

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ROMATOLOJİ BİLİM DALI

BLEOMİSİN İLE OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL SKLERODERMA
MODELİNDE PROTEAZOM İNHİBİSYONUNUN TEDAVİ EDİCİ ROLÜ

ROMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ
Dr. Süleyman Serdar KOCA

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ahmet IŞIK

ELAZIĞ
2010

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez yan dal Uzmanlık Tezi Standartları'na uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden uzmanlık yan dal Uzmanlık Tezi olarak kabul edildi.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet IŞIK

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Emir DÖNDER

Prof. Dr. Ahmet IŞIK

Prof. Dr. Eftal YÜCEL

Prof. Dr. Fahrettin OKSEL

Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKER

Bu yan dal tezi Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimi tarafından 1662 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim döneminde eğitimime katkıları nedeniyle, tüm İç Hastalıkları AD ve Romatoloji BD öğretim üyelerine teşekkür ederim.

ÖZET

Skleroderma, yaygın fibrozla karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Bir proteozom inhibitörü olan bortezomib kollajen üretimini azaltarak, yıkımını artırarak anti-fibrotik etkilere sahiptir. Deneysel çalışmalarda böbrek ve kalpte fibroz gelişimini önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, bleomisin (BLM) ile uyarılan deneysel skleroderma modelinin erken ve geç evrelerinde, bortezomib tedavisinin dermal fibrozun önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmaya 6 grup (her grupta n=10) Balb/c fare alındı. A ve D grubu farelere, subkutan 100 µl fosfat ile tamponlanmış salin (FTS); B, C, E ve F grubu farelere subkutan 100 µg/gün BLM (100 µl FTS içinde çözündürülmüş) uygulandı. BLM uygulamalarına ek olarak, C grubu farelere ilk 3 hafta, F grubu farelere son 3 hafta, intraperitoneal 1.6 mg/kg dozunda bortezomib haftada iki kez uygulandı.

A, B ve C grubu fareler 3. hafta; D, E ve F grubu fareler 6. hafta sonunda sakrifiye edildi ve yapılacak analizler için kan ve doku örnekleri alındı. IL-4 ve TGF-β1 serum düzeyleri, deri dokusu tip I kollajen, nükleer faktor-κB (Nf-κB), Nf-κB inhibitör (I-κB) ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK)1 protein düzeyleri, dermal kalınlık, dermal alandaki inflamatuvar hücre sayıları ve α-düz kas aktin pozitif (α-SMA+) hücre sayıları belirlendi.

Fibrozun erken evresinde ciltte inflamatuvar hücre infiltrasyonu varken, yerleşmiş fibroz evresinde ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu yoktu ancak, heriki dönemde de Nf-κB ve JNK1 ekspresyonları yüksekti. Nf-κB ve JNK1 ekspresyonlarını baskılayan bortezomib erken evrede dermal kalınlık, dermal inflamatuvar hücre sayısı ve α-SMA+ hücre sayısını azaltırken, yerleşmiş fibroz evresinde bu parametreleri etkilemedi.

Sonuç olarak, BLM ile uyarılan skleroderma modelinde bortezomib, erken evrede anti-inflamatuvar etkileri ile fibroz gelişimini önlemekte, yerleşmiş fibroz tedavisinde ise etkili olmamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Skleroderma, Proteazom, Bortezomib

ABSTRACT

THE THERAPEUTIC ROLE OF PROTEASOME INHIBITION IN BLEOMYCIN INDUCED EXPERIMENTAL SCLERODERMA

Scleroderma is a chronic inflammatory disease characterized by widespread fibrosis. Bortezomib, a proteasome inhibitor, has anti-fibrotic properties by reducing collagen production and favoring collagen degradation, and attenuates experimentally induced renal and cardiac fibrosis. The aim of this study was to evaluate the preventive effects of bortezomib on early and later stages of bleomycin (BLM)-induced experimental scleroderma model.

This study involved six groups Balb/c mice (n=10 in each group). Group A and D were only received subcutaneously 100 μ l phosphate-buffered saline (PBS), whereas group B, C, E and F mice were subcutaneously administered 100 μ g/day BLM (dissolved in 100 μ l PBS). In addition to BLM, group C mice were intraperitoneally administered 1.6 mg/kg bortezomib twice a week for the first three weeks, while group F mice were received same dose of bortezomib for the second three weeks.

Groups A, B and C mice, at the end of the third week, and group D, E and F mice, at the end of sixth week, were sacrificed and blood and tissue samples were then obtained for further analysis. IL-4, and TGF- β 1 serum levels, type I collagen, nuclear factor- κ B (Nf- κ B), inhibitor of Nf- κ B (I- κ B) and c-Jun N-terminal kinase (JNK)1 protein levels of skin tissues, dermal thicknesses, the numbers of inflammatory cells on dermal layer and α -smooth muscle actin-positive (α -SMA+) cells were determined.

In early stage of fibrosis, inflammatory cell infiltrations of the skin are prominent, while this inflammatory status is decreased in the later stage of fibrosis. However, the expressions of Nf- κ B and JNK1 were higher in the both stages. Bortezomib which downregulated the expressions of Nf- κ B and JNK1 decreased dermal thickness, dermal inflammatory cell counts and α -SMA+ cell counts in early stage, although it had no effects on the late stage of fibrosis.

In conclusion, in BLM-induced dermal fibrosis, bortezomib has anti-fibrotic effect in early stage of fibrosis which may be related with its anti-inflammatory effects, although it is not effective on the established fibrosis.

Key Words: Scleroderma, Proteasome, Bortezomib

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel bilgiler	2
1.1.1. Epidemiyoloji	3
1.1.2. Etiyoloji	3
1.1.3. Patogenez	4
1.1.4. Klinik özellikler	7
1.1.5. Tedavi	9
1.1.6. Proteazom inhibisyonu	14
1.1.7. Sklerodermada deneysel hayvan modelleri	16
1.1.7.1. Bleomisin ile uyarılan dermal fibroz	19
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1. Deney hayvanları	21
2.2. Çalışma grupları ve uygulamalar	21
2.2.1. Kontrol grupları	21
2.2.2. Bleomisin ve bortezomib uygulamaları	23
2.3. Kan ve doku örneklerinin toplanması	23
2.4. Histopatolojik ve immunohistokimyasal analizler	23
2.5. Serum sitokin analizleri	23
2.6. Western blot analizler	23
2.7. İstatistiksel analizler	23
3. BULGULAR	24
3.1. BLM ile uyarılmış dermal fibroz	24
3.2. BLM ile uyarılmış dermal fibrozun bortezomib ile tedavisi	24
4. TARTIŞMA	29
5. KAYNAKLAR	34
6. ÖZGEÇMİŞ	41

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Sklerodermaya özgü otoantikörler ve bu otoantikörlerin skleroderma alt grupları ve klinik bulgular ile ilişkileri	6
Tablo 2. Skleroderma grubu hastalıkların sınıflandırılması	7
Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü PAH fonksiyonel durum sınıflandırılması	11
Tablo 4. Sklerodermada deneysel hayvan modelleri	16
Tablo 5. Skleroderma deneysel hayvan modelleri arasındaki farklılıklar	18
Tablo 6. Çalışma gruplarında serum sitokin düzeyleri ve histopatolojik bulgular	24

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Sklerodermadaki temel patolojik özelliklerin hastalığın zamanla değişen fenotipine katkıları	2
Şekil 2.	Skleroderma patogeneğinde rol aldığı düşünülen olası yollar	5
Şekil 3.	PAH tedavi algoritması	12
Şekil 4.	Nf- κ B aktivasyon yolağı ve sonuçları	15
Şekil 5.	Proteazom aracılı I- κ B degradasyonu	15
Şekil 6.	Çalışma grupları ve uygulanan tedaviler	21
Şekil 7.	Çalışma gruplarında serum IL-4 düzeyleri	25
Şekil 8.	Çalışma gruplarında dermal alandaki inflamatuvar hücre sayıları	26
Şekil 9.	Çalışma gruplarında α -SMA+ hücre sayıları	26
Şekil 10.	Çalışma gruplarında dermal kalınlıklar	27
Şekil 11.	Çalışma grupları deri doku örneklerinde tip I kollajen (a), Nf- κ B (b), I- κ B (c) ve JNK1 (d) protein ekspresyon düzeyleri	28

KISALTMALAR LİSTESİ

ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
AECA	: Anti-endotelyal hücre antikoru
ANA	: Anti-nükleer antikor
BLM	: Bleomisin
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CMV	: Sitomegalovirüs
CTGF	: Kollojen doku büyüme faktörü
c-IAP	: Hücresel apoptoz inhibitör protein
dcSSC	: Yaygın cilt tutulumlu sistemik skleroz
EBV	: Epstein bar virus
ESM	: Ekstraselüler matriks
ELUAR	: Avrupa Romatizma Birliği
FTS	: Fosfat ile tamponlanmış salin
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
GVHD	: Graft-versus-host hastalığı
HPF	: Büyük büyütme alanı
ICAM-1	: İnterselüler hücre adezyon molekülü-1
IL	: İnterlökin
ILD	: İnterstisyel akciğer fibrozu
I-κB	: Nükleer faktor-κB inhibitör
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
KKB	: Kalsiyum kanal blokerleri
lcSSc	: Sınırlı cilt tutulumlu sistemik skleroz
MAPK	: Mitojen-aktif protein kinaz
MCP-1	: Monosit kemoatraktant protein 1
MCTD	: Mikst bağ doku hastalığı,
MIP-1α	: makrofaj inflamatuvar protein-1α
MMP	: Matriks metalloproteinaz

MRL/lpr γ R-/-	: IFN- γ reseptörü gen defisiti olan MRL/lpr türü fare
NA	: Değerlendirilmemiş
Nf- κ B	: Nükleer faktör- κ B
NO	: Nitrik oksit
PAH	: Pulmoner arteryel hipertansiyon
PDE-5	: Fosfodiesteraz tip 5
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PM/Scl	: Polimiyozit/skleroderma
RAG-2-/-	: Recombination activating gene knockout
RANTES	: Regulated on activation normal T cell expressed and secreted protein
RF	: Raynaud fenomeni
RLX-/-	: Relaksin gen defisiti fare
RNA	: Ribonükleik asit
RNP	: Ribonükleoprotein
sc	: Subkutan
SF	: Serum fizyolojik
SP1	: Spesifite protein 1
SSc	: Sistemik skleroz
TBR1 ^{CA}	: Yapısal etkin TGF- β reseptör tip 1 transgenik fare
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü β
TIMP	: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF- α	: Tümör nekroz faktör alfa
TRAF	: TNF reseptör ilişkili faktör
Tsk	: Tight skin
T β RII Δ k;	: TGF- β 1 tip II reseptör kinaz defisiti
UCD-200;	: University of California at Davis line-200
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
α -SMA	: α -düz kas aktini

1. GİRİŞ

Skleroderma (sistemik skleroz; SSc), deri ve iç organların yaygın fibrozu ile karakterize, kronik inflamatuvar bir hastalıktır (1-3). Hastalığın patogenezi net olarak bilinmemektedir. Ancak, immün aktivasyon ve vaskülopati patogeneze önemli roller almaktadır (1-3). Skleroderma hastalarının deri biyopsilerinde T lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptanmıştır (4). Ek olarak, skleroderma hastalarında tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin (IL)-2, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin serum düzeylerinin yükseldiği ve deri tutulumunun şiddeti ile korele olduğu gösterilmiştir (5).

Nükleer faktör- κ B (Nf- κ B) adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve bazı sitokinlerin salınımını artırır ve anti-apoptotik etki gösterir (6). Nf- κ B aktivasyonu, *nükleer faktör- κ B inhibitör* (I- κ B) tarafından kontrol edilmektedir (6) ve I- κ B degradasyonuna yol açan proteazom, Nf- κ B'nin aktivasyonunu artırmaktadır (6, 7). Bir proteazom inhibitörü olan bortezomib, Nf- κ B aktivasyonunu suprese ederek anti-inflamatuvar etkiler göstermektedir (6, 7).

Ekstraselüler matriks (ESM) elamanlarının yapımı ve yıkımı dinamik bir denge halinde olup, bu dengenin yapım lehine bozulması fibrojeniz (yapım/fibroz) ile sonuçlanmaktadır (8, 9). ESM degradasyonu *matriks metalloproteinaz* (MMP)'lar ile sağlanmaktayken, doku MMP inhibitörü (*tissue inhibitor of metalloproteinases* [TIMP]) bu dengeyi fibrojeniz lehine kaydırmaktadır (8, 9). İnsan dermal fibroblast hücre kültüründe, bortezomibin kollejen sentezini ve TIMP-1 düzeyini azalttığı, MMP-1 düzeyini artırdığı gösterilmiştir (10). Bortezomibin, farelerde safra yolu ligasyonu ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarı modelinde, hepatik fibrojenizi baskıladığı ortaya konulmuş ve bu durum karaciğer fibrozunda önemli rolü olan hepatik stellat hücrelerin artmış apoptozu ile ilişkilendirilmiştir (11). Ek olarak, *in vivo* proteazom inhibisyonunun kalp (12) ve böbrekte (13) oluşturulan fibrozu önlediği saptanmıştır.

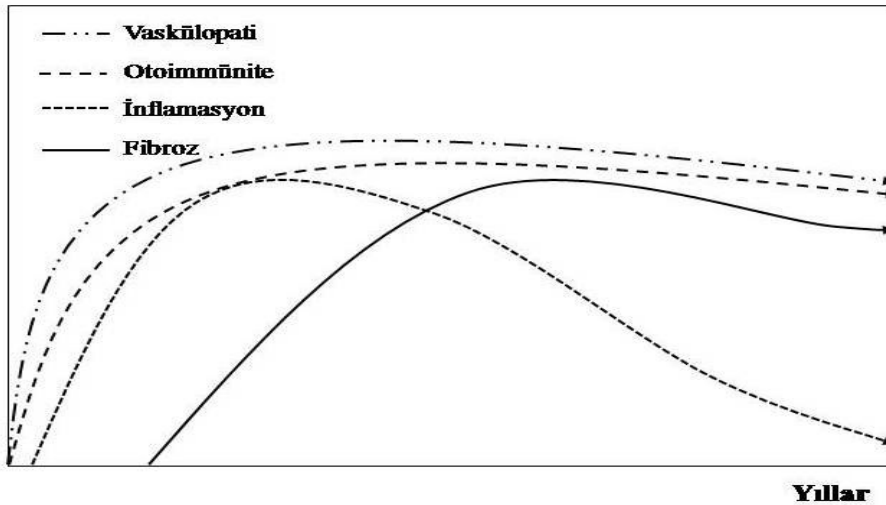
Günümüzde, skleroderma patogenezi ile ilgili tartışmalar sürmektedir ve etkin bir tedavi protokolu bulunmamaktadır. Skleroderma, nadir görülen bir hastalıktır ve hastalar romatoloji polikliniklerine hastalığın değişik evrelerinde başvurumaktadırlar. Bu

nedenle, yeterli sayıda ve homojen bir hasta popülasyonu sağlanamamakta ve bu durum skleroderma çalışmaları açısından deneysel hayvan modellerini önemli kılmaktadır. Günümüze kadar birçok deneysel skleroderma modeli tanımlanmıştır. Bu modellerden, oluşturulmasının kolaylığı ve insandakine benzer immünolojik ve histopatolojik özellikler göstermesi nedeniyle bleomisin (BLM) ile uyarılmış dermal fibroz/skleroz modeli tercih edilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, BLM ile oluşturulan deneysel skleroderma modelinde, bir proteazom inhibitörü olan bortezomibin dermal fibrozun önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin araştırılmasıdır.

1.1. Genel bilgiler

Skleroderma, deri ve iç organların yaygın fibrozu ile karakterize kronik otoimmün inflamatuvar bir hastalıktır. Sklerodermanın etiyoloji ve patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır ve romatizmal patolojiler arasında tedavisinde en başarısız olunan bir hastalıktır. Sklerodermadaki başlıca patolojiler vaskülopati, otoimmünite, inflamasyon ve fibrozdur (Şekil 1). Sklerodermada özellikle küçük arterler, arteriyol ve kapillerlerin tutulduğu proliferatif, tıkaçıcı bir vaskülopati görülmektedir. Vaskülopati, endotel hücrelerinin aktivasyonu ve yıkımı ile başlar. Aktive fibroblastlardan salgılanan kollajen, fibronektin ve glukozaminoglikanlar fibroza yol açar.



Şekil 1. Sklerodermadaki temel patolojik özelliklerin hastalığın zamanla değişen fenotipine katkıları

1.1.1. Epidemiyoloji

Hastalık en sık 30-50 yaşlarında görülmektedir ve kadın/erkek oranı 8/1'dir (14). Amerika Birleşik Devletleri'nde erişkin popülasyonda skleroderma insidans ve prevalansı sırasıyla milyonda 19.3 ve 242 olarak bildirilmiştir (15).

1.1.2. Etiyoloji

Sklerodermanın etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamasına karşın, genetik ve çevresel faktörler etiyolojiden sorumlu tutulmaktadır.

Skleroderma etiyolojisinde genetik faktörlerin rolü yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Birinci derece yakınlarında skleroderma bulunan bireylerde, skleroderma gelişme olasılığı artmaktadır. Normal popülasyonda skleroderma gelişme riski % 0.026 iken, birinci derece yakınlarında skleroderma bulunan bireylerde bu risk % 1.6 olarak belirlenmiştir (16). İkiz çalışmalarında, düşük klinik konkordans oranı (% 4.7) bildirilmesine karşın, anti-nükleer antikor (ANA) konkordansı çok daha yüksek (tek yumurta ve çift yumurta ikizlerinde sırasıyla % 90 ve % 40) bildirilmiştir (17). Bu bulgular, hastalığın oluşumunda genetik faktörlerin tek başına sorumlu tutulamayacağını göstermektedir. Transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β), monosit kemoatraktant protein 1 (MCP-1), IL-1 α , TNF- α , ESM proteinleri (fibronektin, fibrillin vb.), nitrik oksit (NO), endotelin-1 ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) genleri araştırılmış ve bu genlerdeki bazı polimorfizmler sklerodermaya duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir (18).

Silika tozları, vinil klorid, L-triptofan, meme silikon implantları ve organik çözücüler skleroderma ile ilişkilendirilen çevresel faktörlerdir (19). Mesleksel uğraşlar nedeniyle vinil klorid ile karşılaşan işçilerin çoğunda Raynaud fenomeni (RF) ve sklerodermaya özgü deri bulguları gözlenmektedir (20). 1980'li yıllarda, İspanya'da epidemik toksik yağ sendromu ve ilerleyen yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde görülen L-triptofan kullanımı ile ilişkilendirilen eozinofili-miyalji sendromunun deri bulguları, skleroderma ile benzerlikler göstermektedir (19). Diğer birçok çevresel ve mesleksel faktörün skleroderma ile ilişkileri araştırılmasına karşın, bu risk faktörlerinin birçok hastada bulunmayışı nedeniyle skleroderma etiopatogenezinden tek başlarına sorumlu tutulamayacaklarını düşündürmektedir (19).

Bakteriyel ve viral çeşitli enfeksiyöz ajanların (helikobakter pilori, sitomegalovirüs [CMV], parvovirus B19, epstein bar virus [EBV] ve retroviruslar) skleroderma etiyojijisinde rol alabileceği düşünölmüştür (21). Skleroderma hastalarında CMV spesifik antikorların artmış olduğu ve bu virusun deney hayvanlarında skleroderma vaskülopatisine benzer vasküler lezyonlara yol açtığı gösterilmiştir (22, 23). Sağlıklı insanlarda % 0.6 sıklığını aşmayan parvovirus B19 varlığı, skleroderma hastalarında % 4 sıklığında bulunmuş (24) ve kemik iliği biyopsilerinde bu virus çok daha yüksek sıklıkta (% 57) saptanmıştır (25). SSc hastalarında, helikobakter pilori seroprevelansının da yüksek olduğu (% 78) gösterilmiştir (26). Enfeksiyöz ajanlar, moleküler benzerlik ve/veya direkt endotelyal hücre hasarı yaparak, skleroderma etiopatogenezine katkı yapıyor olabilir (21).

Skleroderma hastalarının kanında ve deri lezyonlarında, fetal orjinli mikrokimerik hücrelerin artmış olduğu gözlenmiştir (27, 28). Skleroderma, kadınlarda erkeklerden yaklaşık 8 kat daha sık görölmekte ve çoğu hastada doğurganlık çağı sonrası başlamaktadır (14). Allojenik transplantasyonları izleyen komplikasyonlardan olan *graft-versus-host* hastalığı (GVHD) ile skleroderma arasında histolojik, patojenik ve klinik benzerlikler olması, skleroderma etiopatogenezinde mikrokimerizmin rol oynuyor olabileceğini düşöndürmektedir (27). Ancak, sağlıklı bireylerde bile mikrokimerik hücrelerin saptanması, bazı hastalarda mikrokimerik hücrelerin olmayışı, hastalığın başlangıcından önce hiç gebeliğı olmayan kadın hastaların varlığı ve erkeklerde de hastalığın görölmesi, mikrokimerizmin SSc etiopatogenezindeki rolü açısından soru işaretleri taşımaktadır (27).

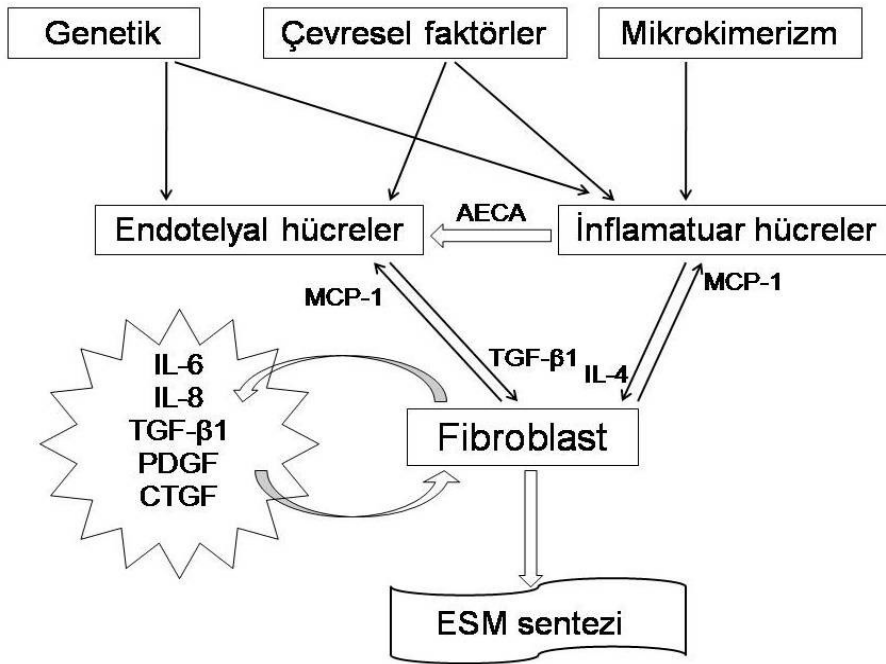
1.1.3. Patogenez

İmmün aktivasyon ve vaskülopati (endotelyal hiperaktivasyon) sonucu fibroblastik aktivasyon ve ESM yapımında artış ve ESM degradasyonunda azalma, skleroderma patogenezinin temel özellikleri olduğu bilinmesine karşın (1-3, 29), sklerodermanın patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Patogenezin endotelyal hücre hasarı ve immün aktivasyon bölümü için, genetik ve çevresel faktörler ve mikrokimerizm tetikleyici risk faktörleri olarak gösterilmektedir

(Şekil 2) (29).

Vaskülopati ile ilişkili RF ve kapilleroskopik anormallikler, sklerodermanın öncül bulgularındandır ve prelinik dönemde bile saptanabilmektedir. Bu durum, vaskülopatinin skleroderma patogenezindeki önemini ortaya koymaktadır. Vaskülopati, endotelial hasar sonucu, inflamatuvar hücrelerin adezyonuna ve migrasyonuna neden olmaktadır ve fibro-intimal proliferasyon ve epizodik vazospazmlar ile karakterizedir (30). Bu proliferasyonun nedeni net olarak bilinmemektedir ve dokularda iskemi ile sonuçlanmaktadır.



Şekil 2. Skleroderma patogenezinde rol aldığı düşünülen olası yollar (29. kaynaktan uyarlanmıştır)

AECA; anti-endotelial hücre antikor, MCP-1; monosit kemoatraktan protein-1, TGF-β1; transforme edici büyüme faktörü-β1, IL; interleokin, PDGF; trombosit kaynaklı büyüme faktörü, CTGF; kollojen doku büyüme faktörü, ESM; ekstraselüler matriks.

Endotelial hücre kültürlerine fibroblast büyüme faktörü-1 (31) veya TNF-α ve IL-1β gibi proinflamatuvar sitokinler eklendiğinde (32), endotelial hücrelerin miyofibroblastik hücrelere dönüştüğü bildirilmiştir. Bir oksidan olan homosisteinin de endotelial-miyofibroblastik hücre dönüşümünü tetiklediği gösterilmiştir (33).

İmmün aktivasyon kanıtları, vaskülopatide olduğu gibi, deri fibrozu oluşmadan önce gösterilebilmektedir (22, 34). Skleroderma hastalarının deri lezyonlarının histopatolojik incelenmelerinde T lenfositler, makrofajlar, mast hücreleri ve daha az oranda B lenfosit infiltrasyonları saptanmıştır (22).

Sklerodermada IL-4, TGF- β ve IL-17 gibi T lenfosit aracılı sitokinler ve T lenfosit aktivasyon belirteçlerinden olan IL-2 reseptör ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Aktive olan T lenfositler, CD154/CD40 ligandı aracılığı ile fibroblastlara bağlanarak doğrudan veya IL-4 ve TGF- β gibi profibrotik sitokinler aracılığı ile dolaylı olarak fibroblastik aktivasyona ve sonuçta kollajen, fibronektin gibi ESM yapıtaşlarının sentezinde artışa neden olur. IL-17, endotelial hücrelerden interselüler hücre adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerinin üretimini artırarak, inflamatuvar hücre infiltrasyonuna katkı sağlamaktadır (22, 29).

Sklerodermada hastalığa özgü otoantikorların saptanması, otoantikor tipi ile hastalık fenotipleri arasındaki ilişki (Tablo 1) ve hipergamaglobulinemi, B lenfositlerin

Tablo 1. Sklerodermaya özgü otoantikorlar ve bu otoantikorların skleroderma alt grupları ve klinik bulgular ile ilişkileri

Hedef antijenler	SSc alt grupları	Klinik bulgular ile ilişkileri
Topoizomeraz-I	dcSSc	ILD, kalp tutulumu, renal kriz
Sentromer proteinleri	lcSSc	Dijital iskemi, kalsinoz, izole PAH
U3-RNP	dcSSc	PAH,ILD, renal kriz, miyozit
Th/T0	lcSSc	ILD, PAH
PM/Scl	lcSSc	Kalsinoz, miyozit
U1-RNP	MCTD	PAH
RNA polimeraz III	dcSSc	Yaygın cilt tutulumu, renal kriz

RNP; ribonükleoprotein, PM/Scl; polimiyozit/skleroderma, RNA; ribonükleik asit, dcSSc; yaygın cilt tutulumlu sistemik skleroz, lcSSc; sınırlı cilt tutulumlu sistemik skleroz, MCTD; mikst bağ dokusu hastalığı, ILD; interstisyel akciğer fibrozu, PAH; pulmoner arteriyel hipertansiyon.

SSc patogeneziindeki rolüne işaret etmektedir. Diğer taraftan, SSc’da B lenfosit

homeostazında değişiklik, poliklonal hiperaktivasyon, duyarlı B lenfositlerde artış ve hafıza B lenfositlerde azalma olduğu gösterilmiştir (35). Ek olarak, endotelial hasara yol açan anti-endotelial hücre antikoru (AECA) B lenfositler tarafından üretilmektedir.

1.1.4. Klinik özellikler

Skleroderma klinik bulgularına göre, lokalize ve sistemik skleroderma olarak iki alt gruba ayrılır. Lokalize formlarda (Tablo 2), sistemik sklerodermadan farklı olarak RF, yapısal vasküler zararlanmalar (dijital ülserler, pulmoner arteriyel hipertansiyon [PAH] vb.), otoimmün belirteçlerde olumluluk ve iç organ tutulumları bulunmamaktadır. En sık görülen lokalize skleroderma formu olan morfea, morfolojik paterni ve etkilenen deri dokusunun genişliğine göre alt gruplara ayrılmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Skleroderma grubu hastalıkların sınıflandırılması (2, 36)

Lokalize (36)	Sistemik (2)
1. Plak morfea	1. Pre-skleroderma
a. Plak morfea	2. Sınırlı kutanöz sistemik skleroz (lcSSC)
b. Guttat morfea	3. Diffüz kutanöz skleroderma (dcSSC)
c. Pasini ve Perini atrofodeması	4. Sklerodermasız skleroderma
d. Keloid morfea	5. Çakışma sendromları
2. Yaygın morfea	
3. Büllöz morfea	
4. Derin morfea	
a. Subkutanoz morfea	
b. Eozinofilik fasiit	
c. Morfea profunda	
5. Lineer skleroderma	
a. Lineer morfea	
b. <i>En coup de sabre</i> skleroderma	

Sistemik formlarda (Tablo 2), deri tutulumuna vaskülopati, otoimmünite kanıtları veya iç organ tutulumuna ilişkin klinik bulgular eşlik etmektedir. Hastalardaki ilk yakınmalar ve klinik bulgular çoğu zaman nonspesifiktir. RF, halsizlik-yorgunluk ve kas-iskelet sistemi yakınmaları başlıca klinik bulgulardır. Bu klinik bulgular haftalar-aylar boyunca devam edebilir. İlk spesifik bulgu, el ve parmak derisindeki şişlik ile

başlayan sertleşmedir. Bu aşamadan sonraki klinik seyir oldukça değişkendir. Klinikte en sık karşılaşılan sistemik formlar olan diffüz cilt tutulumlu SSc (dcSSc) ve sınırlı cilt tutulumlu SSc (lcSSc), temel olarak cilt tutulumu lokalizasyonu ve genişliğine göre ayrılmış olmakla birlikte, pekçok yönüyle farklılıklar göstermektedirler. Pre-skleroderma ve sklerodermasız skleroderma (*scleroderma sine scleroderma*) nadir karşılaşılan diğer sistemik klinik formlardır (Tablo 2). Pre-skleroderma, tipik deri tutulumu olmaksızın, RF'ne SSc'a özgü otoantikorların olumluluğu veya tırnak yatağı kapilleroskopik anormalliklerinin eşlik ettiği klinik formdur. Sklerodermasız sklerodermada ise SSc'a özgü deri tutulumu bulunmaksızın, SSc'un tipik iç organ tutulumları gözlenmektedir.

Sınırlı cilt tutulumlu SSc'da, deri tutulumu, gövde tutulumu olmaksızın, ekstremitelerin distal kısımlarına yerleşiktir. RF, lcSSc hastalarının çoğunda, deri tutulumundan ortalama 5-10 yıl önce başlamaktadır. lcSSc'da, dcSSc ile karşılaştırıldığında, iç organ tutulumları daha az görülmekte veya daha geç dönemde ortaya çıkmaktadır. lcSSc'un sık karşılaşılan klinik bulguları kalsinoz, RF, özefagus dismotilitesi, sklerodaktili ve telenjiyektazi olup, bu bulgular *CREST* sendromu olarak isimlendirilmiştir. Ek olarak, interstisyel akciğer fibrozu (ILD) olmaksızın gelişen PAH, lcSSc'un önemli bir komplikasyonudur. lcSSc'da sıklıkla anti-sentromer antikor pozitifliği vardır. lcSSc'un prognozu, dcSSc'dan daha iyidir.

Cilt tutulumunun ekstremitelerin proksimaline ve gövdeye kadar ilerlediği form, dcSSc olarak adlandırılmaktadır. lcSSc'dan farklı olarak, dcSSc'da RF ile deri tutulumu başlangıcı arasındaki süre daha kısadır. Bu grup hastalarda, sıklıkla anti-sentromer antikor negatif, anti-scl-70 (anti-topoizomeraz-I) antikoruna ise pozitifdir. dcSSc'da, iç organ tutulumu (akciğer, kalp, böbrek ve gastrointestinal sistem) daha sıktır ve prognoz daha kötüdür. Akciğer tutulumunun bir formu olan ILD, başlangıçta efor dispnesi ve non-produktif öksürük ile kendini gösterir. Alveollerdeki inflamasyon ve fibrotik süreci interstisyel fibroz izler ve mortalitesi yüksektir. Kalp tutulumu en sık perikardit şeklinde olup, belirgin semptomlara neden olmayabilir. Miyokard tutulumu efor dispnesi, çarpıntı ve göğüs ağrısına neden olabilir. Gastrointestinal sistem tutulumunda en sık yutma

güçlüğü, pirozis, özefageal reflü ve özefajit gözlenir. İnce barsak tutulumu varlığında ise obstrüksiyon, distansiyon, karın ağrısı, ishal ve malnütrisyon belirlenir.

Sistemik skleroz, bir veya daha fazla bağ dokusu hastalığı ile birlikte görülebilir ve bu durumlar çakışma sendromu olarak adlandırılır.

1.1.5. Tedavi

Günümüzdeki tedavi yaklaşımları sklerodermanın bazı bulgularını kontrol altına alıyor olsa da, skleroderma için uluslararası düzeyde kabul edilmiş bir tedavi protokolu bulunmamaktadır (37). Skleroderma tedavisi, tutulan organ sistemlerine ve klinik bulguların ağırlığına göre düzenlenmelidir. Bu nedenle, tedavi planlanırken hastaların organ-sistem tutulumları açısından çok dikkatli değerlendirilmesi gerekmektedir.

Periferik vasküler sistem tutulumunda tedavi: Vasküler sistem tutulumu tedavisindeki temel hedefler RF sıklığını azaltmak, iskemik ülser lezyonların iyileşmesini hızlandırmak ve progresif tıkalı damar hasarının yavaşlatılmasıdır. RF olan hastaların soğuk, stres ve sigara kullanımından kaçınmaları, sıcak tutan giysiler giymeleri ve gerekmedikçe vazospastik ilaç kullanmamaları gerekmektedir. RF tedavisinde dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokerleri (KKB), ACE inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokerleri gibi vazodilatör ilaçların yararı kanıtlanmıştır. KKB, bu amaçla en sık kullanılan vazodilatörlerdir. Ancak, yararları sınırlıdır ve palpasyon, hipotansiyon vb. yan etkileri bulunmaktadır. ACE inhibitörlerinin etkinliğini araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yukarıdaki tedavi ajanları ile yakınmaların kontrol altına alınamadığı veya kontrendikasyonlar nedeniyle kullanılamadığı durumlarda α reseptör blokerleri, fosfodiesteraz tip 5 (PDE-5) inhibitörleri, fluoksetin gibi serotonin geri alım inhibitörleri, topikal nitroglicerine veya intravenöz (iv) prostaglandin analogları kullanılabilir (37, 38).

Yaşam şekli değişikliği önerileri ve vazodilatör ilaçların kullanımına karşın yakınmaları devam eden olgularda, sempatektomi diğer bir tedavi seçeneğidir. Şiddetli RF olan olgularda, iskemik parmak ülserleri önemli bir sorundur. Dijital ülserler nedeniyle başvuran hastalarda ve klasik tedavi yöntemlerine dirençli RF varlığında, klasik tedavi yaklaşımlarına ek olarak, iv iloprost kullanılabilir (37, 38).

Gastrointestinal sistem tutulumunda tedavi: Gastro-özefageal yakınmaları olan hastalarda, kanıt düzeyi yüksek çalışmalar bulunmamasına karşın, karyola baş kısmının yükseltilmesi ve uygun diyet yaklaşımları (sık ve az miktarlarda yemek vb.) gibi yaşam şekli değişiklikleri ve proton pompa inhibitörleri kullanılabilir (37). Metoklopramid ve eritromisin gibi prokinetik ilaçlar, üst gastrointestinal sistem motilitesini artırmak için kullanılabilir. Bu amaçla yapılmış bir çalışmada, sisapridin etkili olduğu ortaya konulmuş (39), ilerleyen yıllarda ise uzun QT sendromu ve aritmilere yol açması nedeniyle sisaprid kullanımdan kaldırılmıştır. Özefagus darlıkları için periyodik endoskopik dilatasyonlar yapılabilir. Alt gastrointestinal sistem semptomları varsa ve bu durum bakteriyel çoğalma ile ilişkilendirilirse, kinolonlar veya amoksisilin-klavulanik asit gibi geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılabilir (37).

İnterstisyel akciğer fibrozunda tedavi: SSC'da pulmoner tutulumları kabacaILD ve PAH olarak iki gruba ayırabiliriz.ILD saptanan olgularda immünsüpresif ilaçlar etkili olabilir (37). Bu açıdan, randomize kontrollü çalışmalarda değerlendirilmiş olan tek immünsüpresif ilaç siklofosfamid ve Avrupa Romatizma Birliği (EULAR) tarafından skleroderma hastalarında gelişenILD tedavisinde önerilmiştir. EULAR, aktifILD saptanan hastalarda, siklofosfamidin oral 1-2 mg/kg/gün veya iv 600 mg/m²/ay dozlarında uygulanmasını, hastalık aktivitesi kontrol altına alındıktan sonra ise idame tedavisi olarak 2.5 mg/kg/gün dozunda azatioprin kullanımını önermiştir. Ancak, siklofosfamid lökopeni, enfeksiyonlara yatkınlık, hemorajik sistit, alopesi ve infertilite gibi yan etkiler yapabilmektedir. Ek olarak, siklofosfamid mesane kanseri vb. ikincil maligniteler ile ilişkilendirilmiştir.

Pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisi: Sklerodermaya ikincil PAH tedavisinde, öncelikle hastanın fonksiyonel durumunun belirlenmesi (Tablo 3) ve vazoreaktivite testi yapılması gerekmektedir. Vazoreaktivite testinde, kısa etkili bir vazodilatör (inhale iloprost veya NO veya iv adenozin veya epoprostenol) uygulandığında, kardiyak debide değişim olmaksızın, ortalama pulmoner arter basıncında ≥ 10 mmHg düşüş olursa test pozitif olarak yorumlanmaktadır (40). Vazoreaktivite testi pozitif olan hastaların oral KKB tedavisine duyarlı oldukları

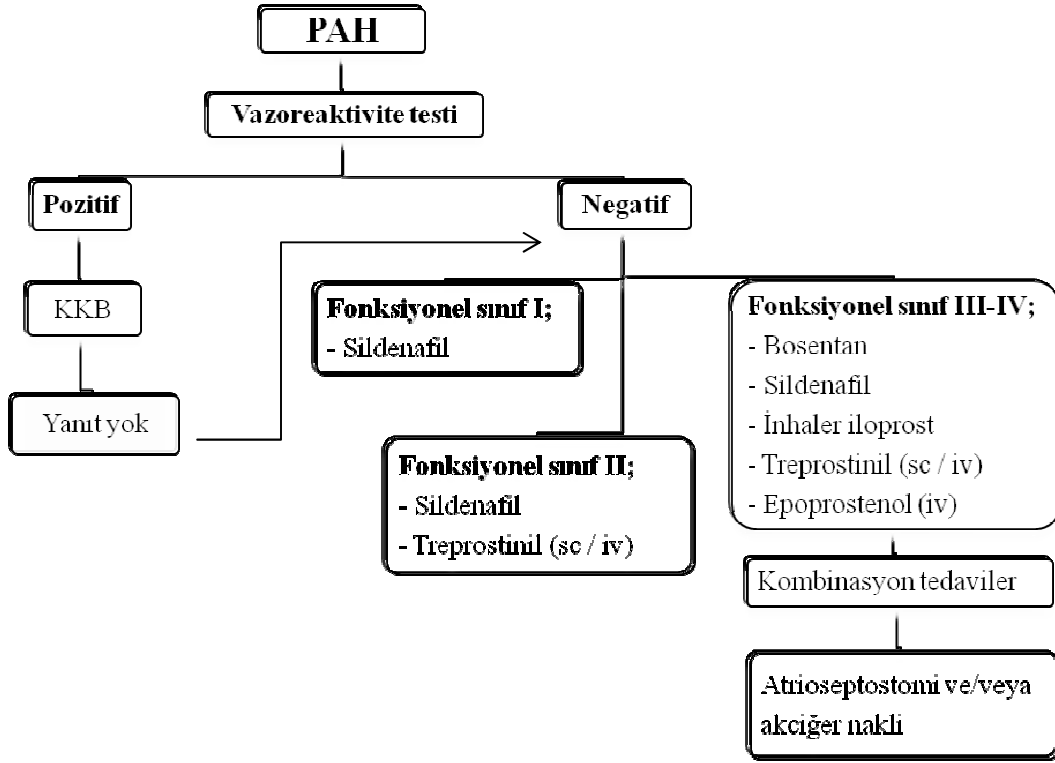
gösterilmiştir. Ancak, idiopatik PAH hastalarının sadece % 13'ünde bu test pozitifdir ve bunların sadece yarısı KKB tedavisinden yararlanmaktadırlar (40). Vazoreaktivite testi negatif olan ve 3-6 ay sonunda KKB tedavisine yanıt vermeyen hastalar, fonksiyonel durumlarına göre, uygun ajanlar ile tedavi edilmelidir (Şekil 3) (41). Bu durumda prostasiklin analogları, endotelin reseptör antagonistleri ve PDE-5 inhibitörleri PAH tedavisinde kullanılabilecek tedavi ajanlarıdır (40). Prostasiklin analoglarından iloprost,

Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü PAH fonksiyonel durum sınıflandırılması (40)

Sınıflar	Tanımlar
I	Fiziksel aktivitede kısıtlanma bulunmayan hastalar; olağan fiziksel aktiviteler dispne, yorgunluk, senkop veya göğüs ağrısına yol açmaz.
II	Fiziksel aktivitesi hafif kısıtlanan hastalar; dinlenirken sıkıntıları yoktur ancak olağan fiziksel aktiviteler bile dispne, yorgunluk, presenkop veya göğüs ağrısına yol açar.
III	Fiziksel aktivitesi ciddi şekilde sınırlanmış hastalar; dinlenme sırasında sıkıntıları yoktur. Ancak olağan fiziksel aktivitelerden daha düşük eylemler bile dispne, yorgunluk, presenkop veya göğüs ağrısına yol açar.
IV	Hastalar, semptomlar olmaksızın herhangi bir aktiviteye katılamazlar ve sağ kalp yetmezliği bulguları vardır. Dinlenme sırasında bile dispne ve/veya yorgunluk gözlenebilir, herhangi bir fiziksel aktivite ile bu yakınmaları artar.

epoprostenol ve treprostinilin egzersiz kapasitesi, dispne skoru, kardiyopulmoner hemodinamiler ve yaşam süresine olumlu etkileri bildirilmiştir. Ancak, epoprostenol sürekli iv olarak uygulanmakta ve infüzyon paketinin devamlı soğutulması gerekmektedir (epoprostenolün ısıya duyarlı olması nedeniyle). Ek olarak, infüzyonun kesilmesi durumunda şiddetli ve ani pulmoner ödem gelişebilmektedir. Ayrıca, baş ağrısı, çene ağrısı, bulantı-kusma ve abdominal kramplar görülebilmektedir (40). Benzer yan etkiler gösteren diğer bir prostasiklin analogu olan treprostinil subkutan (sc) veya iv olarak uygulanabilmekte ve soğutma işlemine gereksinim yoktur (ısıya duyarlı olmaması nedeniyle). iv uygulamanın sc uygulamaya göre daha az yan etki oluşturduğu

gözlenmiştir (40). İloprost, kliniğimizde de kullanımda olan bir prostasiklin analogu olup, inhalasyon şeklinde uygulanması daha az sistemik yan etki oluşturmaktadır. Oral prostasiklin analogu olan beraprostla ilişkin çalışmalar devam etmektedir.



Şekil 3. PAH tedavi algoritması (40, 41)

PAH; pulmoner arteriyel hipertansiyon, KKB; kalsiyum kanal blokerleri

Bosentan, sitaksentan ve ambrisentan, güçlü bir vazokonstriktör ve düz kas mitojeni olan *endotelin-1*'in reseptör antagonistleridir (40). *Endotelin-1*, etkilerini ET_A ve ET_B olarak bilinen iki reseptör üzerinden gerçekleştirmektedir. Ancak, ET_B reseptörünün rolü henüz tartışmalıdır. Bosentan, her iki *endotelin-1* reseptörünün, sitaksentan ve ambrisentan ise spesifik olarak ET_A reseptörünün antagonistleridir. Bosentan, hastalarda egzersiz kapasitesi, pulmoner vasküler direnç ve pulmoner arter basıncı üzerine olumlu etkiler göstermektedir. En sık gözlenen yan etkisi hepatotoksisitedir ve yaklaşık olarak % 5-10 hastada karaciğer fonksiyon testlerinde normalin 3 katı veya daha fazla artışa neden olabilmektedir (40). *Endotelin-1* reseptör

antagonistlerinin etkileri yavaş ortaya çıktığından, ileri evrede ve hemodinamik olarak stabil olmayan hastalarda ilk tercih olmamalıdır (40).

Nitrik oksit, vazodilatör etkisini hücre içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden göstermektedir. Akciğer dokusunda da yoğun olarak bulunan PDE-5, cGMP'ı hızlı bir şekilde inaktive etmektedir. PDE-5 inhibitörü olan sildenafil, cGMP ve böylece NO üzerinden pulmoner vasküler yapılarda vazodilatör etki göstermektedir. Sildenafil kullanımında en sık karşılaşılan yan etki baş ağrısıdır ve genellikle iyi tolere edilebilmektedir (40).

Pulmoner arteriyel hipertansiyona ikincil son dönem sağ kalp yetmezliği geliştiğinde ve kombine tedavilere karşın hastanın yakınmaları kontrol altına alınamadığında atrioseptostomi, kalp-akciğer veya sadece akciğer transplantasyonu uygun seçeneklerdir (37).

Renal krizde tedavi: Malign hipertansiyon ve hızlı ilerleyen böbrek yetmezliği bulguları ile seyreden renal kriz, sklerodermanın en önemli komplikasyonlarından biridir. Renal kriz, önemli derecede mortal olup, 1 ve 5 yıllık sağ kalım oranları sırasıyla % 15 ve % 10 olarak bildirilmiştir (42). Yüksek cilt skoru (modifiye Rodnan deri kalınlık skoru ≥ 20), eklem kontraktürleri varlığı ve kortikosteroid kullanımı renal kriz gelişimi açısından risk faktörleri olarak belirlenmiştir (43). Renal kriz riski yüksek olan hastalar, kan basıncı ve renal fonksiyonlar açısından daha sık ve düzenli olarak izlenmelidir (37).

Renal kriz tedavisinde ACE inhibitörleri ilk seçilecek ilaçlardır. Kaptopril ve enalapril, sağ kalım oranlarını önemli derecede artırmış (1 ve 5 yıllık sağ kalım oranları sırasıyla, tedavi grubunda % 76 ve % 66, plasebo grubunda % 15 ve % 10 olarak belirlenmiştir) ve kalıcı diyalize gereksinim duyan hasta sayısını azaltmıştır (42). Bazı hastalarda, tüm tedavi yaklaşımlarına karşın, geçici ve/veya kalıcı diyaliz ve sonuçta böbrek transplantasyonu gerekebilmektedir.

Kalsinoz tedavisi: Sklerodermada % 25 sıklıkta karşılaşılan kalsinoz, tekrarlayan mikrotravmalara uğrayan ön kol, dirsekler ve parmaklar gibi bölgelerde gözlenmektedir ve lcSSc formunda daha sıktır. Kalsinoz, yerleştiği bölgelerde deriyi

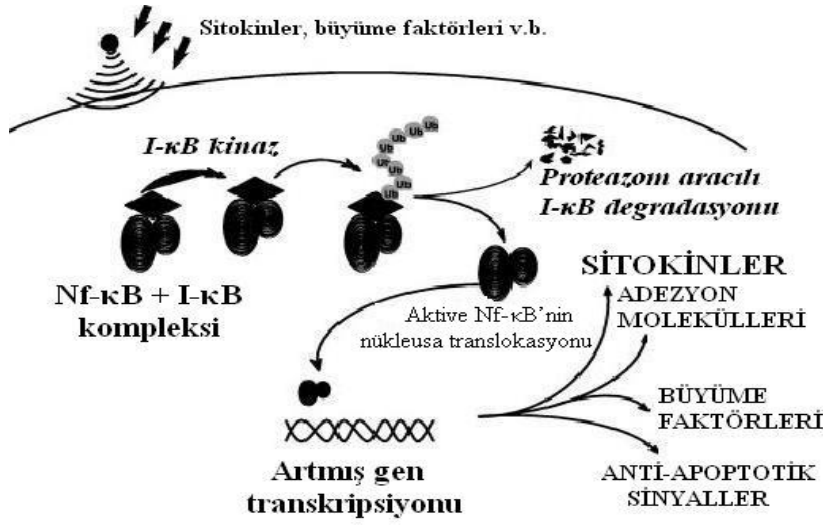
hasarlayarak, ülser lezyonlara ve ikincil enfeksiyonlara neden olmaktadır (44). Değişik çalışmalarda, kalsinoz tedavisinde warfarin, minosiklin, alüminyum hidroksit, aspirin, kolşisin, probenesid, bifosfonatlar ve diltizemin etkinlikleri araştırılmıştır. Ayrıca, yüzeysel ve küçük kalsinozlarda karbondioksit lazer tedavisi, büyük kalsinozlarda ise cerrahi işlemler uygulanabilmektedir. Ancak, bu tedavi yaklaşımlarından hiçbiri kalsinozun önlenmesi ve tedavisinde standart tedavi olarak kabul edilmemektedir (44).

Cilt tutulumunun tedavisi: Günümüzde, yerleşmiş fibroz tedavisinde kullanılabilecek olan onay almış herhangi bir temel etkili ilaç bulunmamaktadır (38). Kortikosteroidler ise hastalık progresyonu üzerine etkili değildir (38). Ek olarak, kortikosteroidler renal krizi de provoke edebilmektedir. Sklerodermada azatioprin, klorambusil ve 5-florourasil gibi immünsüpresifler etkisiz bulunmuştur (45, 46). Uzun yıllardır kullanılmakta olan D-penisilaminin ise etkisi tartışmalıdır (47). Metotreksat ile yapılmış çalışmalarda (48, 49) kısmi bir etki rapor edilmiş ve bu bulgular doğrultusunda metotreksat EULAR'ın SSc tedavi önerilerinde yerini almıştır (37). Ancak, klinik pratikte metotreksat tedavisinin etkili olmadığı gözlenmektedir ve kendi kliniğimizce yapılmış olan deneysel bir çalışmada metotreksatın dermal fibroz üzerine olumlu etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur.

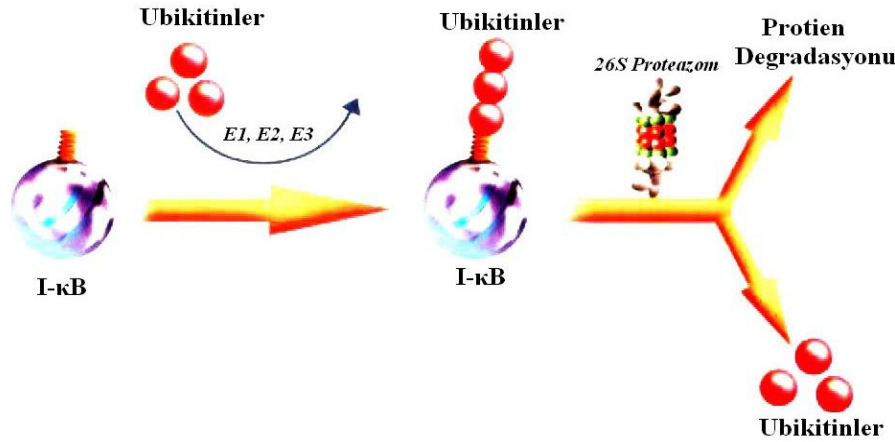
1.1.6. Proteazom inhibisyonu

Sistemik skleroz hastalarının deri biyopsilerinde T lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere inflamatuvar hücre infiltrasyonu belirlenmiştir (4). Ek olarak, SSc hastalarında TNF- α , IL-2, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin serum düzeylerinin yükseldiği ve deri tutulumunun şiddeti ile korele olduğu gösterilmiştir (5).

Nükleer faktör- κ B adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve bazı sitokinlerin salınımını artırır ve anti-apoptotik etki gösterir (6). Nf- κ B aktivasyonu, I- κ B tarafından kontrol edilmektedir (6) ve I- κ B degradasyonuna yol açan proteazom, Nf- κ B'nin aktivasyonunu artırmaktadır (Şekil 4 ve 5) (6, 7). Multipl miyelom tedavisinde kullanımı onaylanmış olan bortezomib, proteazomun 'kimotriptik treonin proteaz' aktivitesinin geri dönüşümlü ve selektif güçlü bir inhibitörü olup, Nf- κ B aktivasyonun suprese ederek anti-inflamatuvar etkiler göstermektedir (6, 7).



Şekil 4. NF-κB aktivasyon yolağı ve sonuçları



Şekil 5. Proteazom aracılı I-κB degradasyonu

Ekstraselüler matriks elamanlarının yapımı ve yıkımı dinamik bir denge halinde olup, bu dengenin yapım lehine bozulması fibrojeniz ile sonuçlanmaktadır (8, 9). MMP'lar ESM'i degrade eder, TIMP'lar ise MMP aktivitesini suprese eder (8, 9). İnsan dermal fibroblast hücre kültüründe, bortezomibin kollejen sentezini ve TIMP-1 düzeyini azalttığı, MMP-1 düzeyini ise artırdığı gösterilmiştir (10). Bortezomibin, farelerde safra yolu ligasyonu ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarı modelinde, hepatik fibrojenizi baskıladığı ortaya konulmuş ve bu durum karaciğer fibrozunda önemli rolü olan hepatik stellat hücrelerin artmış apoptozu ile ilişkilendirilmiştir (11). Ek olarak, *in vivo*

proteazom inhibisyonunun karaciğer (11), kalp (12) ve böbrekte (13) oluşturulan fibrozu önlediği gösterilmiştir.

1.1.7. Sklerodermada deneysel hayvan modelleri

Skleroderma nadir görülen bir hastalıktır ve kliniklerde izlenen hastalar heterojenlik göstermektedir (2, 50). Bu nedenle, ideal bir klinik çalışma planlanması ve yapılması olası değildir. Klinik çalışmaların yerini tam olarak alamayacağı bilinmesine karşın, deneysel hayvan modelleri, değişik insan hastalıklarının patogenezinin anlaşılması ve yeni tedavi protokollerinin belirlenmesinde klinisyenlere önemli ipuçları sunabilmektedir. Literatürde, 15 farklı skleroderma deneysel hayvan modeli bildirilmiştir (Tablo 4) (51-54).

Tablo 4. Sklerodermada deneysel hayvan modelleri

1. Spontan olarak oluşan	UCD-200 tavuk
	Tsk1 fare
2. Uyarılma ile oluşan	Tsk2 fare
	BLM (fare)
	TGF- β ve CTGF (fare)
	Vinil klorid (fare)
	Civa klorid (fare)
3. Transplantasyon	Sklerodermatoz GVHD (B10.D2 vs. Balb/c)
	Modifiye sklerodermatoz GVHD (B10.D2 vs. RAG-/-)
	Siklosporin A ile uyarılan otoimmünite modeli (rat)
4. Genetik	T β RII Δ k fare
	TBR1 ^{CA} fare
	MRL/lprYR-/- fare
	RLX-/- fare
	İntegrin α 1 null (knockout) fare

UCD-200; University of California at Davis line-200, Tsk; tight skin, BLM; bleomisin, TGF- β ; transforme edici büyüme faktörü-beta, CTGF; bağ dokusu büyüme faktörü, GVHD; Graft-versus-host hastalığı, RAG-2-/-; recombination activating gene knockout, T β RII Δ k; TGF- β 1 tip II reseptör kinaz defisiti, TBR1^{CA}; yapısal etkin (constitutively active) TGF- β reseptör tip I transgenik fare, MRL/lprYR-/-; IFN- γ reseptörü gen defisiti olan MRL/lpr türü fare, RLX-/-; Relaksin gen defisiti olan fare.

Deneysel çalışmalarda hastalıkların patogenezinde rol alabilecek olası çevresel faktörler kontrol edilebilmekte, patogenik süreçte rol alabilecek olası tüm basamaklar

her yönüyle test edilebilmektedir. Diğer taraftan, deneysel modellerin avantajları yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Çoğu zaman, belirli bir hastalığa özgü deneysel modeli bulmak ve uygulamaya sunmak zor olmaktadır. Seçilecek olan deneysel model, ilgili hastalığın özelliklerini, olanaklar ölçüsünde, tama yakın yansıtmalıdır.

Sklerodermada vaskülopati, otoimmünite, inflamasyon ve fibroz gelişimi bilinmesine karşın, hastalığın patogenik yolakları tam olarak aydınlatılamamıştır (55). Patogenik yolakların aydınlatılması ve yeni tedavi protokollerinin belirlenmesi açısından, deneysel çalışmalarda spontan olarak oluşan ya da transplantasyon, genetik manipülasyonlar, kimyasal maddeler veya ilaçlar ile uyarılarak oluşturulan çeşitli skleroderma hayvan modelleri kullanılmaktadır (51-54). İmmünite/otoimmünite, vaskülopati ve fibroz sklerodermanın temel özellikleridir. İdeal bir SSc deneysel hayvan modelinden, bu komponentlerin hepsini içermesi beklense de tanımlanmış olan modellerden hiçbiri sklerodermanın tüm özelliklerini birlikte sergileyememektedir (Tablo 5).

UCD-200 tavuk modeli, beklentileri birçok yönü ile karşılamaktadır. Bu model histopatolojik bulguların spontan oluşması, oluş sırası ve etkilenen doku ve organlar açısından insan sklerodermasına oldukça benzerlik göstermektedir. Ancak, tavuklar memeli hayvan değildir. Deneysel çalışmalarda temel amaç, insan skleroderma hastalığına benzer bir model ile çalışmak olmalıdır. Bu doğrultuda, memeli hayvanlarda oluşturulmuş ve/veya oluşturulacak modeller daha akılcı gözükmektedir.

Siklosporin A ile uyarılan otoimmünite ve UCD-200 tavuk modelleri dışındaki skleroderma deneysel hayvan modellerinin hepsi farelerde geliştirilmiştir. Fare derisinin ince olması, kıllar ile kaplı olması ve deride kıl foliküllerinin sık olması (56) fare çalışmalarının dezavantajlarıdır. Diğer taraftan, fare ile ilgili önemli genetik bilgi birikimi varlığı, fare hayvan modellerinin bir avantajıdır. Diğer modeller açısından bu olanaksızdır. Ek olarak, fare genomu kısmen insan genomu ile benzerlikler sergilemektedir (56). Fareler hızlı üreyebilmekte, her doğumda fazla sayıda yavrulayabilmekte, çabuk büyümektedirler ve yaşam süreleri kısadır. Bu nedenle, fare

çalışmalarının maliyeti daha düşüktür. Diğer taraftan, en sık kullanılmış modeller olması nedeniyle, fare modellerine ilişkin bilgi birikimi oldukça fazladır.

Tablo 5. Skleroderma deneysel hayvan modelleri arasındaki farklılıklar

Deneysel modeller	Vaskülopati	Otoimmünite	İnflamasyon	Fibrojeniz
UCD-200 tavuk	+	+	+	+
Tsk1 fare	-	+	-	+
Tsk2 fare	-	+	+	+
BLM (fare)	-	+	+	+
Vinil klorid (fare)	+	-	+	+
Civa klorid (fare)	NA	+	NA	-
TGF- β ve CTGF (fare)	NA	NA	-	+
Sklerodermatoz GVHD (fare)	-	-	+	+
Modifiye sklerodermatoz GVHD (fare)	+	+	+	+
Siklosporin A ile uyarılan otoimmünite (rat)	-	-	+	+
T β RIIAk fare	NA	NA	+	+
TBR1 ^{CA} fare	+	NA	-	+
MRL/lpr γ R-/- fare	+	NA	+	+
RLX-/- fare	NA	NA	-	+
İntegrin α 1 null (knockout) fare	NA	NA	-	+

UCD-200; University of California at Davis line-200, Tsk; tight skin, BLM; bleomisin, TGF- β ; transforme edici büyüme faktörü-beta, CTGF; bağ dokusu büyüme faktörü, GVHD; Graft-versus-host hastalığı, T β RIIAk; TGF- β 1 tip II reseptör kinaz defisiti, TBR1^{CA}; yapısal etkin (constitutively active) TGF- β reseptör tip 1 transgenik fare, MRL/lpr γ R-/-; IFN- γ reseptörü gen defisiti olan MRL/lpr türü fare, RLX-/-; Relaksin gen defisiti, +; var, -; yok, NA; değerlendirilmemiş.

Skleroderma fare modellerinden modifiye GVHD, ideale en yakın deneysel fare modeli olarak gözükmektedir (Tablo 5). Sklerodermayı oldukça iyi yansıtmaktadır (57). Ancak, bu model ile yapılmış deneysel çalışma sayısı kısıtlıdır. Diğer fare modellerinden Tsk1 ve BLM ile uyarılan skleroderma modelleri, çalışmalarda en çok kullanılmış olanlardır. Tsk1 modeli, spontan fibroz gelişen, oldukça iyi bir modeldir. Ancak, bu modelde, akciğerde fibroz yerine amfizematöz değişiklikler oluşmakta, deride inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmemektedir (51, 53). Bu bulgular, Tsk1 modelinde oluşan fibrozun, sklerodermadan farklı bir patojenik yol izlediğini düşündürmektedir. Daha

sonra geliştirilmiş olan Tsk2 modeli (58), Tsk1 modelinin eksikliklerini kapatmış gibi gözükmektedir. Tsk2 modelinde, sklerodermaya benzer şekilde, dermiste fibroz ve subkutan dokuda atrofi gelişmektedir (58). Ancak, Tsk2 modelinde akciğer fibrozu ve vaskülopati bulunmamaktadır (59).

1.1.7.1. Bleomisin ile uyarılan dermal fibroz

Bleomisin *Streptomyces verticillus* mantarından izole edilen anti-tümör bir antibiyotiktir (60). Onkoloji deneyimleri, BLM'in akciğerde fibroz yapıcı etkisini ortaya koymuştur (61). İlerleyen yıllarda, BLM ile uyarılan deneysel akciğer fibroz modelleri geliştirilmiştir (62, 63). Bu model, günümüzde, en iyi deneysel akciğer fibroz modeli olarak varsayılmaktadır (63).

1983 yılında, Mountz ve ark. (64) iki hafta ara ile tekrarlanan yüksek dozlarda BLM uygulamalarının ratlarda 58. haftada dermal fibroz oluşturduğunu bildirmişlerdir. 1999 yılında, Yamamoto ve ark. (65) BLM ile uyarılmış skleroderma fare modelini geliştirmişlerdir. Bu modelde, araştırmacılar BLM'i fosfat ile tamponlanmış salin (FTS) içerisinde çözündürerek, değişik dozlarda (0.1, 1, 10 ve 100 µg; tüm dozlar 100 µl FTS içerisinde), Balb/c farelerin tıraş edilmiş sırt derisine, her gün, sc olarak enjekte etmişlerdir (65). Araştırmacılar, 1 µg ve daha yüksek dozlarda, tekrarlanan BLM uygulamalarının 3-4. haftadan sonra skleroderma benzeri histopatolojik ve biyokimyasal bulgulara yol açtığını bildirmişlerdir (65, 66). BLM uygulamaları sonlandırıldıktan sonra da skleroderma bulgularının en az 6 hafta devam ettiği ve gūnaşırı uygulamaların da benzer histopatolojik bulguları oluşturabildiği gösterilmiştir (65).

Balb/c fare türüne ek olarak C3H/He, C57BL/6J, A/J, DBA/2, B10.BR, B10.A ve B10.D2 fare türlerinde de dermal skleroz geliştiği raporlanmıştır (52). C3H/He ve B10.A türlerinin, BLM'e daha duyarlı ve deneysel model için daha uygun olduğu belirtilmiştir (52).

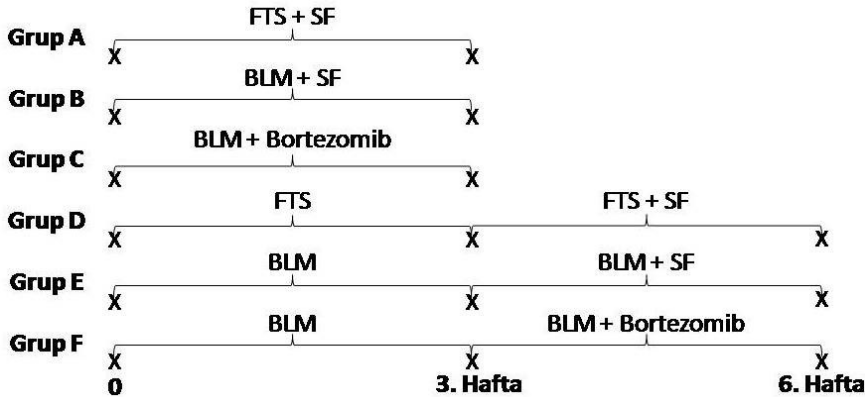
Sklerodermada, hastalığın erken evrelerinde dokularda inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmekte ve ilerleyen evrelerde inflamasyon yerini belirgin fibroza bırakmaktadır. Böylece, BLM ile uyarılan dermal fibroz modeli ve diğer modeller ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, sklerodermanın erken dönemini taklit etmekte

ve hastalığın ilerleyen dönemleri konusunda yeterli bilgi sunamamaktadır. Akhmetshina ve ark. (67), 6 hafta, günaşırı 50 µg BLM uygulandığında 3. haftada fibroz geliştiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar (67), 6 haftalık deneyin ilk 3 haftasını hastalığın erken evresi, sonraki 3 haftasını ise geç evre (yerleşmiş fibroz evresi) olarak yorumlamışlar, tedavi uygulamalarını da sonraki 3 haftada yapmışlardır. Bu modifikasyon, hastalığın geç evresinde tedavi yanıtının değerlendirilmesi açısından uygun bir yöntemdir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

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

2.2. Çalışma grupları ve uygulamalar: Bu çalışmada, BLM ile uyarılmış deneysel skleroderma modelinin erken ve geç (yerleşmiş fibroz) evrelerinde bortezomib tedavisinin etkinliği test edildi. Bu amaçla, erken evre grupları (grup A [kontrol grubu], B [plasebo grubu], C [bortezomib grubu]) ve geç evre grupları (grup D [kontrol grubu], E [plasebo grubu], F [bortezomib grubu]) olarak 6 grup oluşturuldu (Şekil 6). Erken dönem gruplarında BLM ile fibrozun uyarılmasına ve bortezomib tedavisine aynı gün başlandı. Geç dönem gruplarında ise ilk 3 hafta sadece BLM, 21. günden sonra BLM ve bortezomib birlikte uygulandı (Şekil 6).



Şekil 6. Çalışma grupları ve uygulanan tedaviler

FTS; fosfat ile tamponlanmış salin, SF; serum fizyolojik, BLM; bleomisin.

2.2.1. Kontrol grupları: BLM uygulanmayan erken (grup A) ve geç (grup D) dönem kontrol gruplarındaki farelere, sırt derisindeki tıraş edilmiş bir bölgeden, A

grubunda her gün sc FTS ve ek olarak haftada iki kez intraperitoneal (ip) serum fizyolojik (SF) uygulandı. A grubundaki farelere bu uygulamalar ilk 3 hafta süresince, D grubundaki farelere ise sc FTS 6 hafta süreyle ve ip SF haftada iki kez 3. ve 6. haftalar arasında uygulandı.

2.2.2. Bleomisin ve bortezomib uygulamaları; 1 mg BLM, 1 mL FTS içerisinde çözündürülerek, B ve C gruplarındaki farelere 3 hafta, E ve F gruplarındaki farelere ise 6 hafta, 100 µL (100 µg) dozunda, daha önce tanımlandığı şekilde (66), hergün sc uygulandı. Plasebo grupları olarak tanımlanan B grubu farelere ilk 3 hafta, E grubu farelere ise 21. günden çalışma sonuna kadar, haftada iki kez ip SF uygulandı. BLM'e ek olarak, tedavi gruplarından C grubundaki farelere ilk 3 hafta, F grubundaki farelere ise 21. günden çalışma sonuna kadar SF içerisinde çözündürülmüş bortezomib (Velcade, Janssen-Cilag) 1.6 mg/kg dozunda, haftada iki kez ip olarak uygulandı (68).

2.3. Kan ve doku örneklerinin toplanması; Erken dönem gruplarındaki (A, B ve C grubu) fareler 3. haftanın, geç dönem gruplarındaki (D, E ve F grubu) fareler 6. haftanın sonunda, son tedavilerden 24 saat sonra, dekapitasyon ile kurban edildi. Farelerden kan örnekleri alındı, ve enjeksiyon uygulanmış olan sırt derileri daha sonraki incelemeler için eksize edildi. Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, elde edilen serumlar -20°C'de çalışılacağı güne kadar saklandı. Doku örnekleri % 10'luk formalin solusyonu içine konuldu.

2.4. Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler; Formalin solusyonu içerisindeki doku örneklerinden, aynı gün içerisinde, parafin blokları hazırlandı. Bloklardan alınan kesitler *Hematoksilen-Eosin* ve *Masson-Trichom* ile boyanarak, ışık mikroskobunda (Olympus BX-50) X40, X100, X200 ve X400 büyütmede (uzman bir patolog tarafından incelenerek) inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibroz dereceleri belirlendi. Dermal kalınlık (epidermo-dermal bileşke ile dermis-subkutan yağ dokusu bileşkesi arası uzunluk) için, her bir denekte, en az iki farklı preparatta, X100 büyütmede, en az 5 farklı ölçümün ortalaması alındı.

Deparafinize kesitler, monoklonal anti-α-SMA (Actin Muscle Ab-6 [MSA06] Neomarkers) ticari kiti kullanılarak, streptavidin biotin tekniği ile boyandı. Dermal

alandaki, α -SMA pozitif (α -SMA+) fibroblastik hücre sayısını belirlemek için, her bir denekte, en az iki farklı preparatta, X400 büyütmede, en az 5 farklı alandaki α -SMA+ hücre sayısı belirlenip, ortalaması alındı.

2.5. Serum sitokin analizleri; IL-4 ve TGF- β 1 serum düzeyleri, uygun ticari kitler kullanarak (Bender MedSystems, Avusturya), ELISA yöntemi ile belirlendi.

2.6. Western blot analizler; Deri doku homojenatları sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinden sonra jeldeki proteinler nitroselüloz membrana aktarıldı (blotlama). Primer antikolar (Nf- κ B, tip I kollajen, I- κ B ve c-Jun N-terminal kinaz [JNK]1 [Abcam, UK]), % 0.05 oranında Tween-20 içeren tamponda, 1:1000 oranında dilüe edildi ve nitroselüloz membranlar ile +4 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı ve devamında nitroselüloz membranlar tampon solüsyonuyla 5 kez 5 dakika yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37 °C’de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı ve devamında nitroselüloz membranlar tekrar tampon solüsyonuyla 5 kez 5 dakika yıkandı.

Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin solüsyonu kullanıldı. 5-10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda diaminobenzidinle renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların relatif yoğunlukları *Image Analyses System* (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

2.7. İstatistiksel analizler; Çalışmada elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. İstatistiklerin hazırlanmasında *SPSS 11.00* bilgisayar paket istatistik programı (SPSS Inc., Software Chicago, IL, USA) kullanıldı. Analizlerde *Kruskal Wallis*, *Mann-Whitney U* ve *Chi Square* testleri kullanıldı. $P<0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. BLM ile uyarılmış dermal fibroz: 3 hafta BLM uygulanmış olan B grubunda (erken dönem plasebo grubu), A grubu (kontrol grubu) ile karşılaştırıldığında, serum IL-4 düzeyi, dermal kalınlık, dermal alandaki inflamatuvar hücre ve α -SMA+ hücre sayıları (Tablo 6, Şekil 7, 8, 9 ve 10) ile tip I kollojen, Nf- κ B ve JNK1 ekspresyonlarında artış ve I- κ B ekspresyonunda azalma (Şekil 11) vardı.

6 hafta BLM uygulanmış olan E grubunda (geç dönem plasebo grubu), D grubu (kontrol grubu) ile karşılaştırıldığında, dermal kalınlık, α -SMA+ hücre sayısındaki ve tip I kollojen, Nf- κ B ve JNK1 ekspresyonlarındaki artışlar ile I- κ B ekspresyonundaki azalma devam etmekteydi (Tablo 6, Şekil 9, 10 ve 11). Ancak, dermal alandaki inflamatuvar hücre sayısı ve serum sitokin düzeylerinde artış yoktu (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışma gruplarında serum sitokin düzeyleri ve histopatolojik bulgular

	Üç haftalık uygulamalar			Altı haftalık uygulamalar*		
	A grubu	B grubu	C grubu	D grubu	E grubu	F grubu
IL-4 (pg/ml)	200.7±48.4	224.8±9.9 ^a	212.8±25.9	204.2±34.1	202.7±56.7	198.4±62.6
TGF- β 1 (pg/ml)	146.6±98.9	109.5±84.3	168.3±76.5 ^c	214.1±68.8	241.3±121.0	182.6±66.1
İnflamatuvar hücre sayısı (/HPF)	26.3±5.4	68.8±41.6 ^b	25.1±11.5 ^e	20.3±5.8	28.2±7.3	23.3±5.4
α -SMA+ hücre sayısı (/HPF)	3.8±1.0	10.6±1.3 ^b	5.3±0.8 ^e	4.01±0.8	8.4±1.5 ^g	9.01±2.2
Dermal kalınlık (μ m)	202.1±31.7	375.8±54.7 ^b	296.9±40.3 ^d	188.7±25.5	235.8±23.7 ^f	224.8±17.1

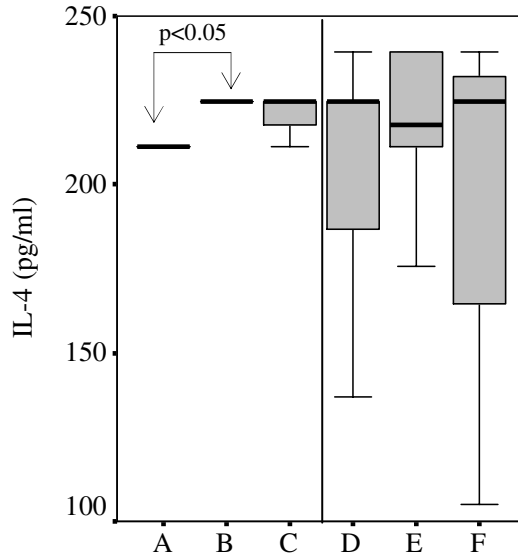
IL; interleukin, TGF- β 1; transforme edici büyüme faktörü- β 1, α -SMA; α -düz kas aktin, HPF; büyük büyüme alanı. *F grubu farelere bortezomib tedavisi 21. günden sonra uygulandı. A grubu ile karşılaştırıldığında: ^ap<0.05, ^bp<0.001. B grubu ile karşılaştırıldığında: ^cp<0.05, ^dp<0.01, ^ep<0.001. D grubu ile karşılaştırıldığında: ^fp<0.01, ^gp<0.001.

3.2. BLM ile uyarılmış dermal fibrozun bortezomib ile tedavisi: Bortezomib ve BLM uygulamaları birlikte başlanmış olan C grubunda, B grubu (erken dönem plasebo grubu) ile karşılaştırıldığında, dermal kalınlık, dermal alandaki inflamatuvar hücre sayısı ve α -SMA+ hücre sayısında, tip I kollojen, Nf- κ B ve JNK1

ekspresyonlarında anlamlı azalma ve I- κ B ekspresyonunda anlamlı artış vardı (Tablo 6, Şekil 8, 9, 10 ve 11). Ancak, serum TGF- β 1 düzeyinde ise, şaşırtıcı bir şekilde, artış vardı (Tablo 6).

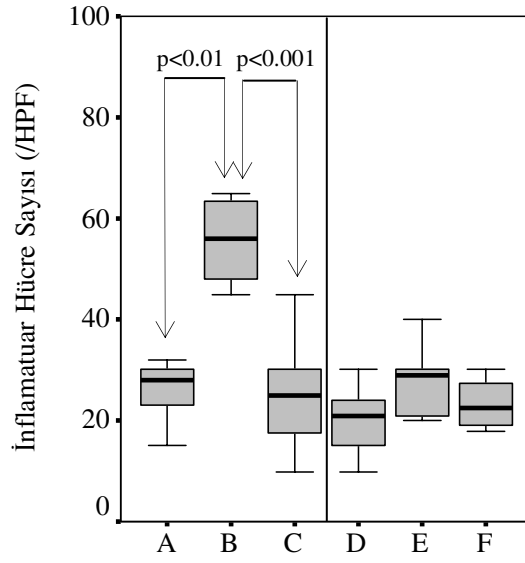
6 hafta BLM uygulanmış olan E (geç dönem plasebo grubu) ve F (geç dönem bortezomib grubu) grupları arasında, serum sitokin düzeyleri, dermal inflamatuvar hücre sayısı, α -SMA+ hücre sayısı ve dermal kalınlık açısından anlamlı bir fark yoktu (Tablo 6). Ancak, bortezomib tedavisi ile yerleşmiş fibroz evresinde tip I kollojen, Nf- κ B ve JNK1 ekspresyonlarında anlamlı azalma vardı (Şekil 11)

Çalışma döneminde, B ve D gruplarında 1'er (% 10), C grubunda 3 (% 30), F grubunda 5 (% 50) deney hayvanı öldü. Mortalite oranları açısından, B ve C grupları arasındaki farklılık anlamlı değildi ($p>0.05$, *Odds* oranı 1.7, % 95 güven aralığı 0.8-3.8'dir). Ancak, F grubunda, E grubu ile karşılaştırıldığında, mortalite oranı anlamlı yüksekti ($p=0.01$, *Odds* oranı 3, % 95 güven aralığı 1.5-6.1'dir).



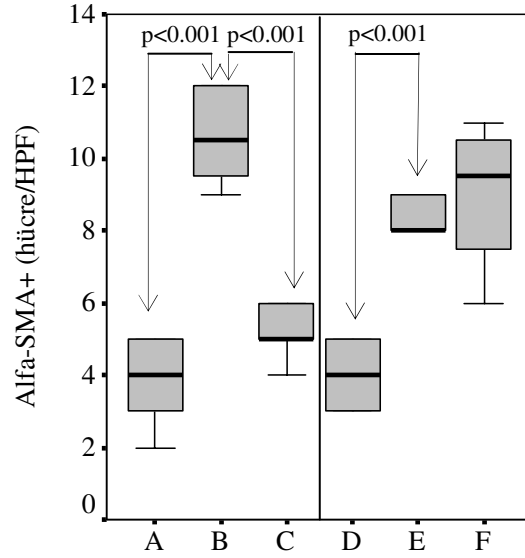
Şekil 7. Çalışma gruplarında serum IL-4 düzeyleri

Serum IL-4 düzeyi, B grubunda, A grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksekti.



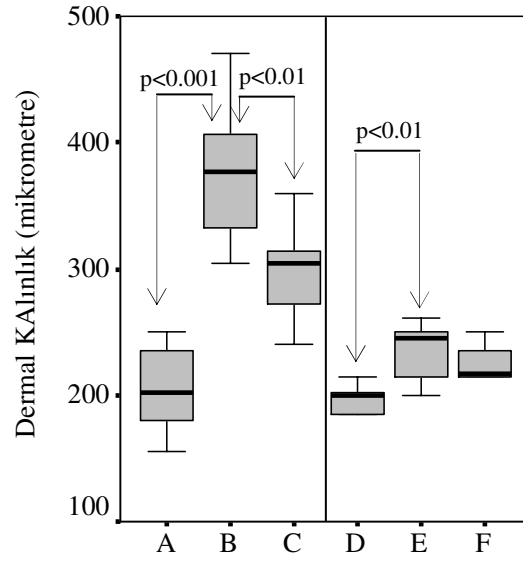
Şekil 8. Çalışma gruplarında dermal alandaki inflamatuvar hücre sayıları

Ortalama inflamatuvar hücre sayısı, B grubunda, A grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksek; C grubunda, B grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düşüktü. *HPF*; büyük büyütme alanı.



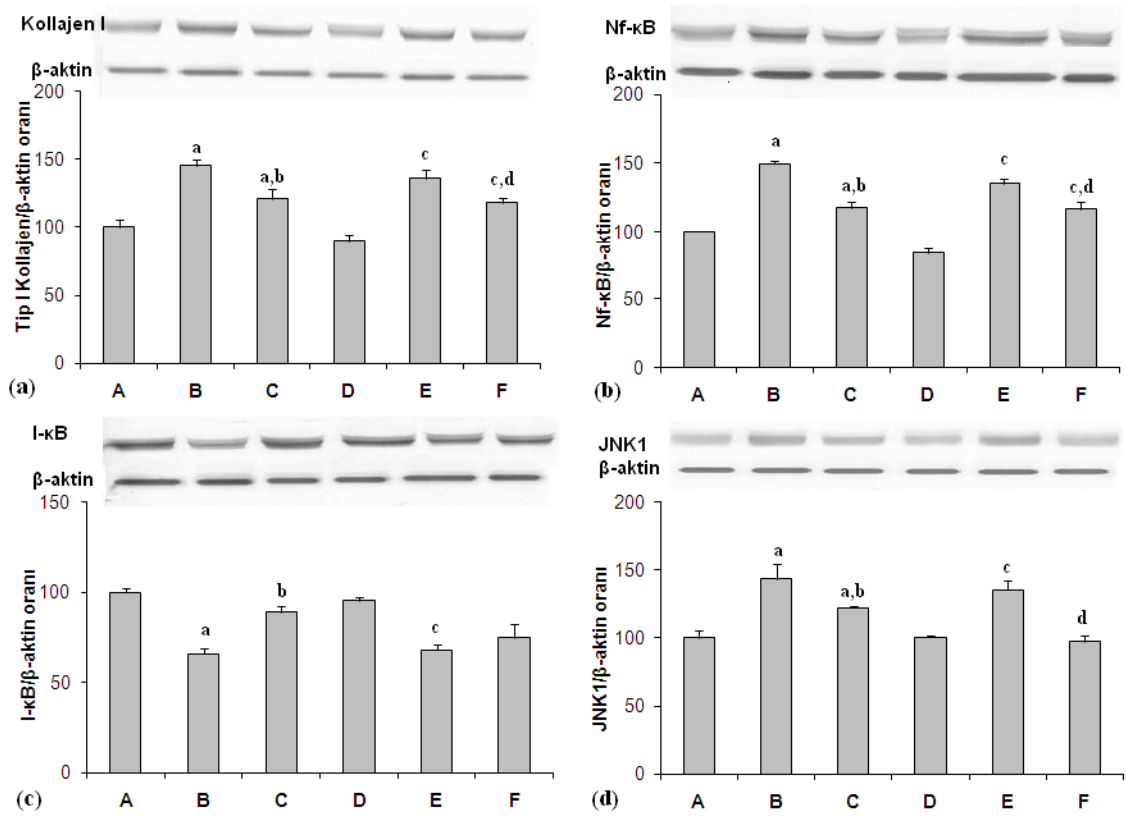
Şekil 9. Çalışma gruplarında α -SMA+ hücre sayıları

Ortalama α -SMA+ hücre sayısı, B grubunda, A grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksekti; C grubunda, B grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düşüktü; E grubunda, D grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı yüksekti. *SMA*; düz kas aktin, *HPF*; büyük büyütme alanı.



Şekil 10. Çalışma gruplarında dermal kalınlıklar

Dermal kalınlık, B grubunda, A grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksekti; C grubunda, B grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düşüktü; E grubunda, D grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksekti.



Şekil 11. Çalışma grupları deri doku örneklerinde tip I kollajen (a), Nf-κB (b), I-κB (c) ve JNK1 (d) protein ekspresyon düzeyleri

Grup A ile karşılaştırıldığında; $p < 0.05^a$.

Grup B ile karşılaştırıldığında; $p < 0.05^b$.

Grup D ile karşılaştırıldığında; $p < 0.05^c$.

Grup E ile karşılaştırıldığında; $p < 0.05^d$.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, BLM ile uyarılmış olan dermal fibroz modelinde erken ve geç (yerleşmiş fibroz) evrelerdeki bulgular incelenmiş ve bir proteazom inhibitörü olan bortezomibin fibrozu önleyici ve tedavi edici rolü araştırılmıştır. Tekrarlanan BLM uygulamaları, erken evrede, serum IL-4 düzeyi, dermis inflamatuvar hücre infiltrasyonu, miyofibroblastik hücre aktivitesi ve dermal kalınlıkta artışa neden olmaktadır. Geç evrede ise, miyofibroblastik aktivite ve dermal kalınlıktaki artışlara, IL-4 düzeyi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu artışları eşlik etmemektedir. Erken evrede, BLM ve bortezomib birlikte uygulandığında, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, miyofibroblastik aktivite ve dermal fibroz gelişmemektedir. Fibroz yerleştikten sonra başlanan bortezomib anti-inflamatuvar ve/veya anti-fibrotik etki göstermemektedir.

Skleroderma deri ve iç organların yaygın fibrozu ile seyreden kronik inflamatuvar bir hastalık olup, vaskülopati, immun aktivasyon ve artmış fibrotik aktivite ile karakterizedir. Ancak, sklerodermanın patogenezi tam olarak bilinmemektedir ve henüz onaylanmış bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Sklerodermanın nadir görülen ve klinik olarak heterojen bir hastalık olması (2, 50) nedeniyle sklerodermada ideal bir klinik çalışma planlanması ve yapılması zorlaşmaktadır. BLM ile uyarılan deneysel skleroderma modeli oluşturulmasının kolaylığı, düşük maliyeti ve sklerodermanın birçok fenotipik özelliklerini sergileyebilmesi nedeniyle, günümüze kadar tanımlanmış olan deneysel skleroderma modellerinden en uygunudur (65, 66).

Bu çalışmada, Akhmetshina ve ark. (67) tarafından modifiye edildiği şekilde, BLM uygulamalarının erken ve geç evre bulguları değerlendirilmiştir. Tekrarlanan BLM uygulamaları 3. haftada dermal fibroz oluşturmaktadır. Erken evrede, dermal fibroza serum IL-4 düzeyi artışı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve miyofibroblastik hücre aktivitesi eşlik etmekte, yerleşik fibroz evresinde ise IL-4 düzeyi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu artışları bulunmamaktadır.

Sklerodermada patogenik mekanizmalar endotelial hücre hasarı, immün aktivasyon ve fibroblastik aktivite olarak üç bölüme ayrılabilir (22, 29). Aktive endotelial hücreler ve inflamatuvar hücreler IL-4, TGF- β 1 gibi sitokin ve büyüme

faktörleri ile fibroblastik hücreleri aktive ederler (22, 29). Aktive fibroblastlar (miyofibroblastlar), ESM yapıtaşlarının sentezi yanında, IL-6, TGF- β 1, PDGF ve CTGF gibi pro-fibrotik sitokin ve büyüme faktörlerini de üretirler (22, 29). Böylece, fibroblastlar bir kez aktive olduktan sonra otokrin özellikler kazanmakta ve aktivasyon için inflammatuar hücre uyarımına gereksinimleri kalmamaktadır (22, 29). Bu çalışmada, inflammatuar hücre infiltrasyonunun ve sitokin artışlarının olmadığı yerleşmiş fibroz evresinde, fibroblastik aktivitenin varlığı, fibroblastların otonomi kazandığı görüşünü desteklemektedir. Skleroderma hastalarında, fibrozun ileri evrelerinde, etkilenmiş olan dokularda inflammatuar hücre infiltrasyonunun azaldığı bildirilmiştir (69).

Nükleer faktör- κ B inflamasyon ve programlı hücre ölümü (apoptoz) regülasyonunda rol alan bir çok geni aktive edebilen, dimerik yapıda bir transkripsiyon faktörüdür. İnflammatuar hücrelerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu etkileyerek çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin üretiminde önemli görevler üstlenmektedir (70, 71). Nf- κ B, olağan durumlarda, hücre stoplazmasına I- κ B ile kompleks yapmış olarak salınmaktadır. Aktive edici sinyaller, I- κ B'nin fosforillenmesi ve lizin rezidü bölgesinden ubiquitinlenmesine yol açmaktadır. Ubikitinlenmiş I- κ B proteazom aracılı degradasyona uğrar ve aktive olmuş Nf- κ B nükleusa transloke olur ve Nf- κ B'ye duyarlı bazı hedef genleri aktive eder (70, 71). TNF- α , IL-1, IL-6 gibi sitokinler, IL-8, MCP-1, makrofaj inflammatuar protein (MIP)-1 α , RANTES (*regulated on activation normal T cell expressed and secreted protein*) gibi kemokinler, E-selektin, ICAM-1, VCAM-1 gibi adezyon molekülleri ve IL-2, IL-12 gibi bazı sitokinlerin reseptör genleri Nf- κ B tarafından aktive olmaktadır (70, 71).

Bir proteazom inhibitörü olan bortezomib, I- κ B'nin proteazom aracılı degradasyonunu, ve sonuçta Nf- κ B aktivasyonunu, önleyerek anti-inflammatuar etkiler göstermektedir (6, 7). Skleroderma patogeneğinde T lenfositlerin aktivasyonu başta olmak üzere, immün aktivasyon önemli görevler üstlenmektedir. Hastalığın erken dönemlerinde bile derinin lenfosit, monosit, makrofaj, mast hücreleri gibi mononükleer hücrelerce infiltre edildiği gösterilmiştir (72). Ek olarak, skleroderma hastalarında TNF- α , IL-2, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin serum düzeylerinin yükseldiği ve deri tutulumunun

şiddeti ile korele olduğu belirlenmiştir (5). Sunulan çalışmada, bortezomib, BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinin erken evresinde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, α -SMA ekspresyonunu ve dermal fibrozu önlemiştir.

Nükleer faktör- κ B, daha önce değinilmiş olanlara ek olarak, hücrel apoptoz inhibitör protein (c-IAP)-1, c-IAP-2, TNF reseptör ilişkili faktör (TRAF)1, TRAF2, bcl-2, siklin D1 gibi hücrel proliferasyon ve apoptoz regülasyonunda rol alan moleküllerin de ekspresyonunu artırmaktadır (70, 71). Bcl-2 ailesi transkripsiyon faktörleri, oldukça kompleks düzenleyici mekanizmalara sahip olan apoptozun önemli inhibitör düzenleyicileridir (70, 71). Skleroderma hastaları dermal fibroblastlarının apoptoza dirençli oldukları gösterilmiş, ve bu durum artmış bcl-2 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (73). Ek olarak, Cipriani ve ark. (74) skleroderma hastalarında α/β ve γ/δ T lenfositlerin apoptoza dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Bortezomib, anti-apoptotik transkripsiyon faktörlerinin üretimini baskılayarak, inflamatuvar hücrelerin apoptoza direncini ortadan kaldırıp, anti-inflamatuvar ve anti-fibrotik etkiler oluşturuyor olabilir.

Proteazom inhibitörü olan bortezomib, anti-inflamatuvar ve pro-apoptotik etkileri (6, 7, 70, 71) yanında, MMP/TIMP dengesini değiştirerek de anti-fibrotik etkilere neden oluyor olabilir. Fibrojenizde, ESM elamanlarının yapımı ve yıkımı dinamik bir denge halindedir (8, 9). ESM yıkımı MMP'lar ile sağlanmaktayken, TIMP'lar MMP'ların doku inhibitörüdür (8, 9). Proteazom inhibisyonu, hasta ve sağlıklı insan dermal fibroblastlarından MMP-1 üretimini artırmakta, TIMP-1 üretimini azaltmaktadır (10).

Fibroblastik aktivitenin temel indükleyici faktörlerinden birisi olan TGF- β , fibroblastlardan, *in vivo* ve *in vitro* olarak, kollajen gibi ESM yapıtaşları ve α -SMA üretimini artırmaktadır (55, 75). Daha önceki bir çalışmamızda, BLM ile uyarılan dermal fibroz modelinde TGF- β 1 serum düzeyinin arttığı gösterilmiştir (76). Ancak, bu çalışmamızda, TGF- β 1 serum düzeyinde beklenen değişimler saptanmadı. TGF- β 1 düzeyinde, beklenen artışın olmamasının nedeni, sadece serum düzeyini çalışmış olmamız olabilir. BLM ile uyarılan dermal fibroz modelinde, lezyon uygulama bölgesine sınırlı kalmaktadır.

SMAD2/3 ve SMAD4'e ek olarak spesifikite protein 1 (SP1), mitojen-aktif protein kinaz (MAPK)'lar ve JNK da TGF- β ile uyarılan artmış kollajen gen aktivitesinin temel transkripsiyon faktörleridir (55, 77). Proteazom inhibisyonu, Smad fonksiyonlarını düzenleme potansiyeline sahip olduğu gibi (77, 78) Smad dışı bu transkripsiyon faktörlerini de inaktive ediyor olabilir. Fineschi ve ark. (10), proteazom inhibisyonu ile TGF- β 'nın pro-fibrotik etkilerinin engellendiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda, BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinde JNK1 ekspresyonunun arttığı ve bortezomibin JNK1 ekspresyonunu baskıladığı gözlemlendi.

Proteazom inhibitörleri, Tsk1 fare modelinde dermal fibrozu, BLM ile uyarılan akciğer fibrozu modelinde ise interstisyel fibrozu geriletmemektedir (79). Diğer taraftan, proteazom inhibisyonu, hasta ve sağlıklı insan dermal fibroblastlarından tip I kollajen üretimini baskılamıştır (10). Ek olarak, proteazom inhibisyonu, safra kanalı ligasyonu ile oluşturulan modelde karaciğer (11), spontan hipertansif ratlarda kalp (12) ve obstrüktif nefropatili ratlarda böbrek (13) fibrozunu geriletmektedir. Sunulan çalışmada ise, bortezomibin anti-fibrotik etkisi, fibrotik süreçte inflamasyonun aktif olduğu erken evre ile sınırlıydı. Bu bulgular, bortezomibin erken evredeki anti-fibrotik etkisinin, anti-inflamatuar etkisinden kaynaklandığını ve fibroblastik aktivite üzerine direkt etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada, BLM uygulaması Nf- κ B ve JNK1 ekspresyonları artırmış olduğu ve bortezomib ile tedavi edildiğinde bu proteinlerin ekspresyonlarının azalmış olduğu gözlemlendi. Bortezomibin, histopatolojik olarak anti-fibrotik etkilerinin gösterilemediği yerleşmiş fibroz evresinde bile, bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını baskılamış olması, fibrotik süreçte başka transkripsiyon faktörlerin de rolü olduğu görüşünü destekliyor olabilir.

Sunulan çalışmada, BLM ve bortezomibin birlikte kullanıldığı gruplarda daha fazla deney hayvanı öldüğü gözlemlenmiştir. BLM hidrolaz, BLM'in deaminasyonuna ve böylece inaktivasyonuna yol açan bir 'nötral sistein proteaz' enzimidir. BLM hidrolaz gen defisiti olan farelerin, BLM'in yan etkilerine daha duyarlı olduğu ve bu farelerde BLM'e bağlı ölümlerin daha sık olduğu bildirilmiştir (80). BLM hidrolaz, 20S

proteazom ile yapısal benzerlik göstermektedir (80). Bortezomib, 20S proteazom inhibisyonu ile BLM hidrolaz aktivitesini baskılayarak, BLM'e bağılı ölüm riskini artırıyor olabilir. Fineschi ve ark. (79), bir proteazom inhibitörü tek başına uygulandığında yaşam oranlarının etkilenmediğini, BLM ile birlikte uygulandığında ise mortalitenin arttığını bildirmişlerdir.

Bortezomib, BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinin erken evresinde anti-inflamatuar ve anti-fibrotik etki göstermesine karşın yerleşmiş fibroz evresinde etkisiz olmaktadır. Bu modelde, erken evredeki serum IL-4 düzeyi artışı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonlarının geç evrede gözlenmediği dikkate alındığında, bortezomibin anti-fibrotik etkisi, anti-inflamatuar etkisi ile ilişkilendirilebilir. Sonuç olarak, anti-inflamatuar etkiler sergileyebilen bortezomib yerleşmiş fibroz tedavisinde etkili değildir.

6. KAYNAKLAR

1. Krieg T, Meurer M. Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspects. *J Am Acad Dermatol* 1988;18:457-481.
2. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-205.
3. Denton CP, Black CM. Scleroderma--clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004;18:271-290.
4. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008;38:132-60.
5. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992;35:67-72.
6. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:630-639.
7. Milano A, Iaffaioli RV, Caponigro F. The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours? *Eur J Cancer* 2007;43:1125-1133.
8. Corriveau MP, Boufaied I, Lessard J, Chabaud S, Sénécal JL, Grodzicky T, Chartier S, Raymond Y, Moulin VJ. The fibrotic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts varies with disease duration and severity of skin involvement: reconstitution of skin fibrosis development using a tissue engineering approach. *J Pathol* 2009;217:534-542.
9. Toubi E, Kessel A, Grushko G, Sabo E, Rozenbaum M, Rosner I. The association of serum matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor levels with scleroderma disease severity. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:221-224.
10. Fineschi S, Reith W, Guerne PA, Dayer JM, Chizzolini C. Proteasome blockade exerts an antifibrotic activity by coordinately down-regulating type I collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and up-regulating metalloproteinase-1 production in human dermal fibroblasts. *FASEB J* 2006;20:562-564.
11. Anan A, Baskin-Bey ES, Bronk SF, Werneburg NW, Shah VH, Gores GJ. Proteasome inhibition induces hepatic stellate cell apoptosis. *Hepatology* 2006;43:335-344.

- 12.Meiners S, Hocher B, Weller A, Laule M, Stangl V, Guenther C, et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome. *Hypertension* 2004;44:471-477.
- 13.Tashiro K, Tamada S, Kuwabara N, Komiya T, Takekida K, Asai T, et al. Attenuation of renal fibrosis by proteasome inhibition in rat obstructive nephropathy: possible role of nuclear factor kappaB. *Int J Mol Med* 2003;12:587-592.
- 14.Mayes MD. Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:751-764.
- 15.Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, Schottenfeld D. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48:2246-2255.
- 16.Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 2001;44:1359-1362.
- 17.Feghali-Bostwick C, Medsger TA Jr, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48:1956-1963.
- 18.Allanore Y, Wipff J, Kahan A, Boileau C. Genetic basis for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2007;74:577-583.
- 19.Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:520-526.
- 20.Veltman G, Lange CE, Jühe S, Stein G, Bachner U. Clinical manifestations and course of vinyl chloride disease. *Ann N Y Acad Sci* 1975;246:6-17.
- 21.Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev* 2008;8:36-40.
- 22.Sakkas LI. New developments in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmunity* 2005;38:113-116.
- 23.Pandey JP, LeRoy EC. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum*

- 1998;41:10-15.
- 24.Ferri C, Longombardo G, Azzi A, Zakrzewska K. Parvovirus B19 and systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:267-268.
- 25.Ferri C, Zakrzewska K, Longombardo G, Giuggioli D, Storino FA, Pasero G, Azzi A. Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients *Clin Exp Rheumatol*. 1999;17:718-720.
- 26.Kalabay L, Fekete B, Czirják L, Horváth L, Daha MR, Veres A, et al. Helicobacter pylori infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60. *Helicobacter* 2002;7:250-256.
- 27.Jimenez SA, Artlett CM. Microchimerism and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:86-90.
- 28.Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:1186-1191.
- 29.Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2003;2:152-157.
- 30.LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:675-694.
- 31.Ishisaki A, Tsunobuchi H, Nakajima K, Imamura T. Possible involvement of protein kinase C activation in differentiation of human umbilical vein endothelium-derived cell into smooth muscle-like cell. *Biol Cell* 2004;96:499-508.
- 32.Chaudhuri V, Zhou L, Karasek M. Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis. *J Cutan Pathol* 2007;34:146-153.
- 33.Sen U, Moshal KS, Tyagi N, Kartha GK, Tyagi SC. Homocysteine-induced myofibroblast differentiation in mouse aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* 2006;209:767-774.
- 34.Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992;166:255-263.
- 35.Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in

- systemic sclerosis. Expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* 2004;50:1918-1927.
36. Peterson LS, Nelson M, Su WP. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc* 1995;70:1068-1076.
37. Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirjak L, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis* 2009;68:620-628.
38. Czirják L. Practical approach to the therapy of systemic sclerosis. *Z Rheumatol* 2004;63:451-456.
39. Horowitz M, Maddern GJ, Maddox A, Wishart J, Chatterton BE, Shearman DJ. Effects of cisapride on gastric and esophageal emptying in progressive systemic sclerosis. *Gastroenterology* 1987;93:311-315.
40. Lee SH, Rubin LJ. Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension. *J Intern Med* 2005;258:199-215.
41. Galiè N, Seeger W, Naeije R, Simonneau G, Rubin LJ. Comparative analysis of clinical trials and evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(12 Suppl S):81S-88S.
42. Steen VD. Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:315-333.
43. DeMarco PJ, Weisman MH, Seibold JR, Furst DE, Wong WK, Hurwitz EL, et al. Predictors and outcomes of scleroderma renal crisis: the high-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis trial. *Arthritis Rheum* 2002;46:2983-2989.
44. Boulman N, Slobodin G, Rozenbaum M, Rosner I. Calcinosis in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34:805-812.
45. Casas JA, Saway PA, Villarreal I, Nolte C, Menajovsky BL, Escudero EE, et al. 5-fluorouracil in the treatment of scleroderma: a randomised, double blind, placebo controlled international collaborative study. *Ann Rheum Dis* 1990;49:926-928.
46. Furst DE, Clements PJ, Hillis S, Lachenbruch PA, Miller BL, Sterz MG, Paulus HE. Immunosuppression with chlorambucil, versus placebo, for scleroderma. Results of a three-year, parallel, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheum* 1989;32:584-593.

47. Clements PJ, Furst DE, Wong WK, Mayes M, White B, Wigley F, et al. High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis: analysis of a two-year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 1999;42:1194-1203.
48. van den Hoogen FH, Boerbooms AM, Swaak AJ, Rasker JJ, van Lier HJ, van de Putte LB. Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial. *Br J Rheumatol* 1996;35:364-372.
49. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR, Baron M, Ellman M, Carette S, et al. A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001;44:1351-1358.
50. Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2008;66:198-202.
51. Jimenez SA, Christner PJ. Murine animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:671-680.
52. Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000;292:535-541.
53. Wu M, Varga J. In perspective: murine models of scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2008;10:173-182.
54. Zhang Y, Gilliam AC. Animal models for scleroderma: an update. *Curr Rheumatol Rep* 2002;4:150-162.
55. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557-567.
56. Sundberg JP, King LE Jr. Mouse mutations as animal models and biomedical tools for dermatological research. *J Invest Dermatol* 1996;106:368-376.
57. 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;50:1319-1331.
58. Christner PJ, Peters J, Hawkins D, Siracusa LD, Jiménez SA. The tight skin 2 mouse. An animal

- model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration. *Arthritis Rheum* 1995;38:1791-1798.
59. Barisic-Dujmovic T, Boban I, Clark SH. Regulation of collagen gene expression in the Tsk2 mouse. *J Cell Physiol* 2008;215:464-471.
 60. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *Antibiot (Tokyo)* 1966;19:200-209.
 61. Remlinger KA. Cutaneous reactions to chemotherapy drugs: the art of consultation. *Arch Dermatol* 2003;139:77-81.
 62. Okamoto T, Amano T, Wada T, Harada M, Tanaka T. [Experimental pulmonary fibrosis induced by bleomycin] *Igaku To Seibutsugaku* 1970;80:299-301.
 63. Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L152-160.
 64. Mountz JD, Downs Minor MB, Turner R, Thomas MB, Richards F, Pisko E. Bleomycin-induced cutaneous toxicity in the rat: analysis of histopathology and ultrastructure compared with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Dermatol* 1983;108:679-686.
 65. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112:456-462.
 66. Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin Immunol.* 2002;102:209-216.
 67. Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Busch N, Zwerina J, Schett G, et al. Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:219-224.
 68. Srimatkandada P, Loomis R, Carbone R, Srimatkandada S, Lacy J. Combined proteasome and Bcl-2 inhibition stimulates apoptosis and inhibits growth in EBV-transformed lymphocytes: a potential therapeutic approach to EBV-associated lymphoproliferative diseases. *Eur J Haematol* 2008;80:407-418.
 69. Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, Settas L, Zafiriou E, Sakkas L. Early T cell activation

- in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1233-1235.
- 70.Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stres responses. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1509-1520.
 - 71.Yamamoto Y, Gaynor RB. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004;29:72-79.
 - 72.Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:679-685.
 - 73.Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2001;44:1667-1676.
 - 74.Cipriani P, Fulminis A, Pingiotti E, Marrelli A, Liakouli V, Perricone R, et al. Resistance to apoptosis in circulating alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2006;33:2003-2014.
 - 75.Ihn H. Autocrine TGF-beta signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* 2008;49:103-113.
 - 76.Koca SS, Isik A, Ozercan IH, Ustundag B, Evren B, Metin K. Effectiveness of etanercept in bleomycin-induced experimental scleroderma. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:172-175.
 - 77.Li Y, Wang DW, Song LW, Peng RY, Gao YB, Ma JJ. [Effects of TGFbeta1 on the transcriptional activity of SP1, AP1 and Smad3-Smad4 in lung fibroblasts] *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2005;21:679-682.
 - 78.Zhang F, Laiho M. On and off: proteasome and TGF-beta signaling. *Exp Cell Res* 2003;291:275-281.
 - 79.Fineschi S, Bongiovanni M, Donati Y, Djaafar S, Naso F, Goffin L, et al. In vivo investigations on anti-fibrotic potential of proteasome inhibition in lung and skin fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:458-465.
 - 80.Schwartz DR, Homanics GE, Hoyt DG, Klein E, Abernethy J, Lazo JS. The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4680-4685.

6. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılı, Osmaniye ili Bahçe ilçesi doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimlerimi Osmaniye ili Düziçi ilçesinde tamamladım. 2000 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Giresun ili Bulancak ilçesi İcilli köyü Sağlık Ocağında 3 ay pratisyen hekim olarak çalıştım. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, 2001 yılı Ocak ayında başladığım, İç hastalıkları uzmanlık eğitimi, 2005 yılı Mart ayında tamamladım. 17 Haziran 2005 tarihinde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı'nda Romatoloji yan dal uzmanlık eğitime başladım. Halen bu görevime devam etmekteyim. Yabancı dilim İngilizcedir. Evli olup iki çocuğum vardır.