ortamda nötrofilleri ayrıştırılarak infliximab ile inkübe edildi. Sonrasında hem inkubasyon öncesinde hem de inkubasyondan sonra nötrofillerin sitozole Ca²⁺ iyon salınışı hesaplanarak infliximabın bu kanallara olan etkisi araştırıldı. Nötrofillerde infliximabla ortaya çıkabilecek oksidatif stres durumunu incelemek için Glutatyon (GSH), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Lipid peroksidaz (LPO) düzeyleri; apoptoz için ise kaspas-3 ve kaspas-9 düzeylerine bakıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ankilozan Spondilit

2.1.1. Tanım

Ankilozan spondilit, vertebranın progresif ve asendan kemik füzyonuna yol açabilen, spinal eklemlerin inflamasyonu ile karakterize, periferik eklemlerin daha az sıklıkla etkilendiği, etyolojisi tam olarak aydınlatılmamış kronik inflamatuvar bir hastalıktır. AS sadece eklemden değil aynı zamanda göz ve kalp gibi eklem dışı organlarda da tutulumlara yol açabilmektedir.

Ankilozan spondilit geçmişten günümüze klinik, genetik, epidemiyolojik ve radyolojik olarak benzerlik gösteren, seronegatif spondiloartropatiler olarak sınıflandırılan hastalıkların prototipidir (Tablo 1) (1).

Tablo 1. Seronegatif Spondiloartropatiler

-
- Ankilozan spondilit
 - Psöriatik artrit
 - İnflamatuvar barsak hastalığıyla ilişkili artrit
 - Reaktif artrit
 - Farklılaşmamış spondiloartrit
 - Juvenil kronik artrit ve juvenil başlangıçlı ankilozan spondilit
-

Bu hastalıkların klinik ve laboratuvar olarak bir takım ortak özellikleri de Tablo 2’de gösterilmiştir.

2.1.2. Tarihçe

“*Ankylosing Spondylitis*” terimi füzyon veya yapışıklıklar anlamına gelen Yunanca “*ankylos*” (egilmiş) ve “*spondylos*” (omur) sözcüklerinden türemiştir. AS ilk kez 1691’de Bernard Connor isimli İrlandalı tarafından Fransız mezarlığından çıkartılan ankiloz bir iskelette tanımlanmıştır (1-2). Brodie ara sıra göz inflamasyonu ve ankiloz omurgası olan 31 yaşında bir erkek hastayı ilk olarak

1841’de tanımlamıştır. Bunu 1893 yılında Von Bechterev’in, 1897 yılında Struempell’in, 1898 yılında da Marie’nin olguları izlemiştir (3). Yıllar sonra omurga radyografisi tekniklerinin geliştirilmesi sonucunda 1930’larda Krebs, Scott ve Forestier tarafından sakroiliit, kısa bir süre sonra da tipik sindesmofitler tanımlanmıştır (1,2). Buckley 60 olgu sunumu ile AS hastalığını ilk olarak 1931 yılında derlemiştir. 1961’de Roma, 1966’da New York AS tanı kriterleri geliştirilmiştir (2).

Tablo 2. Spondiloartropati grubu hastalıkların ortak özellikleri

• Romatoid faktörün negatif olması	• Asimetrik oligoartrit
• Aksiyel tutulum	• Genel olarak genç yaşta başlaması
• Aortit gelişme olasılığı	• Entezit ve entezopati
• HLA-B27 pozitifliği	• Aile öyküsünün olması
• Tekrarlayan üveit atakları	
• Deri, mukoza, ürogenital sistem, göz ve bağırsak gibi eklem dışı sistemlerin tutulması	

2.1.3. Epidemiyoloji

Semptomlar sıklıkla geç adölesan veya erken erişkinlik döneminde başlar. Genellikle 26 yaş civarında kendini gösteren AS, genç insanları etkileyen bir hastalıktır. 45 yaşından sonra ortaya çıkma ihtimali % 5 dir. Erkekler kadınlara göre 2-3 kat daha fazla etkilenmektedir (4).

Avrupa ve Amerika verilerinde prevalans ortalama % 0,1-0,2 olarak bildirilmiştir (5). Türkiye’de askerler arasında yapılan bir araştırmada ise prevalans % 0,14 olarak bulunmuştur (2). İzmir’in Balçova ve Narlıdere ilçelerinden seçilen 20 yaş ve üzeri 2835 kişide yapılan epidemiyolojik bir çalışmada ise AS prevalansı % 0.49 olarak bildirilmiştir (6).

Spesifik bir popülasyonda AS ve diğer SpA’lerin insidans ve prevalansı ile HLA-B27 prevalansı arasında güçlü bir ilişki ve doğrusal olmayan bir korelasyon vardır (7). Çeşitli ülkelerden bildirilen çalışmalarda AS insidansı her 100.000 de yıllık 0,5 ile 14 arasında değişmektedir (8). Bu farklılıklara hedef popülasyonun seçimi, bel ağrısı ve tanının doğrulanması için seçilen radyolojik yöntem, etnik

zemine bağılı olarak populasyonlar arasında farklılık gösteren HLA-B27 prevalansı ve alt tiplerinin dağılımı sebep olmaktadır.

Hastalık kadınlar ve erkekler arasında farklı klinikle seyredebilmektedir. Periferik eklem tutulumu, geç yaşta ortaya çıkması ve servikal bölgeden başlangıç gibi atipik durumlar kadınlarda daha fazla görülürken, bambu kamışı görünümünü de içeren tipik deformiteler erkeklerde daha fazla görülmektedir (9). Hastalığın erken yaşta başlaması ve erkek olmak kötü prognoz kriterleri arasında yer almaktadır (10).

2.1.4. Etyoloji

Hastalığın etyolojisi halen kesin olarak aydınlatılamamıştır. Fakat patogeneizde genetik ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. AS'de ailesel risk söz konusu olup bu risk majör doku uyum antijenlerinden HLA geni, özellikle de HLA-B27 alt gurupları ile ilişkili olarak saptanmıştır (11). Hastalığın HLA-B27 antijeni ile olan ilişkisi, genetik yatkınlığı olan kişilerde tetikleyici çevresel faktörlere karşı immün yanıtlar sonucu geliştiğini düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada tek yumurta ikizlerinde AS konkordansı %75, HLA-B27 pozitif çift yumurta ikizlerinde ise bu oran % 27 olarak tespit edilmiştir (12). Bu bulgular hastalığın oluşumunda genetik faktörlerin çevresel faktörlerden daha önde geldiğini göstermektedir.

Ankilozan spondilit ile HLA-B27 geni arasındaki ilişkinin keşfinden sonra AS'in epidemiyolojisiyle ilgili pek çok araştırma gündeme gelmiştir. Dünya genelinde özellikle beyaz ırkta HLA-B27 pozitifliği AS'li hastalarda % 80-98 oranında saptanırken normal populasyonda bu oran sadece % 4-8 oranında saptanmıştır (13). Diğer spondiloartropati grubu hastalıklarda da çeşitli oranlarda pozitiflikler bildirilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Spondiloartropati grubu hastalıklarda HLA-B27 pozitiflik oranları

<u>Hastalık</u>	<u>Oran (%)</u>
Ankilozan spondilit	%80-98
Psöriatik artrit	%60-70
Reaktif artrit	%60-80
Enteropatik artrit	%50-70
Junevil spondiloartrit	>%90
Farklılaşmamış spondiloartrit	%90

HLA-B27 gen kodu, 6. kromozomun (6p) kısa kolu üzerindeki DNA'nın 3.6 megabazlık bir zincirinde yerleşen multipl genlerden oluşan MHC (majör histokompatibilite kompleksi) sınıf I bölgesinde yer almaktadır. MHC, immun fonksiyondan sorumlu yaklaşık 220'nin üzerinde gen içermektedir (14).

HLA-B27 tek bir allel değildir. Kendisi nükleotid dizi homolojisi yoluyla birbirleriyle ilişkili en yaygın alt tip olan B2705'den türeyen HLA-B*2701'den B*2728'e kadar isimlendirilen en az 31 farklı allel içermektedir (15).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada 38 HLA-B27 pozitif AS hastası ile 47 HLA-B27 pozitif sağlıklı kontrolü grubu karşılaştırılmış ve hasta grubunda baskın olan HLA alt tipinin HLA-B2705 olduğu saptanmıştır. Türk popülasyonu ile diğer popülasyonlar karşılaştırıldığında HLA-B27 alt tip dağılımının Beyaz-Avrupa ile benzer olduğu bulunmuştur. Çalışmaya az hasta dahil edilmesi bu sonuçların dikkatli yorumlanmasını gerektirmektedir (16). AS'nin etyolojisinde bakterilerin spesifik bir rol oynadığı gösterilemese de birçok organizma suçlanmıştır. (17,18).

2.1.5. Patogenez

Daha çok sakroiliak eklemi ve aksiyel iskeleti etkileyen AS'in patogenezi tam olarak bilinmemektedir. HLA-B27 başta olmak üzere genetik faktörlerin çeşitli çevresel faktörlerle etkileşmesi sonucu inflamasyon tetiklenmekte ve bunun da patogeneizde esas rol oynadığı düşünülmektedir (19).

Ankilozan spondilitte görülen inflamasyonun histopatolojik bulguları AS'e özgü olmayıp diğer inflamatuvar eklem hastalıklarında görülen histopatolojik bulgularla benzerlik göstermektedir. Hastalık başlıca sinovyal zarlarda, eklem ile intervertebral disklere komşu kemik yapılarında ve entezis bölgelerinde inflamasyonla karakterizedir. Entezis; tendon, ligaman, kapsül veya fasyanın kemiğe tutunduğu bölge anlamına gelmektedir. Kasların epifize yapıştığı fibrokıkırdak yapısındaki entezisler (asil tendonu gb) AS'de daha sık tutulmaktadır (20).

İnflamasyonlu dokunun histopatolojik incelemesinde T hücreleri ve makrofajların baskın olduğu ve proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Dokularda CD4+ hücreler daha baskın olmak üzere T hücreler ve CD68+ makrofajların yaptığı infiltrasyon sonucunda fibroblast proliferasyonu ve neovaskülarizasyon meydana gelmekte ve inflamasyon bölgesinde artmış TNF- α ekspresyonu görülmektedir (21,22).

Patogenezinde genetik etmenlerin en fazla rol oynadığı romatizmal hastalıklardan biri olan AS'in etiopatogenezinde en önemli rolü olan kuşkusuz HLA-B27 genomudur. Bu genin hastalığın gelişmesindeki etkisinin altında yatan gerçek mekanizma hala tam olarak belirlenememiştir. Bununla birlikte AS'in patogenezinde HLA-B27'nin rolünün olduğunu ileri süren bir takım teoriler gündeme gelmiştir.

1- *Artritojenik peptid hipotezi*: Bu hipotez eklem ya da entezis kaynaklı artritojenik peptidlerin B27 tarafından CD8+ T hücrelerine sunulması sonucu konağın kendi dokularına yönelmesini tanımlar (23). Bakteri kökenli peptidlerle çapraz reaksiyonun oluştuğu süreçte muhtemelen eklem / entezal kırıkardan köken alan artritojenik özgün-peptidlerin HLA-B27 tarafından sunumundan sonra bazı bakterilere karşı T hücre aracılı savunmada sitotoksik T hücresi otoreaktivitesinin indüklendiği ileri sürülmektedir (24).

2- *HLA-B27 homodimer formasyonu*: Konvansiyonel olmayan HLA-B27 homodimerlerinin hücre yüzeyindeki varlığı da patojenik immün yanıtlar için olası bir tetikleyici olarak düşünülmüştür (25). HLA-B27'nin ağır zincirleri, invitro olarak ekstrasellüler alfa-1 domainlerinde sistein-67 rezidülerinden bağlanan disülfid bağımlı homodimerler oluşturabilirler (26-27). Bu durum, B27'nin endoplazmik retikulumda uygunsuz kıvrılmasının neticesi olarak oluşur ve uygunsuz kıvrılan protein birikimi proinflamatuvar intrasellüler stres cevabıyla sonuçlanabilir (24).

3- *β 2- mikroglobulin (β 2m) birikimi hipotezi*: Bu hipotezde AS'in bir β 2m birikim hastalığı olduğu, B27 alt tiplerinin hücre membranında ekspresyonları yapılan peptid kompleksleri B27 moleküllerinden β 2m ayrılma oranları açısından farklılık gösterdiğini öne sürmüştür (28-30).

4- *Protein katlanma kusurları*: HLA molekülünün sentezlenmesi sonrasında katlanarak üç boyutlu yapısının oluşması, endoplazmik retikulum içerisinde sunacağı peptid ve β 2m ile bağlandıktan sonra tamamlanmaktadır. HLA-B27 diğer HLA sınıf I allelleri arasında yavaş katlanan bir protein olarak bilinmektedir. HLA-B27 ekspresyon miktarındaki artışın hastalık patogenezini ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. (32-35).

Hastalığın en erken ve tipik bulguları sakroiliak eklem (SİE)'de, bu ekleminde iliak tarafında ortaya çıkmaktadır. Subkondral kemikte düzensizliği takiben yüzeysel erozyon ve fokal skleroz gelişir. Erozyonun ilerlemesiyle eklem aralığında yalancı genişlemeler görülür. Zaman içerisinde fibrozis, kalsifikasyon, interosseöz köprüleşme, ossifikasyon ve son olarak ankiloz gelişir (36,37).

Entezis dediğimiz inflamasyon bölgelerindeki iyileşmeyi yeni kemik oluşumları izler (38). Diskle omur cismi arasındaki end-plate'da ise kronik inflamatuvar hücrelerin yer aldığı granülasyon dokusu ve yeni kemik oluştuğu gözlenir (2,38,39).

Ankilozan spondilitte vertebral gövdelerin kareleşmesini açıklayan kemik remodelingi, histolojik olarak, vertebral gövdelerin korteks ile spongios yapılarında yıkım ve eş zamanlı yeniden yapımla giden, akut ve kronik spondilit temeline dayanır. Kare vertebral gövdelerin oluşması yıkıcı osteit ve tamirin birleşimidir (40).

2.1.6. Klinik Bulgular

2.1.6.1 Kas İskelet Sistemi Tutulumu

Hastalığın en karakteristik bulgusu tüm bel ağrılarının yaklaşık % 15'ni oluşturan inflamatuvar karakterdeki bel ağrısıdır. Genellikle gluteal bölgede yer değiştiren karakterde, 3 aydan uzun süreli, gecenin ilerleyen zamanlarında ve sabah erken saatlerde doruk yapan, en az 30 dakika sabah tutukluğu ile ilişkili olan, egzersiz ile azalan, istirahatle artan ve non-steroid anti-inflamatuvar ilaç (NSAİİ) kullanımına iyi yanıt veren künt bir ağrıdır. Başlangıçta genelde tek taraflı ve aralıklı olurken, birkaç ay içerisinde devamlı ve iki taraflı hissedilebilir. Ağrı başlangıçta derin gluteal bölgede hissedilse de çoğu zaman lokalizasyonu zor olabilir (41).

Entezitis AS'ye özgü bir bulgu olup, ligamentlerin ve tendonların insersiyon bölgelerindeki veya eklem kapsüllerinin kemiğe yapışma yerlerindeki inflamasyon ile karakterizedir. Entezit aynı zamanda birçok omurga dışı bölgeleri de etkiler (42). Kostosternal bileşkelerde, tarsal kemiklerde, iliak kristada, trokanter majorlarda, tibial tüberküllerde, topukta, iskiyal tüberositaslarda, aşil tendonu veya plantar fasiada hassasiyete yol açabilmektedir (43). Torakal omurga ile birlikte, kostosternal ve manubriosternal eklemlerde entesopati oluşması ile birlikte, hastalarda öksürme ve hapşırma ile artan, bazen "plöritik" olarak karakterize edilen göğüs ağrısı gelişebilir (44). Son dönemlere doğru, eklemlerdeki ankiloz ve/veya ligamanlardaki kalsifikasyon sonucu tüm omurga hareketleri kısıtlanır, lomber lordoz azalır, dorsal kifoz artar, göğüs ön duvarı düzleşir, karın öne doğru çıkar, karın solunumu başlar.

Ankilozan spondilitte en sık tutulan omurga dışı eklemler kuşak veya "kök" eklemlerdir (kalçalar ve omuzlar gibi) ve bu bölgelerde ağrı hastaların %15'e varan bölümünde başlangıç belirtisi olabilir (13). Kalçalardaki destrüktif değişiklikler

yavaş ilerleyicidir, genellikle unilateraldir ve ankiloz gelişmeden önce femur başının belirgin deformitesi ile ilişkilidir.

Ankilozan spondilitte kalça ve omuzların dışındaki eklemlerde periferik artrit görülmesi nadirdir fakat olduğunda da genellikle özellikle alt ekstremiteleri tutan asimetrik oligoartrit şeklindedir ve özellikle de dizleri etkiler. Diz eklemi aralıklı gelişen efüzyon şeklinde tutulabilir. AS'de temporomandibuler eklem tutulumu görülebilir ve daha ciddi hastalığı gösteren değişkenlerle ilişkilidir (45).

2.1.6.2. İskelet Sistemi Dışı Bulgular

Ankilozan spondilitli birçok hastada subfebril ateş, halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık ve azalmış yaşam kalitesini içeren genel konstitüsyonel semptomlar görülebilir (42). Bunun yanı sıra hastalık birçok farklı organ ve sistemi etkileyebilen bir özelliğe sahiptir.

Ankilozan spondilitin en sık görülen iskelet dışı bulgusu akut anterior üveit olup hastaların yaklaşık %25-40'ında gözlenir (46). HLA-B27 pozitiflerde ve erkek cinsiyette görülme oranı daha yüksektir (13). Hastalarda çoğunlukla ani başlayan bir oküler ağrı, fotofobi, kızarıklık, lakrimasyon ve görme bulanıklığı vardır. Tipik olarak ani başlangıçlı ve unilateraldir.

Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında AS'li hastalarda iletim bozukluklarının, kalp kapak hastalıklarının ve kardiyomyopatilerin daha sık olduğu tespit edilmiştir (47-49). HLA B27 önemli bir genetik risk faktörüdür.

Ankilozan spondilitte pulmoner tutulum görülebilir. Genellikle nadirdir ve hastalığın geç bir bulgusudur. En çok görülen tutulum şekli üst lob fibrozisi, miçetoma oluşumu (aspergilloma) ve plevral kalınlaşmadır. Kostovertebral eklem tutulumu nedeniyle göğüs ekspansiyonu azalsa bile artmış diyafragmatik solunum nedeniyle hastaların ventilasyon sorunu olmaz (2,50).

Özellikle hastalığın geç dönemlerinde spinal tutulumun ilerlemesiyle nadir olmakla birlikte bazı nörolojik komplikasyonlar da ortaya çıkabilir. Şiddetli ankilozu olan ve uzun yıllardır hastalığı devam eden hastalarda Kauda Equina Sendromu görülebilir (51).

Ankilozan spondilitli hastalarda renal komplikasyonlar nadirdir. Hastalarda IgA nefropatisi, mikroskopik hematüri ve proteinüri, amiloidoz (nadir), analjezik nefropatisi, glomerülonefrit ve renal yetmezlik görülebilir (52).

2.1.7. Tanı Kriterleri

Ankilozan spondilitin tanısı diğer bir çok romatizmal hastalıkta olduğu gibi klinik, laboratuvar ve görüntüleme yöntemlerine dayanılarak konulur. Hastalık, başka bir ilişkili hastalık yoksa “birincil” veya “idiyopatik”, psöriyazis veya kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilişkili ise ikincildir. Günlük pratikte olası AS tanısı radyolojik olarak sakroiliit varlığıyla desteklenmektedir.

Tablo 4. Roma tanı kriterleri (1961)

Klinik kriterler

1. Dinlenme ile azalmayan 3 aydan uzun süreli bel ağrısı ve tutukluğu
2. Torakal bölgede ağrı ve tutukluk
3. Lomber omurgada hareket kısıtlılığı
4. Göğüs ekspansiyonunda kısıtlanma
5. İritis veya sekellerine ait öykü veya bulgu

Radyolojik kriterler

6. AS’e özgü bilateral sakroiliak değişiklikleri gösteren röntgenoram

Kesin tanı:

1. En az bir klinik kriter ile birlikte bilateral 3 ya da 4. derece sakroiliit
 2. En az dört klinik kriter
-

AS için ilk olarak 1961 yılında Roma tanı kriterleri (Tablo 4) ve takiben 1966 yılında New York tanı kriterleri (Tablo 5) geliştirilmiş olup, daha sonrasında bu tanı kriterlerinin seçiciliğini ve duyarlılığını artırmak için çeşitli revizyonlar yapılmıştır. İlk revizyon 1984 yılında günümüzde halen yaygın olarak kullanılmakta olan Modifiye New York tanı kriterleri (Tablo 6) geliştirilmiştir (53).

Son olarak ASAS (Assessment of SpondyloArthritis International Society) bir dizi tartışma ve değerlendirme sonucunda aksiyal spondiloartrit tanı kriterleri oluşturmak amacıyla uluslararası bir çalışma başlatmıştır. On altı ülke ve 25 merkezden toplamda 649 hasta çalışmaya alınmıştır. İlk etapta 71 hasta formu 20 uzman tarafından değerlendirilmiş, aday kriterler oluşturulmuş ve daha sonra rafine edilen bu kriterler uluslararası çalışmanın verilerinde sınanmış ve en son olarak ASAS tarafından onaylanan kriterler ASAS aksiyal spondiloartrit sınıflama kriterleri olarak yayınlanmıştır (54,55) (Tablo 7).

Tablo 5. New York tanı kriterleri (1966)**Klinik kriterler**

1. Lomber omurgada her üç düzlemde hareket kısıtlılığı: öne fleksiyon, yana fleksiyon ve ekstansiyon
2. Dorsolomber bileşkede ya da lomber omurgada ağrı
3. Dördüncü interkostal aralık düzeyinde ölçülen göğüs ekspansiyonunun 2,5 cm ya da daha az olacak biçimde kısıtlanması

Radyografik derecelendirme

Normal, 0; şüpheli, 1; minimal sakroiliit, 2; orta şiddette sakroiliit, 3; ankiloz, 4

Kesin tanı

1. En az bir klinik kriter ile birlikte bilateral 3 ya da 4. derece sakroiliit
2. Klinik kriter 1 veya klinik kriter 2 ve 3'ün her ikisi birlikte unilateral 3 ya da 4. derece sakroiliit veya bilateral 2. derece sakroiliit

Olası tanı

1. Klinik kriter olmadan bilateral 3. veya 4. derece sakroiliit

ASAS aksiyal spondiloartrit kriterlerinin duyarlılığı %82,9, özgünlüğü ise %84,4 olarak saptanmıştır. Bu kriterler oldukça basit ve uygulama kolaylığı olan kriterlerdir ve günlük klinik pratikte taramaya yönelik kolayca akılda tutulabilir bir şekilde önerilmiştir (56).

Tablo 6. Modifiye New York kriterleri (1984)**Klinik kriterler**

1. En az 3 aydır var olan, egzersizle düzeliyor istirahatle düzelmeyen bel ağrısı
2. Lomber omurganın sagittal ve frontal düzlemlerde hareket kısıtlılığı
3. Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinsine göre normal değerlerin altında olması

Radyolojik kriterler

4. 2-4. derece bilateral sakroiliit
5. 3-4. derece unilateral sakroiliit

Kesin tanı: Klinik kriterlerden herhangi birisi ile birlikte unilateral 3-4. derece veya bilateral 2-4. derece sakroiliit.

Tablo 7. ASAS aksiyel spondiloartrit sınıflama kriterleri (2009)

Sakroiliitin görüntülenmesi + ≥ 1 Spondiloartropati Bulgusu	HLA-B27 pozitifliği + ≥ 2 Spondiloartropati Bulgusu
<u>Spondiloartropati Bulguları</u> <ul style="list-style-type: none"> ▪ İnflamatuvar bel ağrısı ▪ Artrit ▪ Entezit (topuk) ▪ Üveit ▪ Daktilit ▪ Psöriasis ▪ Crohn hast / Ülseratif kolit ▪ Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlara iyi yanıt ▪ Pozitif aile öyküsü ▪ HLA-B27 pozitifliği ▪ CRP yüksekliği 	<u>Sakroiliitin görüntülenmesi</u> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Manyetik rezonans (MR)'da aktif (akut) inflamasyon SpA ile ilişkili sakroiliit için oldukça fazla fikir vericidir. ▪ Modifiye New York kriterlerine göre kesin radyografik sakroiliit

2.1.8. Laboratuvar Bulguları

Ankilozan spondilitli hastalarda eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve C-reaktif protein (CRP) inflamasyon göstergeleri olarak kullanılmakla beraber hastalığın aktivitesini değerlendirmekte sınırlı değere sahiptir (57,58). Dolayısıyla ESH'nin normal olması hastalığın aktif olmadığı anlamına gelmez. Serum CRP düzeyleri hastalık aktivitesi için daha iyi bir göstergedir. ESH ve CRP aksiyel tutulumdan çok periferik artropati ile ilişkilidir (59).

Romatoid faktör (RF) ve antinükleer antikor (ANA) negatiftir. Serum kompleman düzeyleri normal veya yükselmiş olabilir. Serum IgA düzeyleri hafif-orta derecede artmış bulunur ve genellikle akut faz reaktanları ile korelasyon gösterir. İnflamasyon derecesi ile ilişkili olarak trombosit sayısında hafif artış, hafif

normokrom normositer anemi görülebilir. Periferik eklem tutulumunda sinovyal sıvı analizleri diğer inflamatuvar artropatilerden farklılık göstermez (2).

HLA-B27 AS tanısında kullanılabilse de bel ağrılı hastalarda AS için doğrulayıcı veya tarama testi olarak kullanılmamalıdır. Özellikle anamnez ve fizik muayene bulguları AS ile uyumlu ancak yeterli radyolojik bulgusu olmayan hastalarda HLA-B27 tanı koymada yardımcı olabilir (59).

2.1.9. Radyolojik Bulgular

2.1.9.1. Direkt Radyografi

Görüntüleme yöntemlerindeki gelişmelere rağmen AS'in tanı ve sınıflamasında direkt radyografiler halen yerini korumaktadır. Sakroiliit tanısı için öncelikle ön-arka pelvis grafisi istenir, ancak pelvisin normalde var olan öne eğimi SİE'in tam olarak görüntülenmesini engelleyebileceği için her zaman yeterli olmayabilir. Bu nedenle şüpheli durumlarda pelvisin frontal düzlemle 30 derecelik açı ile SİE'lerin oblik grafileri değerlendirilebilir (2).

Direkt radyografiler esas olarak erozyon, skleroz, sindesmofit ve ankiloz gibi geç dönemde ortaya çıkan yapısal kemik değişiklikleri gösterir. Erken AS olgularında duyarlılığı düşüktür ve tanı gözden kaçabilir (60-62). Yapılan çalışmalar erken sakroiliitin tespitinde BT ve MRG'nin direkt radyografiden daha duyarlı olduğunu göstermiştir (63).

Hastalığın en sık başlangıç yeri SİE'ler olup bu yüzden en erken radyolojik değişiklikler buradan gelişir. Başlangıçta unilateral ve asimetric bir tutulum olabilirse de ilerleyen dönemlerde bilateral ve simetric sakroiliit görülmektedir. İlk radyolojik bulgu eklem yüzeylerinde keskinlik kaybı ve bulanıklaşmadır. Daha sonra eklem yüzeylerinde erozyonlar ve subkondral skleroz artışı görülmeye başlar. İliak yüzeyde eklem kırırdağı daha ince olduğundan erozyonlar öncelikle eklem iliak yüzünde olmaya başlar. İlerleyen evrelerinde erozyonların büyümesi eklem aralığında yalancı genişlemeler şeklinde görülür. Zamanla eklemde kemiksel köprüleşmeler görülür ve eklem aralığı kapanmaya başlar. Sakroiliitin son aşamasında eklemde artık tam ankiloz meydana gelir (64). New York kriterlerine göre bu radyografik bulgular 0 ile 4 arasında evrelendirilir (53) (Tablo 8). Spinal tutulum sıklıkla vertebraların ön köşeleri, intervertebral disk ve anterior

longitudinal ligamentin birleşim yerinde başlar ve diskovertebral köşede fokal destrüksiyon alanları oluşur. Buna Romanus *lezyonu* denir (62,65).

Tablo 8. Sakroiliitin Evrelemesi

Radyolojik tutulum şekli	Evre
Normal radyogram	0
Eklem yüzeyinde dejenerasyon	1
Eklem aralığında erozyon ve skleroz	2
Eklem aralığında erozyon, skleroz ve ankiloz başlangıcı	3
Eklem aralıklarında tam füzyon (ankiloz)	4

Vertebra ön köşelerin erozyonu nedeniyle vertebraların normalde konkav olan ön yüzü düzleşir. Lomber bölgede daha belirgin olan bu bulguya *vertebral kareleşme* denir. Reaktif tamir sürecinin vertebral köşelerde oluşturduğu skleroz artışı direkt radyografilerde radyodens görünür ve parlayan köşe (*shining / shiny corner*) olarak isimlendirilir (64). İntervertebral diskte annulus fibrozus dış liflerinin ossifikasyonu sonucu karakteristik bir bulgu olan *sindesmofitler* oluşur. Sindesmofitler bir vertebradan diğerine uzanarak vertebralar arasında kemik köprüler oluşturur. Bu köprüleşmeler yaygın hale geldiğinde ön arka grafilerde spinal kolonda *bambu kamışı* görünümünü ortaya çıkar.

2.1.9.2. Bilgisayarlı Tomografi

Kesitsel görüntü alma olanağı olan BT ile sakroiliak eklemlerdeki erozyon, skleroz artışı ve eklem aralığında daralma gibi kronik yapısal değişiklikler direkt radyografilere göre daha erken görülebilmektedir (66). Yapılan araştırmalar BT' nin sakroiliit tanısında direkt radyografilerden daha duyarlı olduğunu göstermiştir (67). BT yapısal kemik değişikliklerini belirlemede MRG'dan daha başarılı olmasına rağmen eklem kıkırdağı, aktif inflamasyon ve kemik iliğini göstermede yetersizdir.

2.1.9.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme

Bu yöntemin en önemli avantajı direkt radyografi ve BT'de yapısal hasarın görülmediği erken olgularda aktif inflamasyon alanlarını tespit edebilmesidir. Böylece erken tanı ve tedavi şansı doğmaktadır. Son 10 yıl içerisinde kullanıma giren

TNF- α blokerlerinin AS'li hastalarda inflamatuvar semptomlarla birlikte spinal kolondaki inflamasyonu da önemli ölçüde baskıladığı MRG çalışmalarıyla gösterilmiştir (68). Kemik iliği ödemi (osteit), sinovit ve entesit gibi aktif inflamatuvar lezyonlar en iyi STIR (Short Tau Inversion Recovery) sekanslar ve kontrastlı MRG ile değerlendirilir (62).

2.1.9.4. Ultrasonografi

Ankilozan spondilit için esas kullanım alanı entesopatilerdir. Ultrasonografi entesopatinin erken evrelerinde MRG'ye göre daha duyarlı bulunmuştur. Ucuz, hızlı ve noninvaziv bir teknik olması yanında iyonize edici radyasyon içermemesi de önemli bir avantajdır (60).

2.1.9.5. Kemik Sintigrafisi

Bu yöntem intravenöz olarak verilen Tc99 metilen difosfanatın artmış kan akımı ve kemik döngüsü olan bölgelerde yoğunlaşması prensibine dayanır. Asimetrik tutulumlar daha anlamlı kabul edilir. Bulguların spesifik olmaması ve yüksek radyasyon riski nedeniyle günümüzde sakroiliit tanısında geri planda kalmıştır (69).

2.1.10. Tedavi

2.1.10.1. Farmakolojik Olmayan Tedavi

Çoğu hasta için AS, iyi bir işlevsel prognozu olan nisbeten hafif bir hastalıktır. AS'in farmakolojik tedavisindeki hızlı gelişmelere rağmen fizik tedavi ve egzersiz programları halen tedavi planının temel parçalarından birisi olmaya devam etmektedir. Her hastaya ilk tanı konulduğunda ve belli aralıklarla özellikle omurgaya yönelik eklem hareket açıklığı egzersizleri, spinal ekstansör kas grubunu güçlendirme egzersizleri, postür ve göğüs ekspansiyonunu koruyacak egzersizler gösterilmelidir (70).

2.1.10.2. Farmakolojik Tedavi

Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)

Bu ilaçlar 1950'lerde ilk piyasaya çıkışlarından beri AS'nin farmakolojik tedavisinin köşe taşları olmuşlardır. NSAİİ'nin enflamatuvar bel ağrısını hızlı bir şekilde azaltıp tutukluğu giderdikleri kesindir. Bu nedenle bu ilaçlar günümüzde de 'altın standart' konumlarını halen korumaktadır (71). NSAİİ'nin hastalığın laboratuvar belirteçlerini etkilediğine ilişkin henüz çok az bulgu mevcut olmakla birlikte ilk veriler röntgen bulgusunda görülen yapısal hasarı önlemede bir rolere olabileceğini akla getirmektedir (72).

Sulfasalazin (SSZ) ve Metotreksat (MTX)

Ankilozan spondilitte en çok çalışılmış ilaç olmasına rağmen etkinliği halen tartışmalıdır. AS'de SSZ kullanımının altında yatan mantık, inflamatuvar barsak hastalığı ve spondilartropatiler arasındaki ortak ilişki yanında, spondilartropatisi olan hastaların ileumunda inflamatuvar lezyonların tanımlanmış olmasıdır (11). SSZ'in periferik artritlerde etkili olduğu belirlenmesine rağmen aksiyel tutulumlarda belirgin yararlılığı gösterilememiştir (73). SSZ'in sık görülen yan etkileri halsizlik, bulantı, kusma ve dispeptik yakınmalardır (74).

MTX, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek DNA ve RNA sentezini durduran bir folik asit analogudur. Altan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada hastalar birinci yılın sonunda enflamasyon ve fonksiyonel parametreler bakımından değerlendirilmiştir. Sadece hekim global değerlendirmesi parametresinde MTX'in üstünlüğü saptanmış, diğer parametrelerde iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (75).

Kortikosteroidler

Uzun süreli düşük doz kortikosteroid kullanımının AS tedavisinde yeri yoktur. Diğer tedavilere yanıt alınmayan olgularda, kronik inatçı periferik artritte düşük doz oral kortikosteroid veya intravenöz pulse yüksek doz metilprednizolon yarar sağlayabilir. Ayrıca tek eklemde kronik artrit ve entezopatili olgularda kortikosteroid enjeksiyonları denenebilir (2).

Anti-TNF- α Tedavileri

Son 10 yılda TNF- α antagonistleri gibi sitokin yolunu spesifik olarak inhibe eden biyolojik ajanların geliştirilmesiyle beraber spondilopatilere olan klinik tanı ve tedavi yaklaşımları temelden değişmiştir. TNF- α blokajının gerek RA gerekse AS'de inflamasyona bağlı klinik semptomları ve akut faz reaktanlarını baskılamakla kalmayıp, aynı zamanda kemik ve eklem yapı üzerinde de modifiye edici rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu ajanların RA'lı hastaların eklem aralığı ve kemik yüzeyinin korunmasında etkili olduğuna dair kuvvetli kanıtlar bulunsada, AS'de yeni kemik oluşumunun azaltılması konusundaki etkileri çelişkilidir (77).

İnfliximab

Şimerik fare insan monoklonal antikoru olup, insan TNF- α 'sını hedef alır. Bu ajan transmembran ve solubl TNF- α 'ya bağlanmak suretiyle bu sitokinin aktivitesini nötralize edip, hücre yüzey reseptörleriyle etkileşmesine engel olur. AS tedavisinde 5mg/kg dozunda başlangıçta, 2. ve 6. haftalarda uygulandıktan sonra her 8 haftada bir tekrarlanır (78). İnfliximabın tepe kan düzeyleri diğerlerine göre daha fazladır.

Etanercept

Etanercept, TNF- α 'ya bağlanan ve onu inaktive eden insan IgG1'inin Fc kısmına bağlı insan p75 TNF reseptörünün dimerik füzyon proteinidir. Haftada iki defa 25 mg veya haftada bir 50 mg dozunda deri altı enjeksiyon olarak uygulanır ve monoklonal antikordardan farklı olarak başka bir proinflamatuvar sitokin olan lenfotoksin α 'ya da bağlanır. Etanerceptin 2 adet p75 bağlama yüzeyi bulunduğundan doğal monomerik reseptöre oranla TNF- α 'yı bağlamada daha yüksek affiniteye sahiptir (79). Yarı ömrü yaklaşık 68 saattir.

Adalimumab

Tamamen rekombinant insan Ig G1 monoklonal antikoru olup, insan TNF- α 'sına spesifiktir. TNF- α 'ya bağlanarak aktivitesini inhibe eder. Yarılanma ömrü yaklaşık 10-20 gün olup iki haftada bir 40 mg dozunda subkutan uygulanır (80).

2.1.11. Ankilozan Spondilitte Hastalık Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Ankilozan spondilitin aktivitesini ve fonksiyonel durumunu belirlemede ve tedaviye yanıtını izlemede kullanılmak üzere çeşitli hastalık değerlendirme indeksleri geliştirilmiştir. Hastalığın aktivitesini belirlemede klinik bulgular ya da CRP ve ESH gibi inflamasyon belirteçleri yeterli değildir. Gözlemciler arasındaki değişkenliği ortadan kaldırmak ve standart bir değerlendirme sağlayabilmek için BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) geliştirilmiştir (81). BASDAI hastalara kolaylıkla uygulanabilen, hastanın son bir haftalık genel durumunu, yorgunluk hissini, aksiyel ve periferik eklemlerdeki ağrının şiddetini, eklemlerin şişlik ve hassasiyetini, sabah tutukluğunun şiddet ve süresini ölçmeye yönelik 6 sorudan oluşan bir değerlendirme aracıdır (EK 1). AS'in tedavisinde, Anti TNF- α ilaçların kullanıma girmesinden sonra hazırlanan klavuzlarda, tedavi kararı verilmesinde ve izleminde BASDAI skorunun kullanılması önerilmektedir (82).

Hastaların fonksiyonel durumunu belirlemede kullanılan indeksler de geliştirilmiştir. Bunlar arasında BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index) ve BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index) sayılabilir. BASFI, hastaların son bir haftalık günlük yaşamları esnasındaki fonksiyonlarını belirlemek üzere hastalara sorulan 10 soruya verilecek cevabın değerlendirilmesiyle elde edilmektedir (EK 2) (83).

2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi gösteren maddelerdir (84,85). Organik ya da inorganik yapıda olabilen serbest radikallerin, eşleşmemiş elektronları nedeniyle, reaktiviteleri bir hayli yüksek, buna karşılık yarı ömürleri çok kısadır (86,87). Serbest radikallerin hedefi olan membran yapısında bulunan fosfolipidler, glikolipidler, doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri, oksidan ajanların arttığı ve antioksidan ajanların azaldığı veya yetersiz kaldığı durumlarda oluşan oksidatif strese maruz kalırlar. Sonuçta serbest radikaller hücrel hasar meydana getirirler (85,88,89).

İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen (O₂), yapısı itibarıyla radikal

olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikali (SOR) akla gelmektedir.

Vücutta oluşan SOR ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. Yoğun SOR üretimi ya da antioksidan defansın azalması, biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel modifikasyonlara yol açarak oksidatif strese neden olur. (85,89,90).

Serbest radikaller hücrede DNA, protein, karbonhidrat ve lipit gibi önemli hücresel yapılara etkilidir. Hücre membranının yapısında bulunan glikolipit, fosfolipit ve gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikaller için iyi bir hedeftir (88,91). Serbest radikaller ve serbest radikal tepkimeleri sonrası oluşan ürünler hücresel yaşamı tehdit etmekte ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır (92,93).

2.3. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

2.3.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Lipidler; biyolojik moleküler içinde reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan moleküllerdir. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir (91,94). Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO.) bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar (95). Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile hidroperoksidlere, hidroperoksidler de daha zararlı radikal özelliği olan aldehidlere dönüşürler. Bu aldehidler içinde en çok bilineni malondialdehid (MDA)'dir. Dolayısıyla bir dokuda MDA seviyesinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (96).

2.3.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Bunun başlıca sebebi, hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır (97). DNA molekülü serbest radikaller için önemli bir hedeftir ve kolaylıkla hasara uğratılır (94). DNA molekülü hasarı sonucu kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenezis, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin görüldüğü bilinmektedir (98).

2.3.4. Karbonhidratlarda Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 radikallerini meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, göz hastalıkları gibi pek çok hastalıkta ve durumda serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan mekanizmaların yetersiz olduğu gösterilmiştir (87).

2.4. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

2.4.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

Glutasyon (GSH): Sistein içeren bir tripeptit yapısında olup in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve eksojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (99,100).

E Vitamini : Lipid fazda çözünen zincir-kırıcı etkili bir antioksidandır (95,101).

C vitamini: Süperoksit ve hidroksil radikalının doğrudan temizleyicisidir (102).

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterir.

Bilirubin: Serbest radikalleri tutar, O_2^- ve OH^- toplar (99,103).

Albümin: Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit ve hipokloriti toplar (103).

Ürik asit: Plazma konsantrasyonlarında O_2^- , OH^- ve peroksil radikallerini temizler.

Seruloplazmin: SOD benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir (104).

Taurin: Ksenobiotiklere bağlanır. LPO ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder (105).

β -Karoten: Peroksitlere karşı doğrudan etki ederek inaktif hale getirir (98,106).

Melatonin: Organizmada yapılan ve tahrip edici hidroksil radikali temizler (107).

2.4.2. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.2.1. Glutasyon Peroksidaz

GSH-Px yapısında bir metal olan selenyumu bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. İn vitro ortamda GSH'ı GSSG'ye çevirir. Bu tepkime

H₂O₂'yi yüksek özgülük ile katalizleyerek detoksifiye eder. GSH'un GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda glutatyon peroksidaz enzimi H₂O₂'i suya indirger. Daha sonra glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutatyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir (106).

2.4.2.2. Katalaz

Katalaz (CAT) enzimi esas olarak peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 "hem" grubu bulunan bir hemoproteindir (95). Özellikle hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (110). Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (109).

2.4.2.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit Dismutaz (SOD), süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalizleyerek organizmayı toksik reaktif oksijen metabolitlerine karşı koruyan bir metalloenzimdir (110,112). SOD enzimi ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan ürünlerin birikmesi CAT enzimi tarafından bertaraf edilmektedir.

2.5. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.5.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Hücrelerin yapmış olduğu işlevler iyon değişimleri ile tetiklenmektedir. Canlılarda meydana gelen hareket, beynin hafızayla ilgili işleyişleri, pankreatik hücrelerde salgılama, yaraların iyileşmesi, kalbin kasılması ve apoptoz gibi reaksiyonlarda Ca⁺² belirleyici rol oynamaktadır. Ca⁺² hem hücre içi hem de hücreler arası etkileşimlerde önemli görevlere sahiptir. Hücre içi Ca⁺² sinyali, hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun ([Ca⁺²]_i) geçici bir şekilde artışından oluşur (113).

2.5.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu

Günümüzde geliştirilen patch-clamp ve mikrospektrofluorometrik teknikler ile beraber flurosan ışığına duyarlı çeşitli boyalar hücre içindeki iyonik akımları ve hücre içi serbest iyon seviyelerinin ölçülmesini mümkün hale getirmiştir (113).

Hücre içi Ca^{+2} hem hücre dışı ortama, hem de hücre içinde Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşük seviyededir. Bu nedenle Ca^{+2} hücre içi iletişimde sinyal görevi yapabilmektedir. Öyle ki hücre dışındaki $[Ca^{+2}]$ 'u yaklaşık olarak 10^{-3} M, Ca^{+2} depolarında, örneğin endoplazmik retikulumda (ER) 5×10^{-4} M civarlarında iken, $[Ca^{+2}]$ i bu değerlerden binlerce kez daha düşük olan 10^{-7} seviyelerindedir. Bu yüzden, hem hücre içi ile dışı arasında, hem de ER ile sitoplazma arasında, çok yüksek bir Ca^{+2} derişim farkı vardır. Bu fark, Ca^{+2} için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına sebep olur. Hem hücre zarı, hem de ER zarından Ca^{+2} geçişi, bu sürdürücü kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan olur. Bu kanallar, çoğunlukla kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} geçirgenliği sağlarlar (114).

Hücresinin içindeki serbest Ca^{+2} iyonunun artışı 2 yolla meydana gelir (115).

- 1- Hücre dışından hücre içine Ca^{+2} girişi,
- 2- Hücre içi kalsiyum depolarından Ca^{+2} salınması,

1- Hücresinin dışından hücresinin sitoplazmasına Ca^{+2} girişini sağlayan Ca^{+2} kanal tipleri şunlardır:

A- Ligand Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur. Böylece bu kanallar Ca^{+2} 'a karşı geçirgen hale gelirler. Bu kanallara en iyi örnek nikotinik Asetilkolin (ACh) reseptörleridir (116).

B- Voltaj Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Hücre membranının depolarize olması sonucunda bu kanallar aktive olur ve Ca^{+2} 'a karşı geçirgen hale gelirler. Böylece hücre membranında meydana gelen elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir (117).

C- Kalsiyumun sızarak hücreye girdiği kanallar: Hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar.

D- Ca-Na değiş-tokuş:

- 2- Hücre içi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} çıkışını sağlayan yapılar

Ca^{+2} 'un hücre içindeki depolardan hücresinin sitoplazmasına salınmasında en önemli rol oynayan faktörler Ca^{+2} ve inositol trifosfat (IP3) ile uyarılan reseptörlerdir. Hücre membranındaki reseptörlere agonistlerin bağlanması ile aktive

olan G proteininin uyardığı fosfolipaz C (PLC), membran fosfolipitlerinde İP3 ve diaçilgliserol (DAG) sentezine yol açmaktadır. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PtdIns 4, 5P2) ve DAG, protein kinaz C (PKC) yi aktive ederek bir seri fosforilasyon ve bunu izleyen aktivasyon veya inaktivasyona neden olur. İP3 ise hücre içi depolardan heparinle bloke edilebilen Ca^{+2} salınımına yol açmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} artışının tetiklediği Ca^{+2} salınımı, pozitif geri-besleme mekanizması olarak iş görmektedir.

2.6. Apoptoz

Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (118).

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürlür. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozdur. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik olabilir (119,120).

2.6.1. Apoptozun Başlatılması

Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir (121).

Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller:

Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (Reseptör- Ligand etkileşmesi), Fas-Fas ligandı, TNF, sitotoksik T lenfositleri, hücreleri etkileyen diğer dış etkenlerdir.

Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller:

DNA hasarı, hücre içi Ca^{+2} seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptoza götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir.

2.6.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara kaspaz adı verilir. Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı olarak ikiye ayrılır. Kaspaz ailesinin 14 üyesi tespit edilmiştir. Kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10 hücre ölümüyle ilişkilidir. Apoptozdan asıl sorumlu kaspaz 3'tür (122).

Kaspaz aktivasyonunda iki önemli uyarı yolu vardır. Biri ölüm reseptörleri aracılı-ekstrinsik yol, diğeri ise mitokondri aracılı-intrinsik yoldur. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla; iç sinyaller ise mitokodri aracılığıyla kaspazları aktive etmektedir. Mitokondri dış zarının geçirgenliği bazı proteinler ile sağlanmaktadır. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir ve bu grup proteinlerin bir kısmı proapoptotik etkili iken diğeri kısmı ise antiapoptotik etkilidir. Antiapoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozu baskıladığı oysa proapoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir (123).

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozuna neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozu giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (124,125).

2.6.3. Hücrede Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olunca sitoplazma ve çekirdek içindeki hedef proteinler yıkılır. Kaspazlar DNA endonükleazı serbestleştirerek DNA kırıklarına neden olurlar. Kaspazların aktifleştirdiği bir diğeri protein olan aktin yıkan protein hücrenin normal şeklinin bozulmasına yol açar.

2.6.4. Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokulardan temizlenirler (120).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi (SDÜTF) Romatoloji Kliniği ile Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Tez projesi için gerekli olan 'etik kurul onayı' SDÜTF Etik Kurul Başkanlığından alınmıştır. Ayrıca hastalar araştırma hakkında ayrıntılı bilgilendirilmiş ve çalışmayı kabul edenlerden 'bilgilendirme ve onay formu' alınmıştır.

3.1.Hasta Grupları

Çalışmaya SDÜTF Romatoloji kliniğince yeni tanı konulmuş veya daha önceden tanısı olupta kliniğimizce takip edilen 10 adet AS'li hasta alındı. Hastalarımızın tümüne Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS) aksiyel spondiloartrit sınıflama kriterleri (Tablo 7) (54) kullanılarak tanı konuldu.

Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet uyumlu 10 adet sağlıklı birey alındı.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

- 1- ASAS aksiyel spondiloartrit sınıflama kriterlerine göre AS tanısı olmak
- 2- Daha önce sulfasalazin, metotreksat ya da anti-TNF gibi hastalık modifiye edici tedavi kullanmamış olmak

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri

- 1- AS'e eşlik eden başka bir romatizmal hastalığı olmak
- 2- AS dışında sistemik, kronik bir hastalığı olmak
- 3- Aktif enfeksiyonu olmak
- 4- Malignitesi olmak
- 5- Gebelik

Çalışmaya dahil edilen hastalar 2 ana gruba ayrılarak nötrofilleri izole edildi. Sonrasında infliximabla inkübe edilip edilmediğine göre 2 alt gruba daha ayrılarak toplam 4 grup oluşturuldu.

Kontrol grubu: Kontrol grubunun nötrofilleri infliximabla (INF) inkübe edilmeden analizler yapıldı.

Kontrol + INF grubu: Kontrol grubunun nötrofilleri infliximabla inkübe edilerek analizler yapıldı.

AS grubu: AS'li hastaların nötrofilleri infliximabla inkübe edilmeden analizler yapıldı.

AS + INF grubu: AS'li hastaların nötrofilleri infliximabla inkübe edilerek analizler yapıldı.

AS'li hastalarda tanı amaçlı lomber vertebra hareket açıklığını göstermek üzere Schober testi, lateral fleksiyon, göğüs ekspansiyonu ve tragus duvar mesafesi ölçümleri yapıldı. AS'li hastalar ve kontrol grubunun BASDAI ve BASFI ölçümleri EK-1 ve EK-2 deki anket formları kullanılarak hesaplandı.

Çalışmaya alınan tüm bireylerden 12 saat açlık sonrası, sistemik hastalık tanısını dışlamak amacıyla hemogram, rutin biyokimyasal tetkikler (glukoz, BUN, kreatinin, AST, ALT, ALP, Ca, P), RF, ESH, CRP düzeyi için kan örnekleri alındı.

3.2. Örneklerin Alınması ve Saklanması

Çalışmaya alınan bireylerden yaklaşık 45 cc venöz kan örneği alındı. Tüm hasta ve kontrol bireylerinde kan örnekleri aynı şartlarda ve aynı kişiler tarafından alındı. Kanlardan 35 ml si uygun antikoagülan eklenmiş enjektörlerle alınıp laboratuara ulaştırıldı. Kalan 10 ml ise serum elde etmek için kullanıldı. Daha sonra kanlar nötrofil izolasyonu bölümünde anlatıldığı şekilde santrifüj edilerek hücreler ve serum izole edildi.

3.2.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)

Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

CO₂ inkubator: Heal force (Japonya)

Laminar flow kabini: Javan (Belçika)

Sallamak su banyosu: Labart (Japonya)

Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)

Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)

Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)

Soğutmalı santrifüj: Kubato (Japonya)

50 ml lik plastik falcon tüpleri. 1000/pk: Teknik (Türkiye)

15 ml lik falcon tüpleri. 1000/pk: Rota (Türkiye)

1B-103 Borasilicated kapillar tüp, 1000/pk: Fagus (Türkiye)

3.2.2.Nötrofil İzolasyonu

50 ml hacimli steril bir şırıngaya, 7 ml ACD solüsyonu (pıhtılaşmayı önleyici) konuldu. İçerisine hasta veya sağlıklı bireyden 35 ml taze venöz kan çekilerek ve bu kan içerisinde 10,5 ml HES (eritrositleri çöktürmeye yarar) olan 50 ml hacimli iki adet falcon tüplerine eşit miktarda bölünerek hafifçe karıştırıldı. Sonra bu karışım 30 dakika boyunca dik bir şekilde tutuldu. Bu arada iki tane vakumlu biyokimya tüpüne, serum elde etmek amacı ile yaklaşık 5'er ml kan alındı. 15 dakika dik bir şekilde bekletildi. 15 dakika sonunda 3000 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.

Elde edilen serum, steril 15 ml hacimli bir falcon tüpüne konuldu. SER + 1x Phosphate buffer saline (PBS) solüsyonu hazırlandı. (47,5 ml 1xPBS + 2,5 ml SER) 30 dakika sonunda, iki farklı tabaka gözlemlendi (eritrositler tüpün dibine çökmüş olur) ve yaklaşık 40 ml olan bu üst kısım (süpernatant) alınarak ayrı, steril bir 50 ml hacimli falcon tüpüne konularak 350 g'de 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant tüpün dibinde az bir miktar kalacak şekilde atıldı ve tüpün dibindeki çökelti (pellet) bu az miktar sıvı ile tekrar çözülmeye çalışıldı. Bir konsantre PBS solüsyonu ile 40 ml hacme kadar tamamlandı ve tekrar 350 g'de santrifüj edildi. Bu işlem yukarıda yazıldığı şekilde bir kez daha tekrarlandı.

Tüpün dip kısmında kalan pelletin içerisinde az miktarda da olsa eritrosit kalmış olabileceği ihtimalinden dolayı pelletin üzerine hızlı bir şekilde 10 ml enjeksiyonluk steril su döküldü ve 30 saniye durmasına müsaade edildi. 30 saniye sonrasında 2 konsantre PBS solüsyonu konuldu (son durum 1 konsantre PBS olmuş olur). Tekrar santrifüj işlemine götürüldü. Santrifüj sonrası kırmızı renkli bir solüsyon ve gri renkli pellet görülmesi beklendi. Bu pellet SER+1xPBS solüsyonu ile sulandırılarak çözüldü, ve santrifüj işlemi basamakları iki kere tekrarlandı. Steril 50

ml hacimli bir falcon tüpüne 15 ml Ficoll konuldu. Santrifüj işleminden çıkan pellet 10 ml SER+1xPBS ile tekrar sulandırıldı. Ve Ficoll solüsyonunun üzerine çok yavaş ilave edildi. 25 ml hacimli bu yeni solüsyonumuz 800 g'de 20 dakika santrifuj edildi. Ficoll; santrifuj ve yoğunluğu etkisi ile sadece nötrofillerin tüpün dibine çökmesine izin verir.

Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve tüpün dibindeki pellet tekrar SER+1xPBS ile sulandırıldı ve santrifüj işlemi basamağı iki kere tekrarlandı. Elde edilebilen hücre miktarına göre 10 ile 15 ml hacim arasında sulandırılırdı ve FURA-2 AM flüoresan maddesi ile son konsantrasyon 2 mikrom olacak şekilde 37 C de 45 dakika boyunca sallamalı su banyosunda boyandı. Boyanma işleminden sonra fazla boyaların atılması için hücreler tekrar santrifüj ve yıkanma işlemine tabi tutuldular. Tampon solüsyonu içerisinde etrafı şeffaf plastik küvetlere konularak spektrofloreometredeki yerine yerleştirilerek okunma işlemine geçildi.

Nötrofiller izolasyon miktarlarına bağlı her biri 10^7 hücre olacak şekilde 2 kısma ayrıldı. Bir kısmına hiçbir işlem yapılmadı. Diğer kısmına ise hücre canlılığı (MTT) testi uygulanarak en uygun infliximab dozu ve süresi bulundu ve hücreler bu doz ve sürede infliximab ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında oksidatif stresle ilgili değerlerin (GSH, GSH-Px, MDA düzeyleri) ölçülmesi için donduruldu. MDA (Placer ve ark. 1968) (126) analizleri ise spektrofotometrik olarak yapıldı.

3.2.3. Hücre Canlılığı (MTT Analizi)

Bu deneyde sarı renkte olan (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide maddesi canlı hücreler tarafından mor renkli formozan kristaline mitokondrial solunum yolu ile dönüştürülmektedir. Eğer hücreler canlı değilse bu reaksiyon gerçekleşmez. Renk oluşumu da spektrofotometrik yöntemle değerlendirilip sonuçlara göre infliximabın en uygun doz miktarı belirlenmiştir.

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] analizi ilk olarak Mosmann tarafından kullanıma girmiştir. MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat

dehidrojenaz aktivitesine bağımlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Reaksiyon ürünü uygun karışımda çözüldükten sonra spektrofotometrik yöntemle ölçülür. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır. Hücre canlılığı ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması, radyoaktif izotop kullanmaya gerek olmaması avantaj olarak kabul edilir.

3.2.4. Hücre İçi Kalsiyumun Ölçülmesi

Hücre içi Ca^{+2} miktarının ölçümü için nötrofil hücreleri oda ısısında 45 dakika boyunca $4\mu M$ fura-2 AM flüoresan boyası ile boyandı (127). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na^+ -HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; $CaCl_2$, 1,2; $MgCl_2$, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7.4)] solusyonu içerisinde Biyofizik Anabilim Dalında mevcut florasan spektrofotometrede (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında flüoresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{2+} iyon düzeyi $[Ca^{+2}]_i$ değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi ve Grynkiewicz ve ark.'nın metoduna göre hesaplandı (128).

3.2.5. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü

3.2.5.1. GSH ve GSH-Px Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi (129). GSH tayini için %10 triklorikasetik asit (TCA) solusyonu ve Tris tamponu (0,4 M pH:8,9) kullanıldı.

Tris tamponu (0,4 M pH:8,9): 48.46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH 8.9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlandı.

0.1 ml kan homejenatı 0.4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi, 0.1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0.9 ml distile su, 2.0 ml Tris tamponu ve 0.1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk tarafından bildirilen yöntemeye göre spektrofotometrede belirlendi. Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu (128).

3.2.5.2. Lipit Peroksidasyon (LPO) Analizi

Nötrofillerde LPO düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve ark.(69) bildirdikleri yöntemeye göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: Tüm nötrofil grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100°C' lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler nanomol/gram protein olarak belirlendi (128).

3.2.6. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Aktiviteleri Tayini

Hücreler bir saat süre ile 37C de 2 mL substrat solüsyonu (20 mM HEPES, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1% CHAPS, 5 mM dithiothreitol (DTT), ve 8.25 µM kaspaz substratı; pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı) içerisinde inkube edilerek sonrasında ultrasonik parçalama işlemine tabi tutuldu (130). Açığa çıkan enzimler spektrofotometre (Varian Cary Eclipse, Australia) cihazında 360 nm

uyarılma ve 460 nm emilme dalga boylarında okundu. Kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri floresan boyalar ile boyanarak değerlendirildi (AC-DEVD-AMC Kaspaz-3 ve AC-LEHD-AMC Kaspaz-9 için). Elde edilen veriler floresan birimi / miligram protein olarak kaydedildi.

3.2.7. Nötrofil Sitozüne Ca^{+2} Akışının Hangi Kanaldan Olduğunun Belirlenmesi

Verapamil ve diltiazem düşük ve yüksek voltaja duyarlı kanalları bloke eden kimyasallardır. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) ise transient receptor melastatin 2 (TRPM2) kapılarını bloke eden spesifik olmayan bir kimyasal maddedir. Nötrofil sitozölüne Ca^{+2} akışının hangi katyon kanallarından gerçekleştiğini test etmek için, elde edilen nötrofiller fMLP ile uyarılmadan önce 30 dakika 10 μ Mol verapamil+diltiazem (131) veya 0.1 mM 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) ile nötrofiller inkübe edildiler (132).

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Nötrofil hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS for Windows 15.0 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Gruplar arası fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistikî karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

Çalışmaya 10 (7 erkek, 3 kadın) AS'li hasta ile yaş ve cins grubu uygun sağlıklı 10 (7 erkek, 3 kadın) kontrol olmak üzere 20 kişi alındı. AS'li hastaların hepsi BASDAI skoru esas alındığında aktivasyon döneminde (BASDAI > 4) idi. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması $33,8 \pm 6,8$ yıl iken, kontrol grubunun yaş ortalaması $32,5 \pm 5,3$ yıl idi. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında ESH, CRP, BASDAI ve BASFI skorları AS'li grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı. Hasta ve kontrol gruplarının ESH, CRP, BASDAI ve BASFI düzeylerinin ortalamaları ve istatistiksel analizleri Tablo 9' da gösterilmektedir

4.2. Oksidatif Stres Bulguları

Kontrol, AS ve AS + INF grubundan izole edilen nötrofillerde oksidatif stres belirteci olarak; LPO ve antioksidanlardan GSH ile GSH-Px düzeyleri çalışıldı. LPO değerleri, kontrol grubuna kıyasla AS grubunda önemli düzeyde ($p<0.05$) yüksek gözlenirken, AS+INF grubunda, AS grubuna kıyasla önemli düzeyde ($p<0.05$) düşük bulundu. GSH ($p<0.001$) and GSH-Px ($p<0.05$) değerleri, kontrol grubuna kıyasla AS grubunda önemli düzeyde düşük gözlenirken, AS+INF grubunda, AS grubuna kıyasla önemli düzeyde ($p<0.05$ ve $p<0.01$) yüksek bulundu (Tablo 10).

Tablo 9. AS ve kontrol gruplarında ESH, CRP, BASDAI ve BASFI değerleri

	AS grubu (n=10) (Ortalama ± SD)	Kontrol grubu (n=10) (Ortalama ± SD)	p
ESH	23,1 ± 16,8	7,1 ± 4,7	<0,05
CRP	16,2 ± 14,9	4,2 ± 1,5	<0,00
BASDAI skoru	5,1 ± 0,7	0,7 ± 0,5	<0,00
BASFI skoru	3,9 ± 1,5	0,3 ± 0,6	<0,00

ESH : Eritrosit sedimentasyon hızı, CRP: C reaktif proein

BASDAI: Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksi

BASFI: Bath Ankilozan Spondilit Fonksiyonel İndeksi

Tablo 10. Nötrofillerde LPO, GSH ve GSH-Px düzeyleri (ortalama ± SD ve n=10)

	LPO (µmol/gr prot)	GSH (µmol/gr prot)	GSH-Px (IU/gr protein)
Kontrol	19.60 ± 1.52	3.27 ± 0.37	10.65 ± 1.44
AS	23.30 ± 3.02 ^a	2.56 ± 0.24 ^b	8.17 ± 1.39 ^a
AS + INF	20.30 ± 2.82 ^c	2.97 ± 0.30 ^d	9.79 ± 1.20 ^c

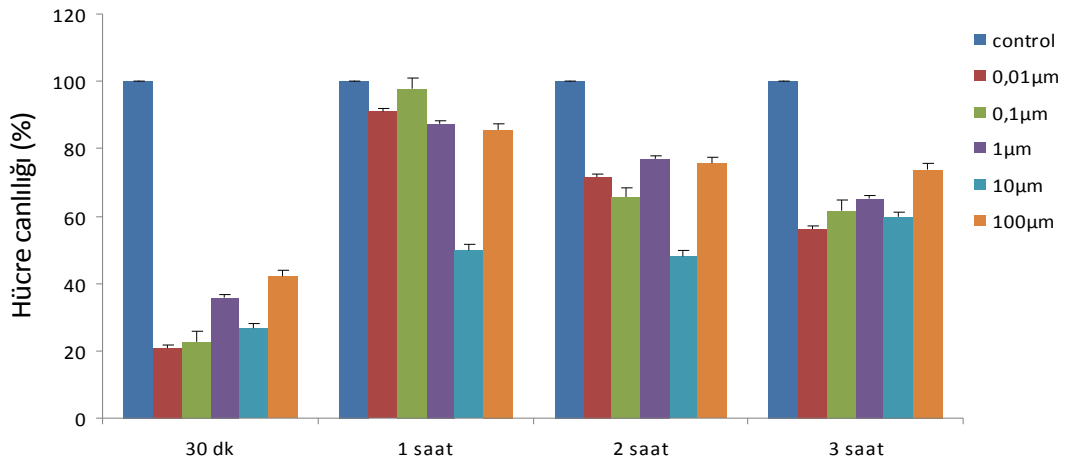
LPO: Lipid peroksidasyon, GSH: Glutasyon, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

^ap<0.05 ile ^bp<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla.

^cp<0.05 ile ^dp<0.01 AS grubuna kıyasla.

4.3. İnfliximab Dozunun Hücre Canlılığı (MTT) Testi İle Belirlenmesi

Elde edilen nötrofiller, 4 farklı zaman (30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 3 saat) ve kontrol ile farklı 5 dozda infliximab ile inkübe edildiler. Elde edilen sonuçlarda 1 saat ve 100 µM dozun öldürücü olmayan doz olduğu belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. MTT test sonuçları

4.4. Apoptozis Sonuçları

Kontrol, kontrol + INF, AS ve AS + INF gruplarından elde edilen apoptozis sonuçları şekil 2’de gösterilmiştir. Bu şekil incelendiğinde;

Apoptozis düzeylerinin AS grubunda hem kontrol grubuna hemde kontrol + INF grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.001$) yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna infliximab eklendiğinde apoptozis düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p < 0,001$) azaldığı görüldü. AS grubuna infliximab eklendiğinde apoptozis düzeylerinin AS grubuna göre anlamlı olarak ($p < 0,001$) azaldığı saptandı. AS + INF grubunda apoptozis düzeylerinin kontrol + INF grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p < 0,01$) gözlemlendi.

4.5. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Sonuçları

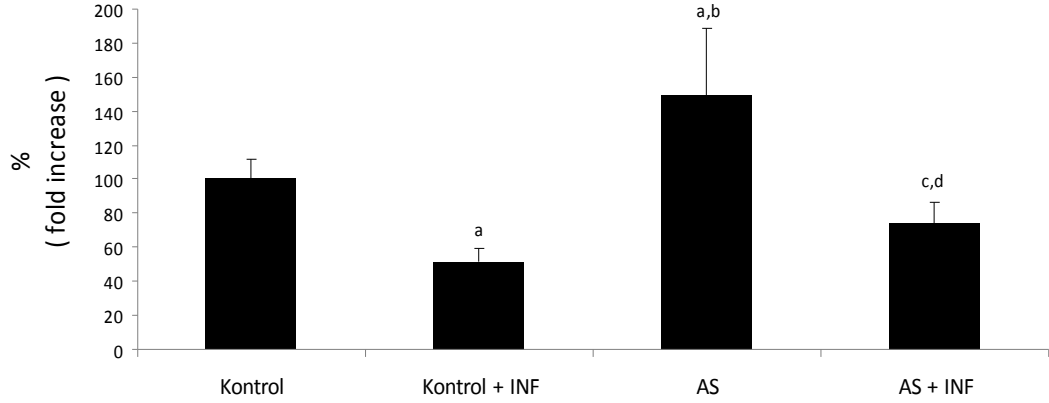
Kontrol, kontrol + INF, AS ve AS + INF gruplarından elde edilen kaspaz 3 ve kaspaz 9 değerleri şekil 3 ve şekil 4’de gösterilmiştir. Şekil 3 incelendiğinde;

Kaspas-3 düzeylerinin AS grubunda hem kontrol grubuna hemde kontrol + INF grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.001$) yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna infliximab eklendiğinde kaspas-3 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p < 0,001$) azaldığı görüldü. AS grubuna infliximab eklendiğinde kaspas-3 düzeylerinin AS grubuna göre anlamlı olarak ($p < 0,001$)

azaldığı saptandı. AS + INF grubunda kaspas-3 düzeylerinin kontrol + INF grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p<0,001$) gözlemlendi.

Şekil 4 incelendiğinde;

Kaspas-9 düzeylerinin AS grubunda hem kontrol grubuna hemde kontrol + INF grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.001$) yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna infliximab eklendiğinde kaspas-9 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0,001$) azaldığı görüldü. AS grubuna infliximab eklendiğinde kaspas-9 düzeylerinin AS grubuna göre anlamlı olarak ($p<0,001$) azaldığı saptandı. AS + INF grubunda kaspas-9 düzeylerinin kontrol + INF grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p<0,001$) gözlemlendi.



Şekil 2. İnfliximabın AS'li hastaların nötrofil apoptozis değerleri üzerindeki etkileri (n=10, ortalama \pm SD).

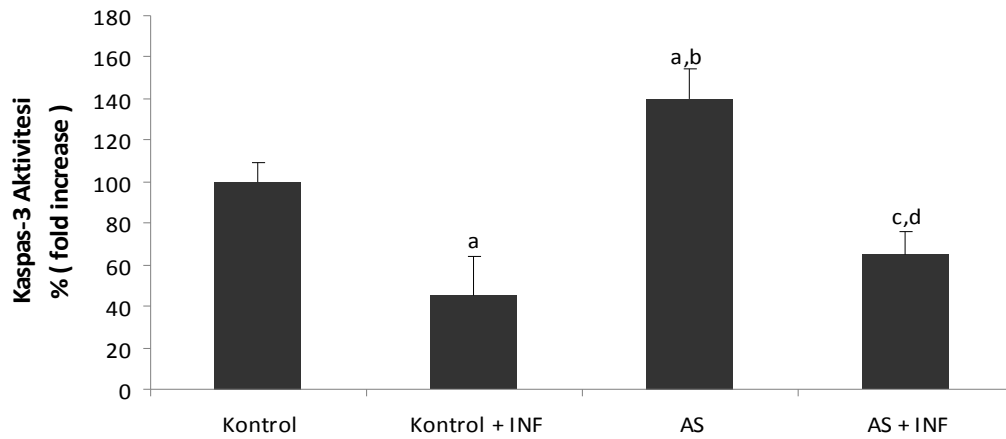
^a $p<0.001$ ve kontrol grubuna kıyasla.

^b $p<0.001$ ve kontrol ile kontrol + INF grubuna kıyasla.

^c $p<0.001$ ve hasta grubuna kıyasla.

^d $p<0.01$ ve kontrol + INF grubuna kıyasla.

AS: Ankilozan spondilit, INF: İnfliximab



Şekil 3. İnfliximabın AS'li hastaların nötrofil kaspas-3 değerleri üzerindeki etkileri (n=10, ortalama ± SD).

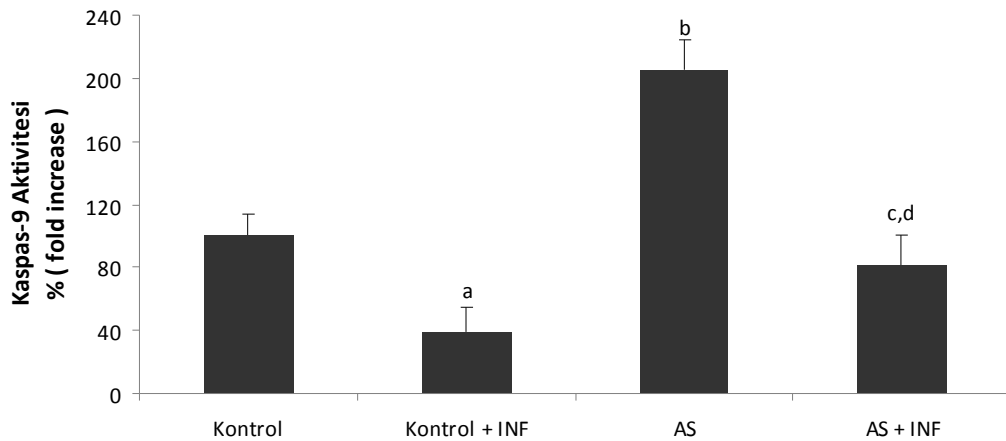
^ap<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla.

^bp<0.001 ve kontrol ile kontrol + INF grubuna kıyasla.

^cp<0.001 ve AS grubuna kıyasla.

^dp<0.001 ve kontrol + INF grubuna kıyasla.

AS: Ankilozan spondilit, INF: İnfliximab



Şekil 4. İnfliximabın AS'li hastaların nötrofil kaspas-3 değerleri üzerindeki etkileri (n=10, ortalama ± SD).

^ap<0.001 ve kontrol grubuna kıyasla.

^bp<0.001 ve kontrol ile kontrol + INF grubuna kıyasla.

^cp<0.001 ve AS grubuna kıyasla.

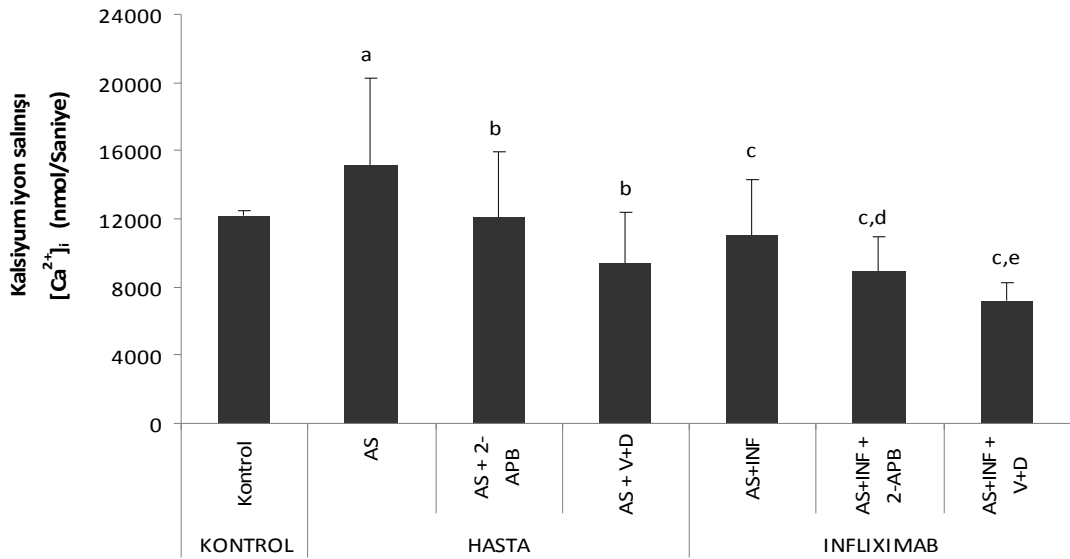
^dp<0.001 ve kontrol + INF grubuna kıyasla.

AS: Ankilozan spondilit, INF: İnfliximab

4.6. Sitozole Ca+2 Salınışı Sonuçları

Kontrol, kontrol + INF, AS ve AS + INF gruplarından elde edilen Ca+2 iyon salınışı sonuçları şekil 5’de gösterilmiştir. Bu şekil incelendiğinde;

AS grubunda kontrol grubuna göre sitozole Ca+2 iyon salınımının istatistiksel olarak ($p<0,001$) daha fazla olduğu gözlemlendi. Hem AS + 2-APB grubunda hem de AS + V+D grubunda AS grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0,001$) sitozole Ca+2 iyon salınımının daha az olduğu görüldü. AS hastalarına infliximab eklendiğinde sitozole Ca+2 iyon akışının AS hastalarına göre anlamlı olarak ($p<0,01$) azaldığı gözlemlendi. AS+INF + 2-APB grubunda AS + 2-APB grubuna göre sitozole Ca+2 iyon salınımının anlamlı olarak ($p<0,001$) azaldığı saptandı. AS+INF + V+D grubunda da AS + V+D grubuna göre sitozole Ca+2 iyon salınımının anlamlı olarak ($p<0,001$) azaldığı gözlemlendi. Hücre içine Ca+2 salınışının tüm gruplardaki zaman akım grafiği şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 5. Gruplar arası sitozole kalsiyum akışı

^a $p<0.001$ ve kontrol grubuna kıyasla.

^b $p<0.001$ ve AS grubuna kıyasla.

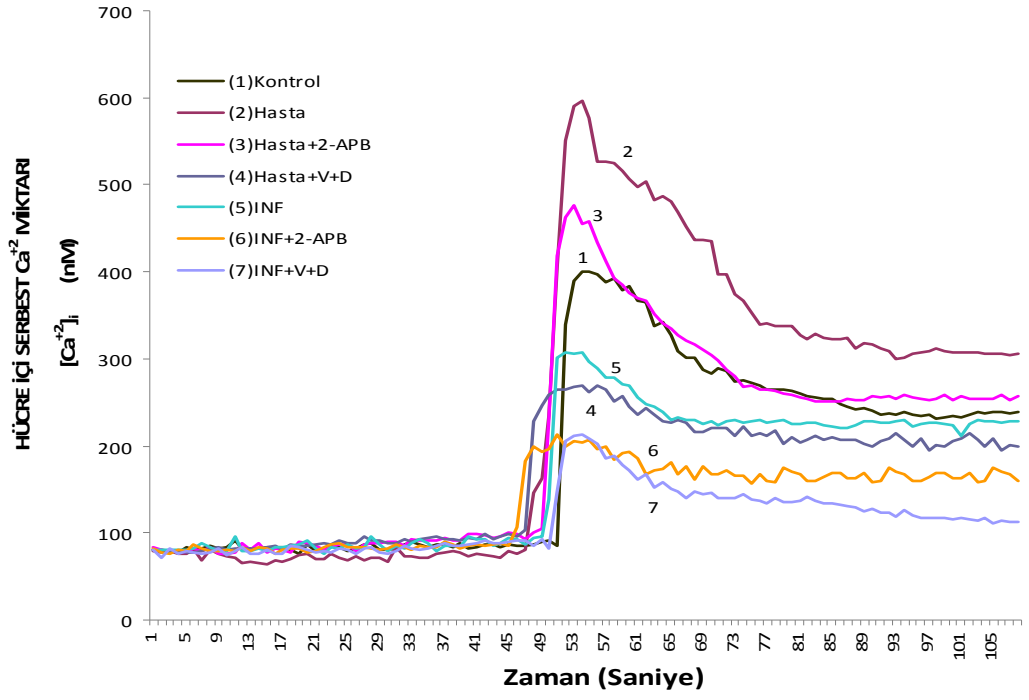
^c $p<0.01$ ve AS grubuna kıyasla.

^d $p<0.001$ ve AS + 2-APB grubuna kıyasla.

^e $p<0.001$ ve AS + V+D grubuna kıyasla.

AS: Ankilozan spondilit, INF: İnfliximab, 2-APB: 2-aminoethoxydiphenyl borate

V: Verapamil, D: Diltiazem



Şekil 6. Hücre sitozolüne Ca^{+2} salınışının tüm gruplardaki zaman akım grafiği

5. TARTIŞMA

Ankilozan spondilit genellikle 20-40 yaş arası erkeklerde kadınlara göre 3 kat daha fazla görülen inflamatuvar romatizmal bir hastalıktır. Hastalığın seyrine baktığımızda hastalar bedensel olarak etkilenmekte ve yaşamlarının en verimli devrelerinde iş gücü kaybına uğramaktadırlar. Hastalığın günümüzde halen kesin bir tedavisi olmayıp kullanılan mevcut ilaçlar hastalığın gidişatını yavaşlatmak için kullanılmaktadır.

Hastalığın patogenezi aydınlatıldıkça kullanılan tedavilerde o yönde ilerlemektedir. AS'li hastalarda hem aksiyel iskelette hemde periferik eklemlerde TNF- α molekülü yüksek oranda saptanmış ve bunun ışığında anti-TNF ilaçlar kullanıma girmiştir. Günümüzde bu ilaçlarla hastalarda klinik olarak belirgin bir rahatlama sağlanmış ancak radyolojik olarak ilerlemenin devam ettiği bildirilmiştir (62).

Ankilozan spondilitte hastalık aktivitesinin ve fonksiyonun değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılan BASDAI ve BASFI skorları önceki yapılan çalışmalarda hasta gruplarında kontrol gruplarına göre yüksek bulunmuştur. Bu skorların değişiminin tedaviye cevabı izlemde ve düşük BASDAI skorlarının biyolojik tedavilere cevabı öngörmekte kullanışlı olduğu bildirilmiştir (133). Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu (133) olarak AS'li hasta grubunda kontrol grubuna göre BASDAI ve BASFI değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Yine benzer şekilde hastalık aktivitesini gösteren ESH ve CRP değerleri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p < 0,05$).

Nötrofillerin inflamatuvar hastalıklarda yer alan doku hasardan sorumlu olduğu bilinmektedir. Oksidatif stresle artan ROS nötrofil aktivasyonundan sorumludur. ROS ismi verilen ürünlerden başlıcaları; O_2^- , H_2O_2 ve OH^- 'dir. Bu ürünler özellikle doymamış yağ asitlerinin yapılarını bozarak hücrelerde hasara yol açmaktadırlar. ROS'un zararlı etkilerinin hücre düzeyinde belirlenmesinde kullanılan yöntem MDA esasına bağlı LPO düzeyi tayinidir (134).

Oksidasyon/antioksidasyon dengesinin oksidasyon yönünde bozulmasının yani oksidatif stresin RA, Behçet gibi inflamatuvar hastalıkların patogenezinde olduğu gibi AS patogenezinde de önemli rolü olduğunu gösteren deliller mevcuttur.

Oksidatif stres serbest radikallerin ya oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında düşme sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır. İnflamasyon sırasında ortaya çıkan TNF- α , IL1- β gibi proinflamatuvar sitokinler nitrik oksit, malondialdehit oluşumunu, ksantin oksidaz aktivitesini indüklemekte ve serbest radikal oluşumunu bu yolla arttırmaktadırlar. AS patogenezinde oksidatif stresin rolünü araştıran çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Biasi ve arkadaşları AS'nin aktif döneminde anormal derecede yüksek nötrofil göçü olduğunu ve bu hastalarda dolaşımdaki nötrofillerce reaktif oksijen radikallerine cevabın arttığını göstermişlerdir (135). Kocabaş ve arkadaşları AS'li hastalarda serumda oksidan/antioksidan düzeylerine bakmış ve sonuçta AS'de dengenin oksidan yönünde bozulduğunu göstermişlerdir (136). Karakoç ve arkadaşları oksidatif stresi değerlendirmek için total oksidatif stres, total antioksidan seviye ve oksidatif stres indeksini kullanmışlar ve AS hastalarında total antioksidan seviyesinde kontrol grubuna göre düşüklük saptanırken oksidan özelliği gösteren diğer iki parametrede hasta grubunda anlamlı bir yükseklik göstermişlerdir (137).

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden en çok etkilenen hücre elemanları membran lipidleridir. Oksidatif atak özellikle polyanstatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile kendisini gösterir. Malondialdehit bu zincir reaksiyon sırasında bir ara ürün olarak oluşur. Bu nedenle MDA düzeyi oksidatif polyanstatüre yağ asitleri hasarının bir göstergesi olarak kabul edilir. MDA miktarının artması hasarı gösterir. Özgöçmen ve arkadaşları AS'li hastaların serumlarında MDA düzeylerini değerlendirmişler ve MDA düzeyini AS'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptamışlardır (138). Bizim çalışmamızda da Özgöçmen ve arkadaşlarını destekler nitelikte benzer sonuçlar elde edilmiş ve LPO düzeyleri AS'li hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek saptanmıştır. LPO seviyelerindeki bu artış AS'li hastalarda daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi oksidatif stresin artması sonucu aşırı üretilen ROS'lar ile ilişkili olabilir. Yine antioksidan parametrelere bakıldığında GSH ve GSH-Px düzeyleri önceki literatürleri destekler nitelikte AS'li hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı. Yukarıda bahsedilen çalışmaların hepsi AS'li hastaların serumlarında bakılan değerler olup AS'li hastaların nötrofillerinde antioksidan

parametreleri değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim alışmamızda AS'li hastaların nötrofilleri direkt hedef olarak alınmış ve antioksidan parametreler serumda bakılan değerlere benzer şekilde sonuçlar elde edilmiştir. Nötrofiller fagositoz sırasında serbest oksijen radikallerini üretmektedirler. Serbest radikallerin üretimi artar ise bunların inhibisyonundan sorumlu olan antioksidanların düzeyi azalmaktadır. AS'de fagositik aktivitenin arttığı çok iyi bilinmektedir. Bundan dolayı antioksidan enzim düzeyleri yükselmemiş olabilir.

TNF- α reaktif oksijen türlerinin (ROS) retimini artmasını tetikleyen inflamatuvar bir sitokindir (139). Çeşitli alışmalar anti-TNF ajanların RA'li hastalarda ROS retimi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Pay ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada RA hastalarının nötrofil kültürlerinde anti-TNF ajanların nötrofil kemotaksisini ve ROS üretimini azalttığını göstermişlerdir (140). Başka bir çalışmada RA'li hastalarda anti-TNF ajanların infilamasyonlu eklemde ROS üretimini ve ayrıca eklemde olan nötrofil akımını belirgin azalttığını göstermişlerdir (141). Literatüre bakıldığında AS'li hastalarda anti-TNF ajanların oksidatif stres üzerine olan etkilerini inceleyen çalışma az sayıdadır. AS'li hastaların nötrofillerinde ise bu etki hiç çalışılmamıştır. Karakucak ve arkadaşları AS'li hastalarda anti-TNF ajan kullananlarla NSAİİ kullanan hastaların oksidatif durumlarını karşılaştırmışlar ve anti-TNF alanların hem NSAİİ kullananlara hemde kontrol grubuna göre oksidatif durumun daha iyi olduğunu göstermişlerdir (142). Bizim çalışmamız anti-TNF ajanlardan inlifliximabın AS'li hastaların direkt nötrofilleri üzerinde oksidatif stresi inceleyen ilk ve tek çalışmadır. Çalışmamızda AS grubuna infliximab eklendiğinde antioksidan parametrelerde istatistiksel olarak belirgin bir düzelme saptanmıştır. Ajanın bu etkisini nötrofil kemotaksisini azaltarak ve ROS oluşumunu inhibe ederek yaptığı düşünülebilir. Bu sonuçlar infliximabın AS'li hastaların nötrofillerinde oksidatif stres üzerine olumlu etkisinin olduğunu ve bu yolu da kullanarak inflamasyonu baskılayabileceğini düşündürmektedir.

TNF- α inhibitörlerinin in vivo apopitozu indükleyip indklemiyeceği sorusuna yanıt bulmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu ilaçlarla tedavi edilen psöriasis, RA ve Crohn hastalarının (CH) biyopsi materyalleri ve periferik kandaki apopitotik hücrelerin sıklığı lerek incelenmiştir. Yapılan 3 ayrı alışma CH da infliximab tedavisinden 4 saat ile 4 hafta sonrasında periferik kandaki monositlerde

ve lamina propriadaki T hücrelerinde apoptozun sayısının arttığını göstermiştir (143-145). RA'de yapılan 2 çalışmanın birisinde infliximab sonrası yapılan sinoviyal biyopsilerde apoptozda artış görülmezken, diğer çalışmada apoptotik hücrelerde 2-5 kat artış saptanmıştır (146). Psöriatik artritli hastaların hem sinoviyal biyopsilerinde hem de psöriatik cilt lezyonlarından yapılan biyopsilerde infliximab tedavisinden 48 saat sonra apoptotik hücrelerde artış saptanmıştır (147).

Ankilozan spondilitli hastaların nötrofillerinde infliximab ile yapılan apoptozis çalışması literatürde bulunmamaktadır. Bizde bu açıktan yola çıkarak infliximabın AS'li hastaların in vitro olarak ayrıştırılmış nötrofillerinde apoptoz üzerine nasıl etki ettiği sorusuna yanıt bulmak için nötrofilleri infliximabla inkübe ederek kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerini hesapladık. Şekil 8'e bakıldığında infliximabın hem kontrol grubuna hem de AS'li hasta grubuna eklendiğinde apoptozu belirgin olarak azalttığını gözlemledik. Yine apoptozun göstergesi olan kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerine baktığımızda infliximabın bu enzim düzeylerini belirgin oranda azalttığını ve sonuçta apoptozu inhibe ettiğini söyleyebiliriz. TNF- α apoptozisin ekstrensek yolağında, özellikle kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynadığı gibi intrensek apoptozis yolağında da başlangıç kaspazlarını aktifleştirmek suretiyle etkin olduğu gözlenmiştir (148). Proapoptotik bir sinyal olarak kabul edilen TNF- α 'yı bloke eden ilaçlar antiapoptotik etkinlik göstermektedirler. Bizim sonuçlarımızda bu literatürü destekler nitelikte olup infliximab AS'li hastaların nötrofillerinde apoptozisi inhibe etmektedir. TNF- α antagonistlerinin transmembran TNF aracılığıyla apoptozis üzerine çift etki yapabildiği yani apoptozu hem inhibe edip hemde indükleyebileceği belirtilmiştir (149). Çalışmamızda infliximabın apoptozu inhibe ettiğini saptadık. Ancak apoptozun inhibisyonuna rağmen inflamasyonda baskılanma olması bu çift etkiye bağlı olarak inflamasyonu baskılayan birtakım sitokinler ortama salınıyor olabilir. Bunun irdelenmesi için hasta sayısı çok olan daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekir.

Ankilozan spondilitte nötrofil fonksiyonlarının arttığı bildirilmiştir (150). Nötrofil fonksiyonlarını etkileyen en önemli faktörlerden biri hücre içi serbest Ca²⁺'un düzeyidir. Kalsiyum iyonu nötrofillerde kemotaksis, adezyon, araşidonik asit ürünlerinin yapımı ve serbest oksijen radikalleri üretimini etkilediği için nötrofillerde meydana gelen hücre içi Ca²⁺ düzey değişiklikleri nötrofil

fonksiyonlarını doğrudan etkilemektedir (151). Bir dokuda inflamasyon varsa nötrofiller genellikle bu inflamasyonda ilk savunma bariyerini oluşturmakta ve bakterilerin salgılamış olduğu fMLP ile aktif hale gelmektedir. Bu uyarılma sonucunda hücre içi Ca^{+2} miktarında artış meydana gelmekte ve serbest radikal üretimi artmaktadır.

Biz çalışmamızda AS'li hastaların nötrofilleriyle kontrol grubunun nötrofillerinin hücre içi Ca^{+2} düzeylerini karşılaştırdık. Ayrıca AS'li hastaların nötrofillerini infliximab ile inkübe ederek sitozole Ca^{+2} akışının değişip değişmediğini inceledik. Nötrofilleri infliximab ile inkübe etmeden önce hücre için toksik olmayan dozun belirlenmesi için MTT testi yapıldı. Sonuçta 1 saat ve 100 μM dozun öldürücü olmayan doz olduğu belirlendi (Şekil 7). AS'li hastaların nötrofillerinde yapılan hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin kontrol gruplarından elde edilen nötrofillerin hücre içi Ca^{+2} değerlerine göre anlamlı oranda yüksek saptanması ($p < 0,001$) ve baktığımız hasta gruplarının aktivasyon döneminde olması nedeniyle AS'in aktivasyonunda nötrofil intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyi artışının etkili olabileceğini düşündürmektedir.

TNF- α inhibitörlerinden olan infliximabın AS'li hastaların nötrofillerinde sitozole Ca^{+2} akışı üzerine etkisinin olup olmadığı daha önce hiç araştırılmamıştır. Çalışmamız bu konu üzerinde yapılan ilk ve tek çalışmadır. Çalışmamızda infliximabın AS'in aktivasyonunda nötrofil intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyi değişimleri üzerine etkili olabileceği düşünülerek, nötrofiller in vitro ortamda infliximab ile inkübe edildi. AS'li hasta grubunda infliximabla inkübasyondan sonra ölçülen intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyinin bazal ölçümlere göre anlamlı düzeyde düşük saptanması ($p < 0,001$), AS hastalarında infliximabın nötrofil intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyini azalttığını göstermektedir. İnfliximabın Ca^{+2} üzerine etkisini hangi Ca^{+2} kanalı üzerinden yaptığı bilinmediği için voltaja duyarlı Ca^{+2} kapıları, kalsiyum kanal blokerleri olan diltiazem + verapamil veya 2-APB ile bloke edildi (131,132). İnfliximab+verapamil+diltiazem ile inkübe edilen AS'li hasta nörofillerinde infliximab+2-APB ile inkübe edilenlere göre intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyinde anlamlı düzeyde azalma saptandı ($p < 0.01$). Bu sonuçlar ışığında infliximabın hücre içi Ca^{+2} düzeylerini azaltmada TRPM2 kanallarından çok voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarını kullandığı düşünülebilir.

6. SONUÇLAR

Ankilozan spondilit hastalığında sitozole Ca^{+2} salınışında artış mevcuttur. Hastalığın tedavisinde kullanılan TNF-alfa inhibitörlerinden olan infliximab nötrofillerde intrastoplazmik Ca^{+2} düşüklüğüne yol açmaktadır. Ayrıca nötrofillerdeki apoptozu inhibe etmekte ve oksidatif stres üzerine olumlu etkisi bulunmaktadır. İnfliximabın nötrofillerdeki Ca^{+2} sinyali değişikliğini voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları üzerinden yaptığı düşünülmektedir. AS hastalarında verapamil ve diltiazem voltaj bağımlı kanallar aracılığı ile nötrofillerde intrastoplazmik Ca^{+2} düzeyini azaltmaktadır. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının da hedef alınarak gelecekte yeni çalışmalarla desteklenmesi yeni tedavi yaklaşımları açısından yol gösterici olacaktır.

ÖZET

“Ankilozan Spondilitli Hastaların Nötrofillerinde Tümör Nekroz Faktör Alfa İnhibitörü İnfliximabın Kalsiyum Sinyali, Oksidatif Stres ve Apoptozis Üzerine Etkileri”

Ankilozan spondilit, vertebranın progresif ve asendan kemik füzyonuna yol açabilen, spinal eklemlerin inflamasyonu ile karakterize, periferik eklemlerin daha az sıklıkla etkilendiği, etyolojisi tam olarak aydınlatılmamış kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın günümüzde halen kesin bir tedavisi olmayıp kullanılan mevcut ilaçlar hastalığın gidişatını yavaşlatmak için kullanılmaktadır.

Ankilozan spondilitte nötrofil fonksiyonlarının arttığı bildirilmiştir. Nötrofil fonksiyonlarını etkileyen en önemli faktörlerden biri hücre içi serbest Ca²⁺'un düzeyidir. Kalsiyum iyonu nötrofillerde kemotaksis, adezyon, araşidonik asit ürünlerinin yapımı ve serbest oksijen radikalleri üretimini etkilediği için nötrofillerde meydana gelen hücre içi Ca²⁺ düzey değişiklikleri nötrofil fonksiyonlarını doğrudan etkilemektedir.

Biz bu çalışmada anti-TNF ilaçlardan olan infliximabın ankilozan spondilitli hastaların polimorf nükleer lökositleri (PMNL) üzerine olan etkisini kalsiyum sinyalleri üzerinden bakmayı ve hem oksidatif stres hem de apoptozis üzerine olan etkilerini in vitro ortamda araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla AS'li hastaların in vitro ortamda nötrofilleri ayrıştırılarak infliximab ile inkübe edildi. Sonrasında hem inkübasyon öncesinde hem de inkübasyondan sonra nötrofillerin sitozole Ca²⁺ iyon salınışı hesaplanarak infliximabın bu kanallara olan etkisi araştırıldı. Nötrofillerde infliximabla ortaya çıkabilecek oksidatif stres durumunu incelemek için Glutasyon (GSH), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Lipid peroksidaz (LPO) düzeyleri; apoptoz için ise kaspas-3 ve kaspas-9 düzeyleri ölçüldü. Hasta grubunda sitozole Ca²⁺ salınışının arttığı ve infliximabın hücre içi Ca²⁺ düzeylerini azalttığı saptandı. Ayrıca infliximabın nötrofillerdeki apoptozu inhibe ettiği ve oksidatif stres üzerine olumlu etkisinin olduğu gözlemlendi.

Bu çalışmanın sonuçları AS hastalığında nötrofillerde intrasitoplazmik Ca²⁺ akışının ve oksidatif stresin önemini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ankilozan Spondilit, İnfliximab, Kalsiyum Sinyali, Oksidatif Stres

SUMMARY

“Effects of Infliximab, a TNF- α inhibitor, on Intracellular Calcium Signaling, Oxidative Stress Parameters and Apoptosis levels in neutrophils of patients with Ankylosing Spondylitis”

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory disease which is characterized with inflammation of the spinal joints. The etiology of AS is not very well known. There is no definitive treatment of AS till today, the aim of the most common used drugs is to slow down the course of the disease.

Increased neutrophilic activation has been reported in AS patients. Ca^{2+} is a universal cation which plays an important role for many types of cell function. One of the most important factor which affects neutrophil functions is the level (concentration) of intracellular free calcium ions ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Ca^{2+} may affect chemotaxis, adhesion, formation of arachidonic acid pathways products and free oxygen radicals. The changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels affect on neutrophil functions directly.

The main objective of the current study is to investigate the possible protective effects of Infliximab, one of the antiTNF-drug, on neutrophils of patients with Ankylosing spondylitis via $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling, oxidative stress parameters and apoptosis levels, in vitro.

Neutrophils were freshly isolated from the AS patients and incubated with 100 μM Infliximab during one hour. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ release were measured both with before and after incubation of neutrophils with Infliximab. Glutathione (GSH), Glutathione peroxidase (GSH-Px) and Lipid Peroxidation (LPO) levels were also evaluated to determine the oxidative stress status and Caspase-3 and -9 levels were evaluated for apoptosis levels.

We found that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ release increased in patient group and infliximab caused a dramatic decrease on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ release. We also observed that infliximab inhibited the apoptosis of neutrophils and mediates a positive effect on the oxidative stress.

The results indicate the impact of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling and oxidative stress in neutrophils of patients with AS.

Key Words: Ankylosing Spondylitis, Infliximab, Calcium Signaling, Oxidative Stress

Kaynaklar

- 1- Davis JC. Ankylosing Spondylitis. In: Koopman WJ, Moreland LW(eds), Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology Lippincott Williams and Wilkins P. 2005; 1319-33.
- 2- Arasıl T. Ankilozan Spondilit. In: Beyazova M, Kutsal YG (eds), Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Günes Kitabevi, Ankara 2000; 1577-91.
- 3- Arnett FC. Ankylosing spondylitis. In: Kopman WJ (ed.) Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology. Williams&Wilkins, Pennsylvania, 1997; 1197-208.
- 4- Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, van der Linden S, Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2003; 23: 61–6.
- 5- Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. *Arthritis Rheum.* 2010; 58: 15–25.
- 6- Onen F, Akar S, Birlik M, et al. Prevalence of ankylosing spondylitis and related spondyloarthritis in an Urban Area of Izmir, Turkey. *J Rheumatol.* 2008; 35: 305-9.
- 7- Sieper J, Rudwaleit M, Khan MA, Braun J. Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006; 20: 401-17.
- 8- Bakland G, Nossent HC, Gran JT. Incidence and prevalence of ankylosing spondylitis in Northern Norway. *Arthritis Rheum.* 2005; 53: 850-5.

- 9- Braunstein EM, Martel W, Moidel R. Ankylosing spondylitis in men and women: a clinical and radiographic comparison. *Radiology* 1982; 144: 91-4.
- 10- Stone M, Warren RW, Bruckel J, Cooper D, Cortinovis D, Inman RD. Juvenileonset ankylosing spondylitis is associated with worse functional outcomes than adult-onset ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2005; 53: 445-51
- 11- Van der Linden SJ, van der Heijde D. Spondylarthropathies: ankylosing spondylitis. In: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000; 1039 –53.
- 12- Brown MA, Kennedy LG, Mac Gregor AJ, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1823–1828.
- 13- Van der Linden S, Van der Heijde, Braun J. Ankylosing spondylitis. In: Arasıl T, (Ed). *Kelley Romatoloji. Günes Kitapevi, Ankara; 2006: 1125-41.*
- 14- Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* 2005; 56: 683-695.
- 15- Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, Akkoc N. The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun Rev.* 2007; 6: 183-9.
- 16- Birinci A, Bilgici A, Kuru O, Durupinar B. HLA-B27 polymorphism in Turkish patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2006; 26: 285-7.
- 17- Edwards JC, Bowness P, Archer JR. Jekyll and Hyde: the transformation of HLAB27. *Immunol Today.* 2000; 21: 256-60.
- 18- Cowling P, Ebringer R, Ebringer A. Association of inflammation with raised serumIgA in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1980; 39: 545–49.

- 19- Smith JA, Märker-Hermann E, Colbert RA. Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006; 20: 571-91.
- 20- Maksymowych WP. Spondyloarthropathies: Etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis. In: Hochberg M, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, eds. *Rheumatology*. Philadelphia: *Elsevier Limited* 2003; 1183-92.
- 21- Bollow M, Fischer T, Reissbauer H, et al. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis- cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59: 135-40.
- 22- Baeten D, Moller HJ, Delanghe J, Veys EM, Moestrup SK, De Keyser F. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 1611-23.
- 23- Brophy S, Taylor G, Blake D, et al. The interrelationship between sex, susceptibility factors, and outcome in ankylosing spondylitis and its associated disorders including inflammatory bowel disease, psoriasis, and iritis. *J Rheumatol.* 2003; 30: 2054-8.
- 24- Fırat SN. Ankilozan spondilit ve psöriatik artritli hastalarda HLA-B27 sıklığı ve klinik bulgular ile ilişkisinin değerlendirilmesi. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi 2011.
- 25- McMichael A, Bowness P. HLA-B27 : natural function and pathogenic role in spondyloarthritis. *Arthritis Res.* 2002; 3: 153-8.

- 26- Dangoria NS, Delay ML, Kingsbury DJ, et al. HLA B-27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2002; 277: 23459-68.
- 27- Bird LA, Peh CA, Kollnberger S, et al. Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 748-59.
- 28- Uchanska-Ziegler B, Ziegler A. Ankylosing spondylitis: a beta2m-deposition disease? *Trends Immunol.* 2003; 24: 73-6.
- 29- Bingöl Ü. Ankilozan spondilitte etyopatogenezi. *Turkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol-Special Topics* 2011; 4: 7-15.
- 30- Penttinen MA, Heiskanen KM, Mohapatra R, DeLay ML, Colbert RA, Sistonen L, Granfors K. Enhanced intracellular replication of *Salmonella enteritidis* in HLA-B27-expressing human monocytic cells: dependency on glutamic acid at position 45 in the B pocket of HLA-B27. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2255-63.
- 31- Luthra-Guptasarma M, Singh B. HLA-B27 lacking associated beta2-microglobulin rearranges to auto-display or cross-display residues 169-181: a novel molecular mechanism for spondyloarthropathies. *FEBS Lett.* 2004; 575: 1-8.
32. Smith JA, Marker-Hermann E, Colbert RA. Pathogenesis of ankylosing spondylitis: current concepts. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006; 20: 571-91.
- 33- Turner MJ, Delay ML, Bai S, Klenk E, Colbert RA. HLA-B27 up-regulation causes accumulation of misfolded heavy chains and correlates with the magnitude of the unfolded protein response in transgenic rats: Implications for the pathogenesis of spondylarthritis-like disease. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 215-23.

- 34- Coşan F, Gül A. Ankilozan spondilit patogenezi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007; 25: 13-19.
- 35- Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol.* 2010; 22: 126-32.
- 36- Salonen DC, Brower AC. Seronegative spondyloarthropathies: imaging. *Rheumatology* 2008; 5: 1131-42.
- 37- Khan MA. Ankylosing spondylitis. In: Klippel JH (ed), Primer on rheumatic diseases. *Arthritis Foundation* 1997; 24: 189-93.
- 38- Ball J. Enthesopathy of rheumatoid and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1971; 30: 213-23.
- 39- Demirel A. Ankilozan spondilitli hastalarda rezistin seviyesinin hastalık aktivitesi ve proinflamatuvar sitokinlerle ilişkisi. Erciyes Üniversitesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı. 2009.
- 40- Aufdermaur M. Pathogenesis of square bodies in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1989; 48: 628-31.
- 41- Rudwaleit M, Metter A, Listing J, Sieper J, Braun J. Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 569-78.
- 42- Pang WP, Davis JC. In: Ankylosing spondylitis and the spondylarthropathies. çeviri: Uğur M. Bölüm: Ankilozan spondilitin klinik yönleri. Çeviri ed: Özgöçmen S. Kitap: Ankilozan Spondilit ve Spondiloartropatiler. Veri medikal yayıncılık, İstanbul, 2008; 145-53.

- 43- Khan MA. Clinical features of ankylosing spondylitis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (eds), *Rheumatology*. 2003; 1161-81.
- 44- Sebes JI, Salazar JE. The manubriosternal joint in rheumatoid disease. *AJR Am J Roentgenol*. 1983; 140: 117-21.
- 45- Ramos-Remus C, Major P, Gomez-Vargas A, Petrikowski G, Hernandez-Chavez A, Gonzalez-Marin E, et al. Temporomandibular joint osseous morphology in a consecutive of ankylosing spondylitis patients. *Ann Rheum Dis*. 1997; 56: 103-7.
- 46- Wakefield D, Montanaro A, McCluskey P. Acute anterior uveitis and HLAB27. *Surv Ophthalmol*. 1991; 36: 223-232.
- 47- Qaiyumi S, Hassan ZU, Toone E. Seronegative spondyloarthropathies in lone aortic insufficiency. *Arch Intern Med*. 1985; 145: 822-4.
- 48- Bergfeldt L. HLA-B27 associated cardiac disease. *Ann Intern Med*. 1997; 127: 621-9.
- 49- Reveille J. Clinical Features of Ankylosing Spondylitis. In: Hochberg MC, Silman, AJ., Smolen, JS., Weinblatt, ME., Weisman, MH., editor. *Rheumatology: Elsevier Publishers*; 2008; 1109-14.
- 50- Kabasakal Y. Ankilozan Spondilit. In: Gümüşdis G, Doğanavsargil E (eds). *Klinik Romatoloji*. İstanbul, 2003; 501-40.
- 51- Sant SM, O'Connell D. Cauda equina syndrome in ankylosing spondylitis: A case report and review of the literature. *JCR* 1995; 14: 224-6.
- 52- Nabokov AV, Shabunin MA, Smirnov AV. Renal involvement in ankylosing spondylitis (Bechterew's disease). *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 11: 1172-5.

53- Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984; 27: 361-8.

54- Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 777-83.

55- Çalış M, Özgöçmen S. Ankilozan spondilit ve erken aksiyel spondiloartrit sınıflama kriterleri. *Turkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol-Special Topics* 2011; 4: 16-22.

56- Ozgocmen S, Akgul O, Khan MA. Mnemonic for assessment of the spondyloarthritis international society criteria. *J Rheumatol.* 2010; 37: 1978.

57- Ruof J, Stucki G. Validity aspects of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in ankylosing spondylitis: a literature review. *J Rheumatol.* 1999; 26: 966-70.

58- Taylor HG, Wardle T, Beswick EJ, Dawes PT. The relationship of clinical and laboratory measurements to radiological change in ankylosing spondylitis. *Br J Rheumatol.* 1991; 30: 330-5.

59- Göksoy T. Ankilozan spondilit. Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi. *Yüce Dağıtım*, İstanbul 2002; 622-36.

60- Guglielmi G, Scalzo G, Cascavilla A, Carotti M, Salaffi F, Grassi W. Imaging of the sacroiliac joint involvement in seronegative spondylarthropathies. *Clin Rheumatol.* 2009; 28: 1007-19.

- 61- Feldtkeller E, Bruckel J, Khan MA. Scientific contributions of ankylosing spondylitis patient advocacy groups. *Curr Opin Rheumatol*. 2000; 12: 239-47.
- 62- Ulusoy H, Kaya A. Ankilozan spondilitte görüntüleme yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol-Special Topics* 2011; 4: 39-49.
- 63- Yu W, Feng F, Dion E, Yang H, Jiang M, Genant HK. Comparison of radiography, computed tomography and magnetic resonance imaging in the detection of sacroiliitis accompanying ankylosing spondylitis. *Skeletal Radiol*. 1998; 27: 311-20.
- 64- Resnick D, Kransdorf MJ. Ankylosing spondylitis. Bone and joint imaging. Elsevier Saunders Company 2005; 267-87.
- 65- Jevtic V, Kos-Golja M, Rozman B, McCall I. Marginal erosive discovertebral "Romanus" lesions in ankylosing spondylitis demonstrated by contrast enhanced Gd-DTPA magnetic resonance imaging. *Skeletal Radiol*. 2000; 29: 27-33.
- 66- Maksymowych WP. Progress in spondylarthritis. Spondyloarthritis: lessons from imaging. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11: 222.
- 67- Geijer M, Göthlin GG, Göthlin JH. The clinical utility of computed tomography compared to conventional radiography in diagnosing sacroiliitis. A retrospective study on 910 patients and literature review. *J Rheumatol*. 2007; 34: 1561-5.
- 68- Stone M, Salonen D, Lax M, Payne U, Lapp V, Inman R. Clinical and imaging correlates of response to treatment with infliximab in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2001; 28: 1605-14.
- 69- Song IH, Carrasco-Fernández J, Rudwaleit M, Sieper J. The diagnostic value of scintigraphy in assessing sacroiliitis in ankylosing spondylitis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67: 1535-40.

- 70- Uhrin Z, Kuzis S, Ward MM. Exercise and changes in health status in patients with ankylosing spondylitis. *Arch Intern Med.* 2000; 160: 2969–75.
- 71- Dougados M, Dijkmans B, Khan M, et al. Conventional treatments for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61: 40-50.
- 72- Wanders A, Heijde D, Landewé R, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 1756-65.
- 73- Clegg DO, Reda DJ, Abdellatif M. Comparison of sulfasalazine and placebo for the treatment of axial and peripheral articular manifestations of the seronegative spondylarthropathies: a Department of Veterans Affairs cooperative study. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 2325-9.
- 74- Hanauer SB, Stathopoulos G. Risk-benefit assessment of drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Saf.* 1991; 6: 192-219.
- 75- Haibel H, Brandt HC, Song IH, Brandt A, Listing J, Rudwaleit M, et al. No efficacy of subcutaneous methotrexate in active ankylosing spondylitis: a 16-week open-label trial. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 419-21.
- 76- Maksymowych WP, Jhangri GS, Fitzgerald AA, et al. A six-month randomized, controlled, double-blind, dose-response comparison of intravenous pamidronate (60 mg versus 10 mg) in the treatment of nonsteroidal antiinflammatory drugrefractory ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 766-73.
- 77- Schett G, Landewé R, van der Heijde D. Tumour necrosis factor blockers and structural remodelling in ankylosing spondylitis: what is reality and what is fiction? *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 709-11.

- 78- Lecluse LL, Piskin G, Mekkes JR, Bos JD, de Rie MA. Review and expert opinion on prevention and treatment of infliximab-related infusion reactions. *Br J Dermatol*. 2008; 159: 527-36.
- 79- Straub RH, Härle P, Sarzi-Puttini P, Cutolo M. Tumor necrosis factor-neutralizing therapies improve altered hormone axes: an alternative mode of antiinflammatory action. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 2039-46.
- 80- Chang J, Girgis L. Clinical use of anti-TNF-alpha biological agents--a guide for GPs. *Aust Fam Physician*. 2007; 36: 1035-8.
- 81- Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol*. 1994; 21: 2286-91.
- 82- Brandt J, Haibel H, Cornely D, Golder W, Gonzalez J, Reddig J et al. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab.. *Arthritis Rheum*. 2000; 43: 1346-52.
- 83- Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O'Hea J, Mallorie P, Jenkinson T. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol*. 1994; 21: 2281-5.
- 84- Von Sonntag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2006.
- 85- Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Inter Disciplinary Approach. *Kluwer Academic Publishers*, 2002.

86- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47 : 412 – 426.

87- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine (2nd ed). *Clarendon Pres, Oxford* 1989; 432 – 33.

88- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; 1: 1396-1397.

89- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-426.

90- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 2004; 142: 231-255.

91- Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J. R. Soc. Med.* 1989; 82: 747-752.

92- Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery* 1983; 94: 407-411.

93- Parks DA. Oxygen radicals: mediator of gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 1989; 30: 293-298.

94- Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81-103.

95- Akkus S. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. *Mimoza Yayınları*, Konya. 1995; 1-132.

96- Slater TF. Free radical mechanisms in injury. *Biochemistry* 1984; 222: 1- 15.

- 97- Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku superoksit dismutaz, CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri. Uzmanlık Tezi. Ankara Uni. Tıp Fak. Biyokimya A.D. 1994
- 98- Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin. Chim. Acta.* 2006; 365: 30-49.
- 99- Ayçiçek A, Erel O, Koçyigit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur. J. Pediatr.* 2005; 164: 775-778.
- 100- Fedeli D, Falcioni G, Olek RA, Massi M, Cifani C, Polidori C, Gabbianelli R. Protective effect of ethyl pyruvate on msP rat leukocytes damaged by alcohol intake. *J. Appl. Toxicol.* 2007.
- 101- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.* 1993; 90: 7915-7922.
- 102- Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2006; 42: 289-306.
- 103- Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin. Biochem.* 2004; 37: 112-119.
- 104- Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur. Respir. J.* 2005; 26: 257-264.
- 105- Wright CE, Tallan HH, Lin YY. Taurine, biological update. *Annu. Rev. Biochem.* 1986; 55: 427-453.

- 106- Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.
- 107- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer RF, Limson J, Weintraub ST, QI WB. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin transformation. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 29: 1177–85.
- 108- Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto.* 1974; 73: 1075-1086.
- 109- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 2000; 57: 779-795.
- 110- Kılınç K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksid dismutaz. *Biyokimya Dergisi.* 1986; 3: 59-76.
- 111- Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. *Cerrahpasa J. Med.* 1996; 27: 41-50.
- 112- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* 2004; 266: 37-56.
- 113- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985; 260: 3440-50.
- 114- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Molecular Biology of the Cell: Fourth Edition. Garland Publishing Inc 2002; 1: 852-862.
- 115- Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.* 1987; 56: 395-433.

- 116- McKay BE, Placzek AN, Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol* 2007; 74: 1120-33.
- 117- Catterall WA, Perez-Reyes E, International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 411-25.
- 118- Tomatır AG. Apoptoz: programlı hücre ölümü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri* 2003; 23: 499-508.
- 119- Thompson CB. Apoptosis. Editör, Paul WE. *Fundamental Immunology. Lippincott-Raven Publishers.* 1999.
- 120- Nai-Kang KBS, Passaro E. Apoptosis: Programmed cell death. *Arch Surg.* 1998; 133: 773-5.
- 121- Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. Editör, Koopman WJ. *Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams & Wilkins* 2001.
- 122- Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 1010: 1-8.
- 123- Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9: 143-148
- 124- Ferri KF, Kroemer G. Mitochondria-the suicide organelles. *BioEssays* 2001; 23: 111- 15.
- 125- Hatton J. Pharmacological treatment of traumatic brain injury: A review of agents in development. *CNS Drugs* 2001; 15: 553- 81.

- 126- Kleinova M, Hewitt M, Brezova V, Madden JC, Cronin MT, et al. Antioxidant properties of carotenoids: QSAR prediction of their redox potentials. *Gen Physiol Biophys.* 2007; 26: 97-103.
- 127- Gaudry M, C.J. Roberge, R. deMedicis, et al. Crystal-induced neutrophil activation. III. Inflammatory microcrystals induce a distinct pattern of tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:1649–55.
- 128- Demirkan H. Ailevi Akdeniz ateşli hastalarda nötrofil fonksiyonlarının göstergesi olarak nötrofillerde kalsiyum sinyali ve oksidatif stres üzerinde kolşisinin etkisinin araştırılması. Tıpta uzmanlık tezi. 2010.
- 129- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25: 192-205.
- 130- Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente, JA and Rodríguez AB. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res.* 2009; 46: 392-400.
- 131- Korkmaz S, Erturan I, Nazıroğlu M, Uğuz AC, Çiğ B. Colchicine modulates oxidative stress in serum and neutrophil of patients with Behçet's disease regulation of Ca²⁺ release and antioxidant system. *J Membr Biol.* 2011; 244: 113-120.
- 132- Nazıroğlu M, Özgül C, Çelik Ö, Çiğ B, Sözbir E. Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca²⁺ influx TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *J Membr Biol.* 2011; 241: 69-75.
- 133- Rudwaleit M, Listing J, Brandt J, Braun J, Sieper J. Prediction of a major clinical response (BASDAI 50) to tumour necrosis factor alpha blockers in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63: 665-70.

134- Kose K, Dogan P, Ascioğlu M, Erkilic K, Ascioğlu O. Oxidative stress and antioxidant defenses in plasma of patients with Behcet's disease. *Tohoku J Exp Med.* 1995; 176: 239-48.

135- Biasi D, Carletto A, Caramaschi P, Bellavite P, Andrioli G, Caraffi M, et al. Neutrophil functions, spondylarthropathies and HLA-B27: a study of 43 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: 623-7.

136- Volkan Kocabaş, Hilal Kocabaş, Mustafa Kemal Başaralı, İlhan Sezer, Cahit Kaçar, Sadık Büyükbaş. Ankilozan Spondilit Hastalarının Serum Oksidan-Antioksidan Seviyeleri. *Selçuk Üniv. Tıp Derg* 2010; 26: 79-83.

137- Karakoc M, Altindag O, Keles H, Soran N, Selek S. Serum oxidative-antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2007; 27: 1131-4.

138- Ozgocmen S, Sogut S, Ardicoglu O, Fadillioglu E, Pekcutucu I, Akyol O. Serum nitric oxide, catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2004; 24: 80-3.

139- Cunnane G, Bresnihan B, FitzGerald O Immunohistologic analysis of peripheral joint disease in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 180-82.

140- Pay S, Musabak U, Erdem H, Simsek I, Pekel A, Sengul A et al. Chimerical anti-TNF-alpha, infliximab, inhibits neutrophil chemotaxis and production of reactive oxygen species by blocking the priming effect of mononuclear cells on neutrophils. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2005; 27: 187-98.

141- den Broeder AA, Wanten GJ, Oyen WJ, Naber T, van Riel PL, Barrera P. Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 232-37.

- 142- M. Karkucak, E. Capkin, A. Alver, A. Akyuz, A. Kiris et al. The effect of anti-TNF agent on oxidation status in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2010; 29: 303-07.
- 143- Hove T., van Montfrans C., Peppelenbosch M.P., van Deventer S. J. H. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 206–211.
- 144- Di Sabatino, Ciccocioppo R., Cinque B., Millimaggi D., Morera R., Ricevuti L. Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 70–77.
- 145- Luger A., Schmidt M., Luger N., Pauels H. G., Domschke W. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 2001; 21: 1450–1457.
- 146- Catrina A. I., Trollmo C., af Klint E., Engstrom M., Lampa J., Hermansson Y. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 61–72.
- 147- Goedkoop A. Y., Kraan M. C., Teunissen M. B., Picavet D. I., de Rie M. A., Deactivation of endothelium and reduction in angiogenesis in psoriatic skin and synovium by low dose infliximab therapy in combination with stable methotrexate therapy: a prospective single-centre study. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: 326–34.
- 148- Fadeel B, Orrel S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258:479-517.

149- Daniel T., Lars K., Eric H., Jochen G. S., Paul P. T. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* 2008; 117: 244–79.

150- Il'in MV, Mal'tseva PA, Rosanov DV, Volkova AS, Khrustalev AO. Changes in oxidative stress and apoptosis parameters of neutrophils in rheumatoid diseases. *Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2012; 1: 89-92.

151- Pantaler E, Luckhoff A. Inhibitors of TRP channels reveal stimulus-dependent differential activation of Ca²⁺ influx pathways in human neutrophil granulocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009; 380: 497-507.

EK 1. BASDAI; (BATH ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSİ)

Geçen hafta ile ilgili aşağıdaki soruları her çizgiye işaret koyarak yanıtlayınız.

1. Geçen hafta içinde hissettiğiniz yorgunluğun derecesini tanımlarmısınız ?

Hiç (0) _____ (100) Çok yoğun

2. Geçen hafta içinde hissettiğiniz boyun, bel veya kalça ağrısının şiddetini tanımlarmısınız ?

Hiç (0) _____ (100) Çok yoğun

3. Boyun, bel, kalça dışındaki eklemlerinizdeki ağrı / şişliğin şiddetini tanımlarmısınız ?

Hiç (0) _____ (100) Çok yoğun

4. Basınçla yada dokunmayla hassas olan bölgelerinizde hissettiğiniz rahatsızlığın şiddetini tanımlarmısınız ?

Hiç (0) _____ (100) Çok yoğun

5. Yataktan kalkarken hissettiğiniz sabah sertliğinin şiddetini tanımlarmısınız ?

Hiç (0) _____ (100) Çok yoğun

6. Uyandığınızdan itibaren sabah sertliğiniz ne kadar sürüyor ?

0 saat _____ 2 saat ve üzeri

1/2

1

1.5

TOPLAM SKOR: Bütün soruların skorları bir cetvel yardımıyla ölçülür. 5. ve 6. soruların ortalama değeri, ilk dört sorunun skorları toplamına eklenir. Toplam değer, 5'e bölünür. Bu elde edilen skor BASDAI skorudur.

EK 2. BASFI; (BATH ANKİLOZAN SPONDİLİT FONKSİYONEL İNDEKSİ)

Hastalar 10 aktivitenin herbiri için, kendi seviyelerini, geçen haftayı göz önüne alarak 10 cm'lik Vizüel Analog Skalada (VAS) işaretlemelidirler.

1. Yardımsız çorap ya da pantolon giymeniz
Kolay (0) _____ (100) İmkansız
2. Yardımsız yerden kalem almak için öne eğilmeniz
Kolay(0) _____ (100) İmkansız
3. Yardımsız veya herhangi bir yere tutunmadan oturduğunuz koltuktan kalkmanız
Kolay (0) _____ (100) İmkansız
4. Yerde sırt üstü yatarken yardımsız kalkmanız
Kolay (0) _____ (100) İmkansız
5. Rahatsızlık hissetmeden 10 dakika boyunca ayakta durmanız
Kolay (0) _____ (100) İmkansız
6. Tutamakları tutmadan veya herhangi bir yardım almadan 12-15 basamak çıkmanız
(her adımda bir basamak çıkacak şekilde)
Kolay (0) _____ (100) İmkansız
7. Evde veya iş yerinde tüm günlük aktiviteleri yapmanız
Kolay (0) _____ (100) İmkansız
8. Yardımsız yüksek bir rafa uzanmanız
Kolay (0) _____ (100) İmkansız
9. Vücudunuzu döndürmeden omuzunuzun üzerinden yana bakabilmeniz
Kolay (0) _____ (100) İmkansız
10. Fizyoterapi egzersizleri, bahçe işi ve spor gibi fiziksel aktiviteleri yapmanız
Kolay (0) _____ (100) İmkansız

TOPLAM SKOR: Bütün soruların skorları bir cetvel yardımıyla ölçülür ve toplanır.

Toplam değer 10'a bölünür. Elde edilen skor BASFI skorudur.