

**T.C.**  
**SAĞLIK BAKANLIĞI**  
**İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ**  
**ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ**  
**DAHİLİYE KLİNİĞİ**



**ANKİLOZAN SPONDİLİT HASTALARINDA SERUM PERİOSTİN DÜZEYİ VE**  
**ETKİLİ OLABİLECEK FAKTÖRLER**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. SADETTİN USLU**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof.Dr.Servet Akar**

**İZMİR 2015**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle asistanlık eğitimim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışkanlığı, bitmek bilmeyen enerjisi, bilime olan aşkı, son derece etik ve sabırlı hasta yaklaşımı, ılımlı ancak otoriter idareciliği ile her zaman kendime örnek alacağım ve özellikle son 2 yıлымda tez çalışmamın tüm aşamalarında her türlü kolaylığı sağlayarak benden çok daha özverili çalışan, satırların yetersiz olduğu, teşekkürlerden fazlasını hakeden değerli tez hocam Prof. Dr. Servet Akar' a,

Tez aşamasında hep yanımda olan, desteklerini, samimiyetini esirgemeyen, bu tezin çatısında büyük rolü olan hocamız Yrd. Doç. Dr. Dilek Solmaz'a,

Tezimin biokimya çalışmalarında desteğini hiç esirgemeyen hocamız Prof. Dr. Didem Kozacı'ya,

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimleriyle sürekli yol gösteren, tez aşamasında desteğini eksik etmeyen, son derece sabırlı insancıl karakterinden asla ödün vermeyen kendisini hocadan ziyade bir abla olarak gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Gerçek Can'a,

Eğitim süresi içerisinde bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim, kendileriyle çalışma şansını yakaladığım için kendimi bahtiyar saydığım, bölümümüzün değerli hocaları Doç. Dr. Barış Önder Pamuk, Doç. Dr. Dilek Ersil Soysal, Yrd. Doç. Dr. Zeki Soypaçacı ve Uzm. Dr. Mehmet Sonbahar'a,

Asistan eğitim süresince beraber çalışma şansını yakaladığım bölümümüzdeki değerli asistan arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan annem Fitnat Uslu, babam Sinan Uslu'ya,

Her anımda yanımda olduğunu bildiğim, beni her aşamada destekleyen ve cesaretlendiren biricik sevgili eşim Uzm. Dr. Dilek Nurlu Uslu'ya,

Teşekkürü bir borç bilirim...

## **İÇİNDEKİLER**

### **KISALTMALAR**

### **TABLolar LİSTESİ**

### **ŞEKİLLER LİSTESİ**

### **ÖZET**

### **ABSTRACT**

## **1. GİRİŞ VE AMAÇ**

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Ankilozan Spondilit**

### **2.2 Etyopatogenez**

#### **2.2.1 Genetik Yatkınlık**

#### **2.2.2 Enfeksiyon**

#### **2.2.3 Sitokinler**

#### **2.2.4 İnflamasyon ve Histopatoloji**

### **2.3 Ankilozan Spondilitte Yeni Kemik Oluşumu**

#### **2.3.1 Wnt İnhibitörleri, Dkk-1, Sklerostin**

#### **2.3.2 BMP**

#### **2.3.3 Osteokalsin**

#### **2.3.4 Periostin**

## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1 Çalışmaya Alınan Hastalar**

### **3.2. Laboratuvar ve radyolojik değerlendirmeler**

### **3.3. Çalışmada Kullanılan anketler ve ölçümler**

### **3.4 İstatistiksel Yöntem**

## **4.SONUÇLAR**

## **5.TARTIŞMA**

## **6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

## **7. KAYNAKLAR**

## **KISALTMALAR**

**AS:**Ankilozan Spondilit

**SpA:**Spondilartropati

**BASDAI:**Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index

**BASFI:**Bath Ankylosing Spondylitis Functionel Index

**hs-CRP:**High sentitive C-reaktif protein

**ESH:**Eritrosit sedimantasyon hızı

**ELİSA:**Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**BMP:**Bone Morfogenik Protein

**Wnt:**Wingless Proteins

**Dkk 1:**Dickkopf ilişkili protein 1

**HLA:**Human Leukocyte Antigen–İnsan Lökosit Antijeni

**RA:**Romatoid artrit

**PsA:**Psöriatik artrit

**RS:**Reiter sendromu

**ReA:**Reaktif artrit

**USpA:**Undiferansiye spondilartrit

**IBD:**İnflamatuar barsak hastalığı

**VIC:**Valve interstitial cell

**MGA:**Matriks gla proteini

**UPR:**Unfolded protein response

**IL:**Interlökin

**TNF:**Tümör nekrozis faktör

**TGF:**Transforming growth factor

**IFN:**Interferon

**Fz:**Frizzled

**LRP:**Lipoprotein reseptör

**SİE:**Sakroiliak eklem

**OA:**Osteoartrit

**MHC:**Major histokompatibilite kompleks

**PTH:**Parathormon

**FAK:**Fokal adezyon kinaz

**PDGF:**Platelet derived growth factor

**FGF:**Fibroblast growth factor

**BMI:**Body Mass Index

**PGA:**Physician's global assessment

**ASQOL:**Ankylosing Spondylitis quality of life

**ASDAS:**Ankylosing Spondylitis disease activity score

**mSASSS:**Modifiye Stoke AS Spine Score

**VEGF:**Vascular Endothelial Growth Factor

**GESPIC:**German Spondyloarthritis Inception Cohort

## **TABLÖLAR LİSTESİ**

**Tablo 1.** Periostin salınımını pozitif ya da negatif etkileyen faktörler

**Tablo 2.**Ankilozan Spondilit Modifiye Newyork Tanı Kriterleri

**Tablo 3.**Hasta ve kontrol gruplarının demografik verileri

**Tablo 4.** AS hastaların aktive, fonksiyon ve yapısal hasar indeksleri

**Tablo 5.**Hasta ve kontrollerin laboratuvar değerleri

**Tablo 6.** Periostin düzeylerini predikte eden faktörler

## **ŞEKİLLER LİSTESİ**

**Şekil 1.**Spondiloartropati ailesi

**Şekil 2.** BMP ve Wnt yolağının kemik formasyonu üzerindeki etkisi

**Şekil 3.** Sklerostin, Dkk-1 ve TNF' nin Wnt, BMP ve diğer sinyal yolakları ile olan etkileşimi

**Şekil 4.**Hastalık aktivitesi ve total SİE ankilozuna göre serum periostin değerleri

**Şekil 5.** Sindesmofit varlığı ve kalça tutulumuna göre serum periostin



## **Ankilozan Spondilitli hastalarda serum periostin düzeyi ve etkili olabilecek faktörler**

### **ÖZET**

**Gerekçe:**Ankilozan spondilit (AS) sakroiliak ve spinalinflamasyon ve yeni kemik oluşumu (sindesmofit) ile karakterize kronik romatizmal bir hastalıktır. Bu sürecin altta yatan moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da; mezenkimal hücrelerin kemik yapıcı osteoblastlara farklılaşması anahtar rol oynuyor gibi görünmektedir. Periostin, primer olarak osteoblastlar tarafından salgılanan,ekstrasellüler bir matriks proteindir. Periostinin,Wnt-  $\beta$ -catenin düzenlenmesi aracılığı ile kemik anabolizması üzerinde rol oynadığı gösterilmiştir, böylece AS'de sindesmofit oluşumunun patogenetik mekanizmalarından biri olabilir.

**Amaç:**AS hastalarındaki periostin düzeylerinin değerlendirilmesi. Ayrıca; periostin düzeyleri ve diğer kemik oluşumuna katkıda bulunan biyo-belirteçler arasındaki ilişkiyi ve periostinin hastalık sonlanımı, özellikle deradyografik değişiklikler,üzerineolan etkilerini değerlendirmek.

**Hastalar ve Metod:** İki merkezden modifiye New York kriterlerine göre AS tanısı almış ardışık 98 hasta (77 erkek[%79]; ortalama yaş:  $39.3 \pm 10.0$ ) ve 49 sağlıklı kontrol (37 erkek [%76]; ortalama yaş:  $39.0 \pm 5.9$ ) çalışmaya dahil edildi. Serum periostin, interlökin (IL)-8, Dickkopf-1 (Dkk-1) düzeyleri ELISA yöntemi ile gösterildi. Ayrıca yüksek duyarlılıklı C-reaktif protein (hs-CRP) ve eritrosit sedimantasyon hızı (ESH) düzeyleri de ölçüldü. Hastaların hastalık ilişkili karakteristikleri BASDAI, BASFI ve BASMI kullanılarak değerlendirildi. Pelvis, servikal ve lomber omurga grafilerimodifiye New York ve modifiyestokes ankilozan spondilit spinal skoru (mSASSS) kullanılarak skorlandı.

**Sonuçlar:** Beklenildiği üzere hs-CRP ve ESH düzeyleri AS hastalarında kontrollere göredaha yüksekti. Serum periostin ve Dkk-1 düzeyi AS hastalarında kontrollere göre anlamlı derece daha düşüktü. Aktif AS hastalarında (BASDAI>4 olan hastalar)periostin düzeyi anlamlı şekilde düşük bulundu( $35.4 \pm 25.8$  vs  $53.9 \pm 42.1$  ng/mLve  $P=0.014$ ). İstatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamakla birlikte sindosmofiti olan, kalça tutulumu olan ve sakroiliak ankilozu olan hastalarda periostin düzeyi daha yüksek olma

eğilimindeydi. Regresyon analizinde Dkk-1 ve IL-8'in serum periostin düzeylerinin bağımsız belirleyicileri oldukları gösterildi.

**Yorum:**Bu araştırmanın sonuçları AS hastalarında aktif dönemde periostin düzeylerinin azalmış olduğunu göstermiştir. Periostinin inaktif dönemde artışı belki, Wnt sinyal yolağı ile ilişkili olarak, yeni kemik formasyonuna neden oluyor olabilir.

## **Periostin may have a role in ankylosing spondylitis and it is associated with Wnt signalling pathway regulators**

### **ABSTRACT**

**Background:** Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic rheumatic disease characterized by sacroiliac and spinal inflammation and new bone formation (syndesmophyte). Molecular mechanisms underlying this process have not been yet fully understood however differentiation of mesenchymal cells into bone-forming osteoblasts appears to be a key pathogenic event. Periostin is an extracellular matrix protein and primarily secreted by osteoblasts. It was shown that periostin has a role in bone anabolism by the regulation of Wnt- $\beta$ -catenin signaling, therefore it may be one of the pathogenic mechanisms in syndesmophyte formation in AS.

**Aim:** To evaluate the serum periostin levels in patients with AS. We also assessed the relationship among periostin levels and other biomarkers of bone formation and the role of periostin in disease outcomes, radiographic changes in particular.

**Patients and methods:** In total 98 consecutive AS patients (77 males [79%]; with a mean age of  $39.3 \pm 10.0$  years) according to the modified New York criteria and 49 healthy controls (37 males [76%]; with a mean age of  $39.0 \pm 5.9$  years) from two centers were included in the study. Serum periostin, interleukin (IL)-8, dickkopf-1 (Dkk-1) and sclerostin levels were measured by commercially available ELISA kits. We also determined the serum high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels. Disease related characteristics of patients were assessed by using BASDAI, BASFI, and BASMI. Radiographs of the pelvis, cervical and lumbar spine were scored by using the modified New York and modified Stokes ankylosing spondylitis spinal score (mSASSS).

**Results:** As expected hs-CRP levels and erythrocyte sedimentation rate were higher in AS patients in comparison with controls. Serum periostin and Dkk-1 levels were significantly lower in AS patients compared with controls. Moreover periostin level was particularly lower in patients with active ( $35.4 \pm 25.8$  vs  $53.9 \pm 42.1$  ng/mL and  $P=0.014$ ) disease (BASDAI $>4$ ). There was also a trend towards higher periostin levels in patients with syndesmophyte, hip involvement and sacroiliac ankylosis however these were not reached statistical significance. Regression analysis showed that serum periostin levels were independently predicted by Dkk-1, IL-8 levels.

**Conclusion:** Our results suggested that periostin may be down regulated in AS patients with active disease and the increase in periostin in inactive phase may contribute to the new bone formation along with the Wnt signalling.

## 1-GİRİŞ ve AMAÇ

Spondiloartritler (SpA) ve bu grup hastalığın prototipi olarak ankilozan spondilit (AS), başlıca aksiyal iskelet, periferik eklemler ve entezis bölgelerini tutan, inflamatuvar, romatizmal hastalıklardır. AS'de temel patoloji sakroiliak ve apofizer eklemler ile entezis bölgelerinde yeni kıkırdak ve kemik oluşumudur (entezofit ve sindezmozit)(1).

Kemik oluşumu için bilinen başlıca iki embriyonik mekanizma vardır: İlkinde (endokondral kemik formasyonu) mezenkimal hücreler kondrositlere farklılaşır ve ardından kemik matriksi oluşur. İkinci mekanizmada (membranöz kemik formasyonu) ise mezenkimal hücreler doğrudan osteoblastlara farklılaşarak matriks ve mineral komponent üretimi beraberce gerçekleşir. Entezofitlerde en azından endokondral kemik oluşumunun varlığı gösterilmiştir(1, 2). Bu şekilde yeni kemik oluşumunun erken dönemi bir transforming growth faktör ailesi üyesi olan kemik morfojenik protein (bone morfogjenik protein; BMP) ailesi kontrolündedir. Bu dönemde kondrositlerden salgılanan noggin veya osteoklastlara özgün sklerostin gibi moleküller süreçte endojen inhibitör olarak görev alırlar(3, 4). Sürecin geç dönemi ise wingless (Wnt) glikoprotein ailesi kontrolündedir. Bu ailenin bazı üyeleri mezenkimal hücrelerin yüzeyindeki bir reseptör kompleksini aktive ederek, hücre-içi  $\beta$ -katenin artışı ve nükleusa göçü ile hücrenin osteoblast yönünde farklılaşmasına aracılık etmektedir. Wnt aracılı bu modelin günümüzde AS'de yeni kemik oluşumu için başlıca düzenleyici olduğuna inanılmaktadır. Bu yolağın da Dickkopf ilişkili protein 1 (DKK1) başta olmak üzere endojen inhibitörleri bulunmaktadır (5-7).

AS'li hastalarda endokondral kemik oluşumunun işlevsel olduğu yönünde bazı bulgular elde edilmiştir. Nitekim bazı araştırmacılar Aşil entezitinde BMP aktivasyonunda artış olduğunu göstermiş (3, 8), bazıları da osteositlerde sklerostinin anlamlı şekilde azalmış, hatta sindezmozit geliştirmiş olanlarda en düşük seviyede olduğunu bildirmişlerdir(9). Öte yandan Wnt yolağı ile ilgili veriler çelişkilidir. İlk araştırmacı grubu serum DKK1 düzeylerini RA ve sağlıklılardan yüksek olduğunu ve anti-TNF tedavi ile anlamlı olarak arttığını bildirmişlerken(10), daha sonraki çalışmalarda serum DKK1 düzeylerinin AS'li hastalarda anlamlı şekilde düşük olduğu (11) ve sindezmozitli hastalarda daha düşük bulunduğu(12) bildirilmiştir.

Periostin orijinal olarak, fare osteoblastik hücre dizisinde preosteoblastlar için olası bir adezyon proteini olarak, osteoblast-spesifik faktör ismiyle tanımlanmış ancak daha sonra öncelikle periostta lokalize olması nedeniyle yeniden isimlendirilmiştir(13). Periostin

ekspresyonu periost ile sınırlı değildir. Nitekim periodontal ligaman gibi kollajenden zengin fibröz konnektif dokuda, kalp kapağında ve tendonlarda da eksprese edilmektedir(14, 15). Ayrıca periostin ekspresyonu erişkin farelerde yine myokard, damar ve iskelet kası hasarlanması ve kemik kırığını takiben de artış göstermektedir (13, 16).

Kalp kapağı gelişimi ve osteojenik fenotipi üzerinde (kalsifik kapak gibi dejeneratif süreçlerde) Wnt yolağının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada tavuk embriyonik aort kapağı interstisyel hücre dizisinde (E1- valve interstitial cell [VIC]) Wnt sinyalizasyon yolağının; periostin ve matriks gla proteini (MGA) indüksiyonu için gerekli ve yeterli olduğu gösterilmiştir. (17).

Periostin yalnız embriyonik kemik gelişiminde değil takip eden dönemde bazı fizyolojik ve patolojik kemik yapım/yıkım süreçlerinde de rol oynuyor olabilir. Kemik kırıklarında iyileşme doğrudan veya dolaylı tamir mekanizmaları (yani sırasıyla membranöz ve endokondral kemik formasyonu) ile olabilir. Deneysel modellerde uzun kemik kırıklarını takiben üçüncü günde proliferen olan preosteoblastlarda ve farklılaşmamış mezenkimal hücrelerde periostin mRNA'nın up-regüle olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda periostin ekspresyonu yedinci günde zirve yapmakta ve 14. günde yani kaba trabeküllü kemik (woven bone) geliştiğinde hala saptanabildi düzeyde bulunmuştur(18). Bu durum periostinin kırık iyileşmesinin erken döneminde görevli olduğunu düşündürmüştür. Periostinin serum düzeylerinin iskelet büyümesi ile azaldığı ve erişkinde stabilize olduğu gösterilmiştir. Son olarak fibroz displazide periostinin artmış ekspresyonunun gösterilmiş olması da bu hastalıkta, ayrıca romatoid artrit veya ankilozan spondilit gibi kemik yapım ve yıkım dengesinde değiştiği hastalıklarda ilginç bir tedavi hedefi olabileceğini düşündürmüştür (19).

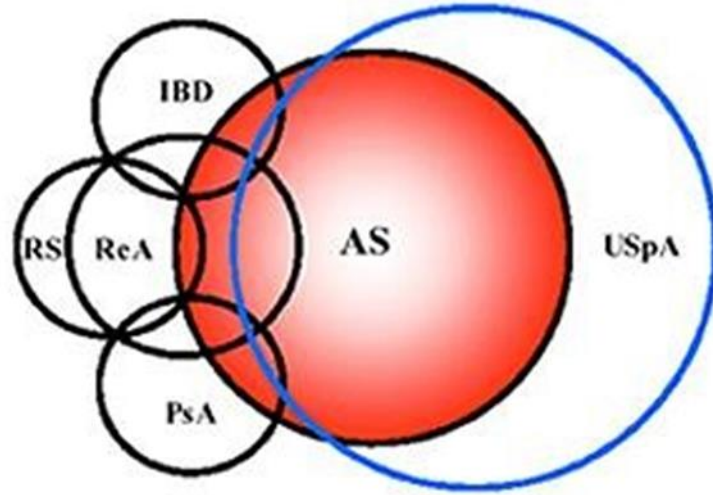
Periostinin hücre survivalı, invazyon ve benzeri mekanizmalar üzerinden metastatik kanser gelişimini artırabileceği düşünülmüştür. Yakın dönemde insan meme kanseri fare modelinde kemik metastazını çevreleyen stromada, sağlıklı kemik ile kıyaslandığında, periostinin aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Yine aynı modelde periostin serum düzeyleri de artmış bulunmuştur (20). Benzer şekilde meme kanserli kadınlarda da serum sklerostin düzeyleri yüksek bulunmuştur(136). Bu sonuçlara dayalı olarak mevcut kemik formasyon ve rezorbsiyon süreçlerini değerlendiren göstergeler metastazı erken dönemlerinde değerlendirme olanağı sağlamazken periostinin kemik stromasındaki değişiklikler ile metastazın erken bir göstergesi olabileceği de ileri sürülmüştür (13).

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada yeni kemik oluşumunun karakteristik bir bulgu olduğu AS hastalarında serum periostin düzeylerinin değerlendirilmesi ve radyolojik progresyon dahil bazı demografik, klinik ve hastalık ilişkili faktörler ile periostinin ilişkisinin gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

## 2- GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ankilozan Spondilit

AS kendine özgü fizyopatolojik, genetik, klinik ve radyografik özellikleri olan, etiyojisi net olarak bilinmeyen ve aksiyel iskeletin (sakroiliak eklemler ve omurga eklemleri) tutulumuyla karakterize, SpA'ler olarak bilinen hastalık grubundan, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Spondiloartritler içerisinde yer alan hastalıklar; AS, reaktif artrit, psöriatik artrit, inflamatuvar barsak hastalığı ile ilişkili artrit ve undiferansiye spondiloartritir(21)(Şekil1).



**Şekil1.**Spondiloartropati ailesi: AS= ankilozan spondilit, PsA= psöriatik artrit, ReA= reaktif artrit RS= Reiter sendromu, IBD=inflamatuvar barsak hastalığı, USpA= undiferansiye spondilartrit

SpA'ler HLA B-27 ile ilişkili olup, aksiyel iskelet tutulumu yanında alt ekstremiteleri tutan asimetrik tipte periferik artrite neden olurlar. Ayrıca iskelet sisteminde entezit olarak bilinen tendon, ligaman ve eklem kapsülü gibi yapıların kemiğe yapışma bölgelerinde inflamasyona da neden olurlar. Yine bu hastalarda psöriazis, üveit ve inflamatuvar barsak hastalığı gibi eklem dışı tutulumlar da görülebilir(22).

Semptomlar genelde geç adolesan ve erken erişkinlik döneminde başlar. Hastalığın en önemli özelliklerinden birisi aksiyel tutulum olup, çoğunlukla sakroiliak eklemlerin tutulması ile başlar. Ancak tanısal özellik gösteren radyografik sakroiliit gelişimi yıllar almakta ve bu durum tanıda gecikmelere yol açmaktadır(23).



AS'li hastaların %30'a çıkan oranlarda, tipik alt ekstremite tutulumu fazla olan asimetric periferik oligoartrit görülebilir. Hastalığın sık görülen ekstra-artiküler bulguları ise akut anterior üveit olmasına rağmen, aort yetmezliği, kardiyak iletim defektleri ve pulmoner fibrozis daha az görülen bulgulardır (24, 25).

Kişiler arasında farklılık göstermekle birlikte hastalık remisyon ve alevlenmeler şeklinde seyretmektedir. Ancak hastalık aktivitesi genellikle sürekli olma eğiliminde olup, uzun süreli remisyonlar nadirdir. Tedavi yapılmadığı zaman önemli morbidite ve mortaliteye yol açabilir(24, 25).

## **2.2Etyopatogenez**

### **2.2.1.Genetik yatkınlık**

Öncelikle AS başta SpA grubu hastalıkların ailesel birikim göstermeleri altında yatan genetik faktörlerin rolüne dikkat çekmiştir. Nitekim aile çalışmalarında yazarlar, AS gelişiminde genetik faktörlerin rolünün %80-90'a varabileceğini ileri sürmüşlerdir (26). Yine monozyotik ikizlerde, dizigotik ikizlere göre daha fazla konkordans görülmesi, hastalığa yatkınlık için genetik faktörlerin, çevresel faktörlerden daha önemli olabileceğini düşündürmektedir (27).

Spondiloartritler için major genetik faktör, bir sınıf I major histokompatibilite komponent (MHC) molekülü olan HLA-B27'dir. Genetik olarak birbirlerinden çok farklı olabilecek popülasyonlarda hastalık ile ilişkisi gösterilmiştir. Günümüzde 70'den fazla alleli tanımlanmış olan HLA-B27'nin B\*2705, B\*2702 ve B\*2704 alt tipleri hastalık gelişimi ile açıkça ilişkili bulunurken B\*2706 ve B\*2709 AS için oldukça düşük bir risk (koruyucu allel?) getirmektedir (28-33).

HLA-B27'nin hastalık patogenezindeki rolü tam olarak ortaya konulamamıştır. Ancak bazı teoriler ileri sürülmüştür. Geleneksel patofizyoloji çerçevesindeki ilk teoride HLA-B27 molekülünün, CD8 pozitif T lenfositlerine öz veya yabancı olabilecek "artritogenik peptidi" sunarak rol oynadığı düşünülmüştür, ancak HLA-B27 transgenik sıçanlarda CD8 pozitif T lenfositlerin rolü olmadığı gösterilmiştir (27, 34-36). Son zamanlarda popülerlik kazanan bir teoriye göre HLA-B27 molekülünün  $\beta$ 2 mikroglobulin içermeyen serbest ağır zincirlerinin hücre yüzeyinde eksprese edilerek killer immünglobulin like reseptörler gibi ilgili reseptörler

aracılığı ile inflamasyonu tetikledikleri ileri sürülmüştür (37). Ayrıca HLA-B27 ağır zincirinin, endoplazmik retikulum içerisinde,  $\beta$ 2 mikroglobulin ve peptid ile birleşmeden önce yanlış katlandığı ve sonuçta “katlanmamış protein yanıtı” (*unfolded protein response; UPR*) aracılığı ile inflamasyonu tetikleyebileceği de düşünülmektedir (37-39).

HLA-B27 varlığı kuzey Avrupa ve Amerika’lı AS hastalar arasında %80-90 pozitif olarak bildirilmektedir. Bununla birlikte genel populasyonda, beyazlarda HLA-B27 pozitif bireylerin yalnızca küçük bir kısmı AS geliştirmektedir (%5-6) ve bu durum total genetik yatkınlığın ancak %20-40’nın HLA-B27 ile açıklanabileceğini düşündürmektedir (27, 40). Bu gözlemlerden yola çıkılarak yapılan tüm genom ilişki çalışmalarında ve aday gen ilişki çalışmalarında diğer bazı genlerin rolü olabileceği ortaya konulmuştur (41-45).

### **2.2.2 Enfeksiyon**

*Chlamydia trachomatis* çeşitli hastalıkların yanında ReA için de iyi bilinen bir etkidir. Uzun zamandır AS’de de rol oynayabileceği düşünülmüş ve bazı bildirimler bu hastalarda artmış enfeksiyon sıklığını ortaya koymuştur (46-48).

### **2.2.3 Sitokinler**

TNF $\alpha$  nın AS etiopatogenezindeki rolü için yapılan araştırmalar sürmektedir. TNF $\alpha$  ekspresyonundaki aşırı artış ile karakterize bir transgenik fare modelinde insandaki hastalığa çok benzeyen bir spondilit gelişmektedir (32). Sakroiliak eklem (SİE)’lerden alınan sinoviyal biyopsilerde makrofajlar, CD4+ ve CD8+ T hücrelerde TNF $\alpha$  mRNA’ sını gösterilmiştir(49). AS’li hastalarda hem periferik kan, hem de kolon lamina propriasında Th1 sitokin [IL-2 ve interferon gamma (IFN $\gamma$ )] ekspresyonunda bozulma olduğu, bunun yüksek TNF $\alpha$  konsantrasyonlarının T hücreleri tarafından IL-2 ve IFN $\gamma$  üretimini bozmasından kaynaklandığı, barsaklarda T hücrelerinin bakterilere karşı savunmasının bozulması sonucu kronik inflamasyon ve oto-immunite ortaya çıktığı düşünülmektedir(49).

### **2.2.4 İnflamasyon ve Histopatoloji**

AS’te inflamasyonun en sık görüldüğü yerler sakroiliak eklemler, entezisler, intervertebral diske yakın vertebral cisimler, periferik eklem sinoviyumu, gastrointestinal kanal ve gözdür. Histopatoloji hakkında bilinenler sınırlıdır. AS hastalarında belli başlı histopatolojik bulgular arasında SİE’ler ve periferik entezis bölgelerinde subkondral kemik iliğinin inflamasyonu sayılabilir.

Entezis; tendon, bağ, eklem kapsülü ve fasiyanın kemiğe yapışma yeridir. AS'de en sık tutulan entez bölgesi alt ekstremitelerde özellikle Aşil tendonu ve plantar fasiyanın kalkaneusa yapışma yerleridir(50). Entezel fibrokartilaj, SpA grubu hastalıklarda karakteristik patolojik değişikliklerin görüldüğü yerdir. Entezis patolojisinde lokal inflamasyon, fibrozis, erozyon ve ossifikasyon görüldüğü bildirilmiştir. Yerleşik hastalığı olan olgularda tanımlanmış lezyonlarda CD8+ ve CD4+ T hücrelerini içeren çok miktarda lenfosit varken, erken entezitte (1 aylık-1 yıllık hastalık) baskın olarak CD68+ makrofajlar bildirilmiştir(51).

Kemik iliğinde bulunan antijen sunucu hücreler ile fibröz kıkırdak antijenleri arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan inflamasyon ve yeni damar oluşumu; subkondral kemik ve fibröz kıkırdak etkiler. Bu şekilde gelişen inflamatuvar infiltrasyon ve destrüksiyon yalnız intervertebral disk enteziti şeklinde olmayıp, yine fibrokartilaj yapısında olan annulus fibrozus tamamıyla etkileyecek şekildedir(52).

Sakroiliak eklemlerin histopatolojik incelemesinde, erken fazda miksoid görünüşlü kemik iliği ve ardından pannus ve granülasyon dokusu oluşumu ile sinovit olduğu bildirilmiştir(53). T hücreleri (CD4>CD8) ve CD68+ makrofajlara, proliferasyon gösteren fibroblastlar ve neovaskülarizasyon eşlik eder. TNF-alfa ve TGF-beta'nın mRNA ekspresyonu artmıştır. Hafif ancak destrüktif, proliferatif, villöz sinovite, miksoid subkondral kemik iliği değişiklikleri eşlik eder ve eklemi oluşturan dokuların harabiyetine sebep olur. Bu yapı zamanla yerini farklı derecelerde fibröz skar, yeni kemik ve kartilaj dokusuna bırakır. Son aşamayı oluşturan ise kondral füzyon ve ankilozdur(54).

Periferik sinovit, adezyon molekülleri ve kemotaktik faktörlerin artmış ekspresyonu ile birlikte endotel hücre aktivasyonu ve artmış vaskülarite gibi diğer inflamatuvar artritlere benzerlik gösterir. İnfiltrat olan hücreler aktif T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, B hücreleri ve CD68+ makrofajlardan oluşur(54).

AS' de eklem kapsülleri, ligamantöz yapılar, özellikle manubriosternal eklemler, simfizis pubis ve intervertebral diskler olmak üzere kartilojinöz yapılar, iliak kanatlar, trokanterler, patella, kalkaneus ve omurlar öncelikli olmak üzere ligamanların kemiğe yapışma noktaları (entesis), apofizer ve sakroiliak eklemlerin sinoviyası etkilenen yapılardır. Entesis ve ligamantöz yapılarda oluşan inflamasyonu (entesitis), kemik dokusu oluşumu ile iyileşme fazı izler. Kıkırdak oluşmadan kemikleşme gerçekleşir. Bu benzer patolojik bulgular, spinal ligamanların herhangi bir bölgesinde ve annulus fibrozusta da

görülür. Annulus fibrozus ve onu çevreleyen ligamanların kemikleşmesi sonucu sindesmofitler oluşur. Kemikten kırıldak dokuya geçişin olduğu diskle omur cismi arasındaki “end-plate”de kronik inflamatuvar hücrelerin varlığı, granülasyon dokusu ve yeni kemik dokusunun olduğu görülür. AS’e özgü bir bulgu olan, hastalığın geç döneminde, omur cisimleri arasında diski geçen yeni kemik köprüleri oluşur. Kemik köprüleri omuz, kalça gibi eklemlerde de görülebilir(51).

### **2.3 Ankilozan Spondilitte Yeni Kemik Oluşumu**

AS’de temel patoloji sakroiliak ve apofizer eklemler ile entezis bölgelerinde yeni kırıldak ve kemik oluşumudur (entezofit ve sindezmozit) (1). Bu süreçte inflamasyon ve bununla ilişkili pekçok faktörün rol aldığı düşünülmektedir. Bu süreç tam olarak anlaşılmamış olmasına karşın Wnt yolağının önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Dkk-1 ve sklerostin gibi Wnt yolağı inhibitörlerinin AS hastalarındaki yeni kemik oluşumu sürecinde yeri olduğu düşünülmektedir (7, 9).

#### **2.3.1 Wnt İnhibitörleri; Dkk-1 ve sklerostin**

Embriyogenez, kanser ve kemik homeostazisinde rol alan hücreler arasındaki ilişkiyi Wnt proteinlerinin düzenlediğine inanılmaktadır. Wnt protein ailesi farklı sinyalizasyon olaylarını aktive edebilir ve bunlar arasında en iyi anlaşılanı standard (kanonik) Wnt yolağıdır (55-57). Standard yolağın aktivasyonu Wnt ve Frizzled (Fz) gibi hücre yüzey reseptörlerinin ve ko-reseptörlerin (low-density lipoprotein receptor-related protein [LRP] 5/6 gibi) etkileşimi sonucunda gerçekleşmektedir. Söz konusu reseptör kompleksinin ligandı ile etkileşimi fonksiyon görecek olan  $\beta$ -catenin’in nukleusa translokasyonuna olanak sağlamaktadır(56).

Tümör nekrozis faktör (TNF)- $\alpha$  nın Wnt inhibitörü olan Dkk-1 ekspresyonunu indüklediği RA’li insan ve hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Bu indüksiyon rezorpsiyonu tetikler, kemik yapım ve tamir mekanizması bloke olmaktadır. Dkk-1’in antikorlar tarafından bloke edilmesi ise katobolik fazı anabolik faza çevirdiği ve osteofit oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir(7, 58).

Erken iskelet gelişimi ile kemiğin remodeling süreçlerinde Wnt sinyalizasyon yolağının önemli rol oynadığına dair kanıtlar giderek artmaktadır (56, 59-62). Wnt/  $\beta$ -catenin yolağı osteoblast diferansiasyonuna ve maturasyonuna ve sonuçta kemik formasyonuna yol

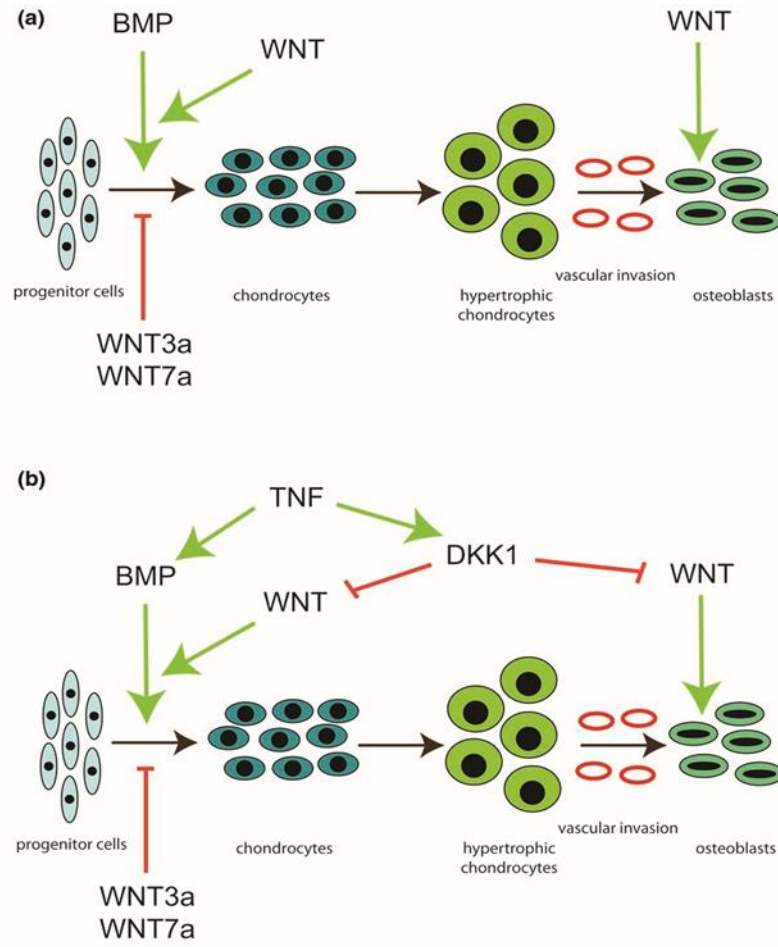
açmaktadır (56). Başlıca perikondrium ve periostta eksprese edilen sekrete edilen Wnt reseptör antagonistleri, Dkk1 ve sclerostin(56, 63, 64), ise yeni kemik formasyonunun negative düzenleyicileridir. Bu yolağın AS hastalarında da operator olduğu yolunda giderek artan bulgular vardır. Nitekim bir AS çalışmasında fonksiyonel ELISA ile ölçülen Dkk1 düzeylerinin sindesmofitli AS hastalarında, sindesmofiti olmayanlar ile kıyaslandığında, daha düşük olduğu bildirilmiştir (12). Ayrıca serum sklerostin düzeyleri, sağlıklı kontrollere göre, AS hastalarında tutarlı şekilde düşük bildirilmiştir (9, 65, 66).

Ankilozan spondilit hayvan modellerinde, Dkk-1 inhibisyonu ile osteofit, kemiksi çıkıntı, eklem füzyon oluşumu gösterilmiştir. Deneysel sakroiliitlerde Dkk-1 inhibisyonunun inflamasyona etkisi olmayıp, kemik erozyonunu ve osteoklast sayısını azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, Wnt yolağının aktivasyonunun yeni kemik oluşumunu indüklediği ve artritli eklemlerde osteofit oluşumunu stimule ettiğini ortaya koymaktadır(7).

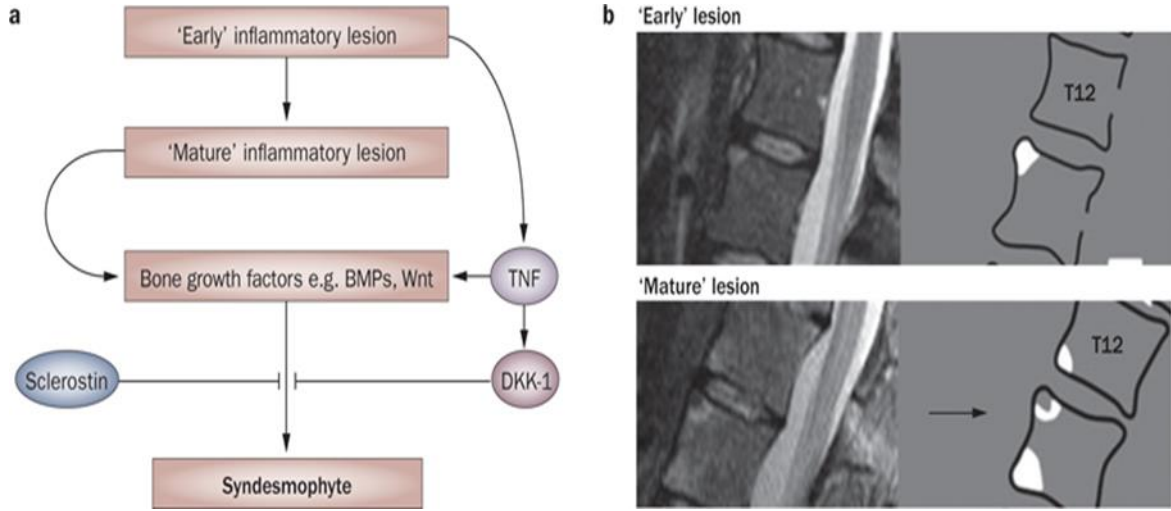
Sklerostin osteositler tarafından sekrete edilir. LRP 4, 5, 6' ya bağlanarak Wnt ilişkili kemik yapım formasyonunu bloke eder. OA ve AS hastalarında sklerostin ekspresyonunun azaldığı, RA hastaları ve sağlıklı bireylerde yüksek olduğu gösterilmiştir. AS hastalarında düşük sklerostin seviyelerinin yeni kemik oluşumu ile bağlantılıdır. AS hastalarında sindesmofit gelişim riskini belirlemek için sklerostin bir biyomarker olarak kullanılabilir(67).

### **2.3.2BMP**

Kemik oluşumunda BMP, Wnt yolağı ile sinerjik etkileşim gösterir (şekil 2). BMP'in mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşmesini indüklediği düşünülmektedir. Aşırı kemik yapımı ile seyreden hayvan modellerinde BMP sinyalizasyonunun arttığı ve BMP inhibisyonunun ise bu proliferatif yanıtı engellediği gösterilmiştir(13). Şekil 3'de ise Wnt yolağı ve inhibitörlerinin AS'de yeni kemik oluşumu üzerindeki karşılıklı etkileşimine dair bir şematik yaklaşım gösterilmiştir.



**Şekil 2.** BMP ve Wnt yolağının kemik formasyonu üzerindeki etkisi Wingless-type like (WNT), Tumour necrosis factor (TNF), Bone morphogenic protein (BMP), Dickkopf ilişkil protein 1 (DKK-1)



**Şekil 3.** Sklerostin, Dkk-1 ve TNF' nin Wnt, BMP ve diğer sinyal yolları ile olan etkileşimi, Wingless-type like (WNT), Tumour necrosis factor (TNF) ,Bone morphogenic protein (BMP) , Dickkopf ilişkili protein 1 (DKK-1)

### 2.3.3 Osteokalsin

Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenen bir matriks proteindir. Kemikte en bol bulunan nonkollajenöz protein olup kemiğe oldukça spesifiktir. Osteokalsin kalsiyumu kemik matriksine bağlayan bir proteindir. Osteokalsin gelişen kemikte mevcuttur ve kemik oluşumuna katkıda bulunur. Osteokalsin mineral depolanmasında ve kemiğin remodellinginin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hızlı kemik dönüşümü ile karakterize durumlarda serum osteokalsin düzeyi yükselir(68). Bazı durumlarda alkalen fosfataz düzeyi ile korelasyon gösterilmişse de sıklıkla bağımsız yanıt vermektedirler. Serum osteokalsin düzeyi kemiği ilgilendirmeyen hastalıklarda tamamen normaldir(69).

### 2.3.4 Periostin

Orijinal olarak osteoblast spesifik faktör şeklinde isimlendirilmiş olan periostin, ilk fare osteoblast hücre dizisinde preosteoblastlar için bir adezyon proteini olarak tanımlanmıştır. Daha sonra periostinin, periosteumda lokalize olduğu gösterilmiştir(70). Periostin sadece kemikle sınırlı olmayıp ağırlıklı olarak kollajenden zengin fibröz dokuda, özellikle de mekanik strese maruz kalan periodantal ligamen, kalp kapakçıkları ve tendonlarda bulunur (15, 71). Periostin salınımının erişkin farelerde kalp, vasküler ve çizgili kas hasarı ile kemik kırıklarından sonra arttığı gözlenmiştir (18, 72). Ayrıca periostinin;

kolon, mesane, meme, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, baş/boyun, ağız ve pankreas gibi çeşitli tümörlerde arttığı gösterilmiştir. Periostindeki artışın, tümörlerin agresif seyirli ve mortalitenin yüksek olması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(73).

Periostin geni fare, tavşan, tavuk gibi farklı türlerde gösterilmiş olup, insanda 13q13.3 kromozomunda lokalizedir (70). Periosteum kemiğin diameter yoğunluğunu, kortikal kalınlığını, kemik boyunu değiştirerek kemiğin güçlenmesini sağlar (74). Gelişen uzun kemikte immunlokalizasyonla periostinin iki izoformu gösterilmiştir. Izoform 3 periosteum, ameloblast ve odontoblast mezenşimal pre-osteoblastlarında tanımlanmıştır. Izoform 2 perikondriumdaki mezenşimal hücrelerde lokalizedir (18, 71-75). Izoform 3 hücrelerin nükleus ve stoplazmasında bulunurken, izoform 2 sadece stoplazmadadır. Bu periostin izoformları, osteogenezde çeşitli proteinlerin farklı rollerinin olduğunu desteklemektedir (75, 76).

Kemirgenlere bakıldığında, embriyonik kemikte çeşitli periostin protein varyantları üretilirken, neonatal, genç ve erişkin kemirgenlerde bu oran daha azdır. Periostin protein (özellikle izoform 3) mezenşimal hücrelerde, alkelen fosfataz üreten periosteumdaki preosteoblast ve osteoblastlar ile trabeküler alandaki osteoblastlarda tespit edilmiştir (77). Benzer şekilde insan kemik immunohistokimyasal incelemelerinde periostinin çoğu varyantı N-terminal parçasını tanıyan antikorla, kalvaria ve uzun kemiklerdeki periosteumun ekstrasellüler matriksinde tespit edilmiştir. Fakat periostin mRNA'sı sadece periosteum hücrelerinde tespit edilmiş olup, esas kemik hücreleri olan osteoblast ve osteositte gösterilememiştir(19). Sonuç olarak periostin yüksek olarak embriyogenez ve kemik büyümesinde oluşmaktadır. Erişkinlerde mekanik strese ve kırık iyileşmesindeki kemik oluşumunda, periostin salınımında artış olması da önemlidir. Periostinin daha iyi lokalize edilebilmesi, izoformlarının gösterilmesi ve tüm fonksiyonlarının belirlenmesi için daha fazla araştırmalara ihtiyaç vardır (78).

Kanser araştırmalarında periostinin oluşumunda birkaç faktörün etkili olduğu gösterilmiştir. Bunların arasında bulunan transkripsiyon faktörleri osteoblast farklılaşmasında da yer alır. Runx2/cbfa 1, Wnt/ $\beta$ -catenin ve osterix yolları esasen pluripotent osteoblastik mezenşimal hücrelerle bağlantılıdır (79). MC3T3-E1 osteoblast benzer hücreler Runx 2 üretir ve bu faktör preosteoblastlarda periostinin erken kemik hücreleri farklılaşmasında, düzenlenmesinde pozitif etki gösterir (80). Kemiğin mekanik strese uğramasını takiben Wnt yolağının periostin regülasyonu üzerindeki etkisi henüz net gösterilememiştir. Sadece Wnt 3



sinyal yolağının periostinin azalttığı gösterilebilmiştir (81). Twist-1 transkripsiyon faktörünün calvaria osteojenik farklılaşmasında rolü vardır ve bu osteoblast farklılaşmasının inhibisyonunda periostin artışı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür(82). Fibröz displazili kemik dokusu olan hastalarda c-Fos artışıyla beraber yüksek periostin salınımı arasında ilişki bulunmuştur. Benzer şekilde transgenik farelerde sklerotik lezyon varlığında aşırı miktarda c-Fos yanında, osteoblastlarda periostin salınımı da gösterilmiştir. Böylelikle c-Fos yolağının periostin up regülasyonunda rol oynayan mekanizmlardan biri olduğu gösterilmiştir(19).

Parathormon (PTH) ve seks steroidleri kemik periosteumu hedefleyen anabolik ajanlardır (83). PTH infüzyonuna maruz kalan kemirgenlerde kemik turnoverının artışı yanında periostin mRNA seviyeleri de yüksek bulunmuştur. İn vitro PTH'un, fare kalvaria osteoblastlarında, periostin ekspresyonunun up regülasyonuna yol açabildiği gözlenmiştir (84). PTH periosteal hücrelerde diferansiyasyonu, in vivo ve in vitro BMP ve Wnt sinyal yolaklardaki erken progenitör proliferasyonu düzenler. PTH'un periostin üzerindeki etkisi bu yolakların biri üzerinden olabilir (85). Ayrıca PTH sklerostin ve osteosit spesifik proteini inhibe ederek osteoblastogenezisi aktive eder. Sklerostin, Wnt ve BMP sinyal yolağını inhibe ederek kemik formasyonunun potent antagonistidir, ayrıca periostinin down regülasyonuna neden olur. PTH osteoblast sentezini ve kemik remodelingini periostin üzerinden farklı yollarla etkileyebilir (86).

Osteoblast progenitörlerinin farklılaşmasını aktive eden, kemik gelişmesinde önemi iyi bilinen iki regülatör faktör TGF- $\beta$  ve BMP'dir. TGF- $\beta$ , BMP-2, activin ve retinoik asit osteoblastlarda periostin salınımını sitümüle ediyor olabilir(87, 88). Aynı zamanda TGF- $\beta$  reseptör aktivasyonunun veya fokal adezyon kinaz (FAK) yolağının bloke edilmesi, periostin mRNA salınımını azalttığı da gösterilmiştir. Ayrıca insan periodantal ligaman fibroblastlarında FAK/src inhibisyonu twist-1 ve periostin mRNA translokasyonunu azaltır. TGF-  $\beta$ , TGF- $\beta$  reseptör aktivasyonu ve FAK /src sinyal yolağı üzerinden periostin salınımını regüle edebilir. FAK aktivasyon sinyal molekülleri öncelikle twist-1'in nükleer translokasyonunu sonrasında periostin aktivasyonunu sağlar (89). Activin ve TGF- $\beta$  mineralizasyonu engeller ve periostin salınımı mineralizasyon üzerinde negatif etkili olup, sonuç olarak TGF-  $\beta$  ve activin mineralizasyon başlangıcını kısmen periostin salınımının up regülasyonu üzerinden kontrol edebilir (90).

Kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda trombosit kökenli büyüme faktörü (*Platelet Derived Growth Factor*; PDGF), FGF1-2 ve anjiotensin II'nin periostini up regüle ettikleri

gösterilmiştir. Fakat henüz bu faktörlerin, periostin üzerindeki etkilerinin kemikteki yansımaları gösterilememiştir (91).

İnorganik fosfat; hidroksiapatit formasyonu görevi dışında, hücre fonksiyonlarını ve gen ekspresyonunu etkileyebilir. Aslında mineralizasyonbaşlangıcındaki inorganik fosfat artışı periostin gen ekspresyonunu down regüle eder ve bu durum osteoblast farklılaşmasında, kemik formasyonunun erken fazında periostinle ilişkisini güçlendirir (92).

Henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, periostin regülasyonu üzerinde etkili olabilecek bazı faktörler (tablo 1) özellikle kemik metabolizmasının erken yaşam döngüsünde hücre proliferasyon ve erken faz osteoblast farklılaşmasında rol oynuyor olabilirler (93).

**Tablo 1.** Periostin salınımını pozitif ya da negatif yönde etkilediği düşünülen faktörler

<b>Regülasyon</b>	<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>
Transkripsiyon faktörleri	Twist-1 Runx-2 C-Fos/AP1	Wnt
Hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörleri	PTH Östrojen TGF- $\beta$ Activin BMP-2 Retinoik asit IL-4 IL-13 TNF alfa PDGF FGF Anjiotensin	Leptin
Fizikokimyasal faktörler	Mekanik stres Hipoksi	Fosfat Mikrogravite

Periosteum mekanik ve hormonal stimülasyona duyarlıdır ve kemiğin güçlenmesi ile ilişkilidir. Periost yüzeyi ve sonrasında endokortikal kompartman modifikasyonu ile, uzun kemiklerin mekanik özellikleri derinden etkilenir. Periosteal osteoblast mekanik etkilere yüksek duyarlılık gösterir. Mekanik stimülasyonla periosteumda yeni kemik oluşumu kemiğin gücünü artırır. Periosteumdaki periostin salınımının kemik mikromimarisi ve gücüyle ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (94).

### 3-GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Çalışmaya alınan hastalar:

*Ankilozan Spondilit hastaları:* Çalışmaya İzmir Katip Çelebi Üniversitesi-Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Romatoloji polikliniklerine başvuran, modifiye 1984 New York kriterlerine(95) göre ankilozan spondilit olarak sınıflandırılan (Tablo 2) ardışık hastalar dahil edildi. Tanı konmuş ardışık 98 hasta dahil edildi.

*Sağlıklı kontrol grubu:* Çalışmaya hasta grubu ile yaş ve cinsiyet uyumlu 49 sağlıklı kontrol alındı.

**Tablo 2.** Ankilozan Spondilit Modifiye Newyork Tanı Kriterleri(95)

<p><b>TANI</b></p> <p><b>Klinik Kriter</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. En az üç aydır var olan egzersiz ile düzelen, istirahat ile düzelmeyen bel ağrısı</li><li>2. Lomber omurganın sagittal ve frontal düzlemlerde hareket kısıtlılığı</li><li>3. Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinse göre normal değerlerin altında olması</li></ol> <p><b>Radyolojik Kriter</b></p> <p>Bilateral evre 2, 3, 4 veya unilateral evre 3,4 sakroiliit</p> <p><b>Kesin AS:</b> Radyolojik kriter ve en az bir klinik kriter</p> <p><b>Olası AS:</b> Üç klinik kriterin varlığı veya radyolojik kriterin klinik kriterleri karşılayan hiçbir semptom veya bulgu olmaksızın varlığı</p>
--

Çalışmaya:

1. Kontrolsüz hipertansiyonu
2. Ciddi karaciğer veya böbrek yetmezliği (kreatinin klerensi <60 mL/dak)
3. Ciddi obezitesi (BMI >35 kg/m<sup>2</sup>)
4. Bilinen malignitesi olan
5. Anti-TNF ilaç kullanan AS hastaları dahil edilmedi.

Çalışmaya İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Çalışmalar etik kurulu'ndan onam alınmasını takiben hasta alınmaya başlandı (Etik kurul onam numarası: 147/2013). Çalışmaya uygun tüm hastalar ve kontrollere çalışma hakkında bilgi verildikten sonra yazılı onamları alındı. Bu çalışma İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

Çalışmaya alınan tüm hastalar ve sağlıklı kontroller yapılandırılmış bir anket formu ile değerlendirilmiştir. Söz konusu form kullanılarak aşağıdaki veriler toplanmıştır:

- Sosyo-ekonomik ve demografik veriler (yaş, cinsiyet, sosyal güvence, medeni hal, çalışma durumu, eğitim seviyesi vb)
- Sağlıkla ilgili davranışlar (sigara, alkol tüketimi vb)
- Semptom başlangıç yaşı
- Tanı yaşı
- Ko-morbid hastalık varlığı
- Geçmiş ve mevcut tedaviler.

Yüz yüze yapılan görüşmeyi takiben tüm hasta ve kontrollerin sistemik muayeneleri ve AS'li hastalarda spinal mobilite ölçümleri yapıldı.

Muayene sonrası tüm hastalardan Bath ankilozan spondilit hastalık aktivite indeksi (*Bath ankylosing spondylitis disease activity index*; BASDAI) (96, 97), Bath ankilozan spondilit fonksiyonel indeks (*Bath ankylosing spondylitis functional index*; BASFI) (98), geçen hafta için hastanın global hastalık değerlendirmesi (PGA), ankilozan spondilit yaşam kalite ölçeği (*Ankylosing spondylitis quality of life*; ASQOL) (99) formlarını doldurmaları istendi. Ankilozan spondilit hastalık aktivite skoru (*Ankylosing spondylitis disease activity score*; ASDAS)-CRP (100) kayıtlardan hesaplandı. Tıbbi kayıtlarda mevcut ise HLA-B27 durumu kaydedildi.

Yine tıbbi kayıtlarında varsa direct grafileri modifiye Stoke AS Spine Score (mSASSS) (101) sistemine göre skorlandı. Yine grafiler sakroiliak eklem ankilozu veya spinal sindesmofit olup olmadığına göre skorlandı.

### **3.2Laboratuvar analizleri:**

Tüm hastalardan sabah açlığı ile 08.00 ve 10.00 saatleri arasında ön koldan venöz kan örnekleri alınıp santrifüj edilerek analiz zamanına kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Serum

hsCRP, periostin, DKK-1, sclerostin, VEGF-A, VEGF-R2, ve osteocalcin düzeyleri ticari olarak bulunabilecek enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitleri kullanılarak, üreticinin önerileri takip edilerek çalışıldı.

### **3.3. İstatistiksel analizler**

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmesi SPSS 16.0 hazır paket programı yardımıyla yapılmıştır. Sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma, kategorik değişkenler yüzde olarak ifade edilecektir. Gruplar arasında sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında t-testi veya Mann Whitney U testi ile kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında çapraz tablo analiz yöntemleri kullanıldı. Gruplar arasında dolaşan periostin açısından fark saptanacak olursa tek veya çok değişkenli regresyon analizleri ile bu farklılık üzerinde etkili olabilecek klinik, demografik ve laboratuvar değişkenlerin ortaya konulmasına çalışıldı.

#### 4- SONUÇLAR

Çalışmaya iki merkezden toplam 98 AS hastası ve 49 sağlıklı kontrol alındı. Hasta ve kontrollerin demografik verileri tablo 3 de özetlenmiştir. İki grubun yaş ve cinsiyetdağılımları benzerdi.

**Tablo 3.Hasta ve kontrol gruplarının demografik verileri**

	AS hastaları (n=98)	Kontrol (n=49)	<i>P</i>
Yaş, ortalama $\pm$ SD	39.9 $\pm$ 9.3	39.0 $\pm$ 5.9	>0.05
Cinsiyet, Kadın/Erkek	21/77	12/37	>0.05
Eğitim süresi, ortalama $\pm$ SD	9.5 $\pm$ 3.8	10.2 $\pm$ 4.0	>0.05
Semptom başlangıç yaşı, ortalama $\pm$ SD	11.4 $\pm$ 10.5	N/A	N/A
Hastalık tanı yaşı, ortalama $\pm$ SD	27.7 $\pm$ 8.6	N/A	N/A

AS hastalarının aktivite ve fonksiyonları değerlendirildi, bununla birlikte BASMI ve radyolojik skorları elde olundu ve tablo 4’de verildi.

**Tablo 4. AS hastaların aktive, fonksiyon ve yapısal hasar indeksleri**

Değişkenler	AS hastaları (n=98)
Ortalama BASDAI	4.2 $\pm$ 2.1
Ortalama BASFI	3.4 $\pm$ 2.4
Ortalama BASMI	3.8 $\pm$ 1.7
Ortalama ASQOL	8.2 $\pm$ 6.1
Ortalama hasta global skoru	2.0 $\pm$ 0.7
Ortalama ASDAS-CRP	3.0 $\pm$ 0.9
Median mSASSS skoru	6 (0-72)

AS hastalarının %67.4’de HLA B27 pozitif (29/47). Kalça tutulumuna bakıldığında 19/88 (%21.6) tutulum tespit edildi. Sindesmotit varlığı hastaların %68.1 (49/72) de tespit edildi. Evre 4 sakroiliit hastaların %38’de (35/92) vardı.

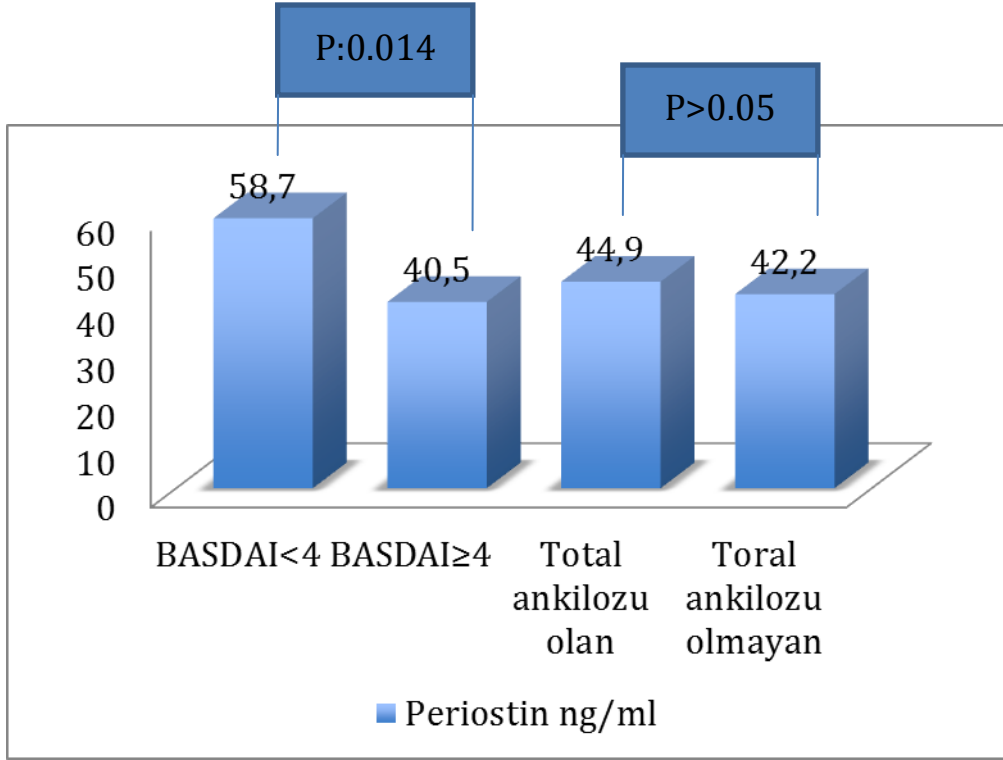
Beklenildiği üzere hs-CRP ve ESH düzeyleri AS hastalarında kontrollere göre daha yüksekti. Serum periostin ve Dkk-1 düzeyi AS hastalarında kontrollere göre anlamlı derece daha düşüktü ve tablo 5’de verildi.

**Tablo 5. Hasta ve kontrollerin laboratuvar değerleri**

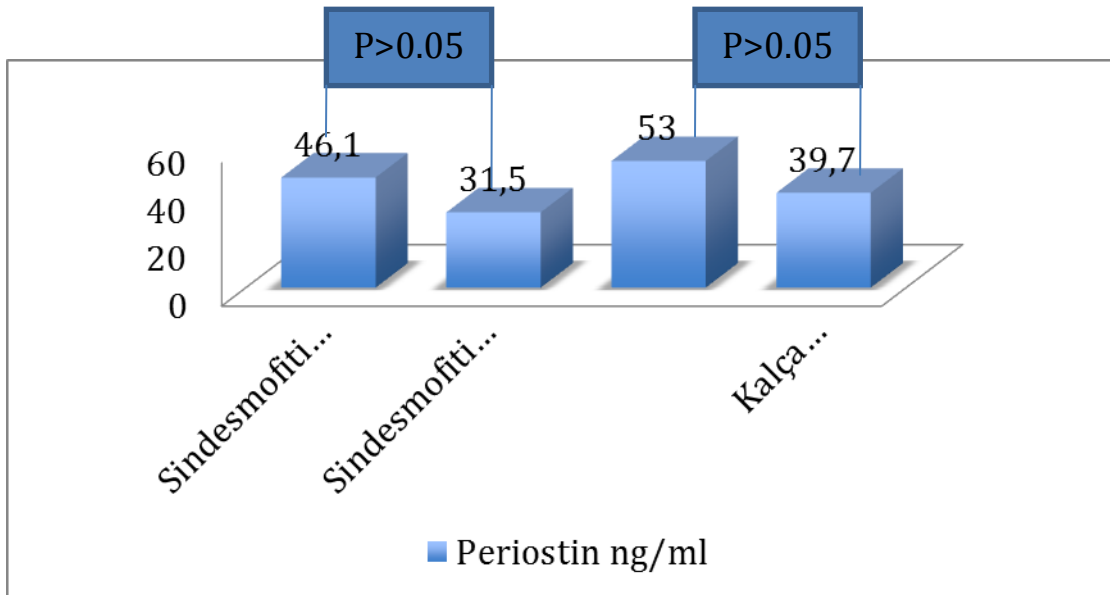
	AS hastaları (n=98)	Kontrol (n=49)	<i>P</i>
Serum periostin (ng/mL)	43.8 ± 35.0	72.5 ± 50.0	0.001
Dkk-1 (ng/mL)	48.9 ± 35.1	68.6 ± 37.8	0.040
IL-8 (pg/mL)	103.9 ± 270.9	66.9 ± 60.1	0.390
hsCRP (µg/mL)	5.2 ± 8.4	0.7 ± 1.3	<0.001
ESH mm/h	25.0 ± 22.3	10.9 ± 9.1	<0.001
Kreatinin (mg/dL)	0.76 ± 0.15	0.82 ± 0.14	0.017

Aktif AS [hastalık aktivitesi (BASDAI>4)] hastalarında periostin düzeyi daha belirgin şekilde düşük tespit edildi (35.4 ± 25.8 vs 53.9±42.1 ng/mL ve *P*=0.014) (Şekil 4). İstatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamakla birlikte sindesmotit, sakroiliak ankilozu (Şekil 4) ve kalça tutulumu olan (Şekil 5) hastalarda periostin düzeyi daha yüksek olma eğilimindeydi.





Şekil4.Hastalık aktivitesi ve total SİE ankilozuna göre serum periostin değerleri



Şekil 5. Sindsesmofit varlığı ve kalça tutulumuna göre serum periostin değerleri

Regresyon analizinde Dkk-1'in periostin düzeylerinin bağımsız olarak predikte ettirdiği gösterildi (Tablo 6).

**Tablo 6.** Periostin düzeylerini predikte eden faktörler

	P	B (%95 Güven aralığı)
Dkk-1	<0.001	0.839 (0.775-0.903)
IL-8	0.089	0.010 (-0.002-0.022)
hs-CRP	0.296	-0.253 (-0.731-0.224)
ESH	0.741	-0.029 (-0.200-0.143)

## 5-TARTIŞMA

Bu çalışmada AS hastalarında serum periostin düzeyleri kontrollerle kıyaslandığında anlamlı oranda düşük bulunmuştur. SpA grubu hastalıklarda periostin düzeyini değerlendiren az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların ikisine yalnızca özet formatında ulaşılabilmektedir ve çok yakın zamanda tam metin bir makale yayınlanmıştır.

Bu konuda yapılmış ilk araştırma Alman spondiloartrit insepsiyon kohortunda (*German Spondyloarthritis Inception Cohort*; GESPIC) izlenen ait modifiye New York kriterlerine göre AS tanısı olan hastalarda (102) serum periostin düzeyleri uzun hastalık süresi (>5 yıl) olanlarda kısa hastalık süresi olanlara göre daha yüksek bildirilmiştir (123.9±142.0 pg/mL vs 77.1±113.7 pg/mL). Yine aynı çalışmada sindesmofiti olan hastaların serum periostin düzeyleri sindesmofiti olmayanlara göre anlamlı şekilde düşük olarak bulunmuş (67.4±112.7 ng/mL vs 133.9±150.1 ng/mL). Kontrol grubu bulunmayan bu çalışmada AS hastalarındaki periostin değerlerinin sağlıklı kontrollere göre kıyaslanması mümkün olmamıştır.

Takip eden ve yine devam edegelen bir çalışma olduğu için henüz tam metin olarak yayınlanmadığı düşünülen bir diğer çalışmada (103) Fransız erken spondiloartrit kohortu olarak bilinen DESIR kohortuna alınmış 701 hastanın dahil edildiği bir çalışmada hastaların bazal serum periostin değerleri bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada serum periostin değerlerinin DKK-1 ve sklerostin gibi 2 yıllık radyografik değerlendirme ile ilişkisinin araştırılacağı belirtilmiştir. Bu çalışmada nokta hastaların erken inflamatuvar bel ağrısı (>3 ay ancak <3 yıl süreli) hastaları olduğu ve bu grup içerisinde AS'den non-radyografik spondiloartrit ve yalnız kronik bel ağrısı şeklinde geniş bir spektrumda hastaların varlığı hatırd tutulmalıdır. Söz konusu çalışmada yine kontrol grubu bulunmamaktadır ve ortalama serum periostin düzeyinin 396.5±461.4 pg/mL olduğu ve erkeklerde daha yüksek olduğu ve yaşla azaldığı belirtilmiştir. Fransız çalışmasında da sindesmofiti olan hastalarda serum periostin düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu bildirilmiştir (222.4 ±286.5 ng/ml vs 412.89 ±471.3 ng/ml ve p=0.021).

Son olarak tam metin yayınlanmış bir araştırmada(104);Yunanistan'da bir askeri hastaneye başvuran ve hemen tamamı erkeklerden oluşan (%94) AS hastalarında, bizim çalışmamıza benzer şekilde, serum periostin düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde düşük olduğu bildirilmiştir [234.4 pg/ml (S.E.M. 7.5) vs 291.4 (S.E.M. 8.3), ve  $P<0.00$ ]. Bahsedilen bu çalışmada ESH, CRP ve BASDAI skorları yüksek olan hastalarda serum periostin değerlerinin daha yüksek olduğu ancak sindesmofiti olan hastalar ile uyumlu şekilde bir çeşit radyografik skorklama yöntemi olan BASRI değerleri yüksek olanlarda periostin anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bizim hasta grubumuzda aktivitesi yüksek hastalarda periostin değerleri düşük idi ve sindesmofit olan hastalarda daha yüksek olma eğiliminde idi ancak bu durum istatistiki anlamlılığa ulaşmadı. Bu sonuç örneklem boyutu ile ilgili olabilir.

Hastalarımızda serum Dkk-1 düzeyleri daha once bildirilen çalışmalara benzer şekilde düşük bulundu ve yine diğer çalışmalara benzer şekilde serum periostin düzeyleri sağlıklı kontrollere göre düşük idi. Ancak yukarıda bahsi geçen Yunanistan çalışmasında (104) serum değerleri bildirilmemiş olmakla birlikte periostinin anlamlı şekilde Dkk-1 ve sklerostin ile negative korele olmasından serum Dkk-1 ve sklerostin düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunduğu düşünülebilir. Ayrıca alışmamız Wnt yolağı ile periostin serum düzeylerinin bağlantılı olabileceği yönünde ipuçları sağlamıştır.

Çalışmamızın belli başlı kısıtlılığı kesitsel doğada olmasındır. Nitekim uzun süreli takip çalışmaları hem Wnt yolağı hem de periostinin, SpA grubunda ve özelde AS hastalarında yapısal hasar gelişiminde rolünü göstermek için uygun olabilir.

Sonuç olarak periostin düzeylerinin AS başta SpA grubu hastalıklarda patogenetik rolünün ve biyomarker olarak değerinin ortaya konulabilmesi için başka çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

## 6- SONUÇ ve ÖNERİLER

AS hastalığının karakteristik patogenetik özelliği yeni kemik oluşumudur. Sindesmofitler bu duruma en güzel örneği teşkil etmektedir. Omurgadaki yeni kemik oluşumu zaman içerisinde omurga hareketlerinde kısıtlılığa neden olmakta ve deformite gelişimine yol açabilmektedir. AS' de yeni kemik oluşumunda görevli moleküllerin patogenetik rollerinin yapılacak çalışmalarla ortaya konulması ile kemik oluşumu erken tanısında biyomarker olarak değerlendirilebilir ve kemik oluşumu patogeneğinde görevli moleküllere karşı oluşturulacak yeni ilaçlar sayesinde sindesmofit oluşumunun engellenmesi, omurga hareketlerinin korumada kullanılacak alternatif ve yeni tedavilerden biri olabilir.

## KAYNAKÇA

1. Lories RJ, Baeten DL. Differences in pathophysiology between rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(4 Suppl 55):S10-4.
2. Tam LS, Gu J, Yu D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nat Rev Rheumatol*.6(7):399-405.
3. Lories RJ, Luyten FP. Bone morphogenetic protein signaling in joint homeostasis and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(3):287-98.
4. Winkler DG, Yu C, Geoghegan JC, Ojala EW, Skonier JE, Shpektor D, et al. Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36293-8.
5. van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*. 2004;199(6):805-14.
6. Schett G, Zwerina J, David JP. The role of Wnt proteins in arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(9):473-80.
7. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature medicine*. 2007;13(2):156-63.
8. Lories RJ, Luyten FP, de Vlam K. Progress in spondylarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondyloarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(2):221.
9. Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, Zwerina J, Herrmann M, Mueller R, et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(11):3257-62.
10. Daoussis D, Liossis SN, Solomou EE, Tsanaktsi A, Bounia K, Karampetsou M, et al. Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*.62(1):150-8.
11. Kwon SR, Lim MJ, Suh CH, Park SG, Hong YS, Yoon BY, et al. Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy. *Rheumatol Int*.32(8):2523-7.
12. Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, Zwerina J, Hueber A, Haibel H, et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(4):572-4.
13. Merle B, Garnero P. The multiple facets of periostin in bone metabolism. *Osteoporos Int*.23(4):1199-212.

14. Kruzynska-Frejtag A, Machnicki M, Rogers R, Markwald RR, Conway SJ. Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation. *Mech Dev.* 2001;103(1-2):183-8.
15. Rios H, Koushik SV, Wang H, Wang J, Zhou HM, Lindsley A, et al. periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol.* 2005;25(24):11131-44.
16. Yoshida N, Yoshida K, Hosoya A, Saito M, Yokoi T, Okiji T, et al. Association of TIMP-2 with extracellular matrix exposed to mechanical stress and its co-distribution with periostin during mouse mandible development. *Cell Tissue Res.* 2007;330(1):133-45.
17. Alfieri CM, Cheek J, Chakraborty S, Yutzey KE. Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction. *Dev Biol.* 338(2):127-35.
18. Nakazawa T, Nakajima A, Seki N, Okawa A, Kato M, Moriya H, et al. Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *J Orthop Res.* 2004;22(3):520-5.
19. Kashima TG, Nishiyama T, Shimazu K, Shimazaki M, Kii I, Grigoriadis AE, et al. Periostin, a novel marker of intramembranous ossification, is expressed in fibrous dysplasia and in c-Fos-overexpressing bone lesions. *Hum Pathol.* 2009;40(2):226-37.
20. Contie S, Voorzanger-Rousselot N, Litvin J, Clezardin P, Garnero P. Increased expression and serum levels of the stromal cell-secreted protein periostin in breast cancer bone metastases. *Int J Cancer.* 128(2):352-60.
21. Gran JT, Husby G. The epidemiology of ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum.* 1993;22(5):319-34.
22. Sieper J, Rudwaleit M, Khan MA, Braun J. Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20(3):401-17.
23. Gerdan V, Akar S, Solmaz D, Pehlivan Y, Onat AM, Kisacik B, et al. Initial diagnosis of lumbar disc herniation is associated with a delay in diagnosis of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 39(10):1996-9.
24. Khan MA, Khan MK, Kushner I. Survival among patients with ankylosing spondylitis: a life-table analysis. *J Rheumatol.* 1981;8(1):86-90.
25. Lehtinen K. Mortality and causes of death in 398 patients admitted to hospital with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1993;52(3):174-6.
26. Thomas GP, Brown MA. Genetics and genomics of ankylosing spondylitis. *Immunological reviews.* 2010;233(1):162-80.
27. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet.* 2011;377(9783):2127-37.

28. Khan M. HLA and spondyloarthropathies. *The HLA Complex in Biology and Medicine* Edited by Mehra N New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers. 2010:422-46.
29. Khan MA. Update on spondyloarthropathies. *Annals of internal medicine*. 2002;136(12):896-907.
30. Taurog JD. The mystery of HLA-B27: if it isn't one thing, it's another. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2478-81.
31. Fiorillo MT, Cauli A, Carcassi C, Bitti PP, Vacca A, Passiu G, et al. Two distinctive HLA haplotypes harbor the B27 alleles negatively or positively associated with ankylosing spondylitis in Sardinia: implications for disease pathogenesis. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(5):1385-9.
32. Sampaio-Barros PD, Conde RA, Donadi EA, Bonfiglioli R, Costallat LT, Samara AM, et al. Frequency of HLA-B27 and its alleles in patients with Reiter syndrome: comparison with the frequency in other spondyloarthropathies and a healthy control population. *Rheumatol Int*. 2008;28(5):483-6.
33. Olivieri I, D'Angelo S, Scarano E, Santospirito V, Padula A. The HLA-B\*2709 subtype in a woman with early ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2805-7.
34. Hermann E, Yu DT, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet*. 1993;342(8872):646-50.
35. May E, Dorris ML, Satumtira N, Iqbal I, Rehman MI, Lightfoot E, et al. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol*. 2003;170(2):1099-105.
36. Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, Tran TM, Sharma R, Dressel R, et al. Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):1977-84.
37. Kollnberger S, Bird LA, Roddis M, Hacquard-Bouder C, Kubagawa H, Bodmer HC, et al. HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondylarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *The Journal of Immunology*. 2004;173(3):1699-710.
38. Smith JA, Turner MJ, DeLay ML, Klenk EI, Sowders DP, Colbert RA. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response are linked to synergistic IFN-beta induction via X-box binding protein 1. *Eur J Immunol*. 2008;38(5):1194-203.



39. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2633-43.
40. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell.* 1990;63(5):1099-112.
41. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet.* 2007;39(11):1329-37.
42. Pointon JJ, Harvey D, Karaderi T, Appleton LH, Farrar C, Stone MA, et al. The chromosome 16q region associated with ankylosing spondylitis includes the candidate gene tumour necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD). *Ann Rheum Dis.* 2010;69(6):1243-6.
43. Sims AM, Timms AE, Bruges-Armas J, Burgos-Vargas R, Chou CT, Doan T, et al. Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(9):1305-9.
44. Pointon JJ, Harvey D, Karaderi T, Appleton LH, Farrar C, Stone MA, et al. Elucidating the chromosome 9 association with AS; CARD9 is a candidate gene. *Genes and immunity.* 2010;11(6):490-6.
45. Zinovieva E, Bourgain C, Kadi A, Letourneur F, Izac B, Said-Nahal R, et al. Comprehensive linkage and association analyses identify haplotype, near to the TNFSF15 gene, significantly associated with spondyloarthritis. *PLoS Genet.* 2009;5(6):e1000528.
46. Cruzat V, Cuchacovich R, Espinoza LR. Undifferentiated spondyloarthritis: recent clinical and therapeutic advances. *Current rheumatology reports.* 2010;12(5):311-7.
47. Csango PA, Upsahl MT, Romberg O, Kornstad L, Sarov I. Chlamydia trachomatis serology in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 1987;6(3):384-90.
48. Kihlstrom E, Gronberg A, Bengtsson A. Immunoblot analysis of antibody response to Chlamydia trachomatis in patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* 1989;18(6):377-83.
49. Maksymowych WP. Spondyloarthropathies: Etiology and Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis. *Rheumatology*2003. p. 1183-92.
50. Braun J, Bollow M, Neure L, Seipelt E, Seyrekbasan F, Herbst H, et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint

- biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(4):499-505.
51. McGonagle D, Marzo-Ortega H, O'Connor P, Gibbon W, Hawkey P, Henshaw K, et al. Histological assessment of the early enthesitis lesion in spondyloarthropathy. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(6):534-7.
  52. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis.* 2002;61 Suppl 3:iii8-18.
  53. Francois RJ, Gardner DL, Degraeve EJ, Bywaters EG. Histopathologic evidence that sacroiliitis in ankylosing spondylitis is not merely enthesitis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):2011-24.
  54. Dougados M LR. Spondyloarthritides: Pathogenesis, Clinical Aspects and Diagnosis. *Eular Compendium on Rheumatic Diseases*2007. p. 108-10.
  55. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192-205.
  56. Lories RJ, Corr M, Lane NE. To Wnt or not to Wnt: the bone and joint health dilemma. *Nature reviews Rheumatology.* 2013;9(6):328-39.
  57. Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews.* 2010;90(4):243-56.
  58. Schett G, Stolina M, Dwyer D, Zack D, Uderhardt S, Kronke G, et al. Tumor necrosis factor alpha and RANKL blockade cannot halt bony spur formation in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2644-54.
  59. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, et al. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes & development.* 2004;18(9):1072-87.
  60. Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *Journal of cell science.* 2002;115(Pt 24):4809-18.
  61. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell.* 2005;8(5):739-50.
  62. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Developmental cell.* 2005;8(5):727-38.

63. Kusu N, Laurikkala J, Imanishi M, Usui H, Konishi M, Miyake A, et al. Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(26):24113-7.
64. Witte F, Dokas J, Neuendorf F, Mundlos S, Stricker S. Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene expression patterns : GEP*. 2009;9(4):215-23.
65. Klingberg E, Nurkkala M, Carlsten H, Forsblad-d'Elia H. Biomarkers of bone metabolism in ankylosing spondylitis in relation to osteoproliferation and osteoporosis. *The Journal of rheumatology*. 2014;41(7):1349-56.
66. Saad CG, Ribeiro AC, Moraes JC, Takayama L, Goncalves CR, Rodrigues MB, et al. Low sclerostin levels: a predictive marker of persistent inflammation in ankylosing spondylitis during anti-tumor necrosis factor therapy? *Arthritis research & therapy*. 2012;14(5):R216.
67. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res*. 2008;23(6):860-9.
68. Kruse K, Kracht U. Evaluation of serum osteocalcin as an index of altered bone metabolism. *Eur J Pediatr*. 1986;145(1-2):27-33.
69. Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest*. 1980;66(5):878-83.
70. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J*. 1993;294 ( Pt 1):271-8.
71. Kruzynska-Frejtag A, Wang J, Maeda M, Rogers R, Krug E, Hoffman S, et al. Periostin is expressed within the developing teeth at the sites of epithelial-mesenchymal interaction. *Dev Dyn*. 2004;229(4):857-68.
72. Wang D, Oparil S, Feng JA, Li P, Perry G, Chen LB, et al. Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse. *Hypertension*. 2003;42(1):88-95.
73. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem*. 2009;107(6):1053-62.
74. Dwek JR. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol*. 39(4):319-23.

75. Zhu S, Barbe MF, Amin N, Rani S, Popoff SN, Safadi FF, et al. Immunolocalization of Periostin-like factor and Periostin during embryogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(4):329-45.
76. Litvin J, Selim AH, Montgomery MO, Lehmann K, Rico MC, Devlin H, et al. Expression and function of periostin-isoforms in bone. *J Cell Biochem.* 2004;92(5):1044-61.
77. Zhu S, Barbe MF, Liu C, Hadjiargyrou M, Popoff SN, Rani S, et al. Periostin-like-factor in osteogenesis. *Journal of cellular physiology.* 2009;218(3):584-92.
78. Kii I, Nishiyama T, Li M, Matsumoto K, Saito M, Amizuka N, et al. Incorporation of tenascin-C into the extracellular matrix by periostin underlies an extracellular meshwork architecture. *J Biol Chem.* 285(3):2028-39.
79. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1233-9.
80. Stock M, Schafer H, Fliegau M, Otto F. Identification of novel genes of the bone-specific transcription factor Runx2. *J Bone Miner Res.* 2004;19(6):959-72.
81. Haertel-Wiesmann M, Liang Y, Fantl WJ, Williams LT. Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275(41):32046-51.
82. Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Muentener C, Mercado MA, Spicer DB. Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev Dyn.* 2006;235(5):1345-57.
83. Chen Q, Kaji H, Iu MF, Nomura R, Sowa H, Yamauchi M, et al. Effects of an excess and a deficiency of endogenous parathyroid hormone on volumetric bone mineral density and bone geometry determined by peripheral quantitative computed tomography in female subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4655-8.
84. Li X, Liu H, Qin L, Tamasi J, Bergenstock M, Shapses S, et al. Determination of dual effects of parathyroid hormone on skeletal gene expression in vivo by microarray and network analysis. *J Biol Chem.* 2007;282(45):33086-97.
85. Ogita M, Rached MT, Dworakowski E, Bilezikian JP, Kousteni S. Differentiation and proliferation of periosteal osteoblast progenitors are differentially regulated by estrogens and intermittent parathyroid hormone administration. *Endocrinology.* 2008;149(11):5713-23.
86. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology.* 2005;146(11):4577-83.

87. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev.* 2005;26(6):743-74.
88. Li G, Oparil S, Sanders JM, Zhang L, Dai M, Chen LB, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling mediates vascular smooth muscle cell expression of periostin in vivo and in vitro. *Atherosclerosis.* 2006;188(2):292-300.
89. Wen W, Chau E, Jackson-Boeters L, Elliott C, Daley TD, Hamilton DW. TGF-ss1 and FAK regulate periostin expression in PDL fibroblasts. *J Dent Res.*89(12):1439-43.
90. Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenberg C, Derkx P, Uitterlinden AG, et al. The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *FASEB J.* 2007;21(11):2949-60.
91. Kim SJ, Kim SY, Kwon CH, Kim YK. Differential effect of FGF and PDGF on cell proliferation and migration in osteoblastic cells. *Growth Factors.* 2007;25(2):77-86.
92. Beck GR, Jr., Moran E, Knecht N. Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res.* 2003;288(2):288-300.
93. Merle B, Garnero P. The multiple facets of periostin in bone metabolism. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* 2012;23(4):1199-212.
94. Seeman E. The periosteum--a surface for all seasons. *Osteoporos Int.* 2007;18(2):123-8.
95. 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 and rheumatism.* 1984;27(4):361-8.
96. Akad K, Solmaz D, Sari I, Onen F, Akkoc N, Akar S. Performance of response scales of activity and functional measures of ankylosing spondylitis: numerical rating scale versus visual analog scale. *Rheumatol Int.* 2013;33(10):2617-23.
97. 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. *The Journal of rheumatology.* 1994;21(12):2286-91.
98. Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O'Hea J, Mallorie P, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *The Journal of rheumatology.* 1994;21(12):2281-5.

99. Doward LC, Spoorenberg A, Cook SA, Whalley D, Helliwell PS, Kay LJ, et al. Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62(1):20-6.
100. van der Heijde D, Lie E, Kvien TK, Sieper J, Van den Bosch F, Listing J, et al. ASDAS, a highly discriminatory ASAS-endorsed disease activity score in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(12):1811-8.
101. Creemers MC, Franssen MJ, van't Hof MA, Gribnau FW, van de Putte LB, van Riel PL. Assessment of outcome in ankylosing spondylitis: an extended radiographic scoring system. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(1):127-9.
102. Poddubnyy D, Ruiz-Heiland G, Rudwaleit M, Haibel H, Appel H, Listing J, et al. Association of serum periostin level with syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(Suppl 3):97.
103. Briot K, Paternotte S, Borderie D, Miceli-Richard C, Dougados M, Roux C. Serum Periostin: a New Marker Of Local Bone Formation In Early Inflammatory Back Pain: results From The DESIR Cohort. [abstract]. *Arthritis Rheum*. 2013;65 (Suppl 10):1545.
104. Sakellariou GT, Anastasilakis AD, Bisbinas I, Oikonomou D, Gerou S, Polyzos SA, et al. Circulating periostin levels in patients with AS: association with clinical and radiographic variables, inflammatory markers and molecules involved in bone formation. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(5):908-14.