TURKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA UNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SİSTEMİK SKLEROZLU HASTALARDA LENFOSİT MİKROK(Ş)İMERİZMİ

Uz. Dr. Ali ŞAHİN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ROMATOLOJİ BİLİM DALI
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuran TÜRKÇAPAR

Ankara
2011

TURKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA UNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SİSTEMİK SKLEROZLU HASTALARDA LENFOSİT MİKROK(Ş)İMERİZMİ

Uz. Dr. Ali ŞAHİN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ROMATOLOJİ BİLİM DALI
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuran TÜRKÇAPAR

Ankara
2011

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Romatoloji Bilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

"Sistemik Sklerozlu Hastalarda Lenfosit Mikrokimerizmi" başlıklı uzmanlık tezi incelenmiştir. Uz.Dr.Ali ŞAHİN'e ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30.06.2011

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Romatoloji Bilim Dalı

Juri Başkanı

Prof.Dr.Murat TURGAY

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr.Gülay KINIKLI

Üye

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Romatoloji Bilim Dalı

Doç.Dr.Nuran TÜRKÇAPAR

Tez Danışmanı

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasında her aşamada yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Murat TURGAY, Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Nuran TÜRKÇAPAR'a teşekkür ederim. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AnaBilim Dalı-Romatoloji Bilim Dalı çalışanlarına, Dr. Tülin ÖZKAN ve tüm Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı çalışanlarına, Dr. Elif Berna KÖKSOY ve Uzm. Dr. Orhan KÜÇÜKŞAHİN'e, istatiksel değerlendirmelerin yapılması ve yorumlanması aşamasında yardımcı olan Zeynep BIYIKLI'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, sabır ve desteğini esirgemeyen eşim Mehtap ve biricik kızım Sedef'e,

Ve ailelerimize ……

Ayrıca bu çalışmanın yürütülmesinde maddi destek sağlayan Ankara Tıplılar Vakfı'na katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Uzm. Dr. Ali ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KABUL VE ONAY i

ÖNSÖZ ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vi

TABLOLAR DİZİNİ vii

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3-21
    - 2.1. Sistemik Skleroz: Tanım, Epidemiyoloji ve Etiyopatogenez
        - 2.1.1. Etiyoloji
            - 2.1.1.a. Çevresel Etkenler
            - 2.1.1.b. Enfeksiyonlar
            - 2.1.1.c. Genetik Faktörler
        - 2.1.2. Humoral İmmün Sistem ve Sistemik Skleroz Patogenezi
        - 2.1.3. Hücresel İmmün Sistem ve Sistemik Skleroz Patogenezi
        - 2.1.4. Mikrokimerizm ve Sistemik Skleroz Patogenezi
        - 2.1.5. Klinik Bulgulara Genel Bakış, Hastalık Aktivitesi ve Şiddetinin Değerlendirilmesi
3. HASTALAR VE YÖNTEM 22-30
    - 3.1. Hasta ve Kontrol Grubu Özellikleri
    - 3.2. Kullanılan Gözlem ve Laboratuvar Teknikleri

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz Yöntemleri

4. BULGULAR 31-39

5. TARTIŞMA 40-47

6. SONUÇLAR 48

7. TÜRKÇE ÖZET 49

8. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY) 51

9. KAYNAKLAR 53-64

10. EKLER 65

Ek 1. Etik kurul onayı 65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACR : American College of Rheumatology

ANA : Anti Nükleer Antikor

ASA : Anti sentromer antikor

ATA : Anti-topoizomeraz

DkSSk : Diffüz kutanöz sistemik skleroz

DLCO : Karbonmonoksid difüzyon testi

GVHH : Graft-versus-host hastalığı

HRCT : yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi

IL : İnterlökin

İAH : İnterstisyel Akciğer hastalığı

LkSSk : Limitli kutanöz sistemik skleroz

MK : Mikrokimerizm

PAB : Pulmoner arter basıncı

PAH : Pulmoner arteriyel hipertansiyon

PCR : Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)

PDGF : Platelet-derived growth factor

RT-PCR : Real-time PCR

SFT : Solunum fonksiyon testi

SRY : sex determining region of Y (cinsiyet gösteren Y kromozom bölgesi)

SSk : Sistemik Skleroz

SRK : Skleroderma renal kriz

TGF : Transforming growth factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Sistemik sklerozun etiyoloji, patogenez ve klinik bulgularının ilişkisi 11

Şekil 2.2. Mikrokimerik hücrelerin transplasental iki yönlü geçişi ve hedef organları 14

Şekil 3.1. Agaroz Jel Elektroforezinde Erkek Y kromozomu materyali (SRY bölgesi) içeren DNA bölgeleri 30

Şekil 4.1. Çocuk sahibi olma durumuna göre grupların dağılımı 32

Şekil 4.2. Light Cycler ® cihazında DNA amplifikasyon eğrileri 39

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Skleroderma ve ilişkili klinik durumlar 4

Tablo 2.2. Sistemik skleroz: Hastalık şiddetinin değerlendirilmesi 21

Tablo 3.1. PureLink™ Genomic DNA Mini Kitin içeriği 25

Tablo 3.2. DNA eldesi işlemi ve aşamaları 26

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının sayı ve yaş açısından dağılımı 31

Tablo 4.2. Sistemik Sklerozlu hasta ve kontrol gruplarının özellikleri 33

Tablo 4.3. Diffüz kutanöz Sistemik sklerozlu erkek çocuk sahibi olan ve olmayan hastaların; cilt skorları ve hastalık şiddet skorlarının karşılaştırılması 34

Tablo 4.4. Limitli kutanöz Sistemik sklerozlu erkek çocuk sahibi olan ve olmayan hastaların; cilt skorları ve hastalık şiddet skorlarının karşılaştırılması 34

Tablo 4.5. Sistemik skleroz hasta gruplarının organ tutulumları açısından dağılımı 35

Tablo 4.6. Sistemik skleroz hasta gruplarının otoantikor profilleri açısından dağılımı 36

Tablo 4.7. Mikrokimerizm varlığı ve çocuk sahibi olma durumuna göre grupların dağılımı 38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sistemik skleroz (SSk), cilt ve akciğer, kalp, böbrek ve gastrointestinal sistem gibi birçok organ ve sistemi tutabilen etyolojisi hala aydınlatılamamış bir otoimmün hastalıktır. SSk'un patogenezinde; mikrovasküler yapıda değişiklik, aşırı ektrasellüler matriks üretimi ve immün sistemde bir dizi değişiklikler sorumludur. İşte bu immün sistemdeki kompleks etkileşimler sonucunda gelişen cilt ve iç organlardaki fibrozis, hastalığın klinik tablosunu oluşturur. Sistemik skleroz, sınırlı ve diffüz olmak üzere iki farklı formda seyreder. Sınırlı olanda daha çok cilt tutulumu ön planda iken diffüz tipte ek olarak iç organ tutulumlarıyla daha yüksek mortalite ve morbiditeye sahiptir. Hastalardaki bu klinik farklılığı neyin oluşturduğu ise tam olarak bilinmemektedir.

Allojenik kök hücre nakli yapılan hastalarda kronik bir komplikasyon olarak gelişebilen GVH hastalığında, organ ve dokularda sklerodermaya benzer fibrozis gelişmesi hatta otoantikor pozitifliği; skleroderma patogenezinde mikroşimerizmin rolü olabileceğini düşündürmüştür.

Mikroşimerizim, bir bireye ait az miktarda DNA ya da hücrenin başka bir bireyde bulunmasıdır. Mikroşimerizmin en sık ve doğal kaynağı gebeliktir. Sistemik skleroz, kadınlarda erkeklere göre daha fazla görülmekte ve çoğunlukla genç kadınlarda doğum sonrasında ortaya çıkmaktadır. İatrojenik nedeni ise GVH hastalığıdır. Gebelik süresince plasenta yoluyla, hemopoetik hücrelerin karşılıklı geçişi olur ve bu mikroşimerik hücrelerin yıllar boyunca varlıklarını sürdürebildiği görülmüştür. Doğum yapmış kadınlarda bebeğe ait hücreler veya çocuklarında anneye ait hücreler dolaşımda yıllarca bulunur. Bu hipotezle, sadece çocuk sahibi olan kadınlarda değil, erkeklerde ve çocuk sahibi olmayan kadınlarda da hastalığın gelişimini açılamak mümkündür. Mikroşimerizm varlığının, sadece skleroderma değil, son yıllarda özellikle diğer otoimmün hastalıklar veya otoimmün olmayan (maligniteler gibi) hastalıkların da gelişiminde rolü olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, diffüz ve sınırlı tipte sklerodermalı hastaların periferik kanındaki lenfositlerde mikroşimerizm varlığı, çocuk sahibi olup olmamaya, çocuğun cinsiyetine ve hastanın cinsiyetine göre değişiminin araştırılması amaçlandı. Ayrıca bu bulguların patogenezle ve hastalık kliniğiyle ilişkisinin araştırılması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sistemik Skleroz: Tanım, Epidemiyoloji ve Etyopatogenez

Sistemik skleroz (Skleroderma, SSk); kronik, cilt başta olmak üzere bir çok sistemi tutan, nedeni bilinmeyen, otoimmünite, vaskülopati ve inflamasyon sonucu hücre dışı alanda artmış kollajen yapımının neden olduğu fibrozisin yol açtığı fonksiyonel ve yapısal anormalliklerin eşlik ettiği bir hastalıktır. Kadınlarda erkeklerden daha sık görülmektedir, kadın-erkek oranı; 3-5:1 gibi saptanmıştır. Hatta bazı çalışmalarda bu oran 14:1'e kadar çıkmaktadır. Kadınlarda 15-40 yaşları (sıklıkla 30-50 yaşları) arasında görülmekte ve menapoz sonrası sıklığı azalmaktadır. Afrika kökenli Amerikalılarda daha sık, daha kötü seyirli ve yaygın hastalık şeklinde erken yaşta görülse de dünya üzerinde bütün ırkları etkileyebilmektedir (1). Görülme sıklığı değişik çalışma ve yayınlarda farklılık gösterse de genel olarak; prevalansı 50-300/milyon ve insidansı 2.3-22.8/milyon/yıl olarak gösterilmiştir (2).

Hastalık ilk olarak 1980 American College of Rheumatology (ACR) sınıflama kriterlerine göre sınıflandırılmıştır (3). Buna göre tek major kriter; metakarpofalengeal veya metatarsofalengeal eklemlerin proksimalinde ciltte kalınlaşmanın varlığıdır. Diğer 3 minör kriter ise; sklerodaktili, parmak uçlarında kalıcı iskemik değişiklikler (dijital pitting skarlar ve/veya dijital ülserler, parmak yastıkçıklarının kaybı) ve bibaziler pulmoner fibrozistir. SSk diyebilmek için 1 major kriter veya 2 minör kriter şartı aranmaktadır. Bu sınıflama kriterlerinin spesifitesi % 98 sensitivitesi ise % 97 olarak hesaplanmıştır.

Bu sınıflama sistemi ile hastaları sınıflamada bazı güçlükler yaşanmaktadır. Skleroderma-spektrum bozuklukları arasında yer alan CREST (C-kalsinozis, Raynaud fenomeni, E-özefageal disfonksiyon, Sklerodaktili, Telenjiektazi) sendromlu bir hastayı buna göre sınıflamakta zorluk çekilecektir. Skleroderma başlıca 2 alt gruba; Lokalize Skleroderma ve Sistemik Skleroz olarak ayrılmaktadır. Lokalize skleroderma grubunda; Morfea, Lineer skleroderma, Skleroderma en coup de sabre yer alır. Buna karşın sistemik skleroz grubu ise ikiye ayrılır; limitli kutanöz Sistemik skleroz (lkSSk) ve diffüz kutanöz Sistemik skleroz (dkSSk) olarak

adlandırılmıştır (Tablo 1). LkSSk tipinde ciltte kalınlaşma daha çok diz ve/veya dirseklerin distalindeki ekstremite bölgelerini etkiler. DkSSk formunda ise ciltte kalınlaşma dirsek ve/veya dizlerin proksimalinde, distal ekstremite bölgelerinde, gövde de ve yüzde olur. LkSSk formunda da yüz ve boyun bölgesi etkilenebilir (4, 5). Genel olarak bakıldığında limitli kutanöz SSklu hastalar toplam vakaların % 65'ini, diffüz SSklu hastalar ise % 35'ini oluşturur. Ayrıca deri tutulumu olmaksızın iç organ tutulumu ile seyreden "sistemik sklerozis sine skleroderma" denilen bir alt grubu da olguların % 5' ini oluşturmaktadır (6). Irksal yapı ve etnik köken; hastalığa eğilimi, klinik bulguları, serolojik belirleyicileri ve hastalık sıklığını etkileyebilmektedir.

Tablo 2.1. Skleroderma ve İlişkili Klinik Durumlar

Bozukluk-Sendrom-Hastalık	**Çeşitleri ve Özellikleri**
Diffüz kutanöz Sistemik Skleroz	Gövde ve ekstremitelerin hem distal hem de proksimalinin tutulumu, yüzde tutulum
Limitli kutanöz Sistemik Skleroz	CREST sendromu ve /veya sınırlı cilt tutulumu.
Sistemik sklerozis sine skleroderma	Raynaud fenomeni, karakteristik iç organ komplikasyonları, serolojik anormalliklerin varlığı, fakat aşikar cilt tutulum bulgularının yokluğu.
Lokalize skleroderma	Lineer skleroderma, En coup de sabre, Morfea: Generalize, Plak
Mikst konnektif doku hastalığı	Sistemik sklerozis, polimiyozit ve Sistemik lupus eritematozus (SLE)
Overlap sendromları	Sistemik sklerozis ile birlikte polimiyozit, romatoid artrit veya SLE
Skleroderma benzerleri	Amiloidoz, kronik graft-versus-host hastalığı, eozinofili ile birlikte diffüz fasiit, eozinofili-miyalji sendromu, nefrojenik fibrozan dermopati, paraneoplastik sendromlar, sklerödem, sklermiksödem (papüler müsinözis), toksik yağ sendromu.
Farklılaşmamış (undifferentiated) bağ doku hastalığı	Birden çok nonspesifik, serolojik veya klinik anormallikler, fakat bunlar herhangi bir romatizmal hastalık için ACR kriterlerini karşılamamaktadır.

ACR: American College of Rheumatology, CREST: kalsinoz, Raynaud fenomeni, özefagus disfonksiyonu, sklerodaktili, telenjiektazi (Kaynak 7'den uyarlanmıştır).

Limitli kutanöz formu, Raynaud fenomeni ile birlikte başlamakta, bulgu ve belirtiler yavaş ilerlemektedir. Göğüs ağrısı, dijital pitting skar veya ülserler, parmak derisinde kalınlaşma, el sırtı ve ön kola ilerleyebilen sertlik, daha sonraları pulmoner fibrozise bağlı dispne, telenjiektaziler (eller ve yüzde) ve ileri dönemler de pulmoner arteryel hipertansiyona bağlı dispne görülebilir. Diffüz formunda ise cilt değişiklikleri Raynaud fenomeninden hemen sonra veya birlikte başlamakta ve iç organ tutulumu hastalığın ilk 2 yılında hızlı bir şekilde ortaya çıkar. Cilt tutulumu ilk 1-5 yılda hızlı ilerlemekte sonra yavaşlamaktadır. Sıklıkla (genellikle) iç organ tutulumu cilt tutulumu ile paralel seyretmez. Pulmoner, kardiyak, gastrointestinal sistem fibrozisi hızlı ilerlemekte ve geri dönüşsüz olmaktadır. Ciltteki hızlı kötüleşme ve yaygın tutulum skleroderma renal kriz (SRK) gelişimi açısından da risk oluşturmaktadır. Diffüz tipte ayrıca tendon sürtünme sesi, sinovit, perikardiyal effüzyon vb. bulgulara rastlanabilir. SSk çok heterojen klinik bulgularla seyredebilmektedir.

2.1.1. Etiyoloji

2.1.1.a. Çevresel Etkenler:

Ortak coğrafyayı paylaşan bazı toplum ve bireylerde SSk veya benzeri multisistem hastalıklar tanımlanmıştır. Örneğin; İspanya'da "Toksik Yağ Sendromu" (8), Amerika'da 1989 yılında tespit edilen diyet desteği amaçlı kullanılan "Triptofan"a bağlı "Eozinofili-Miyalji Sendromu" (9) gibi durumlar çevresel maruziyetin önemini göstermiştir. Fakat bu durumlar ile gerçek SSk'nın klinik, histopatolojik ve laboratuvar özellikleri birbirinden farklıdır. Yine silika tozlarına maruz kalan erkeklerde SSk sıklığı daha fazla gözlenmiştir. Diğer çevresel etkenler; polivinil klorid, trikloroetilen, organik çözücüler, pestisitler, saç boyaları, endüstriyel boyalar, silikon meme implantları vb. olarak sıralanabilir. Silikon doğal (innate) immün hücreler tarafından tanınmakta, makrofajlardan interlökin (IL)-1 ve tümör nekroz edici faktör (TNF)-α salınımına yol açmaktadır. Kazanılmış (adaptif) immün hücreleri de uyararak fibrohiyalin doku sentezinin artışına yol açar. Silikozisde romatoid artrit, SLE ve SSk sıklığı artmış saptanmıştır (10). Romatoid artritin tersine sigara içimi ile direkt bir etyolojik ilişki kurulamamıştır. İlaçlar; bleomisin,

pentazosin, paklitaksel, zayıflama ilaçları (fenfluramin vb), gadolinium (nefrojenik fibrozis sendromu), mazindol, dietilpropion ve kokain diğer çevresel etkenler arasında sayılabilir. Ayrıca radyoterapi de SSk gelişimine neden olabildiği gibi SSk'lı hastalarda fibrozisin artmasına neden olabilir. Kendi hazırladığım Şekil 2.1'de çevresel etkenlerin rolü şematik olarak gösterilmiştir.

2.1.1.b. Enfeksiyonlar:

Enfeksiyöz nedenlerin sistemik sklerozu nasıl tetiklediği henüz netlik kazanmamıştır. Fakat sorumlu mekanizmaların SSk'da otoantikorların (anti-topoizomeraz, anti-sentromer, anti-fibrillin-1, anti-RNA polimeraz I-III, anti-endotelin gibi) saptanması, hücresel immün sistem değişiklikleri (periferik kanda CD4+ T-helper lenfosit sayısında artma CD8 hücrelerde azalma) ve bunların neticesinde mikrovasküler hasar ve fibroblastlarca aşırı kollajen üretimi olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 2.1). Bu enfeksiyöz ajanlar; parvovirüs B19, sitomegalovirüs (CMV), Epstein-Barr virüs, endojen retrovirüsler, helikobakter pylori (H.pylori), klamidya türleri olarak sayılabilir. Özellikle CMV, latent viral enfeksiyon olarak, allograft rejeksiyonundaki, vasküler neointima formasyonunda gösterilmiş ve profibrotik büyüme faktörlerinin (connective tissue growth factor, CTGF veya CCN2) sentezine neden olduğu saptanmıştır. Enfeksiyonlar başlıca 4 mekanizma ile SSk'yı başlatabilmektedir; (i) moleküler benzerlik, (ii) endotelyal hücre hasarı, (iii) süperantijenler, (iv) mikrokimerizm. Diffüz kutanöz SSk'lı hastaların periferik kanlarında daha yüksek oranda CD4+ mikrokimerik T hücreler saptanmış, bu hücrelerin endotel hücrelerine karşı allotipik bir stimulus sergiledikleri gözlenmiştir. SSk'lı hastaların periferik kanlarında ve cilt biyopsilerinde % 83 gibi yüksek bir oranda bu mikrokimerik hücreler saptanmıştır. Bu olay transplante T hücrelerinin Graft-versus-Host hastalığını tetiklemesine benzetilebilir. Latent CMV enfeksiyonlarının yine bu yolla allograft rejeksiyonunu ve organ yetmezliğini tetiklediği gösterilmiştir. Yine enfeksiyöz ajanların, gamma/delta T hücrelerinin gamma reseptörlerini uyararak, Th2 tolorejenik yanıtı Th1 sitotoksik yöne çevirdiği ve uyuyan mikrokimerik hücreleri "non-self" çapraz reaksiyona zorladıkları gösterilmiştir (11, 12).

2.1.1.c. Genetik Faktörler:

Sistemik skleroz kadınlarda daha sık görülmesine rağmen seks hormonlarının bu hastalığın etyopatogenezindeki rolü bilinmemektedir. Toplumda SSk'lu hastaların birinci derece akrabalarında bu ve diğer otoimmün hastalıkların sık görülmesi, akrabalarda otoantikorların saptanması, etnik gruplar arasında sıklık ve klinik özelliklerinin değişmesi, bazı MHC antijenlerinin SSk'lu hastalarda gösterilmesi genetik faktörlerin etyopatogenezde rol alabileceğini düşündürmüştür (13). Az sayıda tek yumurta ikizinde konkordansı % 5-5.9 olarak hesaplanmış, yine serum antikorları için bu oran monozigotik ikizlerde % 95 ve dizigotik ikizlerde % 60 olarak bulunmuştur (14,15). Afrika kökenli Amerikalılarda HLA DRB1*1602, DQA1*0501, DQB1*0301 daha sıklıkla saptanırken, beyaz ırk SSk'lu hastalarda HLA DRB1*1101, DRB1*1104, DQA1*1501, DQB1*0301, DRB1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201 daha fazla bulunmuştur. Amerikan Choctaw yerlilerinde, fibrillin-1 (FBN-1) geninde (15q da yer almakta) tek nükleotid polimorfizmi (single nukleotide polymorphism, SNP) ile hastalığa yatkınlık arasında bir ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Yine diğer gen polimirfizmleri ile SSk ilişkisi gösterilmeye çalışılmıştır. Örneğin; T hücre reseptörü gama zinciri kodlayan gende (TCR-γ), tip I kollajen, fibronektin, IL-1, IL-4 reseptör, IL-8, SCS reseptör 2, stromelizin, SPARC (asidik ve sisteinden zengin sekrete edilen protein), TGF-β, glutatyon-S-transferaz, nitrik oksid sentetaz, ACE gen polimorfizmi, TIMP-I, CTLA-4, sitokrom p-450, MMP-3 ve IL-10 ile ilgili kromozomlarda genetik polimorfizmler ile hastalık ilişkisi çalışılmıştır. Fakat bu ilişki tam olarak ortaya konamamıştır ve bazı SNP'ler ile ilgili daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır (16-21).

2.1.2. Humoral İmmün Sistem ve Sistemik Skleroz Patogenezi

Sağlıklı bireylere kıyasla SSk'lu hastalarda poliklonal hipergammaglobulinemi, kriyoglobulinemi, romatoid faktör ve yalancı pozitif VDRL gibi spesifik olmayan serolojik anormallikler bulunabilir. Hep-2 hücreleri kullanılarak yaklaşık % 95 SSk'lu hasta da antinükleer antikor (ANA) pozitifliği gösterilmiştir. Nükleolar boyanma paterni, skleroderma için daha spesifiktir (22). CD19 ekspresse eden

hücrelerin periferik kanda saptanması, B hücre aktivasyonuna işaret etmektedir. Bu olay hayvan modellerinde, CD19 baskılanmasının fibrozisi önlediğinin gösterilmesi ile doğrulanmıştır. Aktive B hücreleri, IL-4 ve IL-10 salgılayarak, Th2 uyarısına ve fibrozisin artışına yol açar. Aktif B hücrelerinden salgılanan TGF-β ve IL-6, fibroblastları direkt olarak uyararak fibrozisi artırabilir. Ayrıca, B hücrelerinin bazı otoantikorları sentezlemeleri ve deride birikmeleri için, T hücrelerine ihtiyaç duyarlar (23). Sistemik sklerozlu hastalarda çok sayı ve türde otoantikor saptanabilmekte (Şekil 2.1), bunların bir kısmı klinik bulguların ortaya çıkışı ve şiddeti ile ilişkilidir. Fakat bu antikorlar hastalığın klinik bulguları üzerinde direkt etkili değildir ve titreleri ile hastalık aktivitesi arasında ilişki gösterilememiştir.

Anti Scl-70 otoantikorları; ilk saptandığında 70 kDa ağırlığında bir proteini tanıdığı bildirilmiş ve Scl-70 olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları bu antikorların, 110 kDa ağırlığında DNA topoizomeraz-1'e karşı olduğu gösterilmiş ve anti-topoizomeraz (ATA) olarak adlandırılmıştır. ATA sıklıkla diffüz kutanöz SSk'lu hastalarda bulunur (% 30-40); pulmoner fibrozis, interstisyel akciğer hastalığı (İAH), kardiyak tutulum, skleroderma renal kriz gibi iç organ tutulumları ve hızlı, agresif hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Anti-sentromer antikorlar ise çok sayıda kinetokor bölgesine karşı olabilmekte fakat sıklıkla; 17 kDa (CENP-A), 80 kDa (CENP-B) ve 140 kDa (CENP-C) dır. Anti-centromer antikorlar (ASA), limitli kutanöz SSk'lu hastaların % 80-96'sında, dkSSk'lu hastaların ise % 10'unda saptanabilir. Ayrıca bu antikorlar, ciddi dijital iskemi, deri ve mukozalarda telenjiektaziler, cilt altı kalsinozu, hastalık başlangıcından uzun süre sonra gelişebilen pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) ile ilişkilidir. İlginçtir ki aynı hastada hem ATA hem de ASA antikorlar bir arada bulunmaz. Anti-RNA polimeraz I/III (özellikle); ciddi deri tutulumu, yüksek renal kriz gelişme riski, düşük İAH olasılığı ile ilişkilidir. Anti-Ku ve PM-Scl; inflamatuvar kas hastalığı, dermatomiyozit benzeri deri değişiklikleri, pulmoner hastalık, kalsinoz ve iyi prognozla ilişkilidir. Anti histon antikorlar; kardiyak ve pulmoner hastalık, kötü prognoz, Anti-Th/To antikorlar; lkSSk (sıklıkla erkek hastalarda), şiş (puffy) eller, gastrointestinal, pulmoner ve renal tutulum, telenjiektaziler, erken İAH, Anti-U1/U3 (antifibrillarin)-snRNP antikorlar; ciddi Raynaud fenomeni, akciğer tutulumu kötü prognoz, anti-B23 antikorlar ise PAH ile ilişkilidir. Diğer otoantikorlar ise anti-endotelyal hücre antikoru (AECA); endotel

hücre apoptozisini indüklemektedir, anti-FBN 1, anti-MMP 1 ve 3, anti-PDGFR, anti-Nag2 (24-28). Laminin, Kollajen I, III, IV ve VI'ya karşı antikorlar da saptanmıştır. Özellikle Kollajen IV'e karşı olanlar ciddi interstisyel akciğer hastalığı ile ilişkili bulunmuştur (29). Birden çok ve farklı otoantikorun saptanması hastalığın heterojen tabiatını yansıtmaktadır.

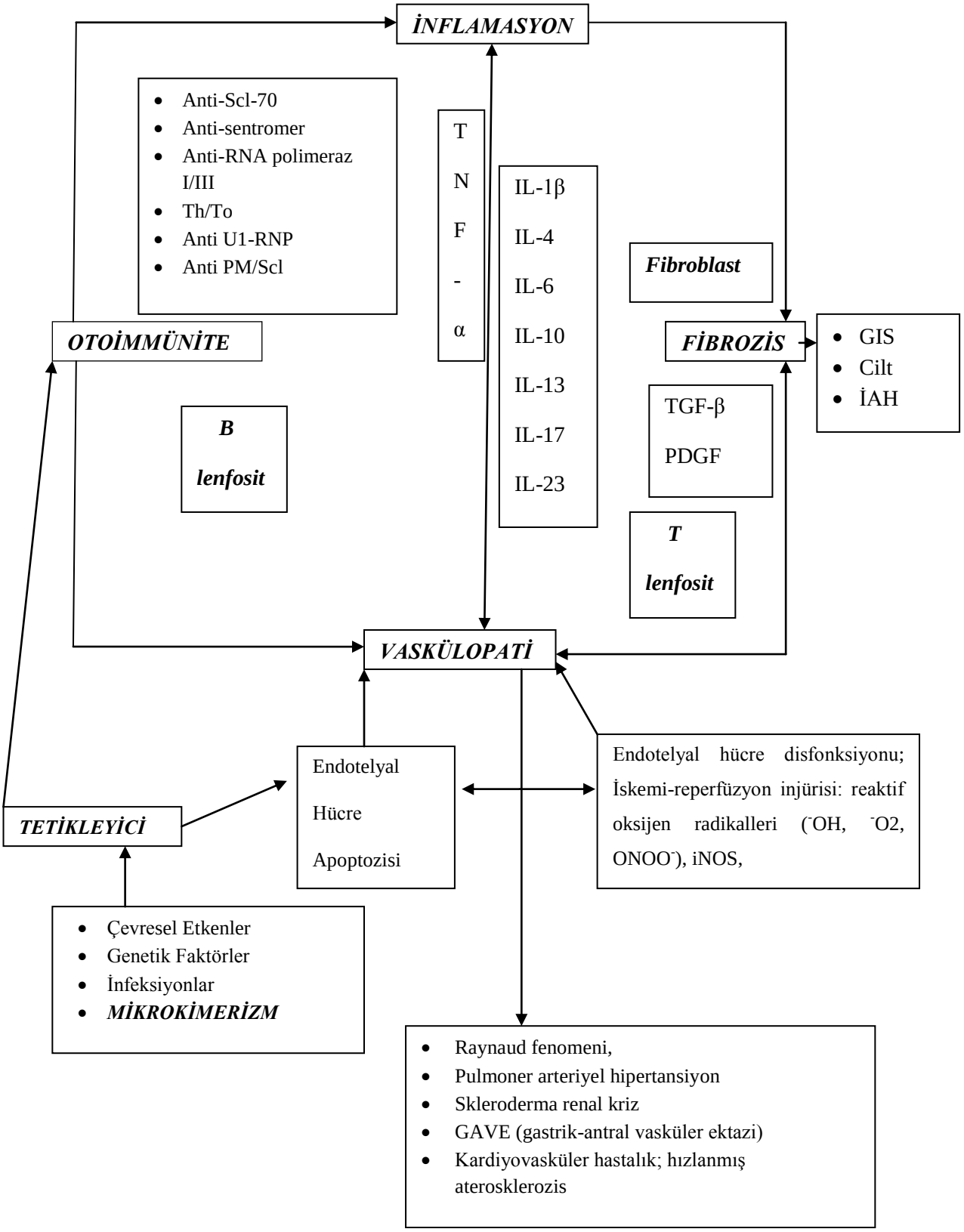
2.1.3. Hücresel İmmün Sistem ve Sistemik Skleroz Patogenezi

Bir çok çalışmada dolaşan lenfosit grupları ve bunların fonksiyonları ile SSk patogenezi araştırılmıştır. Genel olarak sistemik sklerozlu hastalarda absolut lenfopeni olmasına karşın T/B hücre oranı normaldir. Fakat CD4/CD8 T hücre oranı artmış bulunmuştur. Erken dönem cilt lezyonlarında T hücresi, makrofaj, mast hücresi ve nadir B hücre varlığı ile karakterize immün aktivasyonun yol açtığı inflamasyonun süregenleşmesinin bu hastalığa yol açtığı kabul edilmektedir. Erken dönemdeki bu inflamasyon, zamanla yerini fibröz dokuya bırakmaktadır (Şekil 2.1). Buradaki mononükleer hücreler, başlıca CD4+ T hücreler ve makrofajlardan oluşmaktayken, akciğerlerde ise CD8+ T hücreler daha baskındır (30). Bu CD4+ T hücreler; Th2 karakterde sitokin profiline sahip olup, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-23 gibi sitokinler salgılar (Şekil 2.1). CD4+ T hücrelerinin ekspansiyonu "oligoklonal"dir (34). Ayrıca TGF-β ile IL-4, en önemli fibrojenik-profibrotik sitokinlerdir (Şekil 2.1). IL-4 fibroblastlardaki kollajen sentezini uyararak fibrozisi indükler ve TGF-β salınımına yol açar. TGF-β; fibronektin, kollajen, proteoglikan sentezini uyarır, matriks metalloproteinaz (MMP) sentezini baskılar, MMP'ın doku inhibitörünün sentezini uyarıp, ekstraselüler matriks yıkımını engeller (31). Anti-TGF-β antikorlar yada antisense TGF-β oligonükleotidlerin, fibrozisi baskıladığı gösterilmiştir (32). Yine kendi hazırladığım Şekil 2.1'de T ve B lenfosit, fibroblast ilişkisi şematik olarak gösterilmiştir.

Th1 ve Th2 hücrelerinden salınan IL-17'nin SSk'da doku ve periferik kanda yükselmiş olduğu ve fibroblast aktivasyonuna, makrofajlardan TNF-α ve IL-1 salınımına yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca IL-17'nin endotel hücrelerini uyararak IL-1, IL-6 salınımıyla ICAM-1, VCAM-1 artışına yol açtığı saptanmıştır (23). IL-4

üreten Th2 hücrelerin aktivasyonu fibrozisi indükler, interferon-γ üreten Th1 aktivasyonu ise inhibe etmektedir. Fakat bazı yayınlarda Th1 ve Th2 hücrelerin, SSk patogenezinde birlikte rol aldığını göstermiştir. $V\delta1^{+}\gamma/\delta$ T hücrelerinin, SSk'lu hastaların hem kan hem de akciğerlerinde arttığı saptanmıştır (34).

Yine T hücrelerinden salınan IL-2 ve IL-2 reseptör konsantrasyonunun arttığı ve hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu bulunmuştur (35). IL-2, ayrıca Naturel Killer (NK) hücrelerinin lenfokinle uyarılmış killer hücrelere (LAK) dönüşmesine yol açmakta ve LAK hücreler direkt endotelyal hasara neden olmaktadır (36). Yine fibrotik reaksiyonlarda, kronik graft-versus host hastalığında, interstisyel pulmoner fibroziste ve tight skin 1 fare (Tsk 1) sistemik sklerozis modellerinde, mast hücrelerinden salınan granüllerin endotel hasarına yol açtığı ve fibroblastları stimüle ettiği gösterilmiştir. Kronik GVHH periferik kök hücre nakli yapılan hastalarda karşılaşılan; Raynaud fenomeni, dermal skleroz (özellikle parmaklarda), vasküler lezyonlarla karekterize bir SSk modeli olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu lezyonlardaki çalışmalar, donör T hücrelerinin patogenezdeki rollerini ortaya koymuştur. Kronik GVH hastalığı ile SSk arasında klinik ve histopatolojik benzerlikler söz konusudur (37, 38). Bu benzerlikten dolayı bir çok araştırmacı, SSk'lu hastaları immün hücre mikrokimerizmi açısından incelemiştir (39).



Şekil 2.1. Sistemik sklerozun etiyoloji, patogenez ve klinik bulgularının ilişkisi (GIS: gastrointestinal sistem, İAH: interstisyel akciğer hastalığı).

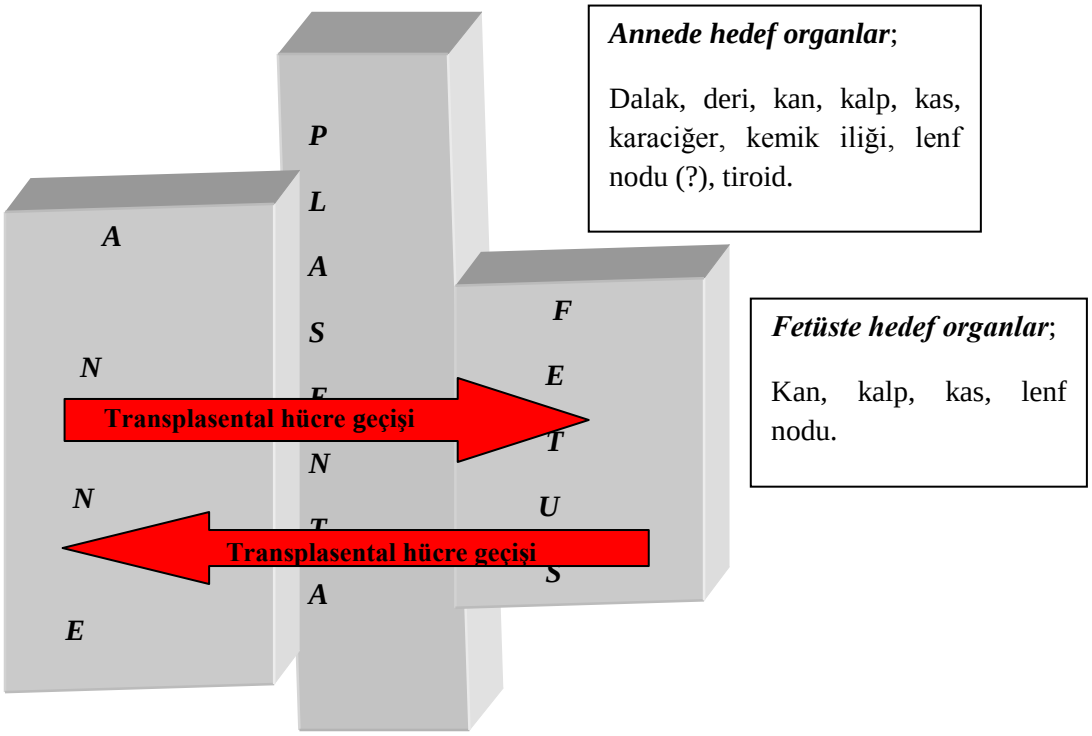
2.1.4. Mikrokimerizm ve Sistemik Skleroz Patogenezi

Gebelik ile gerek otoimmün gerekse de otoimmün olmayan hastalıkların ilişkisi yıllar boyu araştırma konusu olmuştur. İlk olarak 1800'lü yıllarda Alman patolog Schmorl tarafından, eklampsiden ölen kadınların kanlarında trofoblast hücrelerinin gösterilmesiyle bu konuya dikkat çekmiştir (40). Gebelik boyunca, anne ile fetüs arasında iki yönlü hücre geçişinin olduğu bilinmektedir. Feto-maternal (çocuktan anneye geçen) ve materno-fetal (anneden çocuğa geçen) hücre trafiğinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca anne kanında, fetüse ait çok değişik türde hücre olduğu saptanmıştır. Bu hücreler; trofoblast, CD34+ ve CD34+CD38+ hücreler, hematopoetik kök hücreler, mezenşimal kök hücreler, çekirdekli eritroblastlar, T ve B lenfositler, monositler, naturel killer hücreler, hepatositler, böbrek tübüler epitelyum hücreleri, nöron ve glia hücreleri, kalp kası hücreleri, endotel hücreleri, endotelyal progenitör hücreler, tirositler, intestinal epitelyum hücreleri gibi çok değişik hücrelerden oluşmakta ve bu mikrokimerik hücreler, doğumdan sonra, yıllar boyunca varlıklarını sürdürebilmektedirler. Hücre geçişi yanı sıra hücresiz DNA (cell-free DNA) geçişi de olmaktadır (41-42).

Mikrok(ş)imerizm (MK); bir bireye ait az miktarda DNA yada hücrenin, başka bir bireydeki varlığını ifade etmektedir. Genetik olarak birbirinden farklı olan ve ayrı kaynaklardan gelen iki hücre topluluğunun, biri az yoğunlukta olmak üzere, aynı birey yada organda bulunma durumu olarak da tanımlanmıştır. Mikrokimerizmin (feto-maternal, materno-fetal) en sık ve doğal kaynağı gebeliktir. Fakat bu olay için terme ulaşmış bir gebeliğe ihtiyaç olmadığı spontan abortus yapan kadınların % 59.7 gibi oranda MK için pozitif olduğu gösterilmiştir (43). Diğer sık nedenleri ise emzirme ve ikizden geçiştir. İyatrojenik nedeni ise GVHH dir. Ayrıca kan transfüzyonu, solid organ transplantasyonu da neden olarak saptanmıştır. Nispeten anne kanında fetüse ait az miktarda hücre bulunmaktadır. En sık anne kanında 1 hücre/mL olarak tespit edilsede yaklaşık 1 fetal hücre / 100 bin anne hücresi olduğu yönünde fikir birliğine varılmıştır. Yine bir çalışmada, "flow sitometri" yöntemi ile doğumdan sonra, 27 yıl kadar uzun zaman geçmesine rağmen, fetal hücrelerin anne kanında bulunduğu gösterilmiştir (44). Bu olay bize doğumdan itibaren, düşük dereceli bir kimerik durumun varlığını desteklemektedir. Lo ve ark., 1989-90'da

erkek fetüs taşıyan gebelerin kanında, Y kromozom dizilerinin varlığını tespit etmek için "Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR)" kullanmışlar ve PCR ile Y zincirlerinin hacmini artırarak, ayıklanmamış çekirdekli hücrelerin içinde fetüse ait hücrelerin varlığını göstermişlerdir (45-46). Nelson 1996 yılında ilk defa, fetal hücre mikrokimerizminin, otoimmün hastalıklarda rolü olduğu hipotezini öne sürmüştür (47).

Gebeliğin polimorfik erüpsiyonu (GPE), preeklampsi, enfeksiyöz hepatit, otoimmün olmayan tiroid bozuklukları, servikal kanser ile mikrokimerizmin ilişkisi gösterilmiştir (42). Erkek fetüs taşıyan annelerin GPE lezyonlarında, erkek DNA kalıntılarının saptandığı rapor edilmiştir (42). Aynı şekilde "neonatal lupus sendrom"lu çocuklarda "maternal kardiyak miyozitler"in varlığının gösterildiği bildirilmiştir (42). Gebeliğin meme kanseri üzerine koruyucu etkisi (graft-versus-tümör etkisi ile mikrokimerik hücrelerin koruyucu rolleri?) bilinmektedir. Arlett ve ark. mikrokimerik CD4+ T hücrelerin SSk patogenezinde rolleri olabileceğini, sklerodermalı kadınların deri biyopsilerinde bu lenfositlerin saptanabileceğini göstermiştir (48, 49). Sklerodermalı kadınların kanında, sağlıklı bireylere göre kantitatif olarak daha fazla oranda mikrokimerizm, tespit edilmiştir (50). Feto-maternal mikrokimerizmin; SSk, Sjögren's sendromu, primer biliyer siroz (PBS), SLE, Hashimato tiroiditi, Graves' hastalığı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Materno-fetal mikrokimerizm ise juvenil idiyopatik inflamatuvar miyopatiler ile ilşkili bulunmuştur (42). Mikrokimerik hücrelerin "uygun mikroçevrenin" varlığında değişik hücre tiplerine dönüşebileceği ve yerleştiği doku/bölgeye göre, değişik klinik bulguların ortaya çıkabileceği; bunu da birçok faktörün etkilediği gösterilmiştir (Şekil 2.2) (41,42). Gebelik ve doğum sürecinde, mikrokimerik hücre göçünü belirleyen faktörler: genetik faktörler, çevresel nedenler (toksin, ilaç, enfeksiyonlar vb.), immünsüpresyon, travma, hastalıklardır (pre-eklampsi vb.). Ayrıca mikrokimerik hücre devamlılığı, farklılaşma ve yayılmasını yine benzer faktörler etkilemektedir.



Şekil 2.2. Mikrokimerik hücrelerin transplasental iki yönlü geçişi ve hedef organları.

2.1.5. Klinik Bulgulara Genel Bakış, Hastalık Aktivitesi ve Şiddetinin Değerlendirilmesi

Cilt

SSk'lı hastaların cilt bulguları 3 evre de incelenebilir. Başlangıç evresi (inflamatuvar, ödematöz evre); el ve parmaklarda yumuşak, "puffy" ödem, kıvrım çizgilerinin kaybı, kaşıntının (proinflamatuvar sitokin; histamin, bradikinin salınımına bağlı) eşlik ettiği dönemdir. Ciltte ter ve yağ üretimi azalmıştır, cilt kurudur. Daha sonra endurasyon ve ciltte kalınlaşma başlar. Daha sonraki evrede ise, ilerleyici cilt fibrozisi (fibrotik evre) gelişir. MKF distali (sklerodaktili), eller, ön kol, kol, göğüs duvarı, abdomen, kalçalar, bacak ve ayaklar, yüz ve boyun bölgesi etkilenebilmektedir. Cilt tutulumunun yaygınlık ve genişliği; "Modified Rodnan Skin Score (mRSS)" ile hesaplanmakta ve bu bize renal ve kardiyak komplikasyonların gelişimini, tahmin açısından, yardımcı olmaktadır. mRSS'ye göre; cilt palpasyonla 0-3 arası puanlanmaktadır.

- 0: normal cilt kalınlığı
- 1: hafif cilt kalınlığı
- 2: orta derecede cilt kalınlığı
- 3: şiddetli cilt kalınlığı, derinin katlanmasını imkansız kılacak kadar (atrofik evre).

17 vücut bölgesinde, tek tek bu puanlama yapılıp hesaplanır. Bu vücut bölgeleri; yüz, göğüs ön duvarı, abdominal bölge ve vücudun sol-sağ yarısında: parmaklar, el sırtı, ön kol, kol, kalçalar, bacaklar, ayak sırtlarından oluşur. Toplam skor 0-51 arası değişebilmektedir. Diffüz hastalık, herhangi bir proksimal ekstremite ve gövde de oluşan ciltte kalınlığı göstermektedir (51, 52). Deride; hiperpigmente ve vitiligo benzeri depigmente alanlar; "tuz-biber" görünümünü oluşturur. Ayrıca deri ve tendon fibrozisine bağlı eklem kontraktürleri ve ikincil kas atrofileri, ciddi fonksiyon kaybına yol açabilmektedir. Ön kol, dirsek veya parmaklar gibi travmaya maruz kalan bölgelerde, özelikle anti-sentromer antikor pozitif bireylerde, hidroksiapatit depolanmasına bağlı "deri altı kalsinozisi" gelişebilir; bu zeminde deri ülserleri ve buna bağlı ikincil enfeksiyonlar oluşabilmektedir (53). Telenjiektaziler de sklerodermanın, sık görülen cilt bulguları arasında yer alır. Deri sklerozu, eklem fleksiyon kontraktürüne yol açar. Erken ve yaygın deri tutulumu, çoğu olguda tendon kılıfı inflamasyonu, fibrozis ve fizik muayanede tendon sürtünme sesi bulgusuna yol açar.

Vasküler sistem

Soğuk ve stres gibi tetikleyici bir faktör sonrası, parmaklarda görülen 3 fazlı renk değişimi; beyazlaşma, morarma, kızarma şeklinde tariflenen "Raynaud Fenomeni" (RF); SSk'lı hastaların % 95'inden fazlasında görülmektedir. RF, yaygın tutulumla, eş zamanlı, kısa süre önce veya sonrasında gelişebilir. Bu vazospastik, iskemik fenomen; el ve ayak parmakları, kulak, burun, dil, kalp, böbrek ve akciğer arterlerinde dahi ortaya çıkabilmektedir SSk'lı hastalarda, mikrovasküler hasar nedeniyle reaktif bir vazodilatasyon oluşmamaktadır. Bu iskeminin devam etmesi, parmak pulpalarında sert skar dokusu ile kaplı çukurlaşmalar, ikincil infeksiyonlar sonucu ise iyileşmeyen dijital ülser, gangren ve otoampütasyonlara yol açmaktadır.

Bu mikrovasküler hasar tırnak-yatağı kapilleroskopisi ile; dilatasyon, tortiosite, erken sonlanma, mikrohemoraji ve yeni damarlanmalar, dev (giant) kapillerler şeklinde görülebilmektedir (53).

Akciğer

Sistemik sklerozlu hastalarda, en önemli morbidite ve mortalite nedeni olan akciğer tutulumu, başlıca iki şekilde olmaktadır; interstisyel akciğer hastalığı (İAH) ve/veya pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) dır. Diğer akciğer tutulumu bulguları ise; aspirasyon pnömonisi, plevral hastalık, obstrüktif hava yolu hastalığı, hemoptizi ile birlikte endobronşial telenjiektaziler, malignite, kriptojenik organize pnömoni ve interstisyel pnömonidir (non-specific-NSIP, usually-UIP).

Yaygın deri tutulumu olan ve anti-Scl-70 (antitopoizomeraz, ATA) pozitifliği saptanan hastalarda, İAH ve pulmoner fibrozis, daha sık ve erken gelişmektedir. Anti-sentromer antikor pozitif olanlarda ise İAH gelişme oranı, daha düşüktür. Bu hastalarda dispne, kuru öksürük ve fizik muayenede geç inspiratuvar raller, önemli bulgulardır. Ayrıca bu hastaları saptamada, erken evre ve/veya asemptomatik dönemde, solunum fonksiyon testleri (SFT) ve karbonmonoksid difüzyon testi (DLCO) yapılması önerilmektedir. DLCO, alveolar volüm hesaplanarak düzeltilmelidir (DLCO/VA). Bazı otörlere göre bazal SFT, DLCO ve hastalığın ilk 5 yılında her 3-6 ayda bir, bunların tekrarı önerilmektedir (54). Yeni gelişen respiratuvar semptomları olan, SFT'de azalma/bozulma saptanan ve ATA pozitif olgularda, yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (high resolution computed tomography, HRCT) yapılmasını önerenler vardır. HRCT'de "aktif alveolit" bulgusu olan "buzlu cam görünümü", uygun immünsüpresif tedavi ile gerileyebilmektedir. Bronko-alveolar lavaj incelemesi de yine aktif hastalığı olanlarda inflamatuvar hücre sayı, oranı ve fibrotik-antifibrotik faktörlerin dengesini göstermek açısından önemlidir. Kronik olgularda, geri-dönüşsüz fibrozis bulgusu olarak HRCT'de "bal peteği görünümü" izlenir (55).

Bu hastaların fonksiyonel kapasitelerini değerlendirmede, 6 dakika yürüme testi (6DYT) önemlidir. Prognozu belirleyen diğer bir akciğer tutulum şekli, PAH; sınırlı deri tutulumlu ve ASA pozitif olgularda, Raynaud fenomeninin başlangıcından yıllar

sonra “izole” olarak gelişebilmektedir. ATA pozitif, yaygın deri tutulumlu olgularda da izole PAH gözlenebilmektedir. Yorgunluk, açıklanamayan nefes darlığı, atipik göğüs ağrısı varlığında PAH’dan şüphelenilmelidir. Fizik muayenede, ikinci kalp sesinin pulmoner komponentinde şiddetlenme ve bazen çiftleşmesi saptanır. İleri evrelerde sağ kalp yetersizliği bulguları, akciğer grafisinde pulmoner konuslarda belirginleşme ve SFT’de akciğer volümü azalmaksızın izole difüzyon kapasitesi düşüklüğü önemli PAH bulgularıdır.

İnvazif olmayan tarama testi olarak “doppler Ekokardiyografi (EKO)” önemlidir. İstirahatte ≥ 25 mmHg pulmoner arter basıncı (PAB) veya egzersizde ≥ 30 mmHg üzeri PAB değerleri PAH için tanısal olsa da altın standart “sağ kalp kateterizasyonu”dur. PAH’lı hastaların tanı ve tedavisinde, 4.Dünya Pulmoner Hipertansiyon Sempozyumu (2008) sınıflaması ve NYHA fonksiyonel kapasiteye göre (Sınıf I-IV) derecelendirilmesi, 6DYT önerilmektedir. Yine sistemik sklerozisli hastalara asemptomatik bile olsa yılda bir EKO yapılması önerilmektedir (56).

Akciğer tutulumunun erken saptanması konusunda yine çeşitli “biyomarker (biyobelirteç)”lar bize yardımcı olabilmektedir. Bunlar; beyin natriüretik peptid (BNP), N-terminal pro-BNP, surfaktan protein D (SP-D), KL-6 (Krebs von den Lungen-6), TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis), BAFF (B-cell activating factor; Blys, TNFSF13B, THANK, TALL-1), APRIL (a proliferation-inducing ligand; TALL-2, TRDL-1), CA_{NO} (exhaled nitric oxide), polimorfonükleer nötrofilik elastaz, von Willebrand faktör, CCL13, soluble E-selectin, IgG seviyeleri, Psoriasin (S100A7) gibi henüz araştırma safhasında olan belirteçlerdir (57-61). Yine bazı çalışmalarda, PAH tanısı için, transtorasik EKO’da, sistolik PAB’ı 40 mmHg üzeri ve kardiyak kateterizasyonda ise ortalama PAB değeri olarak 25 mmHg olarak kabul etmişlerdir. SFT’de zorlu vital kapasitenin (ZVK) % 70’den az olması ve 1.dakikadaki zorlu ekspratuvar volum (FEV1) / ZVK değerinin % 80’den fazla olmasını akciğer tutulumu bulgusu olarak kabul etmişlerdir (62).

Kalp

Kalp tutulumu primer ve sekonder olarak ikiye ayrılabilir. Primer tutulumda, miyokard, perikard, kalp kapakları, koroner damarlar, ileti sisteminin direkt olarak

vasküler, fibrotik ve inflamatuvar değişiklikler ile etkilenmesi sonucu ortaya çıkar. Sekonder kardiyak olaylar ise, pulmoner vasküler ve/veya interstisyel akciğer hastalığı ve komorbid durumlar; sistemik hipertansiyon, diabetes mellitus, uyku bozuklukları ve obezite sonucu ortaya çıkan kardiyak problemlerdir. Miyokardiyal tutulumda 5 yıllık mortalitenin % 70 gibi olduğu, perikardiyal tutulum ve sol ventrikül yetmezliğinin ise skleroderma renal krizinin habercisi olabileceği bildirilmiştir.

Miyozit, perikardiyal effüzyon ve fibrozis, aritmi, sol ventrikül sistolik ve diastolik disfonksiyonu, sağ kalp yetmezliği, perfüzyon anormallikleri, hızlanmış aterosklerozis gözlenebilmektedir. Kardiyak tutulumla serum otoantikorları ilişkilendirilmeye çalışılmış, ATA ile diffüz tutulum ve kardiyak tutulum ilişkili bulunmuştur. Fakat yine de otoantikor üretimi genetik ve etnik varyasyon gösterebileceğinden tam ilişki saptanamamıştır. NT-proBNP ile ilişki kurulmaya çalışılmıştır. EKG'de ileti defektleri saptanabilmektedir. Direkt grafiler, kardiyak tutulumu göstermede tek başına yeterli değildir. Transtorasik EKO, doku doppleri, nükleer sintigrafik teknikler (Tc99m, talyum 201 vb.), kardiyak MR, sağ kalp kateterizasyonu ve endomiyokardiyal biyopsi, kardiyak tutulumu ve derecesini saptamada kullanılabilecek yöntemlerdir (63-66)

Gastrointestinal Sistem

SSk'da orofarinks, özefagus, mide, ince ve kalın barsaklar, rektum, anüs dahil tüm gastrointestinal sistem etkilenebilmektedir. Sekonder Sjögren sendromuna bağlı, çiğneme ve yutma güçlükleri olabilmektedir. Mikrovasküler yetmezlik ve nörojenik faktörler sonucunda gelişen düz kas atrofisi, GIS tutulumunda önemlidir. DkSSk'lı hastalarda, dil karsinomu gelişme riski artmıştır. Özellikle overlap durumlarında, özefagus çizgili kaslarıda etkilenebilmektedir. Alt özefagus sfinkter yetmezliği ve sonucunda Barret's özefagusu gelişmesi ve bunun zemininde malignite gelişebileceği bildirilmiştir. Erozif özefajit, özefageal ülserler, Mallory-Weis yırtığı ve mukozal telenjiektaziler gelişebilir. Baryum özefagogram, üst endoskopi, özefageal manometri, 24-saat pH probu, direkt grafi ve BT incelemeleri, özefageal tutulumu ve derecesini göstermede önemlidir. Midede gastrik antral vasküler ektazi (GAVE),

gastrit ve mukozal telenjiektaziler sonucunda, iştahsızlık, bulantı, kusma ve kilo kaybı gibi klinik bulgular ortaya çıkmaktadır.

İntestinal bakteriyel aşırı çoğalma sonucu, diyare ve konstipasyon oluşabilir. Yine mukozal telenjiektazilerden kanama, intestinal psödoobstrüksiyon, pnömatosis kistoides intestinalis, malabsorsiyon, rektal prolapsus ve inkontinans görülebilir. Özellikle eşlik eden depresyon, GIS semptomlarını alevlendirmektedir. Karaciğer, SSk'da nadiren etkilenir. Fakat özellikle lkSSk ve ASA pozitifliği ile "Primer Biliyer Siroz (PBS)" birlikteliği iyi bilinmektedir. PBS'de antimitokondriyal antikor pozitifliği, alkalen fosfataz ve total bilirübin yükselir. SSk'da saptanan transaminaz yüksekliği, hepatik tutulumdan ziyade, inflamatuvar kas hastalığı ile ilişkilidir (67).

Böbrek

Mikroanjiyopatiye bağlı gelişen renal kriz, "skleroderma renal kriz" (SRK) olarak da tanımlanan böbrek tutulumu, yaygın deri tutulumlu hastaların % 10'unda, genellikle hastalığın ilk 3 yılında gelişir. SRK; baş ağrısı, nefes darlığı, görme bozukluğu, epileptik nöbet, akciğer ödemi, alt ekstremite ödemi, göz dibi değişiklikleri gibi malign hipertansiyon bulguları, oligurik/anurik akut böbrek yetmezliği, şistositer anemi, trombositopeni, proteinüri, hematüri, eritrosit silendirlerinin saptanabildiği ve artmış mortalite oranı; 5 yıllık survey % 65, ile ilişkili bir durumdur. Nadiren kan basıncı artışı belirgin olmayan veya normal olan olgular da bildirilmiştir.

SRK risk faktörleri şunlardır; diffüz cilt tutulumu, cilt tutulumunun hızlı progresyonu, hastalık süresinin 4 yıldan az olması, yeni gelişen kardiyak olaylar (perikardit, sol ventriküler yetmezlik), yeni gelişen anemi, anti-RNA polimeraz III pozitifliği, son 3 aylık dönemde günde 15 mg'dan fazla prednizon-steroid kullanımı, son 3 ayda siklosporin tedavi ve tendon sürtünme sesidir. İleri yaşta başvuran, başlangıç kreatinin (3 mg/dl) yüksek ve erkek SSk olgularında, prognoz daha kötüdür. Yine 15 mg/gün üzeri glukokortikoid tedavi verilen olgularda, normotansif renal kriz riskinin arttığı gözlenmiştir.

Hastada var olan hipertansiyon, üriner anormallikler, ATA ve ASA pozitifliği, böbrek kan damarı anormallikleri ile SRK ilişkili bulunmamıştır. 1970'lerden önce

SRK % 18 olguda görülebilmekte, renal komplikasyonlar major ölüm nedenleri arasında yer almaktaydı. Anjiyotensin konverting enzim (ACE) inhibitörü kullanımı ile 12 aylık mortalitenin % 76 dan % 15'in altına indiği bildirilmiştir. ACE inhibitörü kullanımı, kalsiyum kanal blokeri ve 2 yıllık diyaliz tedavisine rağmen yanıt alınamayan olgular, renal transplantasyon adayı olarak değerlendirilmelidir. Yine "European League Against Rheumatism Scleroderma Trials and Research" (EUSTAR) verilerine göre SRK prevalansı, dkSSk'lı olgularda % 5, lkSSk'lı olgularda % 2'den daha az olarak rapor edilmiştir (68-70). Hastalık şiddetinin değerlendirilmesi Medsger ve arkadaşlarınca derecelendirilmiş ve aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Sistemik skleroz: Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi.

Tutulan organ ve sistem	*0 (normal)*	*1 (hafif)*	*2 (orta)*	*3 (şiddetli)*	*4 (son dönem)*
Genel	Kilo kaybı < % 5, Hb: 12.3 mg/dl, Htc: % 37.0.	Kilo kaybı % 5.0-9.9, Hb: 11.0-12.2 mg/dl, Htc: % 33.0-36.9	Kilo kaybı % 10.0-14.9, Hb: 9.7-10.9 mg/dl, Htc: % 29.0-32.9	Kilo kaybı % 15.0-19.9, Hb: 8.3-9.6 mg/dl, Htc: % 25.0-28.9	Kilo kaybı % > 20, Hb: < 8.3 mg/dl, Htc: < % 25.0
Periferal vasküler	Raynaud yok; Raynaud vazodilatatör ihtiyacı yok	Raynaud vazodilatatör ihtiyacı var	Dijital pitting skarlar	Dijital ülserasyonlar	Dijital gangren
Cilt	TCS: 0	TCS: 1-14	TCS: 15-29	TCS: 30-39	TCS: > 40
Eklem/tendon	FTP: 0-0.09 cm	FTP: 1.0-1.9 cm	FTP: 2.0-3.9 cm	FTP: 4.0-4.9 cm	FTP: > 5.0 cm
Kas	Normal proksimal kas gücü	Proksimal kas güçsüzlüğü, hafif	Proksimal kas güçsüzlüğü, orta	Proksimal kas güçsüzlüğü, şiddetli	Desteksiz kas gücü yokluğu
GIS	Normal özefagogram, normal ince barsak	Distal özefageal hipoperistaltizm, anormal ince barsak	Bakteriyel aşırı çoğalma için antibiyotik gereksinimi	Malabsorbsiyon sendromu, psödoobstrüksiyon atakları	Hiperalimentasyon gereksinimi
Akciğer	DLCO: % 80, ZVK: % 80, Grafide fibrozis yok, sPAB < 35 mmHg	DLCO: % 70-79, ZVK: % 70-79, Baziler raller, Grafide fibrozis, sPAB: 35-49 mmHg	DLCO: % 50-69, ZVK: % 50-69, sPAB: 50-64 mmHg	DLCO: < % 50, ZVK: < % 50, sPAB: > 65 mmHg	Oksijen gereksinimi
Kalp	EKG: normal, LVEF % 50	EKG'de ileti defekti, LVEF % 45-49	EKG'de aritmi, LVEF % 40-44	EKG'de tedavi gerektiren aritmi, LVEF % 30-40	Konjestif kalp yetmezliği, LVEF < % 30
Böbrek	Hikayede SRK yok, serum kreatinin < 1.3 mg/dl	SRK öyküsü var, serum kreatinin < 1.5 mg/dl	SRK öyküsü var, Serum kreatinin 1.5-2.4 mg/dl	SRK öyküsü var, Serum kreatinin 2.5-5.0 mg/dl	SRK öyküsü var, Serum kreatinin > 5.0 mg/dl veya diyaliz gereksinimi

DLCO: karbonmonoksid difüzyon kapasitesi, EKG: elektrokardiyografi, FTP: fleksiyonda fingertip-to-palm (parmak ucu-avuç içi) mesafesi, GIS: gastrointestinal sistem, Hb: hemoglobin, Htc: hematokrit, LVEF: sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu, sPAB: sistolik pulmoner arter basıncı, SRK: skleroderma renal kriz, TCS: total cilt skoru, ZVK: zorlu vital kapasite (71'nolu kaynaktan uyarlanmıştır).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu Özellikleri

Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı kliniği ve polikliniğinde takip edilen sistemik skleroz hastaları ile yaş ve cinsiyet olarak hasta grubuyla benzer olan, bilinen hiçbir hastalığı olmayan ve herhangi bir ilaç kullanmayan sağlıklı gönüllüler dahil edildi. American College of Rheumatology (ACR) tanı kriterlerine (3) göre Sistemik Skleroz tanısı almış 80 kadın hastadan oluşan hasta grubu ve sağlıklı 40 kadından oluşan kontrol grubu olmak üzere, iki grup oluşturuldu. Hasta grubu; yaygın (diffüz) kutanöz sistemik skleroz (n= 30) ve sınırlı (limitli) kutanöz sistemik skleroz (n= 50) olarak 2 gruba ayrıldı.

Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 28.06.2010 tarih ve 13-265 karar numarasıyla araştırma onayı alındı (Ek 1).

Araştırmaya dahil olma kriterleri:

1) ACR tanı kriterlerine göre sistemik skleroz tanısı alan, yeni tanılı veya tedavi alan ve takipteki tüm hastalar.
2) Kadın hastaların doğum öyküsü (özellikle erkek çocuk sahibi olanlar), abortus öyküsü olanların daha öncelikle dahil edilmesi.
3) Genç evlenmemiş, doğum, abortus vb. öyküsü olmayan hastalarında çalışmaya alınması.

Araştırmaya dahil olmama kriterleri:

1) Kontrol grubunda herhangi bir alt hastalığı (tip 1 DM, malignite vb.), otoimmün hastalığı (tiroidit ve diğer otoimmün hastalık) ve daha önce saptanmış/bilinen otoantikor (RF, ANA, ANCA vb.) pozitifliği olması.
2) Kooperasyonu etkileyecek şekilde şiddetli psikiyatrik bozukluk olması (özellikle son 30 gün içinde tedavisini değiştirmek zorunda kalmış psikoz ve depresyonlu kişiler).
3) Kan transfüzyonu öyküsü olan hastalar.

4) Herhangi bir nedenle periferik kök hücre nakli yapılmış olan hastalar (Allojeneik nakil).

5) Kontrol grubunda ilaç kullanım öyküsünün olması (oral kontraseptif, antidepresan vb.).

3.2. Kullanılan Gözlem ve Laboratuvar Teknikleri

Bütün hastaların ve sağlıklı kontrollerin ayrıntılı anemnezleri alındı ve fizik muayeneleri yapıldı. Hasta dosyalarından eski ve en son verilere ulaşıldı. Her hastanın hastalık süresi, muayenede cilt tutulumu ve yaygınlığı, telenjiektazi, kalsinozis ve diğer bulguları kaydedildi. Tüm hastaların cilt skorları hesaplandı ve cilt tutulumuna göre hastalar ikiye ayrıldı; yaygın (diffüz) kutanöz veya sınırlı (limitli) kutanöz hastalar. Raynaud fenomeni; tanı sırasındaki varlığı veya takipte ortaya çıkışına göre değerlendirildi.

Akciğer tutulumu açısından yine dosya verilerinden ve hasta özgeçmişinden faydalanılarak: SFT, DLCO, HRCT gibi laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri ve hastanın akciğer tutulumu için tedavi ihtiyacı ve/veya tedavi almış olmasına göre karar verildi. Kalp tutulumu: EKG'de aritmi, ileti defektleri, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ölçümü, perikardit öyküsü veya varlığı, EKO bulguları, konjestif kalp yetmezliği ve bunların tedavi gereksinimine göre karar verildi.

Gastrointestinal sistem: ağız açıklığı, ağız kuruluğu, yutma güçlüğü, reflü semptomları, malabsorbsiyon, kilo kaybı, diyare ve konstipasyon gibi bulgu ve önceki endoskopi/kolonoskopi sonuçlarına göre değerlendirildi. Renal tutulum; idrarda proteinüri, hematüri, skleroderma renal krize ait semptom ve bulguları, dosya bilgileri kaydedidi. Özellikle çocuk sahibi olanların (canlı çocuk sahibi olmak şart değil); gebelik ve abortus öyküsü sorgulandı, varsa çocuklarının cinsiyeti (erkek çocuk sahibi olanlar özellikle tercih edildi), yaşı, doğum ile hastalık semptomları arasındaki süre kaydedildi. Kontrol grubunda da yaş ve en son doğum ile kan alma arası süreleri sorgulandı.

Tüm hastaların modifiye Rodnan cilt skoruna göre cilt skorları ve "Medsger hastalık şiddet skalası (71)"na göre hastalık şiddeti hesaplandı. ANA, anti-Scl-70, anti-sentromer, anti-SS-A, anti-SS-B, anti-U1-RNP ve var olan diğer immunblot verileri hasta dosyalarından elde edildi.

Hasta ve kontrol grubunda katılımcılara çalışmanın amacı, önemi anlatılarak yazılı bilgilendirilmiş onamları alındı.

Hasta ve sağlıklı katılımcılardan periferik venöz kan örnekleri, 3 cc kan, EDTA'lı tüplere alınarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'na hemen ulaştırıldı. Özellikle örnek aktarımı sırasında gecikme olmaması, monükleer hücre izolasyonu ve DNA eldesinin doğru olabilmesi için bu süreye dikkat edildi.

DNA eldesi için PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (İnvitrogen™, katalog no: K1820-02) kullanıldı. Lizis/bağlama tamponu, parçalama tamponu, yıkama tamponu 1, yıkama tamponu 2, elüsyon tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA), RNAaz A (20 mg/ml) saklama tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA), proteinaz K (20 mg/ml), spin kolonlar, toplama tüpleri (2.0 ml'lik) mini kitte yer almaktadır. Kitin içeriği ve hangi amaçla kullanıldıkları Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Periferik kandan DNA eldesi işleminde öncelikle, EDTA'lı tüpteki periferik venöz kan örneğinden 3000-4000 devirde, 5 dakika santrifügasyon sonrası, "buffy coat"tan, her bir örnek için 1.5 ml'lik steril eppendorf tüpüne 200 µl aktarıldı. Su banyosu 55 ºC' ye ayarlanıp, 200 µl kan üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi, Proteinaz K eklenen örnek üzerine 20 µl RNAaz A eklenip, daha sonra örnek kısa süre vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında 200 µl PureLink™ Genomik Lizis/Bağlanma Tamponu eklendi. Homojen bir solüsyon elde edilebilmesi için güçlü bir şekilde (10000g) vortekslendi. Daha sonra su banyosu içerisinde 55 ºC'de 13 dakika boyunca, proteinlerin parçalanmasını sağlamak için inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnek üzerine 200 µl % 96-100' lük etil alkol eklendi. Homojen bir solüsyon elde etmek için 5 saniye boyunca vortekslendi.

Daha sonra her bir örnek için, bir toplama tüpüne bir spin kolon aktarılarak, 5 saniye boyunca vortekslenip homojenize edilen örnekler mikropipet yardımıyla spin kolon içeren toplama tüpüne aktarıldı. 10000g' de oda sıcaklığında 1 dakika boyunca santrifüj edilerek santrifüj sonrasında spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.

Kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu I eklenerek, parçalanmış olan protein artıklarını temizlemek için 10000g' de oda sıcaklığında 1 dakika boyunca santrifüj

edilip, santrifüj sonrasında spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu II (diğer artık materyalleri temizlemek için) eklendi. Maksimum hızda oda sıcaklığında 3 dakika boyunca santrifüj edilerek kolon hasta/katılımcı isimlerinin yazılmış olduğu 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

Kolon üzerine 200 µl elüsyon tampon eklendi, oda sıcaklığında 90 saniye boyunca inkübe edilip, maksimum hızda oda sıcaklığında 90 saniye boyunca santrifüj edildi. Elüsyon aşaması ile kolondan mikrosantrifüj tüpüne aktarılan DNA örnekleri – 20 ºC' de saklandı (Tablo 3.2). İzolasyon sonrasında elde edilen DNA' ların varlığı % 1' lik agaroz jel elektroforezi yapılarak kontrol edilmiştir (Şekil 3.1).

Tablo 3.1. PureLink™ Genomic DNA Mini Kitin içeriği

İçerik	***Açıklama***
PureLink™ Genomik Lizis/Bağlanma Tamponu (Genomic Lysis/Binding Buffer)	Hücrelerin lize edilmesini ve DNA' nın kolona bağlanmasını sağlayan tampondur.
PureLink™ Genomik Parçalama Tamponu (Genomic Digestion Buffer)	Optimal Proteinaz K aktivitesi için kullanılır.
PureLink™ Genomik Yıkama Tamponu 1 (Genomic Wash Buffer 1)	Kolondaki DNA'yı yıkama amaçlı kullanılan bir tampondur.
PureLink™ Genomik Yıkama Tamponu 2(Genomic Wash Buffer 2)	Kolondaki DNA'yı yıkama amaçlı kullanılan bir tampondur.
PureLink™ Genomik Elüsyon Tamponu (Genomic Elution Buffer) (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)	Genomik DNA' nın elüsyonu (DNA' nın kolondan ayrılarak ependorf tüpüne aktarılması) için kullanılır.
RNAaz A (20 mg/ml) Saklama tamponu: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA	Purifiye edilen DNA içerisindeki olası RNA kontaminasyonunu minimize etmek için örnek içerisindeki RNA' nın degredasyonu gerekmektedir. Bu nedenle RNAaz A kullanılır
Proteinaz K (20 mg/ml)	Proteinaz K hücrelerin etkin şekilde lizisini sağlar.
PureLink™ Spin kolonlar (Spin Columns with Collection Tubes)	DNA aktarımı için kullanılan kolonlar.
PureLink™ Toplama Tüpleri (Collection Tubes)(2.0 ml)	Kolonların aktarıldığı kapaksız tüpler.

Tablo 3.2. DNA eldesi işlemi ve aşamaları

DENEY AŞAMASI	İŞLEM
Örnek Alınması	• DNA izolasyonu için periferik kan kullanılır. • Her bir örnek için EDTA (100 µl, 0,5 M)' lı tüpe 3 cc periferik kan alınır. • Her bir örnek için, 1,5ml' lik steril ependorf tüpüne EDTA' lı tüpe alınan kandan 200µl aktarılır.
Lizat Hazırlama Aşaması	• Su banyosu 55ºC' ye ayarlanır. • 200 µl kan üzerine 20µl Proteinaz K eklenir. • Proteinaz K eklenen örnek üzerine 20µl RNAaz A eklenir. • Daha sonra örnek kısa süre vortekslenir ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir. • İnkübasyon sonrasında 200 µl PureLink™ Genomik Lizis/Bağlanma Tamponu (Genomic Lysis/Binding Buffer) eklenir. • Homojen bir solüsyon elde edilebilmesi için güçlü bir şekilde (10000g) vortekslenir. • Daha sonra su banyosu içerisinde 55ºC'de 13 dakika boyunca, proteinlerin parçalanmasını sağlamak için inkübe edilir. • İnkübasyon sonrasında örnek üzerine 200µl % 96-100' lük etil alkol eklenir. • Homojen bir solüsyon elde etmek için 5 saniye boyunca vortekslenir.
DNA' nın Kolono Bağlanma Aşaması	• Daha sonra her bir örnek için, bir toplama tüpüne bir spin kolon aktarılır. • 5 saniye boyunca vortekslenerek homojenize edilen örnekler mikropipet yardımıyla spin kolon içeren toplama tüpüne aktarılır. • 10000g' de oda sıcaklığında 1 dakika boyunca santrifüj edilir. • Santrifüj sonrasında spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılır.
DNA Yıkama Aşaması	• Kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu I eklenir. • 10000g' de oda sıcaklığında 1 dakika boyunca santrifüj edilir. • Santrifüj sonrasında spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılır. • Kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu II eklenir. • Maksimum hızda oda sıcaklığında 3 dakika boyunca santrifüj edilir. • Kolon hasta/katılımcı isimlerinin yazılmış olduğu 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılır
DNA Elüsyon Aşaması	• Kolon üzerine 200 µl elüsyon tampon eklenir. • Oda sıcaklığında 90 saniye boyunca inkübe edilir. • Maksimum hızda oda sıcaklığında 90 saniye boyunca santrifüj edilir.
DNA' nın Saklama Koşulları	• Elüsyon aşaması ile kolondan mikrosantrifüj tüpüne aktarılan DNA örnekleri - 20ºC' de saklanır.

DNA izolasyonundan sonra DNA'ların kalitesinin ve miktarının kontrol edilmesi, çalışmada yapılan işlemlerin optimizasyonu için gereklidir. Bunun için hem agaroz jel, hem de spektrofotometrik ölçümler kullanılmıştır. Bu aşamada dNTP set (100 nM), Taq® DNA polimeraz (dNTPack) 1000 U, Primer (100 bp, 250 nM, HPLC), Universal Prob® , Taqman Master (500 rxn), Well Plate 96'lık, nükleaz free water® kullanılmıştır.

Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen DNA'ların bütünlüğünün değerlendirilmesi için % 1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Jel, 1XTBE (Tris-Borik-Asit-EDTA) içerisinde 3 µl (10 mg/ml) etidyum bromür içerecek şekilde hazırlanmıştır. İzole edilen DNA'lardan 5 µl alınarak 1 µl yükleme tamponuyla birlikte jele yüklenmiştir. Agaroz jelde 130 V'da 20 dakika yürütüldükten sonra, jel görüntüleme cihazı ile DNA bütünlüğü değerlendirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan sarf malzemeler, gerekli tampon ve solüsyonlar aşağıdaki gibidir.

1 X TBE (Tris-Borik-asit-EDTA) tamponu (pH: 8)

Tris base (Bio Basic Inc, TB0194)	81 g
Borik Asit (Amresco, 0588)	41.5 g
EDTA (0.5 M)	30 ml

- Tartılan kimyasallar dH_2O içerisinde çözülür, pH 8'e ayarlanır ve dH_2O ile son hacim 750 ml'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.
- Presipitat oluşmuş ise kullanılmaz.

0.5 M EDTA

EDTA (AppliChem, A2937)	18.61 g
NaOH (Sigma-Aldrich, 06203)	≈2 g

- EDTA dH_2O içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür, dH_2O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
- pH NaOH ile 8.0'e ayarlanır.
- EDTA içerisindeki disodyum tuzları pH 8'e gelmeyince çözünmemektedir.

Etidyum bromür (10 mg/ml stok)

Etidyum bromür (AppliChem, A1151)	10 mg
sdH_2O	1 ml

- Etidyum bromür dH_2O içerisinde vortekslenerek çözülür.
- Işığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak + 4 °C'de saklanır.

Jel yükleme tamponu

PCR ürünlerinin, yoğunluğunun arttırılmasıyla, söz konusu ürünlerin agaroz jeldeki kuyucuklara düzgün olarak aktarılabilmesi için jel yükleme tamponu kullanılmıştır.

Xylene Cyanol (Amresco, 0819)	25 mg
Gliserol (AppliChem, A2926)	5 ml

dH_2O ile 10 ml'ye tamamlanır.

- 14 ml'lik falkon tüpü içerisinde vortekslenerek karıştırılır.
- Alüminyum folyo ile sarılarak + 4 °C'de saklanır.

Yürütme Tamponu

DNA'nın elektroforetik hareketliliğini sağlayan yürütme tamponu, konsantre stok (1XTBE) olarak hazırlanmış olan tampondan 10 kat sulandırılarak (10XTBE) hazırlanır.

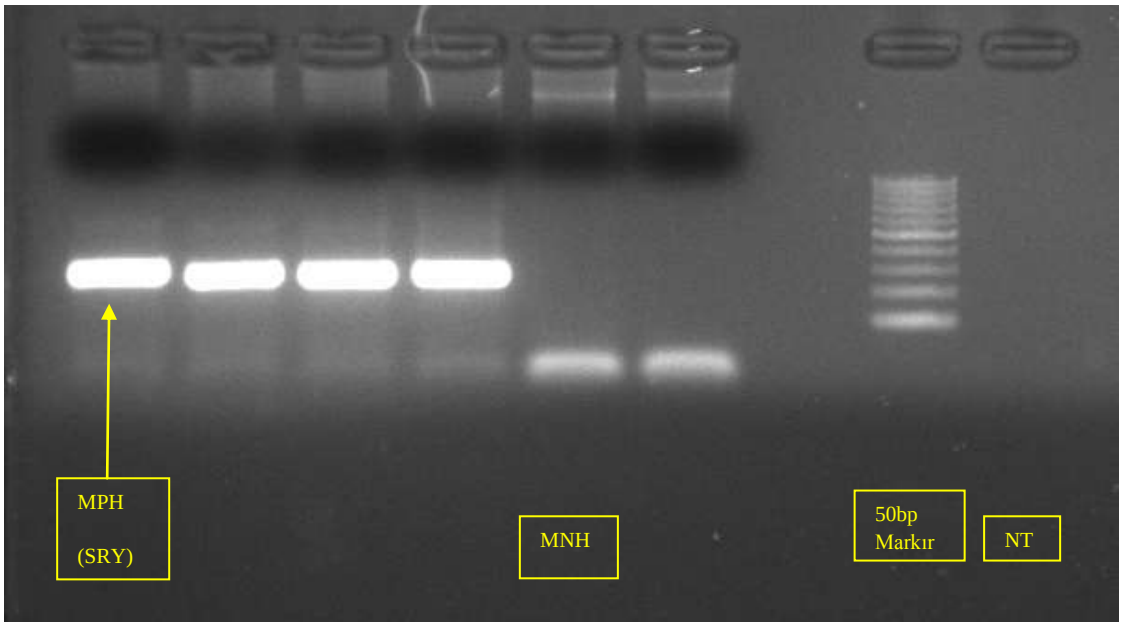
Spektrofotometre ile ölçüm

İzole edilen DNA örneklerinin, miktarlarını ve saflık oranlarını belirlemek amacıyla spektrofotometrik ölçümler alınmıştır. Spektrofotometrik ölçüm aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- Çözülmüş DNA örneğinden 2 μl alınır.
- Spektrofotometrede ölçümler OD_{260} ve OD_{280} değerleri dikkate alınarak yapılır.
- 260 ve 280 nm'deki optik dansite değerlerinin oranı (OD_{260}/OD_{280}) hesaplanarak DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlenir.

Aşağıdaki şekilde; agaroz jel elektroforezinde erkek Y kromozomu materyali (SRY bölgesi) içeren DNA bölgeleri gösterilmiştir (Şekil 3.1).

Örnekler 1/1 - 1/1000 dilüsyona kadar dilüe edilmiştir. Amplifikasyonların gösterilmesinde Light Cycler® ve Light Cycler® Fast Start DNA Master PLUS Reaction kit kullanılmıştır. Bu cihazda elde edilen verilerin analizinde, DYS14 (Y kromozom spesifik DNA dizisi) varlığının gösterilmesinde Light Cycler 480II® programından faydalanıldı. Amplifikasyon için kullanılan baz dizilimleri; SRY-F (Forwad Primer) 5'-TGGCGATTAAGTCAAATTCGC-3' ve SRY-R (Reverse Primer) 5'-CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT-3' şeklindeydi. DNA materyallerinin kuyucuklara yerleştirilmesi işlemi sırasında her defasında farklı eldiven kullanıldı, kuyucukların hazırlanması ve koruyucu kılıfın açılmasında özellikle dikkat edildi, aerosol-rezistan pipetler kullanıldı, işlemde ortamda erkek bulunmaması ve bir bayan tarafından yapılarak tüm kontaminasyonların önlenmesi sağlandı.



Şekil 3.1. Agaroz Jel Elektroforezinde Erkek Y kromozomu materyali (SRY bölgesi) içeren DNA bölgeleri. MPH, mikrokimerizm pozitif hasta – SRY (sex determining region of Y, 137 bp); MNH, mikrokimerizm negatif hasta; NT, non-templated (su ile yapılan negatif kontrol).

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz Yöntemleri

Verilerin kaydı ve istatiksel analizi için SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL 60606, USA) 16.0 paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistiksel veriler ortalama±standard sapma (ortanca, minimum-maksimum) olarak sunuldu. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normallik testleri ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan verilerin değerlendirilmesinde parametrik testler, dağılımı normal olmayanlar için ise non-parametrik testler kullanıldı. Pearson ki-kare testi (korelasyon analizi), bağımsız örneklem testi, ANOVA, Mann-Whitney testi ve Kruskal-Wallis testi kullanıldı. $p<0.05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada 80 sistemik sklerozlu kadın hasta değerlendirildi. 50 (% 62.5) lkSSk, 30 (% 37.5) dkSSklu hasta incelendi (Tablo 4.1). LkSSklu hastaların ortalama yaşları 46.20±14.691 (44, 18-80) yıl, diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastaların yaş ortalamaları 47.23±14.171 (44, 27-76) yıldı.

Kontrol grubunda 40 kadın değerlendirildi (Tablo 4.1). Kontrol grubunun yaş ortalaması 42.55±11.408 (40, 28-73) yıl olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş açısından fark yoktu (p= 0.375) (Tablo 4.1). Kontrol grubunda; 37 kadın (% 92.5) erkek çocuk sahibi, 1 kadın (% 2.5) hiç doğum yapmamış (nullipar), 2 tanesi (% 5) de kız çocuk sahibiydi (Şekil 4.1).

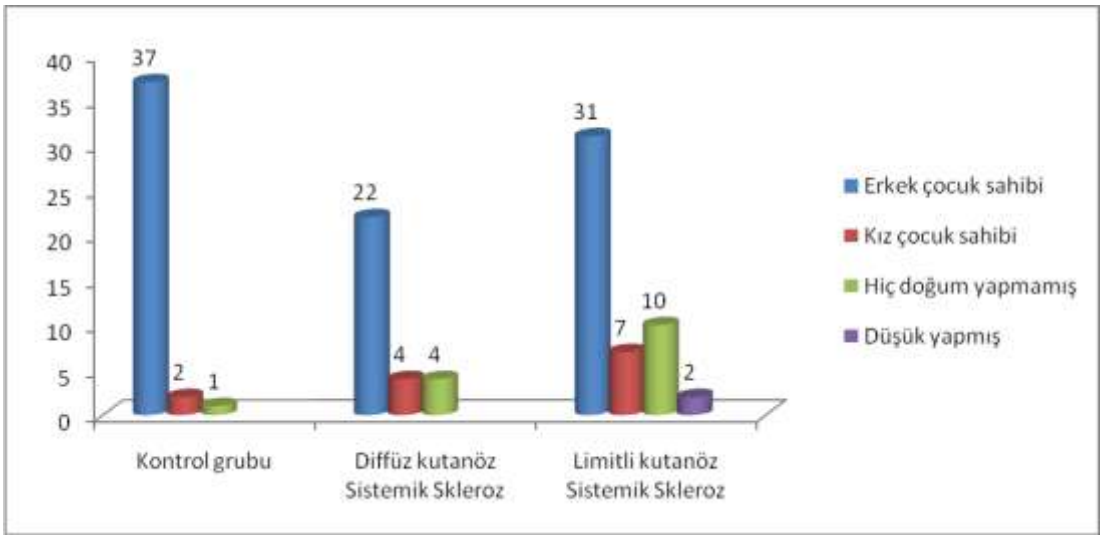
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının sayı ve yaş açısından dağılımı

Gruplar	**N (%)**	**Ortalama Yaş**	**Ortanca Yaş**	**Standart Sapma**	**Minimum**	**Maximum**	***P***
dkSSk	30 (%37.5)	47.23	44	14.171	27	76	0.375
lkSSk	50 (%62.5)	46.20	44	14.691	18	80	
Kontrol	40	42.55	40	11.408	28	73	

dkSSk, diffüz kutanöz sistemik skleroz; lkSSk, limitli kutanöz sistemik skleroz.

Toplam 53 (% 66.25) hastanın erkek çocuğu vardı. Diffüz kutanöz sistemik sklerozlu kadın hastaların 22 tanesi (% 73.3) erkek çocuk sahibi, 4 tanesi (% 13.3) kız çocuk sahibi, 4 tanesi (% 13.2) hiç doğum yapmamıştı (Şekil 4.1).

Limitli kutanöz kutanöz sistemik sklerozlu kadın hastaların 31 tanesi (% 62) erkek çocuk sahibi, 7 tanesi (% 14) kız çocuk sahibi, 10 tanesi (% 20) hiç doğum yapmamış ve 2 tanesi (% 4) düşük yapmıştı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çocuk sahibi olma durumuna göre grupların dağılımı

Diffüz kutanöz sistemik sklerozlu gruptaki hastaların çocuk sayıları ortalama 2.69±1.37 (1-6), limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastaların çocuk sayıları ortalama 2.76±1.21 (1-6), kontrol grubunda ise çocuk sayısı ortalama 1.74±0.91 (1-5) olarak hesaplandı. Bu açıdan hasta ve kontrol grupları arası fark istatiksel olarak anlamlı bulundu ($p< 0.05$) (Tablo 4.2).

Hastalık süreleri ise limitli kutanöz sistemik skleroz grubunda ortanca 4 (1-28) yıl, diffüz kutanöz sistemik skleroz grubunda ortanca 9 (1-35) yıldı. Hastalık süreleri açısından iki grup arasındaki fark anlamlıydı (Mann-Whitney test, $p= 0.001$).

Kontrol grubundaki kadınların ilk doğumdaki yaşları ortalama 26.21±3.819 (17-34) yıldı. Diffüz kutanöz sistemik sklerozlu kadın hastaların ilk doğumdaki yaşları ortalama 24.92±5.176 (17-37) yıl, limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastaların ilk doğumdaki yaşları ortalama 24.11±3.889 (18-33) yıl olarak saptandı (Oneway ANOVA). Arada anlamlı fark yoktu ($p= 0.095$) (Tablo 4.2). Doğum ile tanı arasındaki geçen süre, diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastalarda ortalama 10.2 (ortanca 7.5, 0-30) yıl, limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastalarda ortalama 14.32 (ortanca 12, 0-55) yıl olarak hesaplandı. Bu açıdan anlamlı fark yoktu ($p= 0.390$).

Diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastaların tanıdaki yaşları ortalama 36.10±11.897 (33.5, 18-56) yıl, limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastaların tanıdaki yaşları

ortalama 40.14±14.231 (37.5, 15-77) yıl olarak hesaplandı. Bu açıdan da arada anlamlı fark yoktu (p= 0.188) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Sistemik Skleroz hasta ve kontrol gruplarının diğer özellikleri.

	Diffüz kutanöz Sistemik Skleroz	**Limitli kutanöz Sistemik Skleroz**	**Kontrol**	***P***
Hastalık süresi (yıl)	11.47±8.986 (9, 1-35)	6.20±6.593 (4, 1-28)		0.001*
İlk doğumdaki yaşları (yıl)	24.92±5.176 (17-37)	24.11±3.889 (18-33)	26.21±3.819 (17-34)	0.095
Doğum ile tanı arası süre (yıl)	10.2±9.463 (7.5, 0[£]-30)	14.32±14.2 (12, 0[£]-55)		0.390
Tanıdaki yaşları (yıl)	36.10±11.897 (33.5, 18-58)	40.14±14.231 (37.5, 15-77)		0.188
Çocuk sayıları (n)	2.69±1.37 (1-6)	2.76±1.21 (1-6)	1.74±0.91 (1-5)	<0.05*

*İstatiksel olarak anlamlı.[£] Hiç doğum yapmamış ve/veya bekar hastalardan dolayı.

Cilt skorları (modRSS); diffüz kutanöz sistemik skleroz grubunda ortanca 22 (12-26), limitli kutanöz sistemik skleroz grubunda ise ortanca 10 (4-24) idi. Her iki grup arasındaki fark anlamlıydı (p< 0.05). Hastalık şiddet skalasına (Medsger'e göre) baktığımızda ise; diffüz kutanöz sistemik skleroz grubunda ortanca 2 (1-3), limitli sistemik skleroz grubunda ise ortanca 1 (1-2) idi. Hastalık şiddeti açısından aradaki fark anlamlıydı (p< 0.05). Erkek çocuk sahibi olan dkSSK'lu hastaların Modifiye Rodnan cilt skorları ortanca 22 (12-26), erkek çocuğu olmayan grupta ise ortanca 24 (14-24) idi. Erkek çocuk sahibi lkSSK'lu hastaların ortanca cilt skorları 8 (4-14), olmayan hastaların ise ortanca 10 (4-24) idi. Arada anlamlı fark yoktu (sırasıyla, p= 0.872 ve p=0.577). Erkek çocuk sahibi olan dkSSK'lu grupta hastalık şiddet skoru ortanca 2 (1-3), olmayan grupta ise ortanca 2 (1-2) idi. Erkek çocuk sahibi olan lkSSK'lu grupta ortanca 1 (1-2), olmayan grupta ortanca 1 (1-2) idi. Arada anlamlı fark yoktu (sırasıyla, p= 0.447 ve p= 0.296) (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4).

Tablo 4.3. Diffüz kutanöz Sistemik sklerozlu erkek çocuk sahibi olan ve olmayan hastaların; cilt skorları ve hastalık şiddet skorlarının karşılaştırılması

	Erkek çocuk sahibi olan DkSSk	**Erkek çocuk sahibi olmayan DkSSk**	***P***
Modifiye Rodnan Cilt Skoru	21.00±3.988 (22, 12-26)	21.25±4.132 (24, 14-24)	0.872
Medsger hastalık şiddet skoru	1.95±0.375 (2, 1-3)	1.75±0.463 (2, 1-2)	0.447

DkSSk; diffüz kutanöz sistemik skleroz.

Tablo 4.4. Limitli kutanöz Sistemik sklerozlu erkek çocuk sahibi olan ve olmayan hastaların; cilt skorları ve hastalık şiddet skorlarının karşılaştırılması

	Erkek çocuk sahibi olan LkSSk	**Erkek çocuk sahibi olmayan LkSSk**	***P***
Modifiye Rodnan Cilt Skoru	9.23±3.127 (8, 4-14)	10.53±5.157 (10, 4-24)	0.577
Medsger hastalık şiddet skoru	1.03±0.18 (1, 1-2)	1.11±0.315 (1, 1-2)	0.296

LkSSk; limitli kutanöz sistemik skleroz.

Raynaud fenomeni; diffüz kutanöz sistemik sklerozlu 28 hastada (% 93.3), limitli kutanöz sistemik sklerozlu 47 hastada (% 94) saptandı. Limitli grupta biraz fazla gibi olsada aradaki fark anlamlı değildi (p> 0.05). Diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastaların ortanca PAB değeri 28 (20-50) mmHg, limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastaların ortanca PAB değeri ise 25 (20-45) mmHg idi. Aradaki fark anlamlıydı (p= 0.001). Kardiyak tutulum dkSSk grubunda 5 hastada (% 16.7), lkSSk grubunda 3 hastada (% 6) gözlendi. Pulmoner hipertansiyon dkSSk grubunda 6 hastada (% 20),

lkSSk grubunda 3 hastada (% 6) saptandı. Her iki açıdan da aradaki fark anlamlı değildi (p> 0.05) (Tablo 4.5).

Gastrointestinal sistem tutulumu ise diffüz kutanöz sistemik sklerozlu grupta 23 hastada (% 76.7), limitli kutanöz sistemik sklerozlu grupta ise 20 hastada (% 40) saptandı. Pearson ki-kare testi ile anlamlı fark bulundu (p= 0.001). Diffüz kutanöz sistemik sklerozlu grupta limitli kutanöz sistemik sklerozlu gruba göre gastrointestinal sistem tutulumu 4.92 kat daha fazlaydı (Odds ratio 4.92, % 95 güven aralığı 1.78-13.70). Renal tutulum limitli sistemik sklerozlu 1 hastada (% 2) mevcuttu. İnterstisyel akciğer hastalığı diffüz kutanöz sistemik sklerozlu 13 hastada (% 43.3), limitli kutanöz sistemik sklerozlu 2 hastada (% 4) saptandı. Pearson ki-kare testi ile anlamlı fark bulundu (p< 0.05). İnterstisyel akciğer hastalığı diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastalarda limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastalara göre 18.52 kat daha fazlaydı (Odds ratio 18.52, % 95 güven aralığı 3.74-90.91) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Sistemik skleroz hasta gruplarının organ tutulumları açısından dağılımı

	DkSSk N (%)	**LkSSk N (%)**	***P***	***Odds Ratio***
Gastrointestinal sistem tutulumu	23 (%76.7)	20 (%40)	0.001*	4.92[a]
Raynaud fenomeni	28 (%93.3)	47 (%94)	>0.05	
Kardiyak tutulum	5 (%16.7)	3 (%6)	>0.05	
Renal tutulum (SRK)	-	1 (%2)		
İnterstisyel akciğer hastalığı	13 (%43.3)	2 (%4)	<0.05*	18.52[b]
Pulmoner hipertansiyon [c]	6 (%20)	3 (%6)	>0.05	

*İstatiksel olarak anlamlı; [a] % 95 güven aralığı: 1.78-13.70; [b] % 95 güven aralığı: 3.74-90.91; [c] her iki grup arasında ortanca PAB değerleri açısından aradaki fark anlamlıydı (p= 0.001). DkSSk, diffüz kutanöz sistemik skleroz; LkSSk, limitli kutanöz sistemik skleroz; SRK, skleroderma renal kriz.

ANA pozitifliği dkSSk grubunda 29 hastada (% 96.7), lkSSk grubunda 47 (% 94) bulundu (P> 0.05). Anti-Scl-70 diffüz kutanöz sistemik sklerozlu 23 hastada (% 76.7), limitli kutanöz sistemik sklerozlu 13 hastada (% 26) pozitif saptandı. Her iki grup arasındaki fark anlamlıydı (p< 0.05) ve Anti-Scl-70 pozitifliği diffüz kutanöz

sistemik sklerozlu hastalarda limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastalara göre 9.34 kat daha fazla pozitif olarak saptandı (Odds ratio 9.34, % 95 güven aralığı 3.26-27.02). Anti-sentromer antikoru ise dkSSk grubunda 2 hastada (% 6.7), lkSSk grubunda ise 20 hastada (% 40) pozitifti. Bu açıdan da aradaki fark anlamlı ($p< 0.05$) ve limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastalarda diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastalara göre 9.33 kat daha fazla pozitif olarak saptandı (Odds ratio 9.33, % 95 güven aralığı 1.997-43.627) (Tablo 4.6).

Limitli sistemik sklerozlu 5 hastada (% 10) anti-U1-RNP pozitif olarak bulundu. Diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastalarda ise bu pozitifliğe rastlanmadı ($p >0.05$). Anti-SS-A ise dkSSK'lı 5 hastada (% 16.7), lkSSK'lı 13 hastada (% 26) pozitif olarak bulundu, bu açıdan fark anlamlı değildi ($p> 0.05$). Anti-SS-B ise dkSSk'lı 1 hastda (% 3.3), lkSSk'lı 6 hastada (% 12) bulundu, bu açıdan fark yoktu ($p> 0.05$). Anti-Ku pozitifliği lkSSk'lı 1 hastada (% 2) bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Sistemik skleroz hasta gruplarının otoantikor profilleri açısından dağılımı.

	DkSSk N (%)	**LkSSk N (%)**	***P***	***Odds Ratio***
ANA pozitifliği	29 (%96.7)	47 (%94)	>0.05	
Anti-Scl-70 pozitifliği	23 (%76.7)	13 (%26)	<0.05*	9.34[a]
Anti-sentromer pozitifliği	2 (%6.7)	20 (%40)	<0.05*	9.33[b]
Anti-SS-A pozitifliği	5 (%16.7)	13 (%26)	>0.05	
Anti-SS-B pozitifliği	1 (%3.3)	6 (%12)	>0.05	
Anti-U1-RNP pozitifliği	-	5 (%10)	>0.05	

*İstatiksel olarak anlamlı; [a] % 95 güven aralığı: 3.26-27.02; [b] % 95 güven aralığı: 1.997-43.627; DkSSk, diffüz kutanöz sistemik skleroz; LkSSk, limitli kutanöz sistemik skleroz.

Eşlik eden hastalıklar açısından baktığımızda ise; Ankilozan Spondilit (HLA-B27 pozitif) 2 (% 6.6) diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastada mevuttu. Bu iki hastadan biri 27 yaşında bekar, diğeri ise 62 yaşında ve bu diğer hastanın babasının kız kardeşi (halası) idi. Diabetes mellitus; 4 lkSSk'lı hastada (% 8), ve 1 tane dkSSk'lı hasta (% 3.3) da saptandı. FMF 1 lkSSk'lu hastada (% 2) ve Meniere hastalığı 1 lkSSk'lu

hastada (% 2) gözlendi. Kikuchi Fujimato hastalığı 1 lkSSk'lı hasta (% 2) ve kronik HCV 1 dkSSK'lu hasta (% 3.3) izlendi. Limitli kutanöz sistemik sklerozlu 1 hasta (% 2) da Primer Biliyer Siroz eşlik ediyordu. Yine 1 lkSSk'lu hastada (% 2) otoskleroz ve 3 hastada (% 6) hipotiroidi vardı.

Mikrokimerizm varlığı açısından baktığımızda ise kontrol grubunda 8 kadında (grup içi % 20, tüm gruplar arasında % 22.2), diffüz kutanöz sistemik skleroz grubunda 9 kadın hastada (grup içi % 30, tüm gruplar arası % 25), limitli kutanöz sistemik skleroz grubunda 19 kadın hastada (grup içi % 38, tüm gruplar arası % 52.8) mikrokimerizm saptandı. Bu açıdan gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p= 0.180).

Diffüz kutanöz sistemk sklerozlu mikrokimerizm pozitif saptanan hastaların; 6 tanesi (%66.7) erkek çocuk sahibi, 2 tanesi (%22.2) kız çocuk sahibi, 1 tanesi (%11.1) hiç doğum yapmamış yani gebelik öyküsü olamayan (nullipar, nulligravid) kadın hasta idi. Limitli kutanöz sistemik sklerozlu mikrokimerizm saptanan hastaların 10 tanesi (%52.6) erkek çocuk sahibi, 2 tanesi (%10.5) kız çocuk sahibi, 6 tanesi (%31.6) hiç doğum yapmamış, 1 tanesi (%5.3) düşük yapmıştı. Kontrol grubunda, mikrokimerizm saptananların 7 tanesi (%87.5) erkek çocuk sahibi, 1 tanesi (%12.5) ise hiç doğum/gebelik öyküsü olmayan (nullipar-nulligravid) kadındı (Tablo 4.7).

Mikrokimerizm varlığı ile akciğer tutulumu (p= 0.555), renal tutulum (p >0.05), raynaud fenomeni (p= 0.337), kardiyak tutulum (p= 0.706), pulmoner hipertansiyon (p= 0.483), interstisyel akciğer hastalığı (p= 0.177) arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Mikrokimerizm saptanan hastaların ortanca pulmoner arter basınçları 25 (20-40) mmHg, mikrokimerizm olmayan grupta ise PAB değerleri ortanca 26 (20-50) idi. Bu açıdan da aradaki fark anlamlı değildi (p= 0.151).

Mikrokimerizm ile ANA pozitifliği (p= 0.609), anti-Scl-70 pozitifliği (p= 0.777), anti-sentromer pozitifliği (p= 0.372), anti-U1-RNP pozitifliği (p= 0.653), anti-SS-A pozitifliği (p= 0.694), anti-SS-B pozitifliği (p= 0.232) arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Tablo 4.7. Mikrokimerizm varlığı ve çocuk sahibi olma durumuna göre grupların dağılımı.

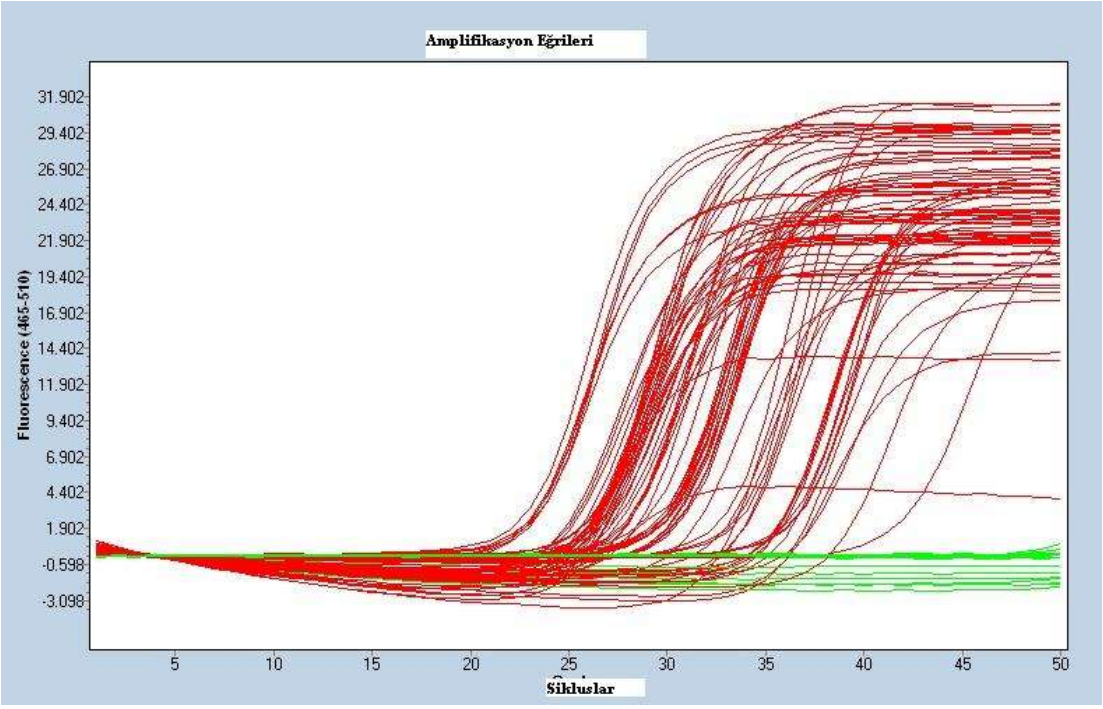
	DkSSk	**LkSSk**	**Kontrol**	***P***
Mikrokimerizm n(%)				
Erkek çocuk sahibi n(%)	6 (66.7)	10 (52.6)	7 (87.5)	
Kız çocuk sahibi n(%)	2 (22.2)	2 (10.5)		
Hiç doğum yapmamış (nullipar-nulligravid) n(%)	1 (11.1)	6 (31.6)	1 (12.5)	**>0.05**
Düşük yapmış n(%)		1 (5.3)		
Toplam n(%)	9 (25)	19 (52.8)	8 (22.2)	

Mikrokimerizm saptanan hastaların Modifiye Rodnan Cilt skorları ortancası= 10 (4-24), mikrokimerizm saptanmayan hastaların cilt skorları ise ortanca= 13 (4-26) idi. Bu açıdan iki grup arasındaki fark anlamlıydı (Mann-Whitney test, p= 0.038). Medsger's hastalık şiddet skalası ise mikrokimerizm pozitif saptanan grupta ortanca 1 (1-2), mikrokimerizm olmayan grupta ise 1 (1-3), aradaki fark anlamlı değildi (p= 0.118). Mikrokimerizm saptanan 28 hastanın 21 tanesinde (%75) Medsger' hastalık şiddet skalası 1, 7 tanesinde (% 25) ise hastalık şiddet skalası 2 olarak hesaplandı.

Mikrokimerizm var olan hastaların çocuk sayıları ortanca 2 (1-5), çocuk yaşları ortanca 20 (1-50) yıl olarak bulundu. Mikrokimerizm varlığı ile çocuk sayısı ve çocuk yaşları arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla, p= 0.881 ve p= 0.865).

Tüm gruplarda mikrokimerizm saptanan kadınların yaş ortalamaları 44.25±13.95 (42.5, 18-76) yıl, saptanmayan kadınların ise yaş ortalamaları 45.67±13.47 (41.5, 27-80) yıl olarak hesaplandı. Mikrokimerizm saptanan diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hastaların yaş ortalamaları 45.11±13.71 (43, 30-76) yıl, limitli kutanöz sistemik sklerozlu hastaların yaş ortalamaları 42.79±15.28 (38, 18-70) yıl, kontrol grubunda ise ortalama 46.75±11.99 (46.5, 31-65) yıl olarak bulundu.

İlk doğum ve sistemik skleroz semptomlarının ortaya çıkışı (tanı) arasında geçen süre mikrokimerizm saptanan grupta ortanca 3.5 (0-49) yıl, mikrokimerizm saptanmayan grupta ise ortanca 14 (0-55) yıl idi. Aradaki fark istatiksel olarak anlamlıydı (Mann-Whitney test, p= 0.020). Tüm gruplarda mikrokimerizmin varlığı Light Cycler ® cihazında (RT-PCR ile) DNA amplifikasyon eğrileri elde edilerek gösterildi ve doğrulandı (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. Light Cycler ® cihazında DNA amplifikasyon eğrileri

5. TARTIŞMA

Sistemik skleroz, doğum yapmış ve özellikle erkek çocuk sahibi kadınlarda daha sık görülmektedir. Fetal hücrelerin plasental yolla anne kanına geçişi gebeliğin 4-5. haftası gibi çok erken dönemde başlamaktadır (72). Bu hücre geçişi tek yönlü olmayıp maternal hücrelerde fetal dolaşıma geçebilmektedir. Aslında gebeliğin oluşumu ve devamında belli bir eşik değerin üzerinde fetal hücrenin anne kan dolaşımına geçmesi gereklidir. Bu eşik değerin altında fetal hücre geçişinde gebelik düşükle sonlanabilmekte iken, eşik değerden fazla hücre geçişi ise otoimmün hastalıklara yatkınlık ve gebelik komplikasyonlarına yol açabilmektedir. Gebelik boyunca annede immün sistemde "klonal delesyon" sonucu, fetusa karşı periferik antijen-spesifik toleransın geliştiği ve bunun sonucunda gebeliğin devamının sağlandığı çeşitli fare hayvan deneylerinde gösterilmiştir (73-75).

Aractingi ve ark. yaptıkları bir çalışmada gebeliğin polimorfik erüpsiyonuna sahip kadınların bu lezyonlarından yapılan cilt biyopsilerinde erkek fetal hücre DNA'larını göstermişlerdir (76). Mikrokimerizm diğer bazı gebelik komplikasyonları ile de ilişkili bulunmuştur. Gebelikte anne kanında dolaşan fetal hücrelerin tesbitinde, PCR, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time, RT-PCR), manyetik hücre işaretleme, FISH gibi teknikler kullanılmaktadır. Bu fetal hücreler uzun ömürlü olup gebelik sonrası yıllar boyunca varlıklarını sürdürebilmekte ve bu olay yalancı pozitif sonuçlara yol açabilmektedir.

Allojeneik nakiller sonrası görülebilen GVHH ile sistemik skleroz arasındaki benzerliklerden dolayı, hala tam olarak ispatlanmamışda olsa, fetal mikrokimerik hücrelerin sistemik skleroz patogenezinde rol oynayabileceği ve/veya bir inflamasyon belirteci olabileceği düşünülmüştür. Bu fetal mikrokimek hücreler CD3, CD4 T hücre belirteçleri taşımasına rağmen, gebelik süresince gelişen immün toleranstan dolayı reaksiyon gelişmemektedir. Sistemik skleroz patogenezinde bu hücrelerin rolünün olabileceği, ilk kez Scott Pereira tarafından gündeme getirilmiştir (77). "Sklerodermanın; anne ile fetüs arasındaki transplasental hücre geçişi sonucunda gelişen, bir kronik GVHH formu olabileceği" yine değişik yazarlarca

bildirilmiştir (77). Sistemik skleroz "kompleks heterojen bir hastalıktır". GVHH'e benzer olarak vücudun kendi yapılarına karşı humoral ve hücresel yanıtlar hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Hem sistemik skleroz hem de GVHH'de immün sistem aktivasyonu ve T lenfositler, doku hasarı ve/veya inflamasyonun gelişimde önemlidir.

Sistemik sklerozlu hastaların kanlarında fetal mikrokimerik hücrelerin varlığı değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin sistemik sklerozlu kadınların cilt biyopsilerinde de saptanabileceği bildirilmiştir. Özellikle erkek çocuk sahibi sistemik sklerozlu kadın hastalarda Y kromozom sekanslarına sahip DNA taşıyan otolog olmayan bu mikrokimerik hücrelerin, GVHH benzeri bir reaksiyonu tetikleyebileceği ve bu hastalığın patogenezinde rol alabileceği vurgulanmıştır (78-81).

Fakat bu hücrelerin varlığının gösterilmesi önemli ve zor bir işlemdir. 30 diffüz kutanöz sistemik skleroz, 17 limitli kutanöz sistemik sklerozlu ve 22 sağlıklı kadının incelendiği bir çalışmada CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde kantitatif PCR ile Y kromozom sekansları içeren DNA'lar araştırılmış. Bu çalışmada sistemik sklerozlu hastalarda % 82.9 (39/47 hasta), kontrol grubunda ise % 63.6 (14/22 kontrol) mikrokimerizm saptanmıştır. Bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P= 0.138). Diffüz kutanöz grupta 26/30 (% 86.7), limitli kutanöz grupta, 14/17 (% 82.4) hastada mikrokimerizm saptanmış, yine iki hasta grubu arasında da mikrokimerizm açısından fark bulunmamıştır (P= 1.0). Bu T hücreler daha çok CD4+ T hücrelerden oluşmaktaydı. CD4+ ve CD8+ mikrokimerik hücrelerin aktive olduklarında CD25 (IL-2 reseptör) ekspresse ettikleri ve oligo-klonal ekspansiyona uğradıkları öne sürülmüştür. Fakat bu çalışmada cilt tutulumunun yaygınlığı, hastalık şiddeti dikkate alınmamıştır (49).

Bizim çalışmamızda RT-PCR tekniği ile sistemik sklerozlu hasta grubunda % 35 (28/80 hasta), kontrol grubunda ise % 20 (8/40 kontrol) mikrokimerizm saptadık. Arada istatiksel olarak anlamlı fark yoktu (p= 0.180). Çalışmamızda diffüz kutanöz sistemik sklerozlu grupta 9/30 (% 30), limitli kutanöz grupta 19/50 (% 38) olarak hesaplandı, aradaki fark anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Yine bir başka çalışmada sistemik sklerozlu kadınların aktif lezyonlarından izole edilen erkek fetal mikrokimerik T hücre klonlarının primer olarak TH2 orijinli olduğu ve anne HLA antijenlerine karşı reaksiyona yol açtığı gösterilmiştir. Bu mikrokimerik hücrelerin gebelik, transplantasyon, doku hasarının tamiri, tip 1 diabetes mellitus dahil diğer bir çok otoimmün hastalıkta, meme kanserinde ve diğer bazı malignitelerde koruyucu role sahip olduklarına dair kanıtlar gösterilmiştir. Fakat bu hücreler sağlıklı kadınlarda da tesbit edilebilmektedir. Hala açıklığa kavuşmamış olan bu durum, bu mikrokimerik hücrelerin nasıl aktive olup sistemik sklerozu başlatabildiği konusudur (80-84).

Sawaya ve ark. çalışmalarında sistemik sklerozlu erkek çocuk sahibi kadınların tutulum olan ve olmayan cilt bölgelerinden yapılan biyopsilerde fetal mikrokimerik hücrelerin varlığını kantitatif olarak göstermeye çalışmışlardır. Bu çalışmada ortalama yaşları 55.8 yıl (46-68) ve hastalık süreleri 2.5 yıl (0.83-6) olan 5 diffüz kutanöz sistemik sklerozlu kadın hasta değerlendirilmiştir. FISH ile RT-PCR tekniği yine bu çalışmada karşılaştırılmış ve sistemik sklerozlu hastaların tutulum olmayan bölgelerden yapılan cilt biyopsilerinde CD4+ mikrokimerik T lenfositler saptanmıştır. Bu çalışmada RT-PCR tekniği FISH'den daha sensitif bulunmuştur. Yine bu çalışmada cilt biyopsilerinde en son doğumdan yaklaşık 50 yıl sonra mikrokimerik hücreler tesbit edilebilmiştir. Buda bize hastalığın erken döneminde mikrokimerik hücrelerin tutulum olmayan cilt bölgesinde yüksek konsantrasyonda saptandığı, daha sonra ise bakteriyel, viral, kimyasal bir tetikleyici sonucu hastalığın gelişerek inflamatuvar hücre göçü sonucu mikrokimerik hücre oranının azaldığını göstermektedir. Mikrokimerik hücrelerin uzun ömürlü oluşu, doğum yapmamış veya erkek sistemik sklerozlu hastalarda, bu hastalığın gelişimini açıklayabilir. Bazı çevresel nedenlerin (viral ve diğer enfeksiyonlar, kimyasal veya diğer faktörler gibi) aktive ettiği mikrokimerik hücrelerin "hedef mikroçevreye" göçü neticesinde (örneğin sistemik sklerozda hedef cilt, akciğer, kalp veya diğer organlar olabilmektedir) otolog inflamatuvar hücrelerin inflame alanda yerleşmesi, pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı, fibroproliferatif ve vasküler olaylar sonucu sistemik sklerozun gelişebileceği ileri sürülmüştür. (84).

Çalışmamızda diffüz kutanöz grupta hastalık süresi ortalama 11.47±8.986 (9, 1-35) yıl, limitli kutanöz grupta ise ortalama 6.20±6.593 (4, 1-28) yıl olarak hesaplandı. İlk doğum ve sistemik skleroz semptomlarının ortaya çıkışı (tanı) arasında geçen süre, mikrokimerizm saptanan grupta ortanca 3.5 (0-49) yıl, mikrokimerizm saptanmayan grupta ise ortanca 14 (0-55) yıl idi. Aradaki fark istatiksel olarak anlamlıydı (Mann-Whitney test, p= 0.020). Bu durum bize mikrokimerizmin hastalığın ortaya çıkış süresini kısalttığını ve böylece hastalığın gelişiminde tetikleyici bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda periferik kan mononükleer hücrelerinde mikrokimerizm varlığı diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hiç doğum yapmamış (nullipar-nulligravid) 76 yaşında kadın hastada tespit edildi. Bu da bize bu mikrokimerik hücrelerin kan dolaşımında uzun yıllar yaşayabileceğini göstermiştir. Ayrıca kontrol grubunda 48 yaşında hiç gebelik öyküsü olmayan (nulligravid) sağlıklı kadında mikrokimerizm saptanmıştır. Limitli kutanöz grupta mikrokimerizm saptanan, hiç doğum yapmamış hastalar ise 18, 20, 29, 34, 38 ve 60 yaşlarındaydı. Yani mikrokimerizm saptanabilen ve hiç doğum öyküsü olmayan en yaşlı hastalarımız 60 ve 76 yaşlarındaydı. Bu da bize yaşam boyu devam edebilen mikrokimerik durumun varlığını göstermektedir. Ayrıca mikrokimerizm saptanan çocuk sahibi hastaların ortanca çocuk yaşı 20 (1-50) yıldı. Yani doğumdan 50 yıl sonra bile kanda mononükleer hücrelerde mikrokimerizm varlığını göstermiş olduk.

RT-PCR tekniği ile periferik kanda mikrokimerik hücrelerin 100 hücre/100.000 maternal hücre oranında saptanabileceği gösterilmiştir. C57BL/6J fareleri ile yapılan çalışmalarda bu oran 2/100.000 konak hücresine kadar yükselmiştir. Bu mikrokimerik T lenfositlerin, anne kan dolaşımında en son gebelikten 40 yıl sonrasında bile, saptanabileceği ifade edilmektedir (85). Artlett ve ark. yaptığı bu çalışmada, yaklaşık 75.000 konak hücresine karşılık 1 mikrokimerik hücre kanda tesbit edilebilmiştir. Seçilecek olan "DNA primer"ı ve probunun önemi vurgulanmıştır (86). PCR amplifikasyonu veya nested PCR tekniği kullanılarak periferik kan da Y kromozom sekansları içeren DNA'lar saptanmaya çalışılmıştır. Fakat bu çalışmalar, mikrokimerik hücreleri göstermede bize çok bir fayda sağlamayacağını göstermiştir (86-88). Çok fazla sayıda otolog hücrenin varlığı bu

işlemi zorlaştırmıştır. PCR öncesi manyetik hücre işaretleme tekniği kullanıldığında ise, erkek mikrokimerik hücrelerin > 250 kat daha fazla hassasiyetle bulunabileceği bildirilmiştir (89).

İtalya'da yapılan bir çalışmada, nested-PCR ve RT-PCR teknikleri kullanılarak sistemik sklerozlu kadın hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde mikrokimerizm varlığı, klinik ve serolojik bulguları ile ilişkisi araştırılmış, nested-PCR tekniği ile 54 sistemik sklerozlu kadın hastanın 41 tanesinde (% 76) Y kromozom spesifik sekanslar saptanırken, RT-PCR ile 8 tanesinde (% 15) saptanabilmiş. Hiç erkek çocuk doğurmamış, düşük öyküsü olmayan 19 hastanın, 2 tanesinde (% 10) RT-PCR ile 13 tanesinde (% 68) ise nested PCR ile mikrokimerizm saptanmıştır. Nested PCR yüksek sensitivite fakat düşük spesifitede bulunmuştur. Sistemik skleroz alt tipleri (diffüz, limitli kutanöz), hastalık aktivitesi ve organ tutulumu tipi ile mikrokimerizmin ilişkisi gösterilememiştir (90). Fakat, SLE'li hastalarda yine nested PCR ile mikrokimerizmin hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (91). Süreğen mikrokimerizm varlığının konak için faydalı ve/veya zararlı etkileri, biyolojik önemleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Büyüme-gelişme, doku tamiri, infeksiyonlara yanıtın çeşitliliği, immün sürvelians ve otoimmünitede rolü olabileceğine inanılmaktadır (91).

Mikrokimerik hücrelerin zaman ve hastalık aktivitesi ile ilgili olarak "fluktuasyon" gösterebileceğinden dolayı kan örneğinin alınma zamanı da önemlidir. Bizim çalışmamızda mikrokimerizm saptanan diffüz kutanöz sistemik sklerozlu 1 hastada farklı zamanlarda alınan kan örneklerinde ise mikrokimerizm saptanamamıştır. Bu durum bize mikrokimerik hücrelerin "fluktuasyon" gösterebileceğini doğrulamaktadır ve tekniğin yanı sıra zamanlamanın da önemli olduğuna işaret etmektedir. Fakat bunun doğrulanabilmesi için farklı zamanlarda, daha fazla sayıda hasta ve kontrolde bu işlem yapılmalıdır. Bu da çalışmamızda mikrokimerizm saptanmasını etkileyen bir durum (limitasyon) olabilir. Bir çalışmada sağlıklı kadınların % 22'inde periferik kan mononükleer hücrelerinde maternal mikrokimerizmin varlığı gösterilmiştir (92). Biz de çalışmamızda sağlıklı kadınların % 20'sinde periferik kan mononükleer hücrelerinde mikrokimerizm saptadık.

Değişik gruplar maternal mikrokimerik hücreleri yenidoğan erkek çocukların karaciğer, dalak, timus, tiroid dokularında ve cilt (jüvenil dermatomiyozitte), kalp kası (neonatal lupuslu, konjenital kalp bloğu olan çocuklarda) dokusunda göstermişlerdir (93-96). Sistemik sklerozlu kadın hastalarda yapılan bir çalışmada değişik dokulardan biyopsiler alınmış ve mikrokimerizmin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada en fazla mikrokimerik hücre sırasıyla; dalak, lenf nodu, akciğer, cilt, adrenal bez, karaciğer ve böbrek dokusunda saptanmıştır (97).

Ayrıca vinil klorid uygulanan farelerde otoimmünitenin indüklendiği (dermal fibrozis geliştiği) ve bu farelerin periferik kanlarında fetal mikrokimerik hücrelerin 48 kat artış gösterebildiği bildirilmiştir. Vinil klorid uygulamasının periferik kanda mikrokimerik hücrelerin aktivasyonuna, bölünme ve çoğalmalarına yol açabileceği vurgulanmıştır. Bunun da bize otoimmünite gelişmesinde mikrokimerizmin bir etken olabileceği, fakat otoimmünitenin nedeni olamayacağını ifade etmişlerdir. Yani çevresel bir maruziyetin, tetikleyicinin sonucunda fetal mikrokimerik hücreler bölünecek, çoğalacak ve otoimmünite gelişebilecektir. Bu çalışmada periferik kan da mikrokimerik hücrelerin artışıyla birlikte farelerde splenomegalininde geliştiği gözlenmiştir (98).

Yapılan bir çalışmada, 35 erkek çocuk sahibi sağlıklı kadından, 11 tanesinde (% 31) periferik kan mononükleer hücrelerinden, Y kromozom sekansları içeren DNA'ların varlığı yani mikrokimerizm gösterilmiştir. Bu çalışmada 20 sistemik sklerozlu hastanın 12 tanesinde (% 60) PCR metoduyla mikrokimerizm saptanmıştır. Daha önceki gebelik kayıpları ve/veya transfüzyonlara bağlı olduğu tesbit edilen 8 kadında mikrokimerizm bu çalışmada gösterilmiştir. Y kormozom DNA'nın erkek çocuk doğurmuş kadında, persistan erkek fetal hücrelerin varlığını gösterebileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmada sistemik sklerozlu hastaların en son erkek çocuk doğumundan çalışmaya kadar geçen süre ortalama 21 yıl olarak hesaplanmıştır (99). Bizim çalışmamızda 37 erkek çocuk sahibi sağlıklı kadından, 7 tanesinde (% 18.9) mikrokimerizm varlığını gösterdik.

Başka bir çalışmada ise, son 30 gün içinde immünsüpresif tedavi (steroid, metotreksat, siklofosfamid vb) almayan 43 sistemik sklerozlu kadın hastada

mikrokimerizm incelenmiştir. Bu hastaların yaşları 20-87 yıl arası değişmekte ve hepsi en azından 1 erkek çocuk sahibi kadından oluşmaktaydı. Tanıdaki yaşları 20-68 yıl ve erkek çocuk yaşları 2-31 yıl arası idi. Bu çalışmada sex-determining region of Y (SRY), yalnızca % 6.9 hastada saptanmış. Bu hastaların yine hastalık tutulumları dikkate alınmamıştır (100).

Bizim çalışmamızda mikrokimerizm saptanan hastaların çocuk yaşları ortanca 20 (1-50) yıl, çocuk sayıları ise ortanca 2 (1-5) idi. Mikrokimerizm saptanan erkek çocuk sahibi hastaların tanıdaki yaşları ise 18-69 yıl idi. Çalışmamızda hastaların ilaç kullanımları dikkate alınmamış fakat kontrol grubunda herhangi bir ilaç kullanmayan kadınlar incelenmiştir. Daha öncede vurguladığımız gibi mikrokimerizmin saptanmasını etkileyen "fluktuasyon" dışındaki bir diğer faktör de "ilaçlar" özellikle "immünsüpresif ilaç" kullanımıdır. Bu da çalışmamızda mikrokimerizm saptanmasını etkileyen bir durum (limitasyon) olabilir. Belki ileride yeni tanılı, henüz tedavi almamış hastalarda mikrokimerizm varlığı araştırılırsa daha farklı sonuçlar bulunabilir.

İspanya'da yapılan bir çalışmada, 47 sistemik sklerozlu hasta (30 limitli kutanöz ve 17 diffüz kutanöz) ile 40 sağlıklı kadın hastada mikrokimerizmin varlığı araştırılmış. 19 limitli ve 10 diffüz kutanöz sistemik sklerozlu hasta erkek çocuk sahibiyken kontrol grubunda 26 kadın hasta erkek çocuğa sahipti. Bu çalışmada 4 hastada (% 13.7), 2 hasta diffüz ve 2 hasta limitli kutanöz grupta, 2 sağlıklı kadında (% 7.6) mikrokimerizm varlığı saptanmış fakat bu istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (101).

Çalışmamızda Mikrokimerizm saptanan hastaların Modifiye Rodnan Cilt skorları ortanca 10 (4-24), mikrokimerizm saptanmayan hastaların cilt skorları ise ortanca 13 (4-26) idi. Bu açıdan iki grup arasındaki fark anlamlıydı (Mann-Whitney test, p= 0.038). Bu olay bize cilt tutulumu yaygın olanlarda mikrokimerik hücrelerin periferik kan dolaşımından cilde (hedef doku) yerleşerek yakalanma şansının azalabileceğini göstermektedir. Fakat Medsger hastalık şiddet skoru ve diğer organ tutulumları, otoantikor profilleri ile mikrokimerizm arasında anlamlı ilişki saptanamadı.

Mikrokimerizmin periferik kanda tesbitinde teknik önemli bir konudur. Fransa'da yapılan bir çalışmada diffüz kutanöz ve limitli kutanöz sistemik sklerozlu hataların tam kan ve periferik mononükleer hücrelerinde varlığı ve HLA-DRB1 uyumu incelenmiştir. Mikrokimerizmi göstermek için RT-PCR ile Y-kromozom spesifik DYS14 sekansı kullanılmıştır. Light Cycler® ve Light Cycler® Fast Start DNA Master PLUS Reaction kit kullanılmıştır. DYS14 ölçümünün sensitivitesi, bu şekilde, 1 genom ekivalanı (gEq) erkek hücreye karşılık 20.000 gEq kadın (maternal) hücre olarak bulunmuştur. Ayrıca bu çalışma da, lkSSk ve dkSSk'lı hastaların mirokimerik hücreleri farklı kan kompartmanlarında taşıdıkları ve feto-maternal HLA-DRB1 uyumu lkSSk'lı hastalarda daha fazla saptanmıştır (102). HLA-DRB1 allelinin romatoid artritte, ortak epitopu (shared epitope, QKRAA ve QRRAA) kodladığı bilinmektedir. Mikrokimerizm yoluyla ortak epitobun taşındığı ve romatoid artritin gelişebildiği öne sürülmüştür. Bu çalışmada hastaların çoğunun kan alındığı sırada DMARD kullanmadığı, fakat DMARD kullanımının fetal mikrokimerik hücre tesbitini etkileyebileceği gösterilmiştir (103).

Gebelikte iki yönlü hücre geçişinin olduğunun saptanmasının üzerinden yıllar geçmesine rağmen, mikrokimerizmin sistemik sklerozdaki rolü henüz tam olarak ortaya konamamıştır (104). Çalışmalarda farklı PCR tekniklerinin kullanılması ve mikrokimerik hücrelerin fluktuasyon göstermesi; çalışmalar arasındaki bu farklı sonuçları açıklayabilir. Özetle biz bu çalışmada diffüz ve sınırlı tipdeki sklerodermalı hastalarda mikrokimerizm oranlarının kontrol grubuyla farklı olmadığını gördük. Doğum sayısı ve çocuğun cinsiyeti ile de ilişkili değildi. Hastalığın klinik seyriyle de anlamlı farklılık gösteremedik. Ancak bu çalışmada mikrokimerizm varlığının hastalığın ortaya çıkış süresini kısalttığını gösterdik. Skleroderma heterojen bir hastalıktır ve skleroderma gelişiminde belli bir etyolojik nedenden ziyade birçok faktörün rolü vardır. Mikrokimerizm varlığıda; hastalığın gelişim sürecini kısaltan bir faktör olarak görülüyor.

6. SONUÇLAR

1- Bu çalışmada sistemik sklerozlu kadın hastalarda mikrokimerizmin varlığı araştırıldı. Mikrokimerizm ile hastalık tutulumu, şiddeti, otoantikor profilleri ile ilişki olup olmadığı incelendi.

2- Sistemik sklerozlu hasta grubunda % 35 (28/80 hasta), kontrol grubunda ise % 20 (8/40 kontrol) mikrokimerizm saptadık. Arada istatiksel olarak anlamlı fark yoktu (p= 0.180). Diffüz kutanöz grupta erkek çocuk sahibi 6 (% 27.3), limitli kutanöz grupta erkek çocuk sahibi 10 (% 32.3) ve kontrol grubunda erkek çocuk sahibi 7 (% 18.9) kadında mikrokimerizm saptandı. Bu da bize tek başına "mikrokimerizm" varlığının hastalığın ortaya çıkması için yeterli olmadığı, başka bir "tetikleyici" nedenin birlikteliğinde hastalığın gelişebileceğini göstermektedir.

3- Mikrokimerizm saptanan grupta Modifiye Rodnan cilt skoru istatiksel anlamlı olarak daha düşük saptandı (p= 0.038). Bu da bize hastalığın başlangıcında mikrokimerizmin bir faktör olduğunu, fakat yaygın cilt tutulumu olanlarda periferik kan dolaşımındaki mikrokimerik hücrelerin dokuya (cilde) göç ederek mikrokimerizm saptanma olasılığının azalacağını göstermiştir.

4- Ayrıca doğum ile tanı arası süre ne kadar kısa ise mikrokimerizm saptanma olasılığı artmaktadır (p= 0.020).

5- Mikrokimerizm ile diğer organ ve sistem tutulumları, otoantikor profilleri arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p > 0.05$)

6- Mikrokimerizm diffüz kutanöz sistemik sklerozlu nullipar-nulligravid 76 yaşında kadın hastada tespit edildi. Bu da bize bu mikrokimerik hücrelerin kan dolaşımında uzun yıllar yaşayabileceğini göstermiştir.

7- Daha öncede vurguladığımız gibi mikrokimerizmin saptanmasını etkileyen "fluktuasyon" dışındaki bir diğer faktör de "ilaçlar" özellikle "immünsüpresif ilaç" kullanımıdır. Bu da çalışmamızda mikrokimerizm saptanmasını etkileyen bir durum (limitasyon) olabilir.

7. ÖZET

SİSTEMİK SKLEROZLU HASTALARDA LENFOSİT MİKROK(Ş)İMERİZMİ

Giriş: Diffüz (DkSSk) ve limitli (LkSSk) tip sklerodermalı hastaların periferik kanındaki lenfositlerde mikroşimerizm varlığı, çocuk sahibi olup olmamaya, çocuğun cinsiyetine ve hastanın cinsiyetine göre değişiminin araştırılması amaçlandı. Ayrıca, mikroşimerizm ile klinik alt tiplerin ilişkisini incelemek hedeflendi.

Gereç ve Yöntemler: Sistemik skleroz tanısı almış 50 limitli ve 30 diffüz kutanöz SSklu hasta ile herhangi bir hastalığı olmayan 40 kadın çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunun evlilik, erkek ve kız çocuk sahibi olma, diğer doğum ve düşük öyküsü sorgulandı. Kan transfüzyonu, allojeneik kök hücre nakli yapılan bireyler çalışmaya dahil edilmedi. Kontrol grubunda ise otoimmün hastalık ve ilaç kullanım öyküsü olanlar dışlandı. Sistemik sklerozlu hastaların otoantikor profilleri, organ tutulumları, Modifiye Rodnan cilt skorları ve Medsger hastalık şiddet skorları hesaplandı. Periferik kan hücrelerinden, lenfositlerden elde edilen DNA'larda Y-kromozom sekansları RT-PCR ile tespit edilmeye çalışıldı.

Bulgular: LkSSk'lu hastaların ortalama yaşları 46.20±14.69 yıl, dkSSk'lu hastaların yaş ortalamaları 47.23±14.17 yıldı. Kontrol grubunun yaş ortalaması 42.55±11.40 yıldı. Gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı yaş farkı yoktu. 80 hastanın 28 tanesinde (%35), 40 sağlıklı kontrolün ise 8 tanesinde (%20) mikrokimerizm pozitif saptandı. Mikrokimerizm dkSSk'lu erkek çocuk sahibi 6 hastada (%27.3), LkSSk'lu grupta erkek çocuk sahibi 10 hastada (%32.3) ve sağlıklı kontrol grubunda ise erkek çocuk sahibi 7 kadında (%18.9) saptandı. Aradaki fark istatiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). LkSSk'li grupta 6 hiç doğum yapmamış-gebelik öyküsü olmayan (nullipar) hastada (%31.6) ve dkSSk'li grupta 1 nullipar hastada (%11.1) mikrokimerizm saptandı. Hiç doğum yapmamış dkSSk'lu hasta 76 yaşında, lkSSk grubunda ise en yaşlı hiç doğum yapmamış hasta 60 yaşındaydı. İlk doğum ve sistemik skleroz semptomlarının ortaya çıkışı (tanı) arasında geçen süre mikrokimerizm saptanan grupta ortanca 3.5 (0-49) yıl, mikrokimerizm saptanmayan

grupta ise ortanca 14 (0-55) yıl idi. Aradaki fark istatiksel olarak anlamlıydı (Mann-Whitney test, p= 0.020). Mikrokimerizm saptanan hastaların Modifiye Rodnan Cilt skorları ortanca 10 (4-24), mikrokimerizm saptanmayan hastaların cilt skorları ise ortanca 13 (4-26) idi. Bu açıdan iki grup arasındaki fark anlamlıydı (Mann-Whitney test, p= 0.038). Fakat, diğer sistem tutulumları, hastalık şiddeti, otoantikor profilleri, çocuk sayısı ve çocuk yaşları ile mikrokimerizm arasında anlamı ilişki saptanmadı.

Sonuç: Skleroderma gelişiminde belli bir etyolojik nedenden ziyade birçok faktör rol oynar. Mikrokimerizm varlığının hastalığın gelişim sürecini kısaltan bir neden olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Lenfosit, mikrokimerizm, sistemik skleroz.

8. SUMMARY

LYMPHOCYTE MICROCHIMERISM IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

Objectives: We aimed to investigate microchimerism in peripheral blood lymphocytes from patients with diffuse (dcSSc) and limited (lcSSc) type scleroderma, by examining the sex of the child and patient and gravidity/parity. In addition, we intended to research the association between microchimerism and the clinical subsets.

Methods: 50 female patients with lcSSc, 30 female patients with dcSSc and 40 healthy controls were included in the study. Patients and controls were questioned about pregnancy, having son or daughter, obstetric and abortion history. People who had blood transfusion and allogeneic stem cell transplantation were not included in this study. Those with a history of autoimmune disease and drug use in the control group were also excluded. Autoantibody profiles and organ involvements of patients with systemic sclerosis were determined. Modified Rodnan skin scores and Medsger disease severity scores of patients with systemic sclerosis were calculated. Y-chromosome sequences were studied by real time-PCR in DNA that was obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Results: The mean age of patients with lcSSc and with dcSSc were 46,20 ± 14,69 years and 47,23 ± 14,17 years, respectively. The mean age of the control group was 42,55 ± 11,40 years. The age difference between study groups was not statistically significant. Microchimerism was found positive in 28 of 80 patients (35%) and in 8 of 40 healthy controls (20%). Microchimerism was found positive in 6 dcSSc patients who had sons (27.3%), in 10 lcSSc patients with sons (32.3%) and in 7 people who had sons in the control group (18.9%). The difference was not statistically significant ($p > 0,05$). Microchimerism was detected in 6 nulliparous patients (31.6%) of the lcSSc group and in one nulliparous patient (11.1%) of the dcSSc group ($p > 0.05$). The nulliparous patient with dcSSc was 76 years old and the oldest nulliparous patient in the lcSSc group was 60 years old. The mean of the time

elapsing between the first pregnancy and diagnosis was 3.5 (0-49) years in microchimerism positive and 14 (0-55) years in microchimerism negative. The difference was statistically significant (Mann-Whitney test, p= 0.020). The means of Modified Rodnan skin scores of patients with and without microchimerism were 10 (4-24) and 13 (4-26), respectively. This was statistically significant (Mann-Whitney test, p=0.038). However, the relation between microchimerism and other system involvements, disease severity, autoantibody profiles, children numbers, children ages were not found.

Conclusions: Various etiological factors rather than one play role on the development of scleroderma. The presence of microchimerism is thought to be a reason that shortens the elapsing time of disease development.

9. KAYNAKLAR

1. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE, et al. Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. Arthritis Rheum 1989;32:998-1006.

2. Chifflot H, Fautzi B, Sordet C, Chatelus E, Sibila J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic lierature review. Semin Arthritis Rheum 2008;37:223-235.

3. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis Rheum 1980;23:581-590.

4. LeRoy EC, Black C, Fleishmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988;15:202-205.

5. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. J Rheumatol 2001;28:1573-1576.

6. Steen VD. The Many Faces of Scleroderma. Rheum Dis Clin North Am 2008;34:1-15.

7. Hinchcliff M, Varga J. Systemic sclerosis/Scleroderma: A Treatable Multisystem Disease. Am Fam Physician 2008;78(8):961-969.

8. Tabuenca JM. Toxic-allergic syndrome caused by ingestion of rapeseed oil denatured with aniline. Lancet 1981;2:567-568.

9. Hertzman PA, Blevins WL, Mayer J, et al. Association of the eosinophilia-myalgia syndrome with the ingestion of tryptophan. N Engl J Med 1990;322:869-873.

10. Pernis B. Silica and the immune system. Acta Biomed 2005;76 Suppl 2:38-44.

11. Grossman C, Dovrish Z, Shoenfeld Y, Amital H. Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis? Autoimmun Rev 2010, doi: 10.1016/j.autrev.2010.09.10.

12. Giacomelli R, Cipriani P, Fulminis A, Nelson JL, Matucci-Cerinic M. Gamma/delta T cells in placenta and skin: their different functions may support the paradigm of microchimerism in systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol 2004;22(3 Suppl 33):528-530.

13. Assassi S, Arnett FC, Reveille JD, Gourh P, Mayes MD. Clinical, immunologic, and genetic features of familial systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2007;56(6):2031-2037.

14. A.Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of anti-nuclear antibodies. Arthritis Rheum 2003;48:1956-1963.

15. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. Arthritis Rheum 2001;44:1359-1362.

16. Reveille JD, Owerbach D, Goldstein R, et al. Association of polar amino acids at position 26 of the HLA-DQB1 first domain with the anticentromere autoantibody response in systemic sclerosis (scleroderma). J Clin Invest 1992;89:1208-1213.

17. Tan FK, Wang N, Kuwana M, et al. Association of fibrillin-1 single-nucleotide polymorphism haplotypes with systemic sclerosis in Choctaw and Japanese populations. Arthritis Rheum 2001;44:893-901.

18. Kratz LE, Broughman JA, Pincus T, et al. Association of scleroderma with a T cell antigen receptor gene resctriction fragment length polymorphism. Arthritis Rheum 1990;33:569-573.

19. Marasini B, Casari S, Zeni S, et al. Stromelysin promoter polymorphism is associated with systemic sclerosis. Rheumatology 2001;40:475-476.

20. Hudson LL, Silver RM, Pandey JP. Ethnic differences in cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 genotype associations with systemic sclerosis. J Rheumatol 2004;31:85-87.

21. Zhou X, Tan F, Reveille JD, et al. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. Arthritis Rheum 2002;46:2990-2999.

22. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, et al. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis: anticentromere antibody and its relationship to CREST syndrome. Arthritis Rheum 1980;23:617-625.

23. Chizzolini C. T cells, B cells, and polarized immune response in the pathogenesis of fibrosis and systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol 2008;20:707-712.

24. Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr, Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patient with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1988;31:196-203.

25. Earnshaw W, Bordwell B, Marino C, Rothfield N. Three human chromosomal autoantigens are recognised by sera from patients with anticentromer antibodies. J Clin Invest 1986;77:426-430.

26. Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. J Immunol 1995;155:2703-2714.

27. Hirakata M, Okano Y, Pati U, et al. Identification of auotantibodies to RNA polymerase II: occurence in systemic sclerosis and association with autoantibodies to RNA polymerase I and III. J Clin Invest 1993;91:2665-2672.

28. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma (mechanisms of disease). N Engl J Med 2009;360:1989-2003.

29. Mackel AM, DeLustro F, Harper FE, LeRoy EC. Antibodies to collagen in scleroderma. Arthritis Rheum 1982;25:522-531.

30. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Arthritis Rheum 1984;27:645-653.

31. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. Semin Arthritis Rheum 2008;38(2):132-160.

32. Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Blockade of endogenous transforming growth factor β signaling prevents upregulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: Association with increased expresion of transforming growth factor β receptors. Arthritis Rheum 2001;44:474-480.

33. Artlett CM. Immunology of systemic sclerosis. Front Biosci 2005;10:1707-1719.

34. White B, Yurovsky VV. Oligoclonal expression of v delta 1+ gamma/delta T-cells in systemic sclerosis patients. Ann NY Acad Sci 1995;756:382-391.

35. Kahaleh MB, LeRoy EC. Interleukin-2 in scleroderma: correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration. Ann Intern Med 1989;110:446-450.

36. Miller EB, Hiserodt JC, Hunt LE, et al. Reduced natural killer cell activity in patients with systemic sclerosis. Correlation with clinical disease type. Arthritis Rheum 1988;31:1515-1523.

37. Pals ST, Radaszkiewicz T, Roozendaal L, Gleichmann E. Chronic progressive polyarthritis and other symptoms of collagen vascular disease induced by graft-vs-host reaction. J Immunol 1985;134(3):1475-1482.

38. Ruzek MC, Jha S, Ledbetter S, Richards SM, Garman RD. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. Arthritis Rheum 2004;50(4):1319-1331.

39. Jimenez SA, Artlett CM. Microchimerism and systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol 2005;17(1):86-90.

40. Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Publeral-Eklampsie. 1st ed. Leipzig: FCW Vogel; 1893.

41. Lee ESM, Bou-Gharios G, Seppanen E, Khosrotehrani K, Fisk NM. Fetal stem cell microchimerism: natural-born healers or killers? Mol Hum Rep 2010;16(11):869-878.

42. Sarkar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and other disorders. Autoimmun Rev 2004;3:454-463.

43. Cadavid A, Rugeles MT, Pena B, et al. Cell microchimerism in patients with recurrent spontaneous abortion: Preliminary results. Early Pregnancy 1997;3:199-203.

44. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:705-708.

45. Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet 1989;2:1363-1365.

46. Lo YM, Patel P, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. Lancet 1990;335:1463-1464.

47. Nelson JL. Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? Arthritis Rheum 1996;39:191-194.

48. Artlett CM. Microchimerism in health and disease. Curr Mol Med 2002;2:525-535.

49. Artlett CM, Cox LA, Ramos RC, et al. Increased microchimeric CD4+ T lymphocytes in peripheral blood from women with systemic sclerosis. Clin Immunol 2002;103 (3 Pt 1):303-308.

50. Lambert NC, Lo YM, Erickson TD, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: Cells or circulating DNA? A quantitative answer. Blood 2002;100:2845-2851.

51. Rodnan G, Lipinski E, Luksick J. Skin thickness and collagen content in progressive systemic sclerosis and localized scleroderma. Arthritis Rheum 1979;22:130-140.

52. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, et al. Inter- and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. J Rheumatol 1995;22:1281-1285.

53. Botzoris V, Drosos AA. Management of Raynaud's phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis. Joint Bone Spine 2010 Dec 21. [Epub ahead of print].

54. Khanna D, Denton CP. Evidence-based management of rapidly progressing systemic sclerosis. Best Prac Res Clin Rheum 2010;24:387-400.

55. Strollo D, Goldin J. Imaging lung disease in systemic sclerosis. Curr Rheumatol Rep 2010;12:156-161.

56. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, et al. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Document and the American Heart Association. Circulation 2009;119:2250-2294.

57. Hummers LK. The current state of biomarkers in systemic sclerosis. Curr Rheumatol Rep 2010;12:34-39.

58. Cavagna L, Caporali R, Klersy C, et al. Comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in screening for pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol 2010;37:2064-2070.

59. Hant FN, Silver RM. Biomarkers of scleroderma lung disease: recent progress. Curr Rheumatol Rep 2011 Feb;13(1):44-50.

60. Avouac J, Airo P, Meune C, et al. Prevalence of pulmonary hypertension in systemic sclerosis in European Caucasians and Metaanalysis of 5 studies. J Rheumatol 2010;37:2290-2298.

61. Bielecki M, Kowal K, Lapinska A, Bertnatowicz P, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. Increased production of a proliferation-inducing ligand (APRIL) by peripheral blood mononuclear cells is associated with Antitopoisomerase I antibody and more severe disease in systemic sclerosis. J Rheumatol 2010;37:2286-2289.

62. Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, Lucas M, Fertig N, Medsger TA Jr. Skin thickness progression rate: a predictor of mortality and early internal organ involvement in diffuse scleroderma. Ann Rheum Dis 2011;70:104-109.

63. Boueiz A, Mathai SC, Hummers LK, Hassoun PM. Cardiac complications of systemic sclerosis: recent progress in diagnosis. Curr Opin Rheumatol 2010;22:696-703.

64. Mok MY, Lau CS. The burden and measurement of cardiovascular disease in SSc. Nat Rev Rheumatol 2010;6:430-434.

65. Clements PJ, Furst DE. Heart involvement in systemic sclerosis. Clinics in Dermatology 1994;12:267-275.

66. Allanore Y, Meune C. N-terminal pro brain natriuretic peptide: the new cornerstone of cardiovascular assessment in systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol 2009;27(Suppl. 54):S59-S63.

67. Charles C, Clements P, Furst DE. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. Lancet 2006;367:1683-1691.

68. Steen VD, Constantino JP, Shapiro AP, et al. Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. Ann Intern Med 1990;113:352-357.

69. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. Ann Rheum Dis 2007;66:754-763.

70. Bussone G, Berezne A, Pestre V, Guillevin L, Mouthon L. The Scleroderma Kidney: progress in risk factors, therapy, and prevention. Curr Rheumatol Rep 2010;

71. Medsger TA Jr, Bombardieri S, Czirjak L, Scorza R, Rossa AD, Bencivelli W. Assessment of disease severity and prognosis. Clin Exp Rheumatol 2003;21(Suppl. 29):S42-S46.

72. Thomas MR, Williamson R, Craft I, Yazdani N, Rodeck CH. Y chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy. Lancet 1994;343:413-414.

73. Schroder J, Tilikianen A, de la Chapelle A. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. Transplantation 1974;17:346-354.

74. Schroder J. Transplacental passage of blood cells. J Med Genet 1975;12:230-242.

75. Jiang S-P, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal “allograft”. J Immunol 1998;160:3086-3090.

76. Aractangi S, Berkane N, Bertheau P, et al. Fetal DNA in skin of polymorphic eruptions of pregnancy. Lancet 1998;352:1898-1901.

77. Black CM, Stevens WM. Scleroderma. Rheum Dis Clin North Am 1989;15:193-212.

78. Arlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. N Eng J Med 1998;338:1186-1191.

79. Artlett CM, Welsh KI, Black CM, Jimenez SA. Fetal-maternal HLA compatibility confers susceptibility to systemic sclerosis. Immunogenet 1997;47:17-22.

80. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, et al. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. Lancet 1998;351:559-562.

81. Artlett CM. Pathophysiology of fetal microchimeric cells. Clinica Chimica Acta 2005;360:1-8.

82. Gammil SH, Nelson JL. Naturally acquired microchimerism. Int J Dev Biol 2010;54(2-3):531-543.

83. Scaletti C, Vultaggio A, Bonifacio S, et al. TH2-Oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigens. Arthritis Rheum 2002;46:445-450.

84. Sawaya HHB, Jimenez SA, Artlett CM. Quantification of fetal microchimeric cells in clinically affected and unaffected skin of patients with systemic sclerosis. Rheumatology 2004;43:965-968.

85. Artlett CM, Dito CG, Christner PJ. Methodology for detecting trace amounts of microchimeric DNA from peripheral murine white blood cells by Real-Time PCR. Biol Proced Online 2003;5(1):103-107.

86. Murata H, Nakauchi H, Sumida T. Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. Lancet 1999;354:220.

87. Miyashita Y, Ono M, Ueki H, Kurasawa K. Y chromosome microchimerism in rheumatic autoimmune disease. Ann Rheum Dis 2000;59:655-656.

88. Ichikawa N, Kotake S, Hakode M, Kamatani N. Microchimerism in Japanese patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2001;44:1226-1228.

89. Cox LA, Ramos RC, Dennis TN, Jimenez SA, Smith B, Artlett CM. Detection of microchimeric cells in the peripheral blood of nonpregnant women is enhanced by magnetic cell sorting before PCR. Clinical Chemistry 2003;49(2):309-312.

90. Mosca M, Giuliano T, Curcio M, et al. Comparison of real-time PCR and nested PCR for the detection of Y chromosome sequences in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2009;68:155-156.

91. Mosca M, Curcio M, Lapi S, Valentini G, D'Angelo S, Rizzo G, Bombardieri S. Correlations of Y chromosome microchimerism with disease activity in patients with SLE: analysis of preliminary data. Ann Rheum Dis 2003;62:651-654.

92. Lambert NC, Erickson TD, Yan Z, et al. Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time polymerase chain reaction: studies of healthy women and women with scleroderma. Arthritis Rheum 2004;50:906-914.

93. Loubiere LS, Lambert NC, Flinn LJ, et al. Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells. Lab Invest 2006;86:1185-1192.

94. Stevens AM, HErmes HM, Rutledge JC, et al. Myocardial-tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block. Lancet 2003;362:1617-1623.

95. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, et al. Maternal cell microchimerism in newborn tissues. J Pediatr 2003;142:31-35.

96. Lambert NC, Nelson JL. Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? Autoimmun Rev 2003;2:133-139.

97. Johnson Kl, Nelson JL, Furst DE, et al. Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2001;44:1848-1854.

98. Christner PJ, Artlett CM, Conway RF, Jimenez SA. Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride. Arthritis Rheum 2000;43:2598-2605.

99. Evans PC, Lambert NC, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. Blood 1999;93(6):2033-2037.

100. Burastero SE, Galbiati S, Vassallo A, et al. Cellular microchimerism as a lifelong physiologic status in parous women. An immunologic basis for its amplification in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2003;4:1109-1116.

101. Selva-O'Callaghan A, Mijares-Boeckh-Behrens T, Prades EB, Solans-Laque R, Simeon-Aznar CP, Fonollosa-Pla V, Vilardell-Tarres M. Lack of evidence of foetal microchimerism in female Spanish patients with systemic sclerosis. Lupus 2003;12:15-20.

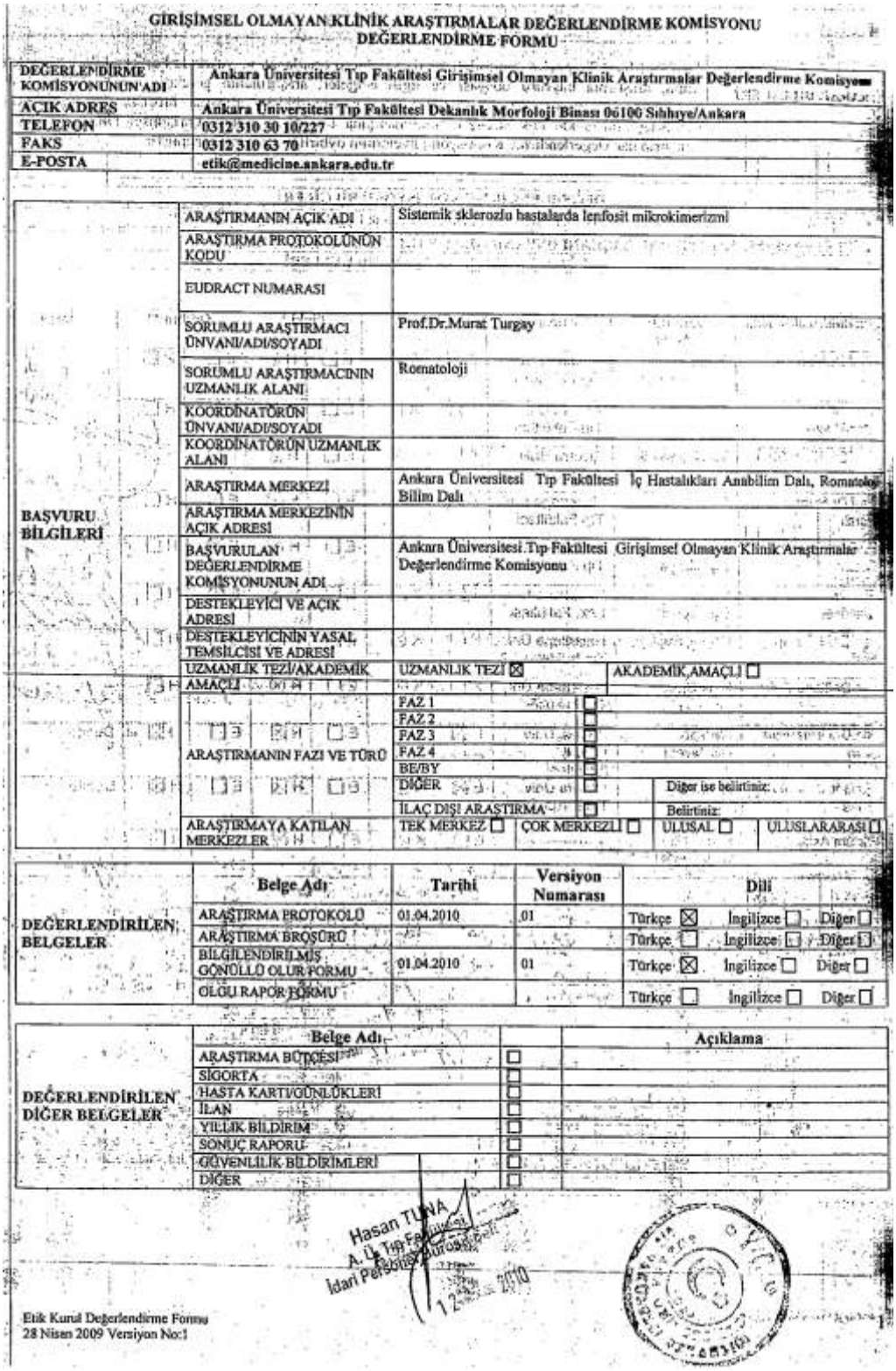
102. Rak JM, Pagni PP, Tiev K, Allanore Y, et al. Male microchimerism and HLA compatibility in French women with scleroderma: a different profile in limited and diffuse subset. Rheumatology 2009;48:363-366.

103. Yan Z, Aydelotte T, Gadi VK, Guthrie KA, Nelson JL. Acquisition of the Rheumatoid Arthritis HLA Shared Epitope through microchimerism. Arthritis Rheum 2011;65(3):640-644.

104. Nelson JL. Naturally acquired microchimerism: for better or for worse. [editorial]. Arthritis Rheum 2009;60:5-7.

10. EKLER

EK – 1. Etik Kurul Onayı



GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU
DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara
TELEFON	0312 310 30 10/227
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sistemik sklerozlu hastalarda lenfosit mikrokimerizmi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
	EUDRACT NUMARASI				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Murat Turgay			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Romatoloji			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI				
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ				
	BAŞVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ				
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐		
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐			
		FAZ 2 ☐			
		FAZ 3 ☐			
		FAZ 4 ☐			
		BE/BY ☐			
		DİĞER ☐	Diğer ise belirtiniz:		
		İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA ☐	Belirtiniz:		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01.04.2010	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	01.04.2010	01	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

Hasan TUNA
A.Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

12 2010

Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No:1

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:13-265	Tarih: 28 Haziran 2010
	Prof.Dr.Murat Turgay'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu ve SOP

DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ

DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Mehmet Melli	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Ajlan Tükün	Tıbbi Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Bülent Gümüşel	Eczacı-Öğr.Üyesi	Hacettepe Üni. Ecz. Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Doç.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Doç.Dr.Muharrem Özen	Avukat-Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☒	Derste
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☒	Derste
Gülsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	———	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR
Hasan TUNA
A.Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi
2010

Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No:1