

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BLEOMİSİN İLE OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL
SKLERODERMA MODELİNDE PARİKALSİTOL TEDAVİSİNİN
ETKİNLİĞİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Fikret DURAN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA**

**ELAZIĞ
2015**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA _____

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... _____
..... _____
..... _____
..... _____
..... _____
..... _____

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin zorlu sürecinde bana yol gösteren, hoşgörü ve sabır ile bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, başta tez danışmanım Prof. Dr. Süleyman Serdar Koca olmak üzere, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emir DÖNDER, Uzm. Dr. Barış GÜNDOĞDU, Uzm. Dr. Ahmet Yıldırım, Uzm. Dr. Servet YOLBAŞ, Dr. Sibel OYUCU ORHAN, Dr. Berçem AFŞAR KARATEPE ve uzmanlık eğitimime katkıda bulunan diğer iç hastalıkları bilim dalları öğretim üyelerine,

Tezin hazırlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN ve Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a,

Sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim anneme, babama ve eşim Mine DURAN'a,

Asistanlığın yoğun temposu içerisinde hayatımızı neşelendiren sevgili kızım Reyyan DURAN'a,

teşekkür ederim.

ÖZET

Sklerodermada, aktive olan *Wingless-type MMTV integration site* (Wnt)/ β -katenin sinyal yolağının fibrotik sürece fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümü ve hatta non-fibroblastik hücrelerin fibroblastik hücrelere dönüşümü aşamasında katkı sağladığı düşünülmektedir. Parikalsitol, vitamin D reseptörü (VDR) aracılığı ile transkripsiyon faktörlerinden *T-cell factor-4* (TCF-4)'ün β -katenine bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe eder ve böylece, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitelerini engeller. Çalışmamızın amacı, bleomisin (BLM) ile oluşturulmuş deneysel skleroderma modelinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının sentetik D vitamin analogu olan parikalsitol ile inhibisyonunun profilaktik ve teröpatik etkinliklerinin belirlenmesidir.

Bu çalışmaya 60 adet Balb/c dişi fare alındı. Erken evre grupları (Grup I [kontrol grubu], II [plasebogrubu] ve III [parikalsitol grubu]) ve geç evre grupları (Grup IV [kontrol grubu], V [plasebo grubu], VI [parikalsitol grubu]) olarak 6 grup oluşturuldu. BLM uygulanmayacak olan kontrol grubu farelere (Grup I) ve (Grup IV), tıraş edilmiş bölgeden, hergün sc fosfat ile tamponlanmış salin (FTS) uygulandı. 1mg BLM, 1mL FTS içerisinde çözündürülerek II. Ve III. Gruplarda ki farelere 3hafta, V. ve VI gruplardaki farelere 6hafta boyunca 100 μ L (100 μ g) dozunda her gün sc uygulandı. BLM'e ek olarak, III. Gruptaki farelere ilk 3hafta, VI. gruptaki farelere ise 21.günden başlayarak çalışma sonuna kadar hergün sc yol ile Parikalsitol (0.3 μ g/kg) enjekte edildi.

İlk üç grup üçüncü haftanın sonunda; kalan gruplar ise altıncı haftanın sonunda, son tedavilerden 24 saat sonra, dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Doku örnekleri histopatolojik inceleme ve Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analizler için toplandı. Doku TGF- β 1, axin-1 ve wnt-2 mRNA ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile belirlendi.

Tekrarlanan subkutan BLM uygulamaları sonucunda; erken ve geç evrede, dermal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, dermal fibroz ve dermal kalınlıkta artış meydana geldi. Benzer şekilde; TGF- β 1, axin-1 ve wnt-2 ekspresyonları belirgin artı. Parikalsitolün hem profilaktik hemde teröpatik uygulamalarında TGF- β 1, axin-1 ve wnt-2 mRNA ekspresyonları belirgin azaldı. Ek olarak, histopatolojik olarak dermal nekro inflamasyon ve dermal fibrozda gerileme tespit edildi.

Sonuç olarak, BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinde axin-1 ve wnt-2 ekspresyonlarının artmış olması Wnt/ β -katenin sinyal yolağının dermal fibrozda aktif olduğunu desteklemektedir. Ekolarak, parikalsitol antifibrotik potansiyele sahiptir ve bu etkisi Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerine etkisi ile ilişkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel skleroderma, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, parikalsitol

ABSTRACT

THE EFFECTIVENESS OF PARICALCITOL IN BLEOMYCIN INDUCED EXPERIMENTAL SCLERODERMA

For Scleroderma, it is thought that Signaling pathway of activated wingless-type MMTV integration site (Wnt)/ β -catenin contributes to fibrotic process in the stage of transformation of fibroblasts into myofibroblasts and even transformation of non-fibroblastic cells to fibroblastic cells. Paricalcitol inhibits connection of T-cell factor (TCF-4) from transcription factors to the β -catenin as competitively through vitamin D receptor (VDR) and thus inhibits the activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. The aim of our study, in experimental scleroderma models created with BLM, is to determine prophylactic and therapeutic efficacy of inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway with paricalcitol which is synthetic vitamin D analog.

60 Balb/c female mice were taken to this study. 6 groups were formed as early stage groups (groups [Control group], II [placebo group] and III [paricalcitol group]) and late-stage groups (group IV [Control group], V [placebo group] VI [paricalcitol group]). Salin (PBS) which was buffered with phosphate everyday was applied from shaved region to the control group of mice (Group I) and (group IV) which BLM will not be applied to. 1mg BLM by dissolving it in 1 ml FTS as 100 μ L (100 μ g) dose was applied sc daily to mice in group of II and III along 3 weeks, in the group of V and VI along 6 weeks. In addition to BLM, Paricalcitol (0.3 μ g / kg) was injected daily with sc route to third group mice first three week and to sixth group mice group from 21th day until the end of the working day.

The first three groups at the end of the third week; the remaining groups at the end of six weeks, 24 hours after the last treatment, were sacrificed by decapitation. Tissue samples was collected for the histopathological and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Tissue TGF- β 1, axin-1 and Wnt-2 mRNA expression was determined by RT-PCR.

As a result of repeated BLM subcutaneous implementation; in the early and late stage, an increase took place in the dermal inflammatory cell infiltration, dermal thickness dermal fibrosis. Similarly; TGF- β 1, axin-1 and wnt-2 expression was significantly increased. In the Prophylactic and therapeutic applications of

paricalcitol, TGF- β 1, axin-1 and Wnt-2 mRNA expression decreased significantly. In addition, it was determined regression in dermal necro inflammation and dermal fibrosis as histopathological.

In conclusion, in the BLM-induced dermal fibrosis model, increased AX-1 wnt-2 mRNA expressions supports that Wnt / β -catenin signaling pathway is active in dermal fibrosis. Moreover, paricalcitol has antifibrotic potential and this effect may be associated on Wnt / β -catenin signaling pathway.

Key Words: Experimental scleroderma, Wnt/ β -catenin signaling pathway, Paricalcitol

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Tanım	2
1.1.2. Epidemiyoloji	2
1.1.3. Etiyoloji	3
1.1.4. Patogenez	4
1.1.4.1. Vasküler Hasar	4
1.1.4.2. İmmün Sistem Aktivasyonu ve İnflamasyon	5
1.1.4.3. Fibroz	5
1.1.5. Skleroderma tipleri	5
1.1.5.1. Lokalize Skleroderma	6
1.1.5.2. Sistemik Skleroderma	6
1.1.5.2.1. Preskleroderma	6
1.1.5.2.2. Diffuz kutanöz skleroderma (dcSSc)	6
1.1.5.2.3. Limitli kutanöz skleroderma (lcSSc)	7
1.1.5.2.4. Sine skleroderma	7
1.1.5.2.5. Çakışma sendromu	7
1.1.6. Klinik	7
1.1.6.1. Cilt tutulumu	7
1.1.6.2. Raynaud Fenomeni	8
1.1.6.3. Gastrointestinal Sistem	8

1.1.6.4. Miyokard tutulumu	9
1.1.6.5. Pulmoner hipertansiyon	9
1.1.6.6. Böbrek tutulumu	10
1.1.6.7. Akciğer tutulumu	10
1.1.7. Tanı	11
1.1.8. Tedavi	12
1.1.8.1. Organ Sistem Tutulumunun Tedavisi	12
1.1.8.1.1. Cilt tutulumu	12
1.1.8.1.2. Deri Ülserleri	12
1.1.8.1.3. Raynaud Fenomeni	13
1.1.8.1.4. Gastrointestinal Sistem	13
1.1.8.1.5. Kalp	13
1.1.8.1.6. Böbrek	13
1.1.8.1.7. Akciğer	14
1.1.8.1.8. Kalsinoz	14
1.1.8.1.9. Kas İskelet Sistemi	14
1.1.8.2. İlaç Tedavisi	14
1.1.8.2.1. Otoimmünite ve İnflamasyonun Önlenmesi	14
1.1.8.2.2. Fibroz Oluşumunu Engelleyen Ajanlar	15
1.1.8.2.3. Vasküler Hasarın Önlenmesi	15
1.1.8. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	16
1.1.9. Parikalsitol	18
1.1.11. Amaç	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Deney Hayvanları	20
2.2. Çalışma grupları ve uygulamalar	20
2.2.1. Kontrol grupları	20
2.2.2. Bleomisin ve parikalsitol uygulamaları	21
2.3 Doku örneklerinin toplanması	21
2.4. Histopatolojik ve immunohistokimyasal analizler	21
2.5. Doku mRNA düzeylerinin belirlenmesi	21
2.6. İstatistiksel Analizler	22

3. BULGULAR	23
3.1. BLM ile uyarılmış dermal fibroz	23
3.2. BLM ile uyarılmış dermal fibrozun parikalsitol ile tedavisi	25
4. TARTIŞMA	26
5. KAYNAKLAR	30
6. ÖZGEÇMİŞ	42

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Diffüz kutanöz skleroderma ile limitli kutanöz skleroderma organ tutulumları	7
Tablo 2.	Hemodinamik olarak pulmoner hipertansiyon tanımları	9
Tablo 3.	Renal kriz risk faktörleri	10
Tablo 4.	ACR/EULAR 2013 Sistemik Skleroz Klasifikasyon Kriterleri	12

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Skleroderma patogenezi	4
Şekil 2.	Kanonikal ve nonkanonikal Wnt sinyal yolları	17
Şekil 3.	Çalışma grupları histopatolojik bulguları	23
Şekil 4.	Çalışma gruplarında ortalama dermal inflamatuvar hücre sayıları	24
Şekil 5.	Çalışma gruplarında ortalama dermal kalınlıklar	25

KISALTMALAR LİSTESİ

ANA	: Antinükleer antikorlar
ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
ACR	: American College of Rheumatology
ANP	: Atriyal natriüretik peptit
APC	: Adenomatöz poliposis koli
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
BLM	: Bleomisin
CKI	: Kazein kinaz I
dcSSc	: Diffuz kutanöz skleroderma
DKK1	: Dickkopf-related protein 1
DLCO	: Karbonmonoksit difüzyon kapasitesinde
Dvl	: Dishevelled
EMT	: Epitelyum hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümünü
ESM	: Ekstraselüler matriks
FVC	: Force vital kapasite
GIS	: Gastrointestinal sistem
GSK3β	: Glikojen sentaz kinaz
GVHD	: Graft-versus-host hastalığı
HRCT	: Yüksek rezolusyonlu tomografi
IAH	: İnterstisyel akciğer hastalığı
ICAM-1	: İnterselüler adhezyon molekülü
IFNγ	: İnterferon- γ
IL	: İnterlökin
KOAH	: Kronik obstruktif akciğer hastalığı
lcSSc	: Sınırlı Cilt Tutulumlu Skleroderma
MCP-1	: Monosit kemoatraktant protein 1
NO	: Nitrik oksit
NSIP	: Nonspesifik interstisyel pnömoni
OIP	: Olağan interstisyel pnömoni
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PAH	: Pulmoner hipertansiyon

RF	: Raynaud fenomeni
SMA	: Düz kas aktin
SSc	: Sistemik skleroz
TGF	: Transforming growth factor
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
Tsk-1	: Tight-skin-1
VDR	: Vitamin D reseptörü

1. GİRİŞ

Skleroderma (sistemik skleroz), deri ve çeşitli iç organların fibrozu ile karakterize, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın patogenezi net olarak bilinmemekle birlikte, immün aktivasyon ve vaskülopatinin patogeneizde rol aldığı düşünülmektedir (1-3). Skleroderma hastalarının deri biyopsilerinde T lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere inflamatuvar hücre infiltrasyonu belirlenmiştir (4). Skleroderma hastalarında tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin (IL)-2, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin serum düzeylerindeki yüksekliğin deri tutulumunun şiddeti ile korele olduğu gösterilmiştir (5). Wingless-type MMTV integration site (Wnt) protein ailesi 19 adet glikoproteinden oluşur (6, 7). Wnt proteinleri transmembran reseptörlerine bağlanmaz ise oluşan stoplazmik destrüksiyon kompleksi β -katenin'in degradasyonuna neden olmaktadır. Tersine, Wnt proteinleri reseptörlerine bağlandığında ise (Kanonikal pathway) destrüksiyon kompleksi dağılmakta ve β -katenin artmakta-aktif olmaktadır. Aktive olan β -katenin nükleusa transloke olarak hücre-hücre adezyonu ve hücre differansiasyonunda rol alan hedef genleri uyarmaktadır (8). Wnt/ β -katenin sinyal yolağı embriyogenez, hücre-hücre adezyonu ve transkripsiyonel düzenlemede rol alır (7, 9).

Deneyisel skleroderma modelleri olan tight-skin-1 (Tsk-1) ve bleomisin (BLM) ile uyarılmış dermal fibroz modellerinde Wnt2, Wnt10b ve Wnt11 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (10).

Ek olarak, skleroderma hastalarının deri örneklerinde Wnt1 ve Wnt11 ekspresyonunun arttığı, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörlerinden olan Dickkopf-related protein 1 (DKK1)'in ekspresyonunun ise azaldığı bildirilmiştir (11). Ayrıca, hastaların deri ve akciğer örneklerinde β -katenin düzeyinin artmış olması Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif olduğunu desteklemektedir (11, 12). Wnt3 ve Wnt10b'nin in vivo uygulamaları dermal fibroza neden olmuştur (13, 14). Bir in vitro çalışmada, Wnt3 uygulaması miyofibroblastik aktivitenin belirteci olan düz kas aktin (SMA) ekspresyonunu artırmıştır (15). Sklerodermada, aktive olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağının fibrotik sürece fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümü (15) ve hatta non-fibroblastik hücrelerin fibroblastik hücrelere dönüşümü aşamasında katkı sağladığı düşünülmektedir (14).

Burada 1,25(OH)₂D₃, ligand-aktive vitamin D reseptörü (VDR) aracılığı ile transkripsiyon faktörlerinden T-cell factor-4 (TCF-4)'ün β-katenine bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe eder (16, 17). Parikalsitol hiperkalsemik olmayan, sentetik vitamin D analogudur ve böylece, Wnt/β-katenin sinyal yolağı aktivitelerini engeller. Adriamisin ile uyarılmış nefropati modelinde, parikalsitol VDR/β-katenin üzerinden Wnt/β-katenin sinyal yolağını bloke ederek nefropatiyi iyileştirdiği gösterilmiştir (18). Ek olarak, TGF-β1 aracılı epitelyum hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümünü (EMT) doğrudan (Wnt yolağından bağımsız) bloke eder (19).

Skleroderma patogenezi ile ilgili tartışmalar günümüzde de sürmektedir ve etkin bir tedavisi bulunmamaktadır. Skleroderma, ender görülen bir hastalıktır. Romatoloji polikliniklerine sklerodermanın çeşitli evrelerinde olan hastalar başvurmaktadır. Bundan dolayı, yeterli sayıda ve homojen bir hasta popülasyonu sağlanamamakta ve bu durum skleroderma çalışmaları açısından deneysel hayvan modellerinin önemini arttırmaktadır. Günümüze kadar birçok deneysel skleroderma modeli tanımlanmış olup, mevcut tanımlanmış olan modellerden, oluşturulmasının kolaylığı ve insandakine benzer immünojenik ve histopatolojik özellikler göstermesi nedeniyle BLM ile uyarılmış dermal fibroz/skleroz modeli tercih edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, BLM ile oluşturulan deneysel skleroderma modelinde, Wnt/β-katenin sinyal yolağını bloke eden parikalsitolün dermal fibrozun önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin araştırılmasıdır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Tanım

Skleroderma, deri ve çeşitli iç organların fibrozu ile karakterize, kronik inflamatuvar bir hastalıktır (1-3). Sklerodermada kalp, akciğer, gastrointestinal sistem (GİS) ve böbrekler sıklıkla tutulmaktadır (20-22).

1.1.2 Epidemiyoloji

Skleroderma, Amerika Birleşik Devletleri'nde 4000 erişkinden birinde görülmektedir. Kadınlarda görülme sıklığı erkeklerden 3 kat daha fazladır (23).

1.1.3 Etiyoloji

Sistemik sklerozun etiyojisi net olarak bilinmemekle birlikte çevresel ve genetik faktörler etiyojiden sorumlu tutulmaktadır. Çevresel faktörler olarak organik solvent, ağır metal, silika maruziyeti ve infeksiyöz ajanlar (sitomegalovirüs, retrovirüs ve ebstein barr virüs gibi) sorumlu tutulmaktadır (23-26).

Mesleki işlerinden dolayı vinil klorid içeren ortamda çalışan işçilerin çoğunda Raynaud fenomeni (RF) ve sklerodermaya özgü deri bulguları gözlenmektedir (27). Çevresel ve mesleksel faktörün skleroderma ile ilişkileri çoğu kez araştırılmasına karşın, birçok hastada bu risk faktörlerinin bulunmaması nedeniyle skleroderma etiopatogenezinden tek başlarına sorumlu tutulamayacaklarını düşündürmektedir (28).

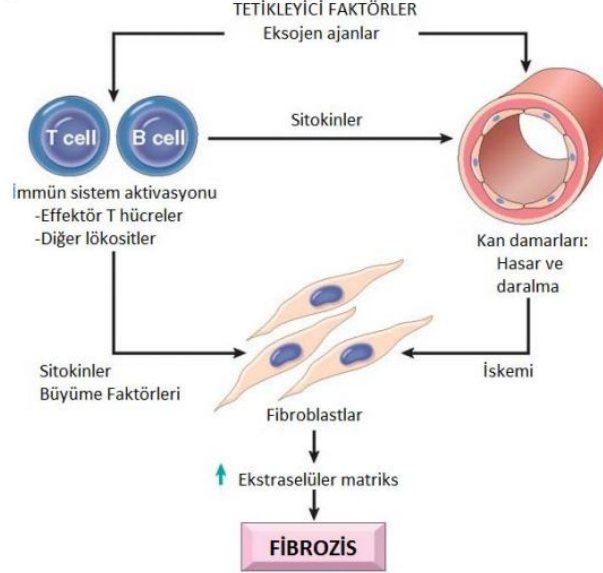
Sistemik sklerozda klas I ve klas II MHC alellerinin sıklığında artış tespit edilmiştir (24). Skleroderma ile insan lökosit antijeni (HLA) arasındaki ilişkiyi araştıran bir araştırmada skleroderma hastalarında HLA A23, DR11 ve B18 düzeyinin yüksek olduğu saptanmıştır (25).

Sklerodermanın genetik yatkınlığı olabileceği düşünülüp birçok çalışmalar yapılmıştır. Skleroderma tanısı olan hastaların birinci dereceden akrabalarında, skleroderma gelişme riskinin arttığı gösterilmiştir, ancak; İkizler arasında görülme oranının düşük olması (monozigot ve heterozigotların her ikisi için de % 4,6) genetik etkinliğin güçlü olmadığını göstermektedir (23). Monosit kemoatraktant protein 1 (MCP-1), Transform edici büyüme faktörü β (TGF- β), TNF- α , IL-1 α , ESM proteinleri (fibronektin, fibrillin vb.), nitrik oksit (NO), endotelin-1 ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) genleri araştırılmış ve bu genlerdeki bazı polimorfizmler sklerodermaya yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (29).

Sağlıklı bireylerin % 22'sinde ve sklerodermalı kadınların % 72'sinde maternal orjinli mikrokimerik hücreler saptanabilmektedir. Mikrokimerik hücreler, infiltre deride ve diğer dokularda görülebilmektedir. Allojenik kök hücre transplantasyonu sonrasında görülebilen graft-versus-host hastalığı (GVHD) ile skleroderma arasında klinik olarak benzerlikler bulunmaktadır. Bu duruma bağlı olarak sklerodermada mikrokimerizmin rol oynuyor olabileceğini düşünülmektedir (23).

1.1.4 Patogenez

Vasküler hasar (vaskülopati), İmmün sistem aktivasyonu (inflamasyon) ve fibroz skleroderma patogenezinin üç ana mekanizması olduğu düşünülmektedir (30)



Şekil 1. Skleroderma patogenezini (31)

1.1.4.1 Vasküler Hasar

Sklerodermada, vasküler hasarın erken evrede olduğu görülmektedir (2). Aktifleşmiş lenfositler tarafından üretilen sitokinler ve endotel hücrelere karşı gelişen antikorlar endotel hücrelerde hasar oluşturmaktadır (32, 33). Lenfositler aktifleştince; CTGF, TGF- β ve PDGF salgılamaktadır. Salgılanan TGF- β ; endotel hasara ve interselüler adhezyon molekülünün (ICAM-1) ekspresyonuna neden olmaktadır. PDGF; endotel hücre proliferasyonunu uyararak ve VEGF miktarını artırarak neovaskülarizasyona neden olmaktadır (2). Endotel hasar ve aktivasyon oluşmasını takiben vazokonstriktör bir madde olan ET-1 miktarında artış ve vazodilatör mediatör olan NO miktarında azalma olması nedeniyle vazomotor tonus kaybolmaktadır (34). Hasar bölgesine inflamatuvar hücreler kemoatraksiyon ile gelmekte ve damar duvarına yapışmaktadır (35, 36). Trombositler temas ettiği subendotel ile adhezyona uğrayarak fibrin birikimi ve intravasküler trombus oluşumuna neden olmaktadır. Damar duvarında mevcut olan kas hücreleri de aktive olarak intima doğru ilerleyerek myofibroblastlara dönüşmektedir. Vasküler değişikliklere bağlı olarak proliferasyon, lümeninde küçülme, kan akımında azalma

oluşmaktadır. Mevcut vasküler değişiklikler RF, parmak iskemisi ve ülserler olarak klinik bulgu vermektedir. Damar kaybı ve neoanjiogenez ileri evrelerde ortaya çıkmaktadır (37).

1.1.4.2. İmmün Sistem Aktivasyonu ve İnflamasyon

Sistemik sklerozda oluşan otoantikolar, humoral immunitenin patogeneizde rol oynadığını düşündürmektedir. Skleroderma hastalarında antinükleer antikolar (ANA) % 90 oranında pozitif saptanmaktadır. Diffuz kutanöz skleroderma (dcSSc)'li hastaların büyük çoğunluğunda Anti Scl70 pozitifken, limitli kutanöz skleroderma (lcSSc)'li hastaların % 30-40'ında pozitif bulunmaktadır. Antisentromer antikolar ise hastaların % 80-90'ında pozitif bulunmaktadır (30).

Mononükleer hücre infiltrasyonunun cilt ve visseral organlarda saptanması, hücrel immunité aktivasyonun bir göstergesidir. Mononükleer hücrelerin özellikle CD4 T lenfositten oluştuğu bilinmektedir (38, 39).

1.1.4.3. Fibroz

Hastalığın patogenezi net olarak bilinmemekte, ancak kollajen ve diğer ekstraselüler matriks (ESM) moleküllerinin aşırı sentez ve depolanması ile fibroz oluşmaktadır (40). ESM üretiminden aktif fibroblastlar (miyofibroblastlar) sorumludur (41, 42). Aktive endotelial hücreler ve inflamatuvar hücreler hücre-hücre etkileşimi ile doğrudan ve çeşitli sitokin, adezyon molekülü ve büyüme faktörü üretimi ile dolaylı olarak fibroblastları aktive edebilmektedir. TGF- β bu aşamalarda önemli görevler üstlenmektedir. Sklerodermada aktive olan fibroblastlar çeşitli sitokin ve büyüme faktörü üretimi ile otokrin ve parakrin özellikler sergilemektedir. Fibroblastik otonomi yanında kemik iliği kaynaklı ve yerel mezenkimal öncül hücrelerin fibroblastik hücrelere dönüşümü, sklerodermadaki fibroblastik aktivitenin devamlılığında sorumlu tutulmaktadır (43).

1.1.5. Skleroderma tipleri

Sistemik skleroz, ciltte sertleşme ile karakterize bir hastalık olduğu bilinmekle birlikte, iç organ tutulumuna da neden olmaktadır. Son dönem organ yetmezliğinin de oluşabildiği bilinmektedir.

Hastalık klinik bulgularına göre temelde lokalize ve sistemik skleroderma olarak iki gruba ayrılır: (2).

1.1.5.1. Lokalize Skleroderma

Lokalize sklerodermanın en sık görülen formu morfeadır. Deri dokusunun etkilenen kısmının genişliğine göre morfealar; yaygın morfea, plak morfea, lineer morfea, büllöz morfea vederin morfea şeklinde alt gruplara ayrılır. Lokalize sklerodermada sistemik sklerodermadan farklı olarak otoimmün belirteçlerde pozitiflik, RF vasküler lezyonlar ve iç organ tutulumu bulunmamaktadır (44).

1.1.5.2. Sistemik Skleroderma

Sistemik skleroderma ise RF ve otoantikordlarda pozitiflik deri bulgularında yıllar önce dahi görülebilmektedir. Bu grubda, preskleroderma, dcSSc, lcSSc, sine skleroderma ve çakışma sendromu sayılabilir.

1.1.5.2.1. Preskleroderma

Reynaud Fenomeni bulunan bir olguda, anti topoisomerez I, antisentromer antikor gibi sklerodermaya özgü otoantikordlardan birinin bulunması veya tırnak yatağı kapilleroskopik incelemelerde kapillerlerde anormalliğin saptanması; olguda büyük bir olasılıkla sklerodermanın gelişebileceğine işaret eder ve bu tablo preskleroderma olarak isimlendirilir.

1.1.5.2.2. Diffuz kutanöz skleroderma (dcSSc)

Reynaud fenomeni ile deri bulgularının oluşması arasında geçen süre oldukça kısadır. Yaygın cilt tutulumu, kalp yetmezliği, tendonlarda krepitasyon, pulmoner fibroz, diffüz gis tutulumu, PAH, oligürik skleroderma renal krizi, kardiyak aritmi görülebilir. Anti-Scl-70 antikor genellikle pozitif, antisentromer antikor ise negatiftir. Cilt kalınlaşması yüz ve gövdeyi de içermekte, ekstremitelerde diz ve dirseklerin proksimaline kadar uzanmaktadır (2, 45).

Tablo 1. Diffüz kutanöz skleroderma ile limitli kutanöz skleroderma organ tutulumları

Organ tutulumu	Diffüz	Limitli
İnterstisyel akciğer hastalığı	%35-60	%35
Pulmoner arteriyel hipertansiyon	%5-10	%10-15
Renal kriz	%12-15	%1-2
Tendon sürtünme sesi	%65	%5
Miyopati	%20	%10
Özefagial dismotilite	%75	%75

1.1.5.2.3. Limitli kutanöz skleroderma (lcSSc)

Cilt tutulumundan yıllar önce RF ortaya çıkar. Sınırlı cilt tutulumu (el, yüz ve ayak) mevcuttur. Eşlik eden kalsinoz, RF, özofageal dismotilite, sklerodaktili, telenjektazi nedeniyle CREST sendromu olarak da bilinir. Antisentromer antikor genellikle pozitif, anti-Scl-70 antikor ise negatiftir Cilt kalınlaşması diz ve dirseklerin distali ile sınırlı, aynı zamanda yüz ve boyunu da içermektedir (2, 45).

1.1.5.2.4. Sine skleroderma

İç organ tutulumunun olup deri tutulumunun olmadığı skleroderma tipidir (2).

1.1.5.2.5. Çakışma sendromu

Sklerodermanın bir veya daha fazla bağ dokusu hastalığı ile birlikte görülmesidir

1.1.6. Klinik

1.1.6.1. Cilt tutulumu

Cilt kalınlaşması hastaların hemen hemen hepsinde el ve parmaklarda başlar. Eller sklerodermanın erken döneminde şiş, gergin, parlak ve eritematöz görünümündedir (ödematöz evre). Zaman geçtikçe cilt kalınlaşır, hareketsiz hale gelir. Deri ekleri ve pililer kaybolur telenjektaziler gelişir (sklerotik evre). Sonrasında sklerodaktili, dudaklarda incelme ve büzülme ortaya çıkar. Ciltte yer yer hipopigmente ve hiperpigmente alanlar gelişebilir (Atrofik evre) (46).

Dijital ülserler; skleroderma hastalarının yaklaşık %50'sinde görülmekle birlikte hızla ilerleyen vasküler bir patolojidir. Skleroderma hastaları için dijital

ülserler klinik olarak önemli bir bulgudur. Ağrı, fonksiyon kaybı ve belirgin şekil bozukluğuna yol açar. Dijital ülserlerin enfekte olması durumunda osteomyelit, gangren ve amputasyona kadar ilerleyebilir (47).

1.1.6.2. Raynaud Fenomeni

Sklerodermanın en erken görülen bulgusudur. El ve ayak parmakları, burun ve kulak kepçesi damarlarında meydana gelen epizodik vazospastik ataklar sonucu ortaya çıkmaktadır. Deride 3 fazlı renk değişimi görülmektedir (34):

A - Palor (solukluk): Vasospazm nedeniyle oluşur.

B - Siyanoz (morumsu renk): İskemi nedeniyle oluşur.

C - Rubor (kızarıklık): Reperfüzyon nedeniyle oluşur.

Tırnak dibinin kapilleroskopik olarak incelenmesinde; genişlemiş, büklüntülü kapillerler, mikrohemorajiler ve kapiller kaybı görülür (37). RF'ye bağlı olarak hastaların yaklaşık yarısında kronik iskemiye bağlı parmak ülserleri gelişebilir.

1.1.6.3. Gastrointestinal Sistem

Deriden sonra en sık etkilenen bölge GİS'tir. Tüm skleroderma hastalarının % 75-90'ında GİS tutulumu olduğu düşünülmektedir (48).

- Özofajial dismotilite % 75-90

- Mide tutulumu % 50

- İnce barsak tutulumu % 40-70

- Kolon tutulumu % 20-50

- Anorektal tutulum % 50-70

Skleroderma hastalarının özofagus, mide ve barsaklarından doku biyopsileri incelendiğinde düz kas atrofisi ve fibroz görülmektedir (49, 50). Sonuçta dismotilite oluşur (51).

Özofagus tutulumuna bağlı olarak; disfaji, regürjitasyon, reflü özofajit, ses kısıklığı gelişir. Mide ve ince barsak tutulumuna bağlı olarak; bulantı-kusma, karın ağrısı, şişkinlik, erken doyma, diyare, malabsorbsiyon ve kilo kaybına yol açabilir (52). Kolon tutulumuna bağlı olarak; intestinal psödoobstruksiyon ve kabızlık görülebilir (53). Hastalığın ince barsak tutulumunda 2 klinik tablo ile karşılaşılır. Birincisi, aşırı bakteri çoğalması nedeniyle gelişen diyare ve malabsorbsiyon, ikincisi

ise mekanik ileus semptomlarını taklit eden fonksiyonel ileustur (psödoobstrüksiyon) (48). Anorektal tutulumla bağlı olarak; rektal prolapsus ve anal inkontinans oluşabilir.

1.1.6.4. Miyokard tutulumu

Miyokardiyal tutulumun hastaların yaşam beklentisi üzerinde önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (54). İleti sisteminin ve Miyokardın tutulumu genel olarak subklinik seyretmektedir. Histopatolojik analizlerde skleroderma hastalarının % 81'inde yama tarzında Miyokardiyal fibroz bulgusuna rastlandığı bildirilmektedir (50). Miyokardiyal RF bağlı olarak kardiyak iskemi ve ileti sisteminin tutulumundan dolayı taşiaritmiler ortaya çıkabilmektedir. Taşiaritmiler genellikle subklinik olarak seyretmekle birlikte ölümcül olabilmektedir (55).

1.1.6.5. Pulmoner hipertansiyon

Sklerodermada görülebilen ciddi ve yaşamı tehdit eden bir komplikasyondur. Bazı hastalarda izole PAH gelişebildiği gibi, İAH ile birlikte de izlenebilmektedir. PAH patogenezinde birçok faktör sorumlu tutulabilir. Ancak; temel rol oynayan faktörün potent bir vazokonstriktör ajan olan ET-1 olduğu düşünülmektedir (56). PAH erken dönemleri asemptomatik olarak seyretmekte iken, ilerleyen safhalarda hastalarda yorgunluk, egzersiz dispnesi ve göğüs ağrısı oluşabilmektedir (57).

Pulmoner arteriyel hipertansiyon çok sayıda klinik durumda gelişebilen bir hemodinamik ve fizyopatolojik durumdur. PAH, dinlenme halinde sağ kalp kateterizasyonu (SKK) ile değerlendirilen ortalama pulmoner arter basıncında (PAB) ≥ 25 mmHg artış şeklinde tanımlanmıştır (Tablo 2) (58).

Tablo 2. Hemodinamik olarak pulmoner hipertansiyon tanımları (58)

Tanım	Özellikler	Klinik grup(lar)
Pulmoner Hipertansiyon (PH)	Ortalama PAB >25 mmHg	Hepsi
Prekapiller PH	PKUB <15 mmHg KD normal ya da azalmış	1. Pulmoner arteriyel hipertansiyon 2. Akciğer hastalığına bağlı PAH 3.Kronik tromboembolik PAH 4.Mekanizmaları belirsiz ya da çok faktörlü PAH
Postkapiller PH	PKUB >15	Sol kalp hastalığına bağlı PAH

Bütün değerler dinlenme halinde ölçülmüştür. Sistemik-pulmoner şantlar (sadece pulmoner dolaşımında), anemi, hipertiroidi ve benzerleri gibi hiperkinetik durumlarda KD yüksek olabilir. KD = kalp debisi; PAB=pulmoner arter basıncı; PAH= pulmoner arteriyel hipertansiyon; PKUB = pulmoner kapiller uç basıncı.

1.1.6.6. Böbrek tutulumu

Skleroderma renal kriz sendromu; hızlı başlayan malign hipertansiyon, hiperreninemi, mikroanjiopatik hemoliz ve progresif renal yetmezlik tablosunun genel adı olarak isimlendirilmektedir (59). Hastalığın en ciddi komplikasyonu olup, son 20-25 yıla kadar skleroderma hastalarındaki en sık ölüm nedeniydi. Skleroderma renal krizi 6 hafta içinde diyaliz gereksinimi veya ölümlerle sonuçlanmaktayken; ACE inhibitörlerinin kullanımı skleroderma renal krizine bağlı ölümleri ve diyaliz gereksinimini azaltmıştır (60). Genel olarak dcSSc hastalarında görülmektedir. Cilt tutulumunun hızlı ilerlediği, hastalığın erken döneminde ortaya çıkmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Renal kriz risk faktörleri

-
- dcSSc
 - Hızlı ilerleyen skleroderma
 - Yüksek doz glukokortikoid kullanımı
 - Anti-RNA polimeraz III antikor pozitifliği
 - Siklosporin
 - Diğer risk faktörleri(yeni gelişen anemi, kalp yetmezliği veya perikardiyal effüzyon gibi yeni gelişen kardiyak olaylar).
-

1.1.6.7. Akciğer tutulumu

İnterstisyel akciğer hastalığı ve PAH'a sklerodermada mortalite ve morbiditenin en önemli nedenleridir (61). Skleroderma hastalarının % 50'sinden azında klinik olarak anlamlı İAH varlığına rastlanır. İnflamatuvar değişikliklerin genel olarak hastalığın erken fazında başladığı ve zamanla ilerlediği düşünülmektedir (62-64). Mononükleer hücreler, endotelial hücreler ve fibroblastlar arasındaki bağlantılar sonucunda kollojen birikimi ortaya çıkmaktadır.

Nonspesifik interstisyel pnömoni (NSIP) en sık görülen histopatolojik patern iken, nadiren de olsa olağan interstisyel pnömoni (OIP) de görülmektedir (65, 66). NSIP; idiyopatik akciğer fibrozisi olan hastalarda, OIP'den daha iyi prognoza sahip iken, sklerodermaya bağlı İAH'da belirgin bir fark görülmemektedir (67). Skleroderma hastalarında, İAH'nın prognoz'un idiyopatik akciğer fibrozundan daha iyidir.

En sık karşılaşılan bulgular nonprodüktif öksürük ve ilerleyici egzersiz dispnesidir (46). Fizik muayane bulgularında ise; tipik olarak ince inspiratuar raller duyulur. Eğer PAH gelişmiş ise; sağ ventrikül yetmezliği bulguları (juguler venöz dolgunluk, sağ ventrikül gallosu, pulmoner ve triküspit yetmezlik üfürümü) ortaya çıkar (68, 69).

Akciğerin X-ray görüntülemesinde interstisyel izlerde artış görülmektedir, ancak bu yöntem erken interstisyel akciğer hastalığının saptanmasında yeterince duyarlı değildir. X-ray den daha duyarlı bir görüntüleme yöntemi yüksek rezolusyonlu tomografi (HRCT) olup, fibrozun şiddeti derecelendirebilmektedir (70, 71). İnterstisyel akciğer tutulumunun HRCT’de görülebilen bulguları; buzlu cam görünümü, interlobuler septalarda kalınlaşma, bal peteği görünümü, retiküler izlerde artma ve subplevral kist oluşumu olarak sıralanabilir. İnce intralobuler fibrozis genellikle buzlu cam görünümü şeklinde görülür (72, 73). Ancak daha düşük olasılıkla da olsa geri dönüşümlü alveolitin bir bulgusu olarak ortaya çıkabilmektedir (71, 73).

Akciğer fonksiyon testlerinin değerlendirmesinde restriktif patern (karbonmonoksit difüzyon kapasitesinde [DLCO] force vital kapasite [FVC] ve total akciğer volümünde düşüklük) bulguları gözlenmektedir (61).

1.1.7. Tanı

American College of Rheumatology (ACR) grubunun 1980 yılında tanımladığı skleroderma sınıflandırma kriterlerine göre 1 major ve 2 minor kriter varlığında % 91 duyarlılık ve % 99 özgüllük ile skleroderma tanısı koyulabilmektedir (21). Bu kriter setine göre metakarpofalangeal eklemlerin proksimaline uzanan cilt sertliği bulunması majör kriter. Sklerodaktili, bibaziler pulmoner fibrozis ve parmak ucu ülseri minör kriterlerdir.

1980 kriterleri erken evre hastaların tanısında yetersiz kalması nedeniyle yeni kriter seti arayışı sonunda 2013 yılında yeni ACR/EULAR skleroderma klasifikasyon kriterleri Tablo 4 yayınlanmıştır (22). Bu yeni setin duyarlılığı % 91 özgüllüğü % 92’dir.

Tablo 4. ACR / EULAR 2013 Sistemik Skleroz Klasifikasyon Kriterleri

Her iki elde parmaklar ve Metakarpofalangeal eklemlerin proksimalinete deri kalınlaşması		9
Parmaklarda deri kalınlaşması (yalnızca yüksek olanı)	Şiş (puffy) parmaklar	2
	Sklerodaktili	4
Parmak ucu lezyonları (yalnızca yüksek olanı)	Parmak ucu ülserleri	2
	Pilting skar	3
Telenjektazi		2
Anormal tırnak yatağı kapilleri		2
PAH ve/veya İn tersti sy el Akciğer Hastalığı (maksimum skor 2)	PAH	2
	İnterstisyel Akciğer Hastalığı	2
RF		3
Sistemik skleroz ilişkili otoantikolar (maksimum skor 3)	Anti-sentromer Ak	3
	Anti-Scl 70 Ak	
	Anti-RNA polimcraz III Ak	
Sistemik skleroz klasifikasyonu için toplam skor > 9 olmalıdır.		

1.1.8. Tedavi

1.1.8.1. Organ Sistem Tutulumunun Tedavisi

1.1.8.1.1. Cilt tutulumu

Yerleşmiş fibroz tedavisinde kullanılabilecek olan onay almış herhangi bir etkili ilaç bulunmamaktadır. Hastalık progresyonu üzerine kortikosteroidler etkili değildir (74). Ayrıca, kortikosteroidler renal krizi provoke edebilmektedir. İmmünsüpresif ajanlar olan; klorambusil, azatioprin ve 5-florourasil sklerodermada tedavisinde etkisiz bulunmuştur (75, 76). D-penisilaminin ise etkisi uzun yıllardır kullanılmasına rağmen tartışmalıdır (77). Yapılmış çalışmalarda metotreksatın kısmi bir etkisi olduğu rapor edilmiş (78, 79) ve bu bulgular doğrultusunda metotreksat EULAR'ın skleroderma tedavi önerilerinde yer almıştır (80).

1.1.8.1.2. Deri Ülserleri

Parmak uçlarında ülserler, paronişi ve tırnak derisinde çatlaklar genellikle iskemi veya travma nedeniyle oluşmaktadır. Basınca daha çok uğrayan diğer ekstremitelerde ülserleri ise nadiren iskemiyle ilişkilidirler. Vazodilatör ilaçların kullanılması deri ülserleri için en uygun tedavi yaklaşımıdır. Bu amaçla kalsiyum kanal blokörleri (KKB), prostosiklin analogları, fosfodiesteraz inhibitörleri (PDİ) ve endotelin reseptör blokörleri (ERB) kullanılabilmektedir. ERB'lerin aktif ulser tedavisinde etki gösterilememiş olmasına karşın yeni ülser gelişimini önleyebilmektedir. Enfeksiyon şüphesi varlığında Staphylococcus aureus'a etkili

olan antibiyotiklerin tercih edilmesi gereklidir. Oral antibiyotiklerin kullanımına en az 14 gün süreyle devam edilmelidir (81).

1.1.8.1.3. Raynaud Fenomeni

Sigara kullanımından kaçınmak, soğuktan korunmak, sıcak tutan giysiler giymek gibi yaşam tarzı gibi değişiklikler önemlidir. ACE inhibitörleri, anjiyotensin reseptör blokerleri, KKB ve PDİ inhibitörleri gibi vazodilatasyon yapan ilaçların yararlı oldukları kanıtlanmıştır (82). Dijital sempatektomi, mikrovasküler rekonstrüksiyon bazı hastalarda başarılı olabilmektedir (83).

1.1.8.1.4. Gastrointestinal Sistem

Gastroözefageal reflüye bağlı gelişen semptomları H2 reseptör blokerleri, proton pompa inhibitörleri, baş kısmının yükseltilmesi, diyet düzenlemeleri ile azaltılabilir. Prokinetik ilaçlar (metoklopramid, eritromisin gibi) üst gastrointestinal sistem motilitesini artırmak için kullanılabilir. Özefagusta gelişen striktürler için periyodik olarak endoskopik dilatasyonlar yapılabilir. Alt gastrointestinal sistem ait semptomlar genellikle aşırı bakteri çoğalmasıyla ilişkili olup, 2-4 hafta geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı semptomlarda düzelme sağlayabilir (83, 84).

1.1.8.1.5. Kalp

Miyokardit saptanırsa, yüksek doz steroid tedavisi denenebilir. Tedavinin temelini dijital türevleri ve diüretikler oluşturmaktadır. Ciddi aritmilerde antiaritmik ilaçlar kullanılır. Nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar veya düşük doz steroid perikardit tedavisinde kullanılabilir (83, 84).

1.1.8.1.6. Böbrek

Tanınımın erken konulması renal kriz tedavisi açısından çok önemlidir. dcSSc'nin erken evresinde, kan basıncının haftada birkaç gün ölçülmesi önerilmektedir. ACE inhibitörlerine; sistolik kan basıncının 30 mmHg veya daha yüksek artışlar gösterdiğinde başlanılmalıdır. Diğer antihipertansif ilaçlar da yararlı olabilir. Bazı hastalarda diyaliz gereksinimi oluşabilir. ACE inhibitörlerinin kullanımına devam edildiğinde, 3-24 ay sonunda diyalize gereksinimini önemli derecede azaltır (83).

1.1.8.1.7. Akciğer

Haemophilus influenza ve Streptococcus pneumoniae aşıları akciğer tutulumu saptanması durumunda profilaktik olarak uygulanmalıdır. Siklofosfamid ve diğer immün süpresif ilaçların kullanımı akut alveolit bulgularının belirlenmesi durumunda yararlı olabilir. PAH'da PDİ, ERB ve Prostosiklin analogları kullanılabilir. Son dönem akciğer hastalığının gelişmesi durumunda; akciğer veya kalp-akciğer transplantasyonu yapılabilir (83, 84).

1.1.8.1.8. Kalsinoz

Kalsinozun önlenmesi veya oluşmuş kalsinozun tedavisi için yararı kanıtlanmış standart bir tedavi protokolu bulunmamaktadır. Kontrollü çalışmalar bulunmamasına karşın litotripsi kalsinoz tedavisinde kullanılmaktadır (85).

1.1.8.1.9. Kas İskelet Sistemi

Nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar eklem yakınmaları için kullanılabilir. Proksimal interfalangeal eklemlerde fleksiyon kontraktürü gelişmesi durumunda cerrahi müdahale yapılması enfeksiyon ve cilt hasarlarını önleyebilir (83, 84).

1.1.8.2. İlaç Tedavisi

1.1.8.2.1. Otoimmünite ve İnflamasyonun Önlenmesi

Aktif alveolit varlığında siklofosfamid yararlı olmaktadır (86). Yaygın deri tutulumu olan hastalarda; pulmoner fonksiyonlar ve deri üzerine orta derecede etkili bulunmuştur (87). Siklofosfamid kullanan hastalarda % 5-15 hemorajik sistit,% 10-15 lökopeni, % 7-10 enfeksiyon, ve % 3 alopesi gibi yan etkiler görülebilmektedir (88). Mesane kanseri tedaviden uzun süre sonra % 3-5 sıklığında görülebilmektedir. Birlikte mesna kullanılması bu komplikasyonlara karşı koruyucudur. İnfertilite görülme sıklığı da fazladır

Metotreksatın dcSSc'li hastaların deri skorunda ılımlı bir iyileşme sağladığı randomize kontrollü bir çalışmada saptanmıştır (78). Deri dışında diğer organlara önemli bir etkisinin olmadığı bilinmektedir.

Skleroderması şiddetli ve progresif olan 70'den fazla hastaya kök hücre transplantasyonu uygulanmıştır (88). Kök hücre transplantasyonundan önce, total

vücut ışınlanması ile birlikte veya total vücut ışınlanması yapılmadanan titimosit globülin ve yüksek doz siklofosfamid kullanılabilir. Transplantasyon ile ilişkili mortalitenin % 9-17 sıklığında olduğu bildirilmektedir (89).

1.1.8.2.2. Fibroz Oluşumunu Engelleyen Ajanlar

İnterferon- γ (IFN γ), aktive T hücreleri tarafından üretilir. IFN γ ; makrofajları aktive eder ve kollajen üretimini güçlü bir şekilde inhibe eder (85). Hastaların % 85'inde interferon- γ -1b tedavisi, grip benzeri semptomlara (ateş, baş ağrısı, miyalji, üşüme, artralji ve halsizlik) neden olmaktadır. 9-12 hafta içinde bu semptomlar azalmaktadır. Karaciğer enzim yüksekliği ve lökopeni gelişimi görülebilir (90).

Skleroderma tedavisinde interferon- α önemli bir yararının olmadığı gösterilmiştir (91).

Yüksek dozlarda (750 mg/gün) D-Penisilaminin kullanımı düşük dozlarda (62,5 mg/gün) kullanımına göre deri sertliğinin azaltılmasında daha etkili bulunmamıştır (77).

Kollajen yıkımını artırmasına üretimini de inhibe etmesine karşın relaksin bir faz II çalışmada, skleroderma tedavisi üzerine herhangi bir yararı gösterilememiştir (92).

1.1.8.2.3. Vasküler Hasarın Önlenmesi

Sklerodermanın erken evresinde temel patogenik özellik vasküler tutulumdur. Vasküler tutulumla bağlı olarak, iç organ hasarı ve süperfisiyal hasar gözlenebilir (93). Vasküler tutulum için Prostaglandin analogları, PDİ ve ERB kullanılabilir (94).

Epoprostenol ve treprostinil prostasiklin analogları olup; kardiyopulmoner hemodinamikler, egzersiz kapasitesi, dispne skoru ve yaşam süresi üzerine etkilidir. Bir diğer prostasiklin türevi olan iloprostun, semptomatik PAH'li skleroderma hastalarının tedavisinde yararlı olduğunu destekleyen veriler bulunmaktadır (95). Prostaglandinlere ait önemli yan etkiler bulunmaktadır. Sürekli intravenöz infüzyon şeklinde uygulanan epoprostenolün infüzyonu kesildiğinde ani ve şiddetli pulmoner ödem yapabilir. Ayrıca; bulantı-kusma, baş ağrısı, çene ağrısı ve abdominal kramplar görülebilir. Treprostinilin en sık görülen yan etkisi ise; infüzyon bölgesinde ağrıdır. (96).

Bosentan, ambrisentan ve siteksentan endotelin-1 reseptör antagonistleridir. Endotelin-1; potent bir vazokonstriktör ve düz kas mitojenidir. Bosentan endotelin-1 i antagonize ederek, PAH ile ilişkili yakınmaları azaltmaktadır (93). Yapılan bir çalışmada, bosentanın egzersiz kapasitesini, pulmoner vasküler rezistansı ve PAB'ı azalttığı gösterilmiştir (97). En sık görülen yan etkisi karaciğer toksisitesi olup, % 10-14 oranında karaciğer fonksiyon testlerinde normal değerın 3 katı veya daha fazla artış gözlenmekte olup, doz ayarlanması ile bu durum kontrol altına alınabilmektedir (96).

Sildenafil, vardenafil ve tadalafil fosfodiesteraz-5 inhibitörleridir. Pulmoner vasküler rezistans indeksini azaltır, şiddetli akciğer fibrozu ve sekonder PAH'ı bulunan hastalarda gaz değişimini artırmaktadır (98). Sildenafil, nitrik oksit ve prostanoit (iloprost) ile ilişkili pulmoner arteriyel vazodilatasyonu artırır (99). RF hastalarında, periferik kan akımını artırır (98). Yan etki olarak; flaşing, baş ağrısı, nazal konjesyon ve dispne görülebilir. Sildenafil düşük dozlarda daha az yan etki gösterir. Sildenafilin yüksek dozlarda kullanımı, sistemik hipertansiyon, miyokard infarktüsü ve retinal yan etkileri nedeniyle görme bozukluğuna neden olabilir. Son zamanlarda yarılanma ömrü uzun olmasından dolayı tadalafil kullanımı sklerodermada periferik vaskülopati tedavisi için tercih edilir hale gelmiştir (100).

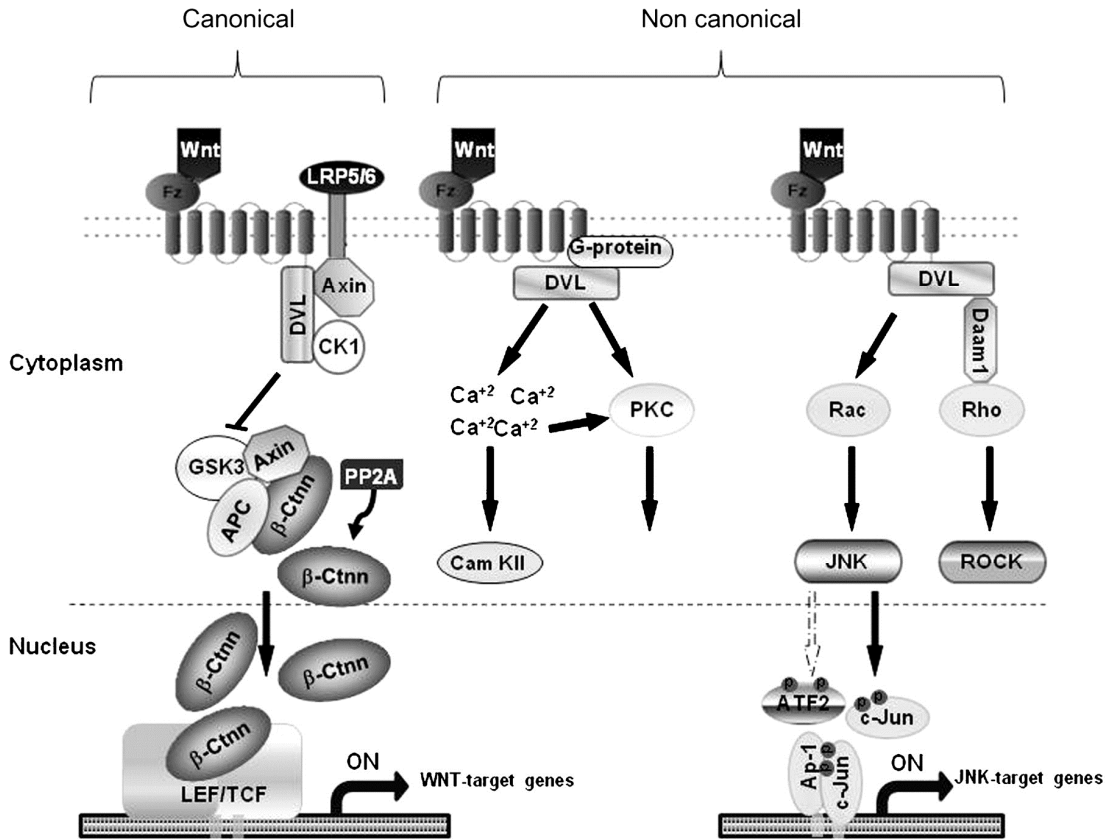
Skleroderma renal krizi nedeniyle ölüm sıklığı ACE inhibitörleri kullanıma girmeden önce yüksekti. İlk kez 1970'lerin sonunda ACE inhibitörleri skleroderma renal krizinde kullanılmaya başlanmıştır. Serum kreatin konsantrasyonu 3 mg/dl'yi geçmeden ACE inhibitörleri kullanılmaya başlandığında, diyaliz gereksinimi önenebilir (101). Skleroderma renal krizi olan hastalarda ACE inhibitörleri kullanılmasına rağmen, % 35 kadarında ölüm olabilmektedir (85).

1.1.8.Wnt/ β -katenin sinyal yolağı

Wingless-type MMTV integration site (Wnt) protein ailesi 19 adet glikoproteinden oluşur (102, 103). Wnt sinyal yolakları Kanonikal (Wnt/ β -katenin), nonkanonikal planar cell polarity ve nonkanonikal Wnt/Ca olarak üçe ayrılır. Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması Wnt proteininin hedef hücre zarına ulaşarak, burada bulunan reseptörlerine (Fz ve LRP5/6) bağlanması ile başlamaktadır (104). Wnt proteininin reseptörlerine bağlanması ile hücre zarında başlayan sinyalin

sitozole aktarılması gerekmektedir. Bu aktarım iki basamakta gerçekleşir. Bu basamaklardan ilki Dishevelled (Dvl) proteininin fosforillenmesidir (105). Hücre zarında başlayan sinyalin sitozole aktarılmasında ikinci basamak LRP5/6 reseptörünün hücre içi kısmının fosforillenmesidir (106). Wnt proteinleri transmembran reseptörlerine bağlanmaz ise oluşan stoplazmik destrüksiyon kompleksi β -katenin'in degradasyonuna neden olmaktadır. Tersine, Wnt proteinleri reseptörlerine bağlandığında ise (Kanonikal pathway) destrüksiyon kompleksi dağılmakta ve β -katenin artmakta-aktifte olmaktadır. Aktive olan β -katenin nükleusa transloke olarak hücre-hücre adezyonu ve hücre differansiasyonunda rol alan hedef genleri uyarmaktadır (8). Wnt/ β -katenin sinyal yolağı embriyogenez hücre-hücre adezyonu ve transkripsiyonel düzenlemede rol alır (102, 103).

Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının sitoplazmadaki işleyişinde görev alan temel biyomoleküller (Dvl), "Kazein kinaz I (CKI)", "Axin", "Glikojen sentaz kinaz (GSK3 β)" ve "Adenomatöz poliposis koli (APC)" proteinleridir. Bu moleküllerin Wnt/ β -katenin sinyal yolunun hedef molekülü olan β -katenin proteini ile yakın ilişkisi bulunmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Kanonikal ve nonkanonikal Wnt sinyal yolakları (107).

Deneysel skleroderma modelleri olan tight-skin-1 (Tsk-1) ve BLM ile uyarılmış dermal fibroz modellerinde Wnt2, Wnt10b ve Wnt11 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (10, 108).

Ek olarak, skleroderma hastalarının deri örneklerinde Wnt1 ve Wnt11 ekspresyonunun arttığı, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörlerinden olan DKK1'in ekspresyonunun ise azaldığı bildirilmiştir (109). Ayrıca, hastaların deri ve akciğer örneklerinde β -katenin düzeyinin artmış olması Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif olduğunu desteklemektedir (110). Wnt3 ve Wnt10b'nin in vivo uygulamaları dermal fibroza neden olmuştur. Bir in vitro çalışmada, Wnt3 uygulaması miyofibroblastik aktivitenin belirteci olan düz kas aktin (SMA) ekspresyonunu artırmıştır. Sklerodermada, aktive olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağının fibrotik sürece fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümü ve hatta non-fibroblastik hücrelerin fibroblastik hücrelere dönüşümü aşamasında katkı sağladığı düşünülmektedir (111).

1.1.9. Parikalsitol

Parikalsitol, 19-nor-1,25-hidroksi-vitamin D2 molekül yapısında olan sentetik bir vitamin D analogudur. Parikalsitol 3.kuşak bir ilaç olup dokuya bağlı seçici VDR aktivasyonu yapmaktadır (112). Yapılan deneysel çalışmalarda kalsiyum ve fosfor düzeyleri üzerine minimal değişiklikler yaparken parathormon (PTH) sekresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (113, 114). Parikalsitol tedavisinin vasküler düz kas hücrelerinde kalsifikasyonu önleyici etkisi hayvan deney modellerinde gösterilmiştir. Vasküler kalsifikasyondan koruyucu etkisinin serum kalsiyum ve fosfor düzeyinden bağımsız olduğu düşünülmektedir (115). Adriamisin ile oluşturulan deneysel nefropatide podosit hasarı, proteinüri ve renal fibrozis gelişimi üzerinde önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (18) Parikalsitol, proinflamatuvar sitokin salınım inhibisyonu, monosit/makrofaj infiltrasyonunun inhibisyonu, myofibroblast aktivasyonunu engellemesi, fibronectin, TGF- β 1, tip I ve III kollojen ekspresyonunu baskılanması gibi etkileriyle renal hasarın gelişmesi üzerinde olumlu etkiler sağlamaktadır. Parikalsitolün renal interstisyel fibrozisi azalttığı obstüriktif üropati deneysel modelinde gösterilmiştir (116). Parikalsitolün renal TGF- β 1 ve TGF- β 1'in tip 1 reseptörünün ekspresyonunu baskılamasına bağlı olarak E-cadherin süpresyonu

ve α -SMA ile tübüler hücrelerde fibronektinin üretimini baskıladığı gösterilmiştir (18).

Yapılan bir çalışmada deneysel olarak oluşturulan aort stnozunda, parikalsitolün kardiyak fibrozisi engellediğini ve sol ventrikül fonksiyonlarını, sol ventrikül ağırlık artıŐından bağımsız olarak koruduğunu göstermiŐlerdir. Parikalsitol grubunda kollojen 3, fibronektin ve atriyal natriüretik peptit (ANP) salınımının azaldığı tespit edilmiştir (117, 118). $1,25(OH)_2D_3$, ligand-aktive VDR aracılığı ile, transkripsiyon faktörlerinden T-cell factor-4 (TCF-4)' n β -katenine bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe eder (16, 17). Parikalsitol hiperkalsemik olmayan, sentetik vitamin D analogudur ve böylece, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesini engeller. Adriamisin ile uyarılmış nefropati modelinde, parikalsitol VDR/ β -katenin üzerinden Wnt/ β -katenin sinyal yolağını bloke ederek nefropatiyi iyileştirdiği gösterilmiştir (18).

1.1.11. Amaç

Bleomisin ile oluşturulmuş deneysel skleroderma modelinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının sentetik D vitamin analogu olan parikalsitol ile inhibisyonunun profilaktik ve teröpatik etkinliklerinin belirlenmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) yapıldı. Çalışmanın etik onayı 12.07.2013 tarihinde, 2013/06 -81 nolu kararı ile, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan alındı.

2.1. Deney Hayvanları

Çalışmaya ortalama 6 hafta yaşında ve 20-25 gram ağırlıklarında, 60 adet Balb/c dişi fare alındı ve 6 eşit gruba ayrıldı. Fareler, 12 saat güneş ışığı alan bir odada, özel olarak hazırlanmış kafeslerde barındırıldı. Çalışma, standart deneysel çalışmalar etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Farelerin beslenmesinde, Elazığ Yem Fabrikası'ndan sağlanacak standart fare yemi kullanıldı ve kafeslerde özel bölümlere yerleştirilmiş olan ve uç kısımlarında damlalık bulunan özel şişeler ile su verildi. Tüm farelerin sırt bölgesinde belirlenmiş olan bir bölge, subkutan (sc) uygulamalar için tıraş edildi.

2.2. Çalışma grupları ve uygulamalar

Bu çalışmada, BLM ile uyarılmış deneysel skleroderma modelinin erken ve geç (yerleşmiş fibroz) evrelerinde parikalsitol tedavisinin etkinliği test edildi. Bu amaçla, erken evre grupları (grup I [kontrol grubu], II [plasebo grubu] ve III [parikalsitol grubu]) ve geç evre grupları (grup IV [kontrol grubu], V [plasebo grubu], VI [parikalsitol grubu]) olarak 6 grup oluşturuldu. Erken dönem gruplarında BLM ile fibrozun uyarılmasına ve parikalsitol tedavisine aynı gün başlandı. Geç dönem gruplarında ise ilk 3 hafta sadece BLM, 21. günden sonra BLM ve parikalsitol birlikte uygulandı.

2.2.1. Kontrol grupları

Bleomisin uygulanmayan erken (Grup I) ve geç (Grup IV) dönem kontrol gruplarındaki farelere, sırt derisindeki tıraş edilmiş bir bölgeden, her gün sc FTS uygulandı. grup I'deki farelere bu uygulamalar ilk 3 hafta süresince, grup IV farelere ise sc FTS 6 hafta süreyle uygulandı.

2.2.2. Bleomisin ve parikalsitol uygulamaları

Bir mg BLM, 1 mL FTS içerisinde çözündürülerek II. ve III. gruplardaki farelere 3 hafta, V. ve VI gruplardaki farelere 6 hafta boyunca 100 µL (100 µg) dozunda daha önce tanımlandığı (119) şekilde her gün sc uygulandı. Parikalsitol (0.3µg /kg) ise, BLM'e ek olarak, III. gruptaki farelere ilk 3 hafta, VI. gruptaki farelere ise 21. günden başlayarak çalışma sonuna kadar her gün sc yol ile enjekte edildi.

2.3 Doku örneklerinin toplanması

I., II. ve III. gruplardaki fareler üçüncü haftanın sonunda; IV., V. ve VI. gruplardaki fareler ise altıncı haftanın sonunda, son tedavilerden 24 saat sonra, dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Farelerden kan örnekleri alındı ve enjeksiyon uygulanmış olan sırt derileri daha sonraki incelemeler için eksize edildi. Alınan doku örnekleri histopatolojik inceleme için ikiye bölündü. Bir bölüm doku % 10'luk formalin solusyonu içine, doku mRNA analizleri için ayrılan diğer kısım ise alüminyum folyo içerisine konularak -80 °C'de çalışılacağı güne kadar saklandı.

2.4. Histopatolojik ve immunohistokimyasal analizler

Formalin solusyonu içerisine alınan doku örneklerinden, aynı gün içerisinde, parafin blokları hazırlandı. Bloklardan alınan kesitler Hematoksilen-Eosin ve Masson-Trichrom ile boyanarak, ışık mikroskopunda X40, X100, X200 ve X400 büyütmede, dalında uzman bir patolog tarafından incelendi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibroz dereceleri belirlendi.

İmmunohistokimyasal değerlendirme, monoklonal anti-αSMA ticari kitlerinin deparafinize kesitlere uygulanması sonrası, αSMA aktivitesinin belirlenmesi yapıldı.

2.5. Doku mRNA düzeylerinin belirlenmesi

Real-time polymerase chain reaction analizler (RT-PCR) için toplanan doku homejenatından, uygun RNA izolasyon kiti kullanılarak, TGF-β1, axin-1 ve wnt-2 mRNA ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile belirlendi.

Farelerden elde edilen deri dokularından RNA izolasyonu için Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanıldı. RNA ölçümleri için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) ile yapıldı. RNA miktarı µg/ml olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı. Komplementer DNA sentezi (cDNA) için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı. Komplementer DNA Sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti ile gerçekleştirildi (Applied Biosystems, Foster City, CA). Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA) Tag Man Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak amplifiye edildi. Isı koşulları 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakika X 40 siklüs, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı. Real Time PCR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çalışmada Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırmalı Ct (Δ Ct) yöntemi ile belirlendi.

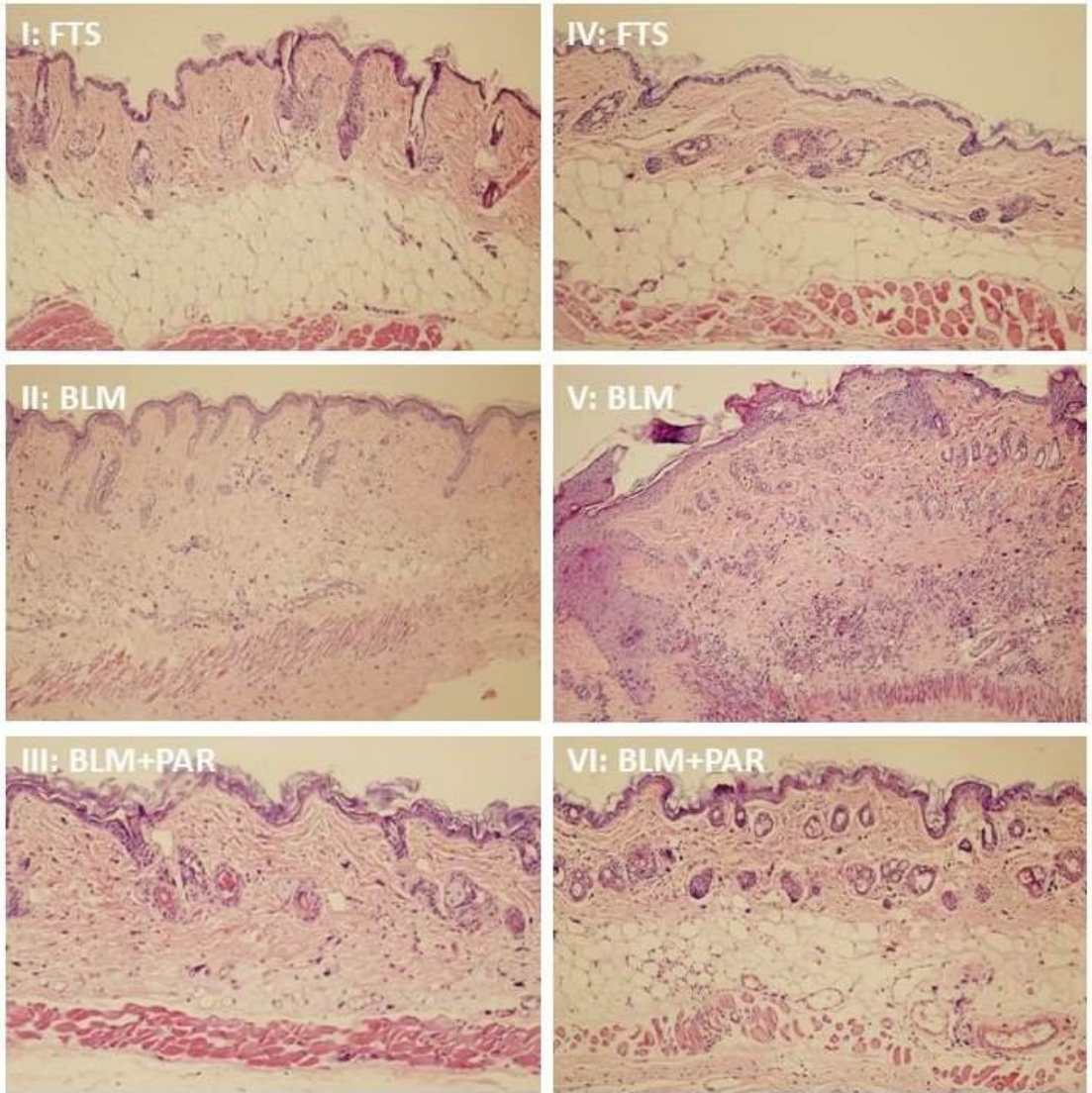
2.6. İstatistiksel Analizler

Çalışma tamamlandıktan sonra elde edilen verilerin istatistikler analizleri, SPSS istatistik programında yapıldı. Gruplar arasındaki olası farklılıkların anlamlılığı Kruskal Wallis ve Post Hoc Mann-Whitney U testleri ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. BLM ile Uyarılmış Dermal Fibroz

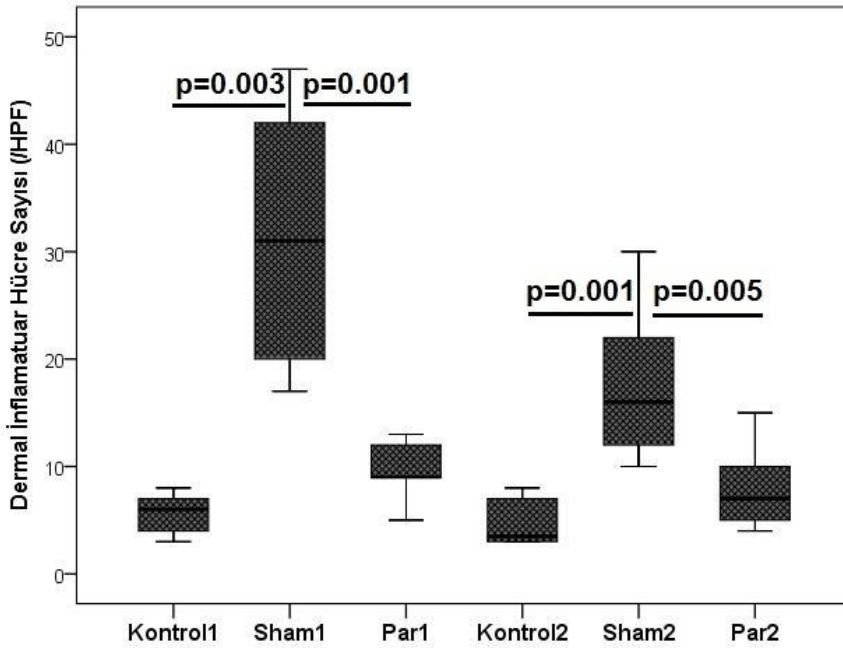
Üç ve 6 hafta FTS enjeksiyonu yapılan I. ve IV. gruptaki (erken ve geç evre kontrol grupları) farelerin deri doku histopatolojik değerlendirilmesinde dermal fibrozun oluşmadığı görüldü (Şekil 3). Ancak, hem 3 hem de 6 hafta BLM uygulamaları dermal ve subkutan alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonuna ve dermal fibroza neden olmuştur (Şekil 3).



FTS; fosfat ile tamponlanmış salin, BLM; bleomisin, PAR; parikalsitol.

Şekil 3. Çalışma grupları histopatolojik bulguları (Hemotoksilen eosin, X200)

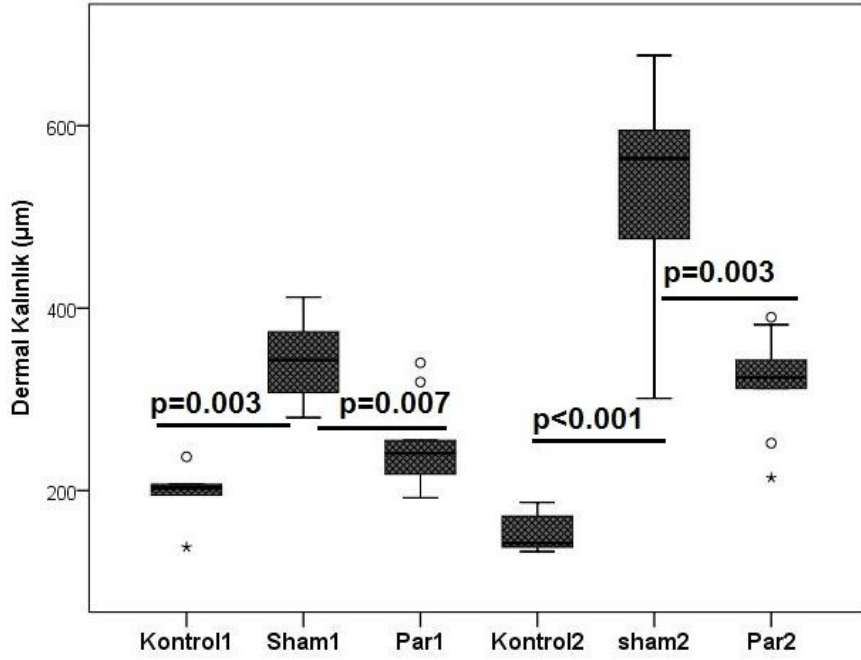
Üç hafta süre ile subkutan BLM uygulanan erken plasebo (sham) grubunda dermal alandaki ortalama inflamatuvar hücre sayısı erken kontrol grubundakine göre anlamlı azalmıştı (Şekil 4). Benzer şekilde, 3 hafta BLM uygulamaları ortalama dermal kalınlıkta artışa neden olmuştu (Şekil 5). 6 hafta BLM uygulanan geç evre plasebo (sham) grubundaki inflamatuvar hücre sayısı geç evre kontrol grubuna göre yüksekti, ancak erken evre plasebo grubundakinden azdı (Şekil 4). Diğer taraftan, inflamatuvar hücre sayısındaki artıştan farklı olarak geç evre plasebo grubundaki dermal kalınlık artışı hem geç dönem kontrol grubundan hem de erken evre plasebo grubundakinden daha yüksekti (Şekil 5).



HPF; her büyük büyütme alanı, Sham; plasebo grubu, Par; parikalsitol.

Şekil 4. Çalışma gruplarında ortalama dermal inflamatuvar hücre sayıları

Tekrarlayan BLM uygulamaları TGF- β 1, *axin-1* ve *wnt-2* mRNA ekspresyonlarını artırmıştı. TGF- β 1 mRNA ekspresyonu 3 haftanın sonunda yaklaşık 100; 6 haftanın sonunda yaklaşık 1000 kat artmıştı. Benzer şekilde, *axin-1* mRNA ekspresyonu 3 haftanın sonunda 110 kat; 6 haftanın sonunda 2600, *wnt-2* mRNA ekspresyonu ise 3 haftanın sonunda 2 kat; 6 haftanın sonunda 26 kat artmıştı. *Axin-1* ve *wnt-2* mRNA ekspresyonlarındaki artış BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinde Wnt/ β katenin yolağının aktive olduğunu düşündürmektedir.



Sham; plasebo grubu, Par; parikalsitol.

Şekil 5. Çalışma gruplarında ortalama dermal kalınlıklar

3.2. BLM ile Uyarılmış Dermal Fibrozun Parikalsitol ile Tedavisi

Hem parikalsitolün BLM uygulamaları birlikte başlandığı III. grupta (profilaktik parikalsitol grubu), hem de parikalsitolün üçüncü hafta başlanıp 6. haftaya kadar uygulandığı VI. grupta (teröpatik parikalsitol grubu) histopatolojik olarak dermal nekro inflamasyon, dermal alandaki inflamatuvar hücre sayısı ve dermal fibrozda gerileme tespit edilmişti (Şekil 3).

Plasebo grupları ile karşılaştırıldığında dermal alandaki ortalama inflamatuvar hücre sayısı ve ortalama dermal kalınlıklar hem profilaktik hem de teröpatik parikalsitol gruplarında anlamlı olarak azalmıştı (Şekil 4 ve 5).

Benzer şekilde, parikalsitolün hem profilaktik hem de teröpatik uygulamalarında TGF-β1, *axin-1* ve *wnt-2* mRNA ekspresyonları belirgin azalmıştı.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda BLM ile uyarılmış olan deneysel skleroderma modelinde erken ve geç (yerleşmiş fibroz) evrelerindeki bulgular incelenmiş ve sentetik vitamin D analogu olan parikalsitolün dermal fibrozu önleyici ve tedavi edici rolü araştırılmıştır. Tekrarlanan subkutan BLM uygulamaları sonucunda hem erken hem de geç evrede dermal fibroz oluşmuştur. Parikalsitolün hem profilaktik hem de teröpatik uygulamalarında histopatolojik olarak dermal nekroinflamasyon ve dermal fibrozda gerileme tespit edilmiştir.

Skleroderma deri ve çeşitli iç organların fibrozu ile karakterize, kronik inflamatuvar bir hastalıktır (1-3). Hastalığın patogenezi net olarak bilinmemekle birlikte, immün aktivasyon ve vaskülopatinin patogeneizde rol aldığı düşünülmektedir (1-3). Skleroderma hastalarının deri biyopsilerinde T lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere inflamatuvar hücre infiltrasyonu belirlenmiştir (4). Skleroderma hastalarında tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin (IL)-2, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin serum düzeylerindeki yüksekliğin deri tutulumunun şiddeti ile korele olduğu gösterilmiştir (5).

Sklerodermanın nadir görülen ve klinik olarak heterojen bir hastalık olmasından dolayı sklerodermada ideal bir klinik çalışma planlanması ve yapılması zorlaşmaktadır (2, 23). Bu nedenle, patogenik yolların aydınlatılabilmesi, etkin tedavi ajanının bulunabilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda deneysel modellere başvurulabilmektedir. BLM ile uyarılan deneysel skleroderma modeli sklerodermanın birçok fenotipik özelliklerinin sergilenebilmektedir. Ek olarak, oluşturulmasının kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle, günümüze kadar tanımlanmış olan deneysel skleroderma modellerinden en uygunu ve en sık kullanılanıdır (119). Çalışmamızda, BLM uygulamalarının üçüncü haftadan sonra dermal fibroza, dermal ve subkutan alanlarda artmış inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olduğu gözlenmiştir.

Skleroderma patogenezinde, vasküler hasarın en erken evre olduğu düşünülmektedir (120). Aktifleşmiş lenfositler tarafından üretilen sitokinler ve endotelial hücrelere karşı gelişen antikolar mikrodolaşımda görülen endotelial hasarı oluşturmaktadır (32, 33). Lenfositler aktifleşince; CTGF, TGF- β ve PDGF salgılamaktadır. Salgılanan TGF- β ; endotelial hasara ve MHC ile birlikte

intersellüler adhezyon molekülünün (ICAM-1) ekspresyonuna neden olmaktadır. PDGF; endotel hücre proliferasyonunu uyararak ve VEGF miktarını azaltarak neovaskülarizasyona neden olmaktadır (120). Endotelyal hasar ve aktivasyon oluşmasını takiben vazokonstriktör bir madde olan ET-1 miktarında artış ve vazodilatör mediatör olan NO miktarında azalma olması nedeniyle vazomotor tonus kaybolmaktadır (34). Hasar bölgesine inflamatuvar hücreler kemoatraksiyon ile gelmekte ve damar duvarına yapışmaktadır (35, 36). Trombositler temas ettiği subendotel ile adhezyona uğrayarak fibrin birikimi ve intravasküler trombus oluşumuna neden olmaktadır. Damar duvarında mevcut olan kas hücreleri de aktive olarak intimaya doğru ilerleyerek myofibroblastlara dönüşmektedir.

Sklerodermada vaskulopati, immün aktivasyon dermal fibrozdan yıllarca önce başlamaktadır. Hastalığın ilerleyen yıllarında dermal alanda endotelyal hücre aktivitesinde ve inflamatuvar hücre sayısında azalma oluşmaktadır. Bu hücrelerin ise başlangıçta fibroblastları aktive ettiği kabul edilmektedir. İnflamatuvar hücre sayısı ve aktivitesinde azalmaya karşın sahada fibroblastlar hala etkindir. Dermal fibroza bağlı olarak oluşan doku hipoksisi, artmış doku basıncına karşın etkinliğine devam eden bu fibroblastlar morfolojik olarak başlangıçtakinden farklıdır. Bu dönüşümün yanı sıra, komşu non-fibroblastik hücrelerin de fibroblastik hücrelere dönüştüğü ortaya konulmuştur. Adiposit, perisit ve epitelyal hücreler fibroblastlara dönüşebilen non-fibroblastik hücrelerdir.

Wnt/ β katenin sinyal yolağı embriyogenez ve organogenezde etkindir. Bu süreçte hücre-hücre etkileşimi ve hücre dönüşümünde görev almaktadır. Deneysel skleroderma modellerinde Wnt2, Wnt10b ve Wnt11 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (109, 110). Ek olarak, skleroderma hastalarının deri örneklerinde Wnt1 ve Wnt11 ekspresyonunun arttığı, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı inhibitörlerinden olan DKK1'in ekspresyonunun ise azaldığı bildirilmiştir (111). Ayrıca, hastaların deri ve akciğer örneklerinde β -katenin düzeyinin artmış olması Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif olduğunu desteklemektedir (111). Wnt3 ve Wnt10b'nin in vivo uygulamaları dermal fibroza neden olmuştur. Bir in vitro çalışmada, Wnt3 uygulaması miyofibroblastik aktivitenin belirteci olan düz kas aktin (SMA) ekspresyonunu artırmıştır. Sklerodermada, aktive olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağının fibrotik sürece fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümü ve hatta non-

fibroblastik hücrelerin fibroblastik hücrelere dönüşümü aşamasında katkı sağladığı düşünülmektedir (110).

Çalışmamızda, BLM uygulamaları ile belirgin dermal fibroz oluşmuş beraberinde axin-1 ve wnt-2 mRNA ekspresyonları belirgin artmıştı. Axin-1 ve wnt-2 mRNA ekspresyonlarının artması dermal fibrozda Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif olduğunu desteklemektedir.

Parikalsitol, 19-nor-1,25-hidroksi-vitamin D2 molekül yapısında olan sentetik bir vitamin D analogudur (112). Parikalsitol, proinflamatuvar sitokin salınım inhibisyonu, monosit/makrofaj infiltrasyonunun inhibisyonu, myofibroblast aktivasyonunu engellemesi, fibronektin, TGF- β 1, tip I ve III kollojen ekspresyonunu baskılanması gibi etkileriyle renal hasarın gelişmesi üzerinde olumlu etkiler sağlamaktadır (116). Çalışmamızda, parikalsitol BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinin erken ve geç evresinde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve dermal fibrozu belirgin geriletmiştir.

Sklerodermanın patogenezi net olarak bilinmemekte, ancak kollajen ve diğer ESM moleküllerinin aşırı sentez ve depolanması ile fibroz oluşmaktadır (40). ESM üretiminden aktif fibroblastlar (miyofibroblastlar) sorumludur (41, 42). Aktive endotelial hücreler ve inflamatuvar hücreler hücre-hücre etkileşimi ile doğrudan ve çeşitli sitokin, adezyon molekülü ve büyüme faktörü üretimi ile dolaylı olarak fibroblastları aktive edebilmektedir. TGF- β bu aşamalarda önemli görevler üstlenmektedir (43). Sunulan çalışmamızda BLM ile uyarılan dermal fibroz modelinde TGF- β 1 mRNA ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.

Transforming growth factor renal fibrozun da önemli bir aracısıdır. Sisplatin ile tedavi edilen ratlarda parikalsitolün sisplatin kaynaklı renal hasarı, fibrozu ve apoptozu geriletmediği gösterilmiştir (121). Ek olarak; parikalsitolün obstrüktif üropatimodelinde T hücrelerinin ve makrofajların filtrasyonunu azalttı bildirilmiştir (19). Parikalsitolün siklosporin (CsA) kaynaklı böbrek hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada, parikalsitol 28 gün boyunca farelerde, CsA (15 mg/kg/gün) ile eş zamanlı uygulandığında anti-inflamatuvar ve anti-fibrotik etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur (122). İnsan böbrek epitelyal hücre yanıtları üzerinde, D vitamini analog paricalcitolun koruyucu etkilerini incelediği bir çalışmada TGF- β 1-kaynaklı fibrozda belirgin gerileme gözlenmiştir (123).

Çalışmamızda, parikalsitolün hem profilaktik hem de teröpatik uygulamalarında histopatolojik olarak dermal nekroinflamasyon ve dermal fibrozda gerileme tespit edilmiştir. Parikalsitolün anti-fibrotik etkileri TGF- β üretimini baskılaması ile ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda, parikalsitol gruplarında TGF- β 1 mRNA ekspresyonları belirgin azalmıştı. Diğer taraftan, vitamin D'nin VDR aracılığı ile transkripsiyon faktörlerinden TCF-4'ün β -katenine bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe ettiği bilinmektedir (16, 17). Hiperkalsemik olmayan sentetik vitamin D analogu olan parikalsitol böylece Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitelerini engeller (18). Parikalsitolün dermal fibrozdaki anti-fibrotik etkisi Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivitesini baskılaması ile de ilişkili olabilir. Çalışmamızda, parikalsitol uygulamalarının ek olarak axin-1 ve wnt-2 mRNA ekspresyonlarını belirgin azalttığı ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızda BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinde axin-1 ve wnt-2 ekspresyonlarının belirgin artmış olduğu parikalsitol ile tedavi edildiğinde axin-1 ve wnt-2 ekspresyonlarının azalmış olduğu, ek olarak histopatolojik olarak dermal nekroinflamasyonu ve dermal fibrozu geriletmediği gözlemlendi. BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinde axin-1 ve wnt-2 ekspresyonlarının artmış olması Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının dermal fibrozda aktif olduğunu desteklemektedir. Ek olarak, parikalsitol antifibrotik potansiyele sahiptir ve bu etkisi Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması üzerine etkisi ile ilişkili olabilir

5. KAYNAKLAR

1. Krieg T, Meurer M. Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspects. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 457-481.
2. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-205.
3. Denton CP, Black CM. Scleroderma-clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18: 271-290.
4. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38: 132-60.
5. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 67-72.
6. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781–810.
7. Van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 2009; 136: 3205–3214.
8. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006; 119: 395–402
9. Wang Y, Li YP, Paulson C, Shao JZ, Zhang X, Wu M, Chen W. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; 19: 379-407.
10. Julie B, Jennifer F, Kimberly J. Increased Expression of Wnt2 and SFRP4 in Tsk Mouse Skin: role of Wnt signaling in altered dermal fibrillin deposition and systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 871–881
11. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of kanonikal Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun* 2012; 3: 735.

12. Farina G, Lafyatis D, Lemaire R, Lafyatis R. A four-gene biomarker predicts skin disease in patients with diffuse cutaneous. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 580-588).
13. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R, et al. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1707-17.
14. Wei J, Fang F, Lam AP, Sargent JL, Hamburg E, Hinchcliff ME, et al. Wnt β -catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2734-45.
15. Lemaire R, Farina G, Bayle J, Dimarzio M, Pendergrass SA, Milano A, et al. Antagonistic effect of the matricellular signaling protein CCN3 on TGF-beta- and Wnt-mediated fibrillinogenesis in systemic sclerosis and Marfan syndrome. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 1514-1423
16. Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J. Vitamin D (3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 2001; 154: 369–387.
17. Shah S, Islam MN, Dakshanamurthy S. The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Mol Cell* 2006; 21: 799–809.
18. He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. Blockade of Wnt/beta-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 90–103.
19. Xiaoyue Tan, Yingjian Li, Youhua Liu. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17: 3382–3393, 2006.
20. Gilliland BC. Systemic sclerosis (scleroderma). Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (editors). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th ed. USA, McGraw-Hill Comp. Inc 2001: 1937–1945.
21. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590.

22. Van Den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 2013; 65: 2737-2747.
23. Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008; 66: 198-202.
24. Black CM, Welsh KI. Genetics of scleroderma. *Clin Dermatol* 1994; 12: 337-347.
25. Favalli E, Ingegnoli F, Zeni S, Fare M, Fantini F. HLA Typing in Systemic Sclerosis. *Reumatismo* 2001; 53: 210-214.
26. Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev* 2008; 8: 36-40.
27. Veltman G, Lange CE, Jühe S, Stein G, Bachner U. Clinical manifestations and course of vinyl chloride disease. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 246: 6-17.
28. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 520-526
29. Allanore Y, Wipff J, Kahan A, Boileau C. Genetic basis for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2007; 74: 577-583
30. Scleroderma. EULAR online course. 2007-2009: 20: 1-30
31. Kumar V, Abbas K, Fausto N, Michell RN. Rheumatoid arthritis and scleroderma in robins and cotran pathologic basis of disease by saunders. An Imprint of Elsevier Inc, 2010: 3121-5
32. Renaudineau Y. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999. 6: 156-60
33. Kahaleh BM. Lymphocyte interactions with the vascular endothelium in scleroderma. *Clin Dermatol* 1994. 12: 253-60
34. Kahaleh MB. Vascular involvement in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22: 19-23.

35. Gruschwitz K. Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 184-189.
36. Kuryliszyn-Moskal A. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1,sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. *Clin Rheumatol* 2004; 24: 111-116.
37. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 155-160.
38. Chizzolini C. Tlymphocyte and fibroblast interactions: the case of skin involvement in systemic sclerosis and other examples. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 431-450.
39. White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1996. 22: 695-708.
40. Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 134–144.
41. Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 4.
42. Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 733–738
43. Varga J, Pasche B. Transforming growth factor as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 2006.
44. Peterson LS, Nelson M, Su WP. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 1068–1076.
45. Steen VD, Powell DL, Medsger T. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 196–203.

46. Edward D H, Ralph CB, Gary SF. Kelley's Textbook of Rheumatology. 2005; 2: 1279-1303.
47. Denton CP, Korn JH. Digital ulceration and critical digital ischaemia in scleroderma. *Scleroderma Care Res* 2003; 1: 12–16.
48. Weinstein WM, Kadell BM. The gastrointestinal tract in systemic sclerosis. Clements P, Furst D (editors). *Systemic sclerosis*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 293-308.
49. Schuffler MD, Beegle RG. Progressive systemic sclerosis of the gastrointestinal tract and hereditary hollow visceral myopathy two distinguishable disorders of intestinal smooth muscle. *Gastroenterology* 1979; 77: 664-671.
50. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT. Pathologic observations in systemic sclerosis: A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med* 1969. 46: 428-440.
51. Robert W. Sjogren MD. Review: Gastrointestinal disorders in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1265-82.
52. Leite LP, Johnston BT, Barrett J, Castell JA, Castell DO. Ineffective esophageal motility (IEM): the primary finding in patients with nonspecific esophageal motility disorder. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1859-1865.
53. Greydanus MP, Camilleri M. Abnormal postcibal antral and small bowel motility due to neuropathy or myopathy in systemic sclerosis. *Gastroenterology* 1989; 96: 110-115.
54. Medsger TA, Masi AT, Rodnan GP. Survival with systemic sclerosis: A life-table analysis of clinical and demographic factors in 309 patients. *Ann Intern Med* 1971. 75: 369-376.
55. Kostis JB, Seibold JR, Turkevich D. Prognostic importance of cardiac arrhythmias in systemic sclerosis. *Am J Med* 1988; 84: 1007-1015.
56. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, Black CM. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol* 1994; 21: 1838-1844.

57. Ramirez A, Varga J. Pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: clinical manifestations, pathophysiology, evaluation, and management. *Treat Respir Med* 2004; 3: 339-352.
58. Türk Kardiyol Dern. Pulmoner hipertansiyon tanı ve tedavi kılavuzu. *Eur Heart J* 2009; 30: 2493–2537.
59. Steen VD, Medsger TA, Osial TA. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 1984; 76: 779-786.
60. Steen VD, Costantino JP, Shapiro AP, Medsger TA. Outcome of renal crisis in systemic sclerosis relation to availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Ann Intern Med* 1990; 113: 352 -357.
61. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1283-1289.
62. Antoniou KM, Wells AU. Scleroderma lung disease: evolving understanding in light of newer studies. *Cur Op Rheumatol* 2008. 20: 686–91
63. Silver RM, Metcalf JF, Stanley JH, LeRoy EC. Interstitial lung disease in scleroderma: analysis by bronchoalveolar lavage. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 1254–1262.
64. Wells AU, Hansell DM, Haslam PL. Bronchoalveolar lavage cellularity: lone cryptogenic fibrosing alveolitis compared with the fibrosing alveolitis of systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1474-82.
65. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1581-86.
66. Kim DS, Yoo B, Lee JS. The major histopathologic pattern of pulmonary fibrosis in scleroderma is non specific interstitial pneumonia. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2002; 19: 121-127.
67. Andrew G, Nicholson AG, Colby TV, DuBois RM, Hansell DM, Wells AU. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients

presenting with the clinical entity of cryptogenetic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2213-17.

68. Salerni R, Rodnan GP, Leon DF. Pulmonary hypertension in CREST syndrome variant of progressive systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1977; 86: 394-399.
69. Seibold JR, Molony RR, Turkevich D. Acute hemodynamic effects of ketanserin in pulmonary hypertension secondary to systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1987; 14: 519-524.
70. Orens JB, Kazerooni EA, Martinez FJ. The sensitivity of high-resolution CT in detecting idiopathic pulmonary fibrosis proved by open lung biopsy: A prospective study. *Chest* 1995; 108: 109-115.
71. Remy- Jardin M, Remy J, Wallaert B. Pulmonary involvement in progressive systemic sclerosis: Sequential evaluation with CT, pulmonary function tests and bronchoalveolar lavage. *Radiolog* 1993; 188: 499-506.
72. Athol U. Wells. Evaluation and management of alveolitis and interstitial lung disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2003. 15: 748-55.
73. MacDonald SLS, Rubens MB, Hansell DM. Nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia: comparative appearances at and diagnostic accuracy of thin-section CT. *Radiology* 2001; 221: 600-605.
74. Czirják L. Practical approach to the therapy of systemic sclerosis. *Z Rheumatol* 2004; 63: 451-456.
75. Casas JA, Saway PA, Villarreal I, Nolte C, Menajovsky BL, Escudero EE, et al. 5-fluorouracil in the treatment of scleroderma: a randomised, double blind, placebo controlled international collaborative study. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 926-928.
76. Furst DE, Clements PJ, Hillis S, Lachenbruch PA, Miller BL, Sterz MG, Paulus HE. Immunosuppression with chlorambucil, versus placebo, for scleroderma. Results of a three-year, parallel, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 584-593.
77. Clements PJ, Furst DE, Wong WK, Mayes M, White B, Wigley F, et al. High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis: analysis of a

- two-year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1194-1203
78. van den Hoogen FH, Boerbooms AM, Swaak AJ, Rasker JJ, van Lier HJ, van de Putte LB. Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 364-372.
 79. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR, Baron M, Ellman M, Carette S, et al. A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1351- 1358.
 80. Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirjak L, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 620-628.
 81. Clements P, Medsger TA, Feghali CA. Cutaneous involvement in systemic sclerosis. Clements P, Furst D (eds). *Systemic Sclerosis*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 129-150.
 82. Klimiuk PS, Taylor L, Baker RD, Jayson MI. Autonomic neuropathy in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 542-545.
 83. Medsger TA. Systemic sclerosis and Raynaud syndrome. Koopman WJ, Boulware DW, Heudebert GR (editors). *Clinical Primer of Rheumatology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2003: 171-181.
 84. Wigley F, Hummers L. Management holistic approach to systemic sclerosis. A Physician's approach. Clements P, Furst D (editors). *Systemic Sclerosis*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 371-384.
 85. Chung L, Lin J, Furst DE, Fiorentino D. Systemic and localized scleroderma. *Clin Dermatol* 2006; 24: 374-392.
 86. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 2655-2666.

87. UK Scleroderma Study Group. How can treatment of systemic sclerosis be improved? By setting up a national database of all cases and entering patients into trials. *BMJ* 1998; 317: 294-295.
88. Furst D, Pope J, Clements P. Systemic sclerosis. Tugwell P (editor). *Evidence-based Rheumatology*. London: BMJ Books, 2004: 443-483.
89. Binks M, Passweg JR, Furst D, McSweeney P, Sullivan K, Besenthal C, et al. Phase I/II trial of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis procedure related mortality and impact on skin disease. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 577-584.
90. Black CM, Silman AJ, Herrick AI, Denton CP, Wilson H, Newman J, et al. Interferon-alpha does not improve outcome at one year in patients with diffuse cutaneous scleroderma results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 299-305.
91. Polisson RP, Gilkeson GS, Pyun EH, Pisetsky DS, Smith EA, Simon LS. A multicenter trial of recombinant human interferon gamma in patients with systemic sclerosis: effects on cutaneous fibrosis and interleukin 2 receptor levels. *J Rheumatol* 1996; 23: 654-658.
92. Seibold JR, Korn JH, Simms R, Clements PJ, Moreland LW, Mayes MD, et al. Recombinant human relaxin in the treatment of scleroderma. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2000; 132: 871-879.
93. Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120: 1562-1569.
94. Lee SH, Rubin LJ. Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension. *J Intern Med* 2005; 258: 199-215.
95. Olschewski H, Ghofrani HA, Walrath D, Schermuly R, Temmesfeld-Wollbrück B, Grimminger F, Seeger W. Inhaled prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension secondary to lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 600-607.
96. Lin AT, Clements PJ, Furst DE. Update on disease-modifying antirheumatic drugs in the treatment of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29: 409-426.

97. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358: 1119-1123.
98. Rosenkranz S, Diet F, Karasch T, Weihrauch J, Wassermann K, Erdmann E. Sildenafil improved pulmonary hypertension and peripheral blood flow in a patient with scleroderma-associated lung fibrosis and the Raynaud phenomenon. *Ann Intern Med* 2003; 139: 871-873.
99. Wilkens H, Guth A, König J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, et al. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104: 1218-1222.
100. Baak S. Treatment of Raynaud's phenomena with the PDE-5 inhibitor, Cialis (tadalafil) in patients with scleroderma and lupus. *Art Rheum* 2005; 52: 169.
101. Steen VD, Medsger TA, Osial TA, Ziegler GL, Shapiro AP, Rodnan GP. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 1984; 76: 779-786.
102. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781-810.
103. Van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 2009; 136: 3205-3214.
104. Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal* 2007; 19: 659-671.
105. Rothbacher U, Laurent MN, Deardorff MA, Klein PS, Cho KW, Fraser SE. Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis. *EMBOJ* 2000; 19: 1010-1022.
106. Zeng X, Tamai K, Doble B. A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation. *Nature* 2005; 438: 873-877.

107. Saadeddin A, Babaei-Jadidi R, Spencer-Dene B, Nateri AS. The links between transcription, beta-catenin/JNK signaling, and carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 1189–1196.
108. Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci* 2007; 120: 3337-3344.
109. Bayle J, Fitch J, Jacobsen K. Increased Expression of Wnt2 and SFRP4 in Tsk Mouse Skin: role of wnt signaling in altered dermal fibrillin deposition and systemic sclerosis. *J Inves Derma* 2008; 128: 871–881.
110. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R, et al. Kanonikal Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1707-1717.
111. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of Kanonikal Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun* 2012; 3: 735.
112. Goldenberg MM. Paricalcitol, a new agent for the management of secondary hyperparathyroidism in patients undergoing chronic renal dialysis. *Clin Ther* 1999; 21: 432-441.
113. Cozzolino M, Brancaccio D. Emerging role for the vitamin D receptor activator (VDRA), paricalcitol, in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Expert Opin Pharma* 2008; 9: 947-54.
114. Martin KJ, González EA, Gellens M, Hamm LL, Abboud H, Lindberg J. 19-Nor-1-alpha-25-dihydroxyvitamin D₂ (Paricalcitol) safely and effectively reduces the levels of intact parathyroid hormone in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1427-1432.
115. Cardús A, Panizo S, Parisi E, Fernández E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 860-866.
116. Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3382-3393.

117. Meems LMG, Cannon MV, Mahmud H. The vitamin D receptor activator paricalcitol prevents fibrosis and diastolic dysfunction in a murine model of pressure overload. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012; 132: 282-9.
118. Shah S, Islam MN, Dakshanamurthy S. The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Mol Cell* 2006; 21: 799–809.
119. Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin Immunol* 2002; 102: 209-261.
120. LeRoy EC Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 675-694.
121. Park JW, Cho JW, Joo SY, Kim CS, Choi JS, Bae EH, et al. Paricalcitol prevents cisplatin-induced renal injury by suppressing apoptosis and proliferation. *Eur J Pharmacol* 2012; 683: 301-309.
122. Piao SG, Song JC, Lim SW, Chung BH, Choi BS, Yang CW. Protective effect of paricalcitol on cyclosporine-induced renal injury in rats. *Transplant Proc* 2012; 44: 642-645.
123. Nolan KA, Brennan EP, Scholz CC, Cullen C, Ryan A, Taylor CT, Godson C. Paricalcitol protects against TGF- β 1-induced fibrotic responses in hypoxia and stabilises HIF- α in renal epithelia. *Exp Cell Res* 2014; 14: 325-335.

6. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılı, Mersin doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimlerimi, Mersin’de tamamladım. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden mezun oldum. Iğdır ili Aralık ilçesi devlet hastanesinde 15 ay pratisyen hekim olarak çalıştım. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda, 2011 yılı Şubat ayında başladığım İç Hastalıkları Uzmanlık eğitimine halen devam etmekteyim. Evli olup bir çocuğum babasıyım.