

Klinik Araştırma

Sklerodermalı Hastalarda Kan ve Tükürükte Sklerostin Düzeyleri

Erhan ÖNALAN^{1,a}, Ali Çağrı ORAL¹, Kübra ORAL¹, Süleyman AYDIN², Ahmet KARATAŞ³, Emir DÖNDER¹

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Çalışmamızın amacı skleroderma (sistemik skleroz) hastalarında kan ve tükürükte sklerostin düzeylerinin belirlenmesi, sağlıklı gönüllülerle karşılaştırılması ve araştırılmasıdır. Literatürden skleroderma ile sklerostin arasında ilişki olduğunu gösteren yeterli çalışma yapılmadığı anlaşılmaktadır. Sklerostinin skleroderma patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza 35 sklerodermalı hasta ile 35 sağlıklı gönüllü alınmıştır. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında kan ve tükürük sklerostin seviyeleri analiz edildi.

Bulgular: Kontrol grubuyla kıyaslandığında, skleroderma grubunda kan ve tükürük sklerostin düzeyleri anlamlı derecede yüksek olarak ölçüldü (p <0,05).

Sonuç: Kronik otoimmün bir hastalık olan sklerodermada sklerostin düzeyleri artmaktadır. Sklerostin Wnt yolağı inhibitörüdür. Bu bulgular sklerostinin veya Wnt yolağının skleroderma patogenezinde rolünü işaret ediyor olabilir. Ancak bu hipotezi doğrulamak için daha fazla katılımcının olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Skleroderma, Sklerostin, Wnt Sinyal Yolağı.

ABSTRACT

Sclerostin Levels in Blood and Saliva in Patients with Scleroderma

Objective: Our study aims to investigate and determine the sclerostin levels in blood and saliva of patients with scleroderma (systemic sclerosis) and to compare their levels with those of healthy volunteers. In the literature, there is no sufficient number of studies that demonstrate the association between scleroderma and sclerostin. Sclerostin is thought to play a role in the pathogenesis of scleroderma.

Material and Method: In our study, 35 scleroderma patients and 35 healthy volunteers were enrolled. Blood and saliva sclerostin levels of the patient and healthy controls were measured.

Results: The level of sclerostin in blood and saliva of the scleroderma group was measured to be significantly higher than in the control group (p <0,05).

Conclusion: The level of sclerostin increases in scleroderma that is a chronic autoimmune disease. Sclerostin is an inhibitor of Wnt signaling pathway. These results may point that sclerostin or Wnt pathway have a role in the pathogenesis of scleroderma. However further studies involving more participants are needed in order to verify this hypothesis.

Keywords: Scleroderma, Sclerostin, Wnt Signaling Pathway.

Bu makale atıfta nasıl kullanılır: Önalın E, Oral AÇ, Oral K, Aydın S, Karataş A, Dönder E. Sklerodermalı Hastalarda Kan ve Tükürükte Sklerostin Düzeyleri. Fırat Tıp Dergisi 2019; 24 (4): 215-218.

How to cite this article: Onalan E, Oral AC, Oral K, Aydın S, Karatas A, Donder E. Sclerostin Levels in Blood and Saliva in Patients with Scleroderma. Fırat Med J 2019; 24 (4): 215-218.

Skleroderma, deri ve iç organların yaygın fibrozu ile seyreden inflamatuvar ve kronik otoimmün bir hastalıktır (1, 2).

Skleroderma hastalığının etiyolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen genetik yatkınlık, çevresel faktörler, enfeksiyonlar hastalığın patojenik sürecini etkileyen olası nedenler arasında gösterilmektedir (3). Ancak, skleroderma etiyopatogenezi halen tam olarak aydınlatılmamıştır.

Sklerodermada immün aktivasyon patogeneizde önemli role sahiptir. Çünkü sistemik sklerozda da damar çevresi inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve bu infiltrasyon yakınındaki fibroblastlarda belirgin artış gösteren kollajen ve ekstrasellüler madde sentezinde artış görülmek-

tedir(4). Skleroderma başlangıcında fibroza yol açan ana sitokinler IL-10, IL-13 ve transforming growth faktör β (TGFβ) olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, hastalığın başlangıcında T hepler (Th1) hakimiyetinin ön planda olduğu düşünülürken, fibrozun geliştiği dönemde ise Th2 hakimiyeti ön planda olduğu düşünülmektedir. Skleroderma hastalarının derisinde CD4+ Th2 hücrelerinde üretilen IL-4, IL-6 ve IL-13 fibroblastları uyatarak kollajen sentezini artırır (5-7).

Sklerostin molekülü SOST geninin bir ürünüdür, büyük ölçüde osteositler tarafından salgınmasına rağmen preosteoklastlar tarafından da salgılanmaktadır. Sklerostin, sistin bağı içeren ve oldukça düzensiz amino ve karboksil uçlara sahip protein ailesinin atipik bir üyesidir. Sklerostinin görevi Wnt sinyal yolağını inhibe ederek

^aYazışma Adresi: Erhan ÖNALAN, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Tel: 0424 233 3555

Geliş Tarihi/Received: 30.10.2018

e-mail: drakdeniz@msn.com

Kabul Tarihi/Accepted: 20.03.2019

kemik formasyonunu engellemektir. Bunu Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP 5/6)'ya bağlanıp Wnt'nin bağlanmasını engelleyerek yaparlar. Sklerostin'in merkezi sistin bağı ve üç tane loop bölgesi içerir. Loop 1 ve 3 bölgeleri beta tabakalardan oluşur ve bu tabakalar parmaklı yapıda kıvrımlıdır. Sklerostin molekülünün loop 2 bölgesi düzenli ve organize değildir. Loop 2 bölgesine bir ligand veya reseptör ile bağlandığında daha sıkı hale gelir. Sklerostin molekülünün Wnt sinyal yolağını inhibe etmesini engelleyen antikörler bunu loop 2'ye bağlanarak yaparlar. Yeni çalışmalarda farklı Wnt protein sınıflarının varlığı saptanmış olup bu Wnt proteinleri Wnt 1, 2, 6, 7a, 7b, 9a, 9b ve 10b'den oluşur. DKK1, hem Wnt1 hem de Wnt2 proteinini inhibe ederken, sklerostin yalnız Wnt2'yi inhibe eder. Buna göre sklerostin'in Wnt sinyal yolağının inhibe eden moleküllerin içinde daha hassas inhibe edendir ama DKK1'in Wnt sinyal yolağını daha geniş çapta ve bütünüyle inhibe ettiği görülmüştür (8, 9).

Son yıllarda, Wnt sinyal yolağının skleroderma patogenezi katkısı üzerinde durulmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda Wnt sinyal yolağını etkileyen sklerostin düzeyinin skleroderma hastaları kan ve tükürük örneklerinde çalışılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının 23.02.2017 tarihli etik kurul onayı alınarak yapılmıştır.

Çalışma ve kontrol grubunun seçimi

Çalışmaya, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Romatoloji Bilim Dalı polikliniklerine başvuran 35 sklerodermalı hasta ile 35 sağlıklı gönüllü alındı. Sağlıklı kontrol grubu, İç Hastalıkları polikliniğine başvuran ve herhangi bir inflamatuvar ve vasküler hastalık tespit edilmeyen bireylerden oluşturuldu. Çalışmaya 18 yaş altı hastalar, malignitesi olanlar, bilinen bir kalp hastalığı olanlar, hipertansiyonu olanlar, sosyokültürel olarak iletişim güçlüğü olanlar ve gebeler dahil edilmedi.

Biyokimyasal ölçümler

Katılımcıların yaşı, cinsiyeti, boyu, kilosu sistolik ve diyastolik kan basınçları kaydedildi. Glukoz, üre, kreatinin, AST, ALT, total kolesterol, LDL, HDL ve eritrosit sedimentasyon hızı rutin olarak bakıldı. Bu verilere katılımcıların dosyasından ulaşıldı.

Sklerostin çalışma yöntemi

Katılımcılardan oturur pozisyonda sol antekübital venden 4 ml kan ve 4 ml tükürük örneği proteaz inhibitörünü içeren (aprotinin) tüplere alındı. Kan örnekleri soğutmalı santrifüjde (4 °C) 4000 r.p.m'de 10 dk santrifüj edilerek elde ettiğimiz serum örneklerini ependorf tüplere aktararak -80 °C'de çalışılacağı güne kadar muhafaza edildi. Tükürük örnekleri de aprotininli tüplere alındı ve çalışma gününe kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Serum ve tükürük örneklerinde sklerostin

(SOST) düzeyleri, (Human Sclerostin; Katalog no: 201-12-5418 Sunred Biological Technology Co. Ltd, Shanghai, CHINA), Elisa yöntemiyle kit kataloglarında belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı. Human Sklerostin kitinin ölçüm aralığı: 0,2-60 ng/ml, (Intra-Assay: CV değeri <10%, Inter-Assay: CV değeri <12%, Sensitivitesi 0,175 ng/ml) idi. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, ABD), absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazı (Awareness Technology Instruments, ABD) kullanıldı. Test sonuçları ng/ml olarak verildi. Tükürük numunelerinde sklerostin ölçümü Aydın tarafından yayınlanan prosedüre uygun olarak yapılmıştır (10).

İstatistiksel analiz

Elde edilen sonuçlar bilgisayar ortamında SPSS-22 programı yardımıyla değerlendirildi. Kategorik veriler Ki-Kare testi, parametrik veriler Student's t-testi ile analiz edildi. p <0.05 anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hasta ve kontrol gruplarına ait demografik ve rutin laboratuvar analizleri sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Skleroderma ve kontrol gruplarında demografik ve laboratuvar bulgular.

	Kontrol (n=35)	Skleroderma (n=35)	p
Yaş (yıl)	30, 57±10, 02	50, 94±13, 11	0, 001
Cinsiyet (K/E)	31/4	30/5	0, 72
Glukoz (mg/dl)	89, 94±10, 11	99, 89±30, 61	0, 07
AST (U/L)	20, 40±10, 45	24, 34±14, 7	0, 21
ALT (U/L)	22, 03±13, 27	20, 89±11, 43	0, 7
Üre (mg/dl)	24, 6±7, 6	32, 85±12, 8	<0.05
Kreatinin (mg/dl)	0, 66±0, 15	0, 71±0, 15	0, 17
Hb (g/dl)	12, 7±1, 63	12, 7±1, 24	0, 81
Htc (%)	39, 06±4, 1	39, 83±4, 1	0, 44

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

K:kadın, E:erkek, AST:Aspartat aminotransferaz, ALT:Alanin aminotransferaz Hb;Hemoglobin, Htc;Hematokrit.

Serum sklerostin düzeyleri

Tüm gruplara ait serum sklerostin düzeyleri değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; kontrol grubuyla kıyaslandığında sklerodermalı hasta grubunda serum sklerostin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak bulundu. (p <0.05) (Tablo 2 ve Şekil 1).

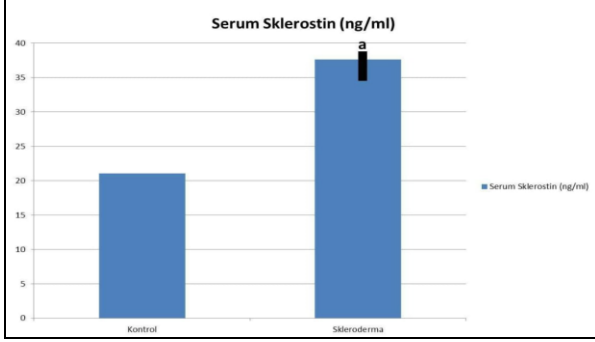
Tükürük sklerostin düzeyleri

Tüm gruplara ait tükürük sklerostin düzeyleri değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; kontrol grubuyla kıyaslandığında sklerodermalı hasta grubunda tükürük sklerostin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak bulundu. (p <0.05) (Tablo 2 ve Şekil 2).

Tablo 2. Serum ve tükürük sklerostin düzeyleri.

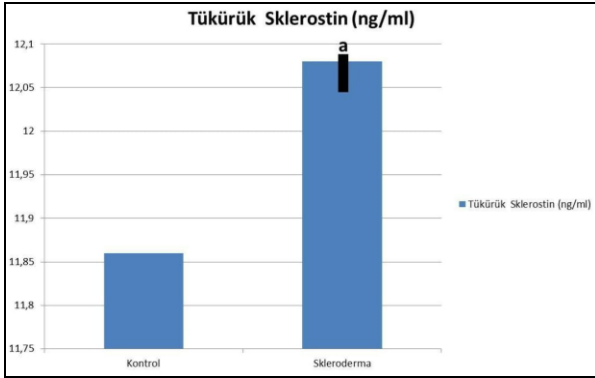
	Kontrol (n =35)	Skleroderma (n =35)	P
Serum sklerostin (ng/ml)	21, 03±15, 15	37, 62±20, 59	<0.05
Tükürük sklerostin (ng/ml)	11, 86±5, 62	12, 08±4, 62	<0.05

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

**Şekil 1.** Serum Sklerostin Düzeyleri.

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

**Şekil 2.** Tükürük Sklerostin Düzeyleri.

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Yaptığımız bu çalışmada, skleroderma hastalarında inflamasyon ve fibrojeniz gibi patolojik süreçlerde serum sklerostin düzeyinin hastalığın patogeneziyle ilişkisi olup olmadığını araştırdık. Skleroderma hastalığı genç kadınlarda daha sık görülmektedir. Skleroderma hastalığındaki değişiklikler ve kontraktürler morbiditeyi, iç organ tutulumları ise hem morbiditeyi hem de mortaliteyi önemli ölçüde etkilemektedir. Ancak, günümüzde skleroderma hastalığının patogenezi için tartışmalar hala sürmektedir.

Bu çalışmamızda tanı almış ve tedavi başlanmış sklerodermalı hastalarda Wnt yolunun doğal inhibitör proteinlerinden olan sklerostin molekül düzeylerinin nasıl değiştiğini inceledik. Son yıllarda kemik metabolizmasında önemli bir yere sahip olan ve kronik inflamatuvar hastalıklarda (örnek: sistemik lupus eritematoz [SLE], romatoid artrit gibi) rol oynayan Wnt yolunda görevli olan sklerostin molekülünün skleroderma tanısı almış

hastalarda nasıl etkilendiğini gösteren yeterli literatür bulunmamaktadır.

Yaptığımız bu çalışma bu açıdan yapılan ilk çalışmalardandır. Çalışmamızda, tanı almış ve tedavi altında olan sklerodermalı hastalarda sklerostin düzeylerinin, sağlıklı gönüllülerden farklı olup olmadığını inceledik; skleroderma hastalığı tanısı alıp tedavi altındaki hastalarla, herhangi bir hastalık öyküsü olmayan ve ilaç kullanımı olmayan sağlıklı gönüllülerin kan ve tükürük örneklerini karşılaştırdık ve bu gruplar arasında anlamlı fark bulduk.

Mödder ve ark. (11) 362 kadın ve 318 erkek üzerinde yaptığı bir çalışmada serum sklerostin düzeylerinin erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek olduğunu ve sklerostin seviyesinin kadın ve erkekte yaşla pozitif ilişkili olduğunu tespit etmiş. Bu durumu erkeklerde daha yüksek kemik kütlesinin olması ve bu kemik kütlesiyle doğru orantılı olarak daha fazla osteosit olması; dolayısıyla daha fazla sayıdaki osteositin daha fazla sklerostin molekülü salgılanması şeklinde açıklamıştır. Sklerostin molekülünün, osteoblast membranındaki reseptörüne bağlanarak, hücre içi sinyal iletim kaskatı üzerinden osteoblastik kemik oluşumunu inhibe edici etkisi mevcuttur. SOST geninin kemikten başka, artıklar kondrositlerde de olduğu gösterilmiştir. Kemik mineralizasyon yoğunluğu azaldıkça artan lokal mekanik baskı kemik oluşumunu artırmak ve kemik rezorpsiyonunu azaltmak üzere sklerostin seviyelerinin down regülasyonuna yol açabilir. Ancak sklerostinin osteoartrit patogeneziindeki rolü henüz bilinmiyor.

Taylan ve ark. (12) yaptığı bir çalışmada skleroderma tanısı olan 46 hasta ile, 30 sağlıklı kontrol grubunun kıyaslandığı çalışmada sklerostin seviyeleri kontrol grubuyla benzer çıkmış.

Fernández-Roldán ve ark. (13) yaptığı çalışmada ise 38 SLE, 20 crohn hastası, 8 skleroderması olan hasta ile 20 sağlıklı hasta karşılaştırılmış. SLE ve skleroderması olan hastaların sklerostin düzeyleri ile ilgili sağlıklı kontrol grubuna benzer çıkmış.

Bu durum kemik mineralizasyonunda rol oynayan Wnt yolunun ve bu yolak inhibitörlerinden olan sklerostin molekülünün, deri fibrozu ve iç organ tutulumu olan ama kemik tutulumu ön planda olmayan skleroderma da etkilenmemesini açıklayabilir.

Bizim çalışmamızda ise skleroderma tanısı almış hastalarla kontrol grubu arasında sklerostin glikopeptidi ölçümünde anlamlı fark bulunmuştur; bu açıdan çalışmamız bu iki çalışmayla farklı sonuçlar bulmuştur. Bunun nedeni çalışmamızın daha geniş bir popülasyonda yapılmamış olması, sklerodermalı hastalarımızın çoğunluğunun kadın olması, hastalara kemik mineral yoğunluğu (KMY) ölçümünün yapılmaması, hastaların glukokortikoid tedavisi almış olmaları ve kontrol grubuna göre sklerodermalı hastaların yaş ortalamasının daha yaşlı olması olabilir.

Yaptığımız çalışmada elde edilen kan ve tükürükteki sklerostin seviyesinin sonuçları; erkeklerde, kadınlara oranla daha fazla görülmezken bunun nedeni çalışmamızdaki sklerodermalı erkek hasta sayısının çok az oluşu ve geniş popülasyonda çalışma yapmamış olma-

mızdan kaynaklı olabilir. Bu nedenle sklerodermalı hastalarda sklerostin düzeylerinin hastalıkla ilişkisini araştırıp biyomarkır olarak kullanılıp kullanılamayacağını saptamak için daha kapsamlı ve yeterli sayıda erkek popülasyonu da içerecek şekilde araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada birtakım kısıtlılıklar mevcuttur. Skleroderma tanısı olup tedavi altındaki hastaların çoğunluğunun kadın popülasyonu olması, sklerodermalı hasta yaş grubunun KMY için endikasyon taşımaması ve dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA)'da düşük doz radyasyon olmasına rağmen etik açıdan uygun olmaması nedeniyle hastalara ve kontrol grubuna KMY ölçümü yapılamadı. Bu nedenle skleroderma hastalarının KMY ve kan, tükürükteki sklerostin seviyesi ile kontrol grubunun KMY ve kan, tükürükteki sklerostin seviyesi arasındaki ilişki direkt olarak karşılaştırı-

lamamıştır. Yine skleroderma tanısı almış olup tedavi altındaki hastaların tedaviden önceki kan ve tükürük sklerostin seviyelerinin ölçülmemiş olması da çalışmamızın bir kısıtlılığı olarak görülebilir.

Sklerodermalı hastaların tedavisindeki kortikosteroid kullanımı bu hastalarda kemik kaybına yol açabilir buda çalışmamızdaki kısıtlılıklardan bir tanesidir.

Sonuç olarak, çalışmamızda, skleroderma tanısı almış olup tedavi altındaki hastaların kan ve tükürükteki sklerostin seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Yine de bu konuda daha büyük popülasyonlarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olup, günümüzdeki skleroderma hastaları için uluslararası düzeyde kabul edilmiş bir tedavi protokolünün olmamasından dolayı skleroderma hastalarının aldığı tedavi, tutulan organ ve klinik bulgulara göre alt gruplarıyla değerlendirilmeleri daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117: 557-67.
2. David M. A case of scleroderma mentioned by Hippocrates in his aphorisms. *Korot* 1981; 8: 61-3.
3. Koca SS, Ozgen M, Isik A. Sistemik skleroz etiyopatogenezi. *RAED Dergisi* 2012; 4: 39-46.
4. Sharma A, Singh AK, Warren J, Thangapazham RL, Maheshwari RK. Differential regulation of angiogenic genes in diabetic wound healing. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2323-31.
5. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cellmediated) immunity. *Science* 2000; 287: 860-4.
6. Zheng W, Li R, Pan H et al. Role of osteopontin in induction of monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1 beta through the NF kappaB and MAPK pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1957-65.
7. Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BLM. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest* 1998; 101: 1468-78.
8. Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP. Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 6278-86.
9. Sokol S, Christian JL, Moon RT et al. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in xenopus embryos. *Cell* 1991; 67: 741-52.
10. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015; 72: 4-15.
11. Mödder UI, Hoey KA, Amin S et al. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 373-9.
12. Taylan A, Birlık M, Kenar G et al. Osteoprotegrin interacts with biomarkers and cytokines that have roles in osteoporosis, skin fibrosis, and vasculopathy in systemic sclerosis: a potential multifaceted relationship between OPG/RANKL/TRAIL and Wnt inhibitors. *Mod Rheumatol* 2018;13: 1-16.
13. Fernández-Roldán C, Genre F, López-Mejías R, Ubilla B, Mijares V, Cano DS. Sclerostin serum levels in patients with systemic autoimmune diseases. *Bonekey Rep* 2016; 5: 775.

Erhan ÖNALAN	0000-0001-5395-0390
Ali Çağrı ORAL	0000-0002-1163-4442
Kübra ORAL	0000-0002-1163-4442
Süleyman AYDIN	0000-0001-6162-3250
Ahmet KARATAŞ	0000-0002-6725-4182
Emir DÖNDER	0000-0003-2537-6023