

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİSTEMİK SKLEROZ HASTALARINDA ALT GRUPLAR VE
HASTALIK SÜRESİ İLE OTOFAJİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Ufkay KARABAY
ORCID: 0000-0001-8608-1865**

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER TIP

DOKTORA TEZİ

**İZMİR
ARALIK 2024**

TEZKODU: DEU.HSI.PhD –2017970138

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSTEMİK SKLEROZ HASTALARINDA ALT GRUPLAR VE
HASTALIK SÜRESİ İLE OTOFAJİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ufkay KARABAY
ORCID: 0000-0001-8608-1865

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER TIP

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ

ORCID ID No: 0000-0002-3570-1865

**Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi 2020.KB.SAG.067 ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik
Araştırma Kurumu 223S546 sayılı projeleri tarafından desteklenmiştir.**

İZMİR

ETİK BEYAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “**Sistemik Skleroz Hastalarında Alt Gruplar ve Hastalık Süresi ile Otofaji Arasındaki İlişkinin Araştırılması**” başlıklı doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Ufkay Karabay

17.12.2024

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR	x
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sistemik skleroz	3
2.1.1. <i>Epidemiyoloji ve etiyoloji</i>	3
2.1.2. <i>Patogenez</i>	4
2.1.2.1. <i>Mikrovasküler hücre hasarı ve vaskülopati</i>	4
2.1.2.2. <i>İmmün sistem aktivasyonu</i>	5
2.1.2.3. <i>Fibrozis</i>	7
2.2. Otoantikolarlar	9
2.3. Tanı	10
2.4. Alt gruplara sınıflandırma	11
2.4.1. <i>Sınırlı deri tutulumlu SSc</i>	11
2.4.2. <i>Diffüz deri tutulumlu SSc</i>	11
2.5. Modifiye Rodnan deri skoru	12
2.6. Otofaji mekanizması	13
2.7. SSc patogenezi ve otofaji mekanizması.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM:	22
3.1. Araştırmanın Tipi.....	22
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	22
3.3. Araştırmanın örnekleme	22
3.4. Çalışma Materyali	22
3.5. Araştırmanın Değişkenleri:	22
3.5.1. <i>Bağımsız değişkenler: SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri.</i>	22
3.5.2. <i>Bağımlı değişkenler: Olgu ve kontrol olma durumudur.</i>	22
3.6. Veri Toplama Araçları:	22
3.6.1. <i>Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar</i>	22

3.6.2. Araştırmaya dahil olma kriterleri	24
3.6.3. Araştırmadan dışlama kriterleri	25
3.6.4. Hasta ve kontrol periferik kan örneklerinin toplanması ve alt grupların belirlenmesi	25
3.6.5. PBMC'lerin İzolasyonu	26
3.6.6. LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ekspresyonunun gerçek zamanlı PCR ile analizi	27
3.6.6.1. RNA izolasyonu	27
3.6.6.2. cDNA sentezi	28
3.6.6.3. Gerçek zamanlı PCR	28
3.6.7. LC3, p62 ve Beklin1 protein ekspresyonlarının Western blot ile analizi.....	29
3.6.7.1. Protein izolasyonu.....	29
3.6.7.2. Protein konsantrasyonu ölçümü.....	29
3.6.7.3. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	30
3.6.7.4. Blotlama, antikor uygulaması, görüntüleme	31
3.7. Araştırmanın planı.....	32
3.8. Verilerin değerlendirilmesi	33
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları	33
3.9. Etik Kurul Onayı.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin bilgileri.....	35
4.2. SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin demografik özellikleri.....	39
4.3. SSc hastalarının klinik ve laboratuvar özellikleri ve kullandıkları ilaçlar	40
4.4. SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri	41
4.5. lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri	42
4.6. Hastalık süresi 5 yıldan kısa veya 5 yıldan uzun olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri	43
4.7. Hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri	44
4.8. mRSS (0-3), (4-14) ve (>14) olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri .	45

4.9. ATA veya ACA pozitif veya otoantikör negatif olan SSc hastalarının sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde ve LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri	47
4.10. Hastalık süresi 5 yıldan kısa veya 5 yıldan uzun ATA pozitif SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde ve LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri	48
4.11. ATA pozitif lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri .	49
4.12. LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin ROC eğrisi analizleri	50
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
EKLER.....	88
EK-1: ETİK KURUL ONAYI	88
EK-2: ÖZGEÇMİŞ	90
EK-3: VERİ TOPLAMA FORMU ÖRNEĞİ.....	94
EK-4: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU ÖRNEĞİ.....	95

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. ACR/EULAR SSc Puanlama Sistemi.....	10
Tablo 2. Projede kullanılan kimyasal malzeme ve kitlerin listesi.....	23
Tablo 3. Projede kullanılan cihazların listesi	24
Tablo 4. Kullanılan primerlerin listesi	29
Tablo 5. SDS-PAGE için %15'lik ayırıcı jel hazırlanması.....	30
Tablo 6. SDS-PAGE için %4'lük paketleyici jel hazırlanması.....	30
Tablo 7. 10X Yürütme tamponu hazırlanması	31
Tablo 8. Kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları	32
Tablo 9. Araştırma Planı	32
Tablo 10. SSc hasta bilgileri	35
Tablo 11. Sağlıklı kontrol bilgileri.....	38
Tablo 12. SSc hastalarının ve kontrol grubunun demografik özellikleri	39
Tablo 13. SSc hastalarının klinik ve laboratuvar özellikleri ile kullandıkları ilaçların dağılımı	40
Tablo 14. SSc hasta alt grupları ve sağlıklı kontroller arasında LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinde tespit edilen değişiklikler.....	50
Tablo 15. Farklı modellerde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin AUC, sensitivite, spesifisite ve <i>p</i> değeri	56
Tablo 16. SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin ROC modelleri.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. SSc patogenezinde rol oynayan mekanizmalar.....	9
Şekil 2. SSc alt grupları.....	12
Şekil 3. SSc'de modifiye Rodnan deri skorlaması.....	12
Şekil 4. Otofaji sinyal mekanizması.	16
Şekil 5. Deneysel protokollerin iş akışı.	26
Şekil 6. SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri..	42
Şekil 7. lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri.....	43
Şekil 8. Hastalık süresi 5 yıldan kısa veya 5 yıldan uzun olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri.....	44
Şekil 9. Hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri.....	45
Şekil 10. mRSS (0-3), (4-14) ve (>14) olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri.....	46
Şekil 11. ATA veya ACA pozitif veya otoantikör negatif olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri.....	47
Şekil 12. Hastalık süresi 5 yıldan kısa veya uzun olan ATA pozitif SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri.....	48
Şekil 13. ATA pozitif lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri.....	49
Şekil 14. SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin ROC eğrisi analizleri ile öngörüsöl anlamlılık çalışması.....	55
Şekil 15. 1, 2, 4, 5 ve 6 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri.....	58
Şekil 16. 7, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	58

Şekil 17. 14, 15, 16, 17, 18, 19 ve 21 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	59
Şekil 18. 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	59
Şekil 19. 29, 31, 33, 34, 35, 46 ve 47 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	60
Şekil 20. 30, 32, 43, 44, 45, 49 ve 50 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	60
Şekil 21. 36, 37, 38, 39, 40, 41 ve 42 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	61
Şekil 22. 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58 ve 59 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	61
Şekil 23. 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ve 70 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	62
Şekil 24. 3, 20, 48 ve 54 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	62
Şekil 25. 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 ve 81 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	63
Şekil 26. 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	63
Şekil 27. 8, 9, 10 ve 11 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	64
Şekil 28. 12, 13, 14, 15 ve 16 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	64
Şekil 29. 17, 18 ve 19 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	65
Şekil 30. 20, 21, 22, 23 ve 24 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	65
Şekil 31. 25, 26, 27, 28, 29 ve 30 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri	66

KISALTMALAR

ACA: Anti-sentromer antikoru

ACR/EULAR: Amerikan Romatoloji Derneği/Avrupa Romatizma Birliği

AMPK: AMP ile aktive olan protein kinaz

APS: Amonyum persülfat

ATA: Anti-topoizomeraz-1 antikoru

ATG: Otofaji ile ilişkili gen

AUC: ROC eğrisinin altında kalan alan

BCA: Bikinkoninik asit

CD: Yüzey farklılaşma antijenleri

cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)

CGRP: Kalsitonin geniyle ilişkili peptid

COL-1:Kollajen tip I

COX: Siklooksijenaz

CTGF: Bağ dokusu büyüme faktörü

CXCL4: Küçük kemokin trombosit faktör 4

DAMP: Tehlike ilişkili moleküler paternler

dcSSc: Diffüz kutanöz sistemik skleroz

ECL: Enhanced chemiluminescence

ECM: Ekstrasellüler matriks

EDTA: Etilendiamintetraasetik

EMT: Epitelyal-mezenkimal dönüşümü

ET-1: Endotelin-1

GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

Gerçek zamanlı PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

GIS: Gastrointestinal sistem

GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışması

HCl: Hidroklorik asit

HE: Hematoksilen&eoizin boyama

HIF: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HLA: İnsan lökosit antijeni
HMGB: Yüksek mobilite grup kutusu
HUVEC: İnsan umbilikal ven endotel hücresi
IFN- γ : İnterferon gama
IHF: İmmünohistokimyasal boyama
IL: İnterlökin
lcSSc: Sınırlı kutanöz sistemik skleroz
mRNA: Messenger RNA
MMP: Matriks metalloproteinaz
mTOR: Rapamisinin memeli hedefi (Mammalian target of rapamycin)
NO: Nitrik oksit
PBMC: Periferik kan mononükleer hücre
PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate-buffered saline)
PGC-1 α : Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama koaktivatörü-1 α
PI3K/AKT: Fosfoinosit 3-kinaz / Protein kinaz B
PPAR γ : Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama
PVDF: Poliviniliden diflorür
RIPA: Radyoimmünopresipitasyon analiz
SDS: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SIRT1: Sirtuin 1
SLE: Sistemik lupus eritematozus
TBST: Tris tamponlu tuz çözeltisi + %0.1 Tween-20 deterjanı
TIMP: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri
ULK1: Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başlangıcından sonuna dek hem teorik hem de pratikte yaptığı özgün ve yüksek katkıları, karşılaştığım problemlere bilgece yaklaşımları, her açıdan sabırla anlayış gösterip özgüven kazanmamda ve gelişmemde eşsiz emekleri olan çok değerli sayın hocam **Dr. Öğr. Üyesi Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ**'e;

Tez çalışmam ve ayrıca bilimsel düşünme ve üretebilme duygusunu aşıl原因an çok değerli sayın hocam **Prof. Dr. Ahmet Merih BİRLİK** başta olmak üzere Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanımız **Prof. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN**, **Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ**, **Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL** ve Moleküler Tıp Anabilim dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine;

Doktora sürecim boyunca yüksek pozitif enerjisiyle her zaman ilgili ve yardımcı olan DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü çok değerli sayın hocam **Prof. Dr. Zahide ÇAVDAR**'a;

Tez izleme komite toplantılarımız boyunca bana değerli katkılarını sunan **Doç. Dr. Duygu SAĞ** ve **Doç. Dr. Gamze TUNA**'ya;

Tez çalışmamın verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde desteğini esirgemeyen **Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU**'na;

Tez çalışmalarım boyunca hasta örneklerinin toplanmasında destek veren **Uzm. Dr. Yeşim EREZ**'e, tüm laboratuvar olanaklarını sağlayarak tez verilerimin oluşmasında katkısı olan **DEÜ Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarına (ARLAB)** ve her zaman güler yüzü ile ARLAB'da olduğum için çok mutlu olduğum ve desteklerini esirgemeyen **Dr. Memduh BÜLBÜL**, **Dr. Öğr. Üyesi Cemre URAL ÖZKAN** ve **Dr. Zehra TAVŞAN**'a;

Doktora sürecimde kendilerini tanımaktan çok mutlu olduğum hem arkadaşlıkları hem de bilimsel katkıları ile **Dr. Naz KANIT** ve **Dr. Nazlı Ecem DAL BEKAR** ve DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsünün iyi niyetli ve yardımsever Öğrenci İşlerinin tüm personellerine;

Hem dostlukları hem de doktora eğitimim üzerine çok değerli katkıları ile **Dr. Öğr. Üyesi Bahtiyar UYGUN**, **Öğr. Gör. Burhan BORA** ve **Dr. Reşit Buğra HÜSEMOĞLU**'na;

Her koşulda yanımda olduklarını bildiğim çok sevdiğim annem **Balucihan ÇITAK** ve çok sevdiğim hayat yoldaşım, eşim **Yağmur TUNA KARABAY**'a çok teşekkür ederim.

SİSTEMİK SKLEROZ HASTALARINDA ALT GRUPLAR VE HASTALIK SÜRESİ İLE OTOFAJİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Ufkay KARABAY

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

Sistemik skleroz (SSc); deri ve iç organların yaygın fibrozisi ile karakterize kronik otoimmün inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. SSc'nin moleküler patolojisi; endotel hücreleri, immün sistem ve fibroblastlar arasında bozulmuş etkileşimin bulunduğu karmaşık bir süreçtir. SSc patogenezi; immün sistem aktivasyonu, mikrovasküler hasar ve fibroblastların miyofibroblastlara diferansiyasyonu sonrasında otonom ve uzun süreli bir aktivite kazanmaları sonucu oluşan fibrozisi içeren üç temel özellik ile karakterizedir. Klinik olarak sınırlı kutanöz (lcSSc) veya diffüz kutanöz (dcSSc) olarak alt gruplara ayrılmaktadır. SSc'nin standardize olmuş veya onaylanmış kesin bir tedavisi henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle hastalığın patogenezinde yeni mekanizmalar araştırılmaktadır. Otofaji, makromoleküller ve organeller gibi sitoplazmik komponentlerin lizozom içerisinde geri dönüşümü ve parçalanmasının kontrolünden sorumlu evrimsel olarak korunmuş homeostazı sağlayan anahtar bir sistemdir. Yapılan çalışmalar, otofajinin düzgün çalışmaması sonucu kanser, nörodejeneratif, kardiyovasküler, enfeksiyöz, metabolik ve pulmoner hastalıklar gibi pek çok patolojik durumun ortaya çıktığını göstermiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, otofajinin SSc patogenezinde de önemli rol oynadığını belirtmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, dcSSc ve lcSSc hastaları ile sağlıklı kontrollerin periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC'ler) otofaji ile ilişkili gen (ATG) moleküllerinin mRNA ve protein ekspresyonlarını belirlemek ve ATG moleküllerinin ekspresyonları ile hastalık süresi, deri tutulumunun şiddeti ve otoantikorlar arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Çalışmada 34 dcSSc ve 43 lcSSc hastasından ve

30 sağlıklı kontrolden alınan PBMC'lerde LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ve protein ekspresyonu analiz edilmiştir. LC3 mRNA ekspresyon düzeyi, lcSSc hastalarında dcSSc hastalarına göre; p62 mRNA ekspresyon düzeyi, lcSSc hastalarında dcSSc hastaları ve sağlıklı kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur. p62 protein ekspresyon düzeyi ise dcSSc hastalarında lcSSc hastalarına göre daha yüksek belirlenmiştir. p62 protein ekspresyon düzeyi, 5 yıldan kısa hastalık süresi olan SSc hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek tespit edilmiştir. p62 mRNA ekspresyon düzeyi, hastalık süresi 5 yıldan daha uzun olan lcSSc hastalarında sağlıklı kontroller ve hastalık süresi 5 yıldan daha uzun olan dcSSc hastalarına göre daha yüksek bulunmuştur. p62 protein düzeyi ise hastalık süresi 5 yıldan daha uzun olan dcSSc hastalarında 5 yıldan daha uzun hastalığı olan lcSSc hastalarına göre daha yüksek belirlenmiştir. LC3 protein düzeyi, mRSS (0-3) olan hastalarda (>14) olan hastalara göre daha yüksek tespit edilmiştir. p62 protein düzeyi, hastalık süresi 5 yıldan kısa olan anti-topoizomeras 1 antikoru (ATA) pozitif hastalarda hastalık süresi 5 yıldan daha uzun olan ATA pozitif hastalara göre daha yüksek bulunmuştur. p62 mRNA düzeyi ise ATA pozitif lcSSc hastalarında sağlıklı kontroller ve ATA pozitif dcSSc hastalarına göre daha yüksek tespit edilmiştir. Yapılan ROC eğrisi analizlerinde LC3 ve p62 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin dcSSc hastalarını lcSSc hastalarından ayırt etmek için yüksek performans gösterdiği belirlenmiştir. LC3 ve p62 mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri ayrıca deri tutulumunun şiddeti ve hastalık süresi ile hasta alt gruplarını ayırt etmek için yüksek performans göstermiştir. Bulgularımız; LC3 ve p62 otofaji molekül düzeylerinin SSc alt gruplarını ayırt etmede önemli olduğunu, ayrıca deri tutulum şiddeti ve hastalık süresi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamız, otofajinin SSc patogeneğinde önemli rol oynadığını ve yeni bir tedavi stratejisi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Sistemik skleroz, otofaji, otofaji ile ilişkili proteinler, otoantikör, modifiye Rodnan deri skoru, fibrozis, periferik mononükleer hücre

Tezin sayfa adedi: 118

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN SUBGROUPS AND DISEASE DURATION AND AUTOPHAGY IN SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS

Doctora Thesis

Ufkay KARABAY

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic autoimmune inflammatory disease characterized by diffuse fibrosis of the skin and internal organs. The pathogenesis of the disease is still not fully elucidated. The molecular pathology of SSc is a complex process involving impaired interactions between the endothelial cells, immune system and fibroblasts. SSc pathogenesis is characterized by three main features: immune system activation, microvascular damage and fibrosis resulting from fibroblast differentiation into myofibroblasts. It is clinically subgrouped into limited cutaneous (lcSSc) or diffuse cutaneous (dcSSc). There is no standardized or approved treatment for SSc. Therefore, new mechanisms are under investigation in the pathogenesis of the disease. Autophagy is a key evolutionarily conserved homeostasis system responsible for controlling recycling and degradation of macromolecules and cytoplasmic components such as organelles within the lysosome. Studies have shown that autophagy dysregulation results in many pathological conditions such as cancer, neurodegenerative, cardiovascular, infectious, metabolic and pulmonary diseases. Recent studies suggest that autophagy also plays an important role in the pathogenesis of SSc. The aim of this thesis study was to determine mRNA and protein expressions of autophagy-related gene (ATG) molecules in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of dcSSc and lcSSc patients and healthy controls and investigate the relationship between the expression of ATG molecules and disease duration, severity of skin involvement and autoantibodies. LC3, p62 and Beklin1 mRNA and protein expression were analyzed in PBMCs from 34 dcSSc and 43 lcSSc patients and 30 healthy controls. LC3 mRNA expression level was higher in lcSSc patients than in

dcSSc patients; p62 mRNA expression level was higher in lcSSc patients compared with dcSSc patients and healthy controls. p62 protein expression level was found to be higher in dcSSc patients than in lcSSc patients. p62 protein expression level was higher in SSc patients with less than 5 years of disease than in healthy controls. p62 mRNA expression level was found to be higher in lcSSc patients with over 5 years of disease compared to healthy controls and dcSSc patients with over 5 years of disease. p62 protein level was higher in dcSSc patients with over 5 years of disease compared to lcSSc patients with over 5 years of disease. LC3 protein level was higher in patients with mRSS (0-3) than in patients with mRSS (>14). p62 protein level was found to be higher in anti-topoisomerase 1 antibody (ATA) positive patients with less than 5 years of disease than ATA positive patients with over 5 years of disease. p62 mRNA level was higher in ATA positive lcSSc patients compared with healthy controls and ATA positive dcSSc patients. ROC curve analyses revealed that LC3 and p62 mRNA and protein expression levels showed high performance to distinguish dcSSc patients from lcSSc patients. LC3 and p62 mRNA and protein expression levels also showed high performance to differentiate patient subgroups by severity of skin involvement and disease duration. Our findings suggest that LC3 and p62 autophagy molecule levels are important in differentiating SSc subgroups and are associated with severity of skin involvement and disease duration. Our study suggests that autophagy plays an important role in the pathogenesis of SSc and may be a new treatment strategy.

Key words: Systemic sclerosis, autophagy, autophagy-related proteins, autoantibody, modified Rodnan skin score, fibrosis, peripheral blood mononuclear cell

Page Number: 118

Supervisor: Asst. Prof. Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sistemik skleroz (SSc), mikrovasküler endotel hasarı ve deri ve iç organların yaygın fibrozisi ile karakterize olan kronik otoimmün inflamatuvar bir hastalıktır. Klinikte en belirleyici özelliği deri fibrozisi (skleroderma) olmakla birlikte vasküler, inflamatuvar ve fibrotik değişikliklerin akciğer, gastrointestinal sistem (GİS), böbrek ve kalp gibi iç organlarda da görülebilmesi nedeniyle 'Sistemik Skleroz' olarak isimlendirilmektedir. Derideki fibrotik değişiklikler ve kontraktürler hastalığın morbiditesini, iç organ tutulumları hem morbiditeyi hem de mortaliteyi etkilemektedir. SSc patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Nadir hastalıklar kategorisinde yer alan SSc'nin insidansı milyonda 18-20, prevalansı ise milyonda 100-300 olgu olarak belirtilmektedir. Hastalığın kadınlarda görülme sıklığı erkeklerde görülme sıklığının altı katıdır. Hastaların %48-68'inde ölüm nedeni genellikle kardiyak, pulmoner, renal ve GİS tutulumuna bağlıdır. Klinik olarak sınırlı (limited) kutanöz (lcSSc) ve yaygın (diffüz) kutanöz (dcSSc) olarak alt gruplara ayrılmaktadır. SSc'nin standardize olmuş veya onaylanmış kesin bir tedavisi henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle hastalığın patogenezi yeni mekanizmalar araştırılmaktadır. Otofaji, hücre içinde bulunan biyomoleküllerin, proteinlerin ve organellerin kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilip birleşmesi ve burada parçalanmasını sağlayan bir mekanizmadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, otofajinin SSc patogenezi içinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir.

Bu çalışmada, SSc hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC'ler) alt gruplar, hastalık süresi, hastalık şiddeti ve otoantikolar ile otofaji mekanizması arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya yönelik hedeflerimiz:

- SSc hastalarının (lcSSc ve dcSSc) ve sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunun PBMC'lerinde otofajik aktivite için LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ve protein ekspresyonlarını incelemek,
- SSc hastalarının (lcSSc ve dcSSc) modifiye Rodnan deri skorlarına göre belirlenen hastalık şiddeti ile otofajik aktivite düzeyi arasındaki ilişkiyi incelemek,

- SSc hastalarının (lcSSc ve dcSSc) hastalık süresine göre erken ve geç evre olmak üzere alt gruplara ayırarak otofajik aktivite düzeyi ile alt gruplar arasındaki ilişkiyi incelemek,

- SSc hastalarının (lcSSc ve dcSSc) hastalık süresine göre otoantikör (Anti-topoizomeraz 1 (ATA, Scl-70), anti-sentromer (ACA)) bulunma durumuna göre alt gruplara ayırarak otofajik aktivite düzeyi ile alt gruplar arasındaki ilişkiyi incelemektir.

Bu amaç ve hedeflere yönelik hipotezlerimiz şu şekildedir:

1. Hipotez:

H0: SSc hastaları (lcSSc ve dcSSc) ve kontrol grubunda periferik kan mononükleer hücrelerindeki otofajik aktivite için LC3-II, Beklin1 ve p62 protein ve mRNA ekspresyonları benzerdir.

H1: SSc hastaları (lcSSc ve dcSSc) ve kontrol grubunda periferik kan mononükleer hücrelerindeki otofajik aktivite için LC3-II, Beklin1 ve p62 protein ve mRNA ekspresyonları farklıdır.

2. Hipotez:

H0: SSc hastası (lcSSc ve dcSSc) erken evre, geç evre ve kontrol grubu arasında periferik kan mononükleer hücrelerindeki otofajik aktivite için LC3, Beklin1 ve p62 protein ve mRNA ekspresyonları benzerdir.

H1: SSc hastası (lcSSc ve dcSSc) erken evre, geç evre ve kontrol grubu arasında periferik kan mononükleer hücrelerindeki otofajik aktivite için LC3, Beklin1 ve p62 protein ve mRNA ekspresyonları farklıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sistemik skleroz

2.1.1. Epidemiyoloji ve etiyoloji

SSc, anormal immün aktivasyon ve vasküler hasarı takiben defektif neovaskülarizasyon ve bozulmuş yeniden modelleme ile deride ve iç organlarda yaygın doku fibrozisi ile karakterize multisistemik bir bağ dokusu hastalığıdır. Klinikte en belirgin özelliği deri fibrozisi (skleroderma) olmakla birlikte, GİS, akciğer, böbrek ve kalp gibi iç organlarda da vasküler, inflamatuvar ve fibrotik değişiklikler görülebilmektedir (1). Farklı ülkelerden elde edilen verilere göre SSc prevalansı milyonda 31-658.6 (2-3), insidansı ise milyonda 3.8-43 (4-5) arasındadır. SSc'nin prevalans ve insidans tahminlerine ilişkin veriler, coğrafi konum ve olgu tespit yöntemleri nedeniyle büyük farklılıklar göstermektedir. SSc, deri tutulumunun paternine ve bazı klinik ve laboratuvar özelliklerindeki prevalans farklılıklarına göre diffüz kutanöz (dcSS) ve sınırlı kutanöz (lcSS) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (6). dcSS'de semptomlar genellikle akut başlangıçlıdır ve deri tutulumu ekstremitelerin distal kısmından başlar, proksimale doğru ilerler ve trunkusa yayılır. Modifiye Rodnan deri skorları (mRSS) yüksek olan hastalarda böbrek tutulumu ve mortalite riski artmaktadır. dcSS hastalarının %3 ila 75'i ATA pozitifdir. lcSS'de deri tutulumu sadece yüzün distal kısmında, boyunda ve ekstremitelerde sınırlıdır. lcSS'li hastaların %17 ila 56'sında ACA pozitifliği vardır (7). SSc'nin etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte genetik faktörler ve çevresel etkiler arasındaki karmaşık etkileşimin çeşitli hücre tiplerinde SSc'ye özgü gen programlarını indüklediği ve bu hastalığın klinik semptomlarının gelişmesine yol açtığı genel olarak kabul edilmektedir. İnsan lökosit antijeni (HLA) sınıf I (HLA-B* 13, HLA-A* 30, HLA-B* 35, HLA-C* 04, HLA-Cw4) ve sınıf II (HLA-DPA1/B1, HLA-DPA1/B1 DPB1* 1301) genlerinin hastalığa yakınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (8). Silika tozu, çözücüler, kimyasallar, ilaçlar ve enfeksiyöz ajanlar gibi çevresel ve mesleki faktörlerin (9), hücreler arası sinyal yolları üzerinde doğrudan etki göstererek ve/veya histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar yoluyla (10) SSc patogenezinde potansiyel olarak rol oynadığı belirtilmektedir (11).

2.1.2. Patogenez

SSc patogenezi endotel hücreleri, immün sistem ve fibroblastlar arasında bozulmuş etkileşimin bulunduğu karmaşık bir süreçtir. Hastalığın klinik ve patolojik belirtilerinin üç farklı sürecin sonucu oluştuğu belirtilmektedir. Mikrovasküler endotel hücre hasarı ve küçük damarların fibroproliferatif vaskülopatisinin patogenezdeki ilk basamak olduğu kabul edilmektedir. Oluşan vaskülopati inflamasyonu tetikleyerek lenfosit aktivasyonu ve otoantikör üretimine yol açtığı, doğal ve adaptif immün sistem anormalliklerine neden olduğu belirtilmektedir. Daha sonra fibroblastlar miyofibroblastlara diferansiye olmakta, deri ve iç organlarda aşırı kolajen ve diğer ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenleri birikerek fibrozis meydana gelmektedir (Şekil 1).

2.1.2.1. Mikrovasküler endotel hasarı ve vaskülopati

Normal koşullar altında endotel; vasküler tonusu düzenlemekte, pıhtılaşma, fibrinoliz, antitrombotik işlevler göstermekte ve çevre dokulara oksijen ve besin taşınmasını sağlamaktadır. SSc hastalarında endoteldeki anormal işlev, deri, akciğer ve serumda endotelin-1 (ET-1) gibi vazokonstriktörlerin aşırı üretimi ve nitrik oksit (NO) ve prostasiklin gibi vazodilatörlerin yetersiz üretimi sonucu vazoaaktif faktörler arasında dengesizliğe neden olmaktadır (12). Mikrovasküler tonustaki sık ve sürekli değişiklik, endotel hücre sıkı bağlantılarının açılmasına, mikrodamar geçirgenliğinin artmasına ve vasküler sızıntılara neden olmaktadır. Mikrovasküler sızıntının devam etmesi mikrohemorajiler ve lokal ödem ile sonuçlanmaktadır (13). Vasküler endotel hücrelerin aktivasyonu sonucu eksprese edilen vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve E-selektin, bölgeye göç eden lenfosit, trombosit, nötrofil, monosit ve doğal öldürücü hücrelerin endotel hücrelere yapışmasına ve dokuya göç ederek perivasküler inflamasyona neden olmaktadır. Trombosit aktivasyonu vazokonstriktör etkili olan tromboksan salınımına yol açmaktadır (13). SSc'nin kutanöz hastalığı, kalsitonin geniyle ilişkili peptit ve serotonin gibi damar genişletici nöropeptidlerin salınımının azalmasına neden olmaktadır (14,15). Belirtilen bu süreçler, endotel hücre apoptozu ve mikrovasküler hasarına yol açmaktadır. Bunun sonucu kapiller kaybı, doku hipoksisi

ve dijital ülserler meydana gelmektedir (16). Ayrıca yapılan araştırmalarda, endotel hücrelerinin mezenkimal hücelere transdiferansiyasyonu olan endotel-mezenkimal geçiş (EndoMT) sonucu α -düz kas aktin (α -SMA) ve tip I kolajen (COL-1) gibi mezenkimal hücre belirteçlerini eksprese ettiği ve damar duvarının fibrozisine yol açtığı bildirilmiştir (17,18). Raynaud fenomeni (RP), soğuğa maruz kalma veya duygusal stres ile başlayan epizodik iskeminin neden olduğu el ve ayak parmaklarına giden kan akımındaki azalmadır. SSc hastalarının %95'inden fazlasında RP bulunmaktadır ve mikrovasküler hasarın bir sonucudur (19). SSc'de RP'nin periferik kan damarlarındaki mikrovaskülopati ve endotel disfonksiyonundan kaynaklandığını göstermektedir (20).

2.1.2.2. İmmün sistem aktivasyonu

SSc hastalarında görülen immün sistem aktivasyonunu başlatan temel faktörün vaskülopati olduğu düşünölmektedir. Hasar görmüş ve apoptotik endotel hüceleri, hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP'ler) salgılayarak immün sistem hücelerinin aktive olmasına ve bölgeye göç etmesine neden olmaktadır (21). Hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonlarındaki artış da immün hücre infiltrasyonunu kolaylaştırmakta ve SSc'nin erken evrelerinde T lenfositleri, monositler ve makrofajlar görölmektedir (22). İnterlökin (IL)-6'nın hastalığın erken evrelerinde yüksek düzeylerde bulunduğu ve SSc şiddeti ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir (23). IL-6'nın endotel hücre aktivasyonu ve hasarını daha da artırması vasküler hasar ve immün yanıtın birbirleriyle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir.

SSc hastaların serumlarında immün hücelere tarafından salgılanan IL-4, IL-13 ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β gibi fibrojenik sitokinlerin yüksek düzeylerde olduğu gösterilmiştir (24,25). Bu sitokinlerin azalmasının farklı modellerde fibrozisi önlediği veya iyileştirdiği gösterilmiştir (26-28). IL-4 ve IL-13 temel olarak tip 2 yardımcı T (Th2) lenfositleri tarafından salgılanmaktadır (29). Her iki sitokin, B lenfosit proliferasyonu ile immünoglobulin ve adezyon moleküllerinin sentezini uyarak immün sisteme etki göstermektedir (29,30). Ayrıca TGF- β üretimini, fibroblast proliferasyonu ve farklılaşmasını uyarmaktadır (27,31). Bunun yanında kolajen sentezini artırmakta, matriks metalloproteinaz (MMP)-1 ve MMP-3

gibi kolajenazların sentezini azaltmakta, metalloproteinaz doku inhibitörünü (TIMP)-1 artırmaktadır (32). TGF- β , SSc hastalarında inflamatuvar ve fibrinojenik etki gösteren çok sayıda sinyal yollarını aktive etmektedir. TGF- β , SMAD proteinlerinin fosforilasyonuna indükleyerek SMAD4 aracılı gen ekspresyonuna neden olmaktadır. c-Jun N-terminal kinaz (JNK), p38 ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK) 1 ve 2 aracılığıyla mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK'ları) aktive etmektedir (33).

Dolaşımdaki monositlerin ve M2 makrofajların aktivasyonu ve etkilenen deriye infiltrasyonları SSc patogenezinin önemli özellikleri arasında bulunmaktadır (34). M2 makrofajları, inflamatuvar M1 makrofajlarından farklı olarak yaralı dokunun yeniden yapılandırılmasını ve ECM sentezi ve depolanmasını sağlamaktadır. Hem M1 hem de M2 makrofajları TGF β , IL-4 ve IL-13 gibi fibrojenik veya IL-6 gibi inflamatuvar sitokinleri yüksek düzeylerde sentezleyebilmektedir (35)

Nötrofiller de makrofajlar gibi TGF β , IL-6 gibi sitokinleri sentezlemektedir (36). Bunun yanında reaktif oksijen türlerini (ROS) üreterek ECM'ye bağlı olan latent TGF- β 'nın salınmasını sağlamaktadır (37). Ayrıca SSc hastalarının patojenlerin yakalanıp öldürülmesinde rol oynayan nötrofil ekstrasellüler tuzakların salınmasına daha yatkın oldukları belirtilmektedir (38).

SSc lezyonlarında ICAM1 ekspresyonunun yüksek olduğu ve TGF- β 'nın lokal olarak artışıyla bölgeye çekilen T lenfositlerin invazyonunu kolaylaştırdığı bildirilmiştir (39). SSc'de Th2 lenfositlerin Th1 lenfositlerinden daha fazla eksprese edildiği ve patogeneizde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (40). Th2 lenfositleri IL-4 ve IL-13 sitokinleri yüksek düzeylerde salgılamakta, makrofaj ve fibroblastlardan TGF- β salınımını indüklemektedir. Ayrıca SSc'de regülatör T lenfositlerin (Treg) Th17 ve Th2 lenfositlere farklılaştığı gösterilmiştir (41).

SSc hastaları aktive olmuş fazla sayıda naif ve az sayıda bellek B lenfositlerinin bulunduğu anormal B lenfosit profili göstermektedir (42). Aktive B lenfositlerin SSc patogenezinde önemli rolü olduğu belirtilmektedir. M2 makrofajlara ve Th2 lenfositlere farklılaşmayı indükleyen IL-6 salgılar. Dermal fibroblastlarla doğrudan hücre-hücre kontaklı ile veya TGF- β salgılayarak fibroblastların profibrotik fenotipe

dönüşmelerine neden olmaktadır (43). Ayrıca SSc'li hastaların %95'inde otoantikörlerin bulunduğu belirtilmektedir. Otoantikörlerin erken tanı, prognoz ve organ hasarının öngörülmesini sağladığı bildirilmektedir (44). Otoantikörlerin büyük bölümünün nükleer, nükleolar ve hücre içi proteinlere karşı geliştiği belirtilmekle birlikte trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve ET-1 gibi hücre yüzey reseptörlerine karşı gelişen ve reseptörlere bağlanarak profibrotik yanıtları tetikleyen otoantikörlerin de bulunduğu bildirilmiştir (45,46).

SSc hastalarında Treg ve regülatör B (Breg) lenfositlerin sayılarının ve aktivitelerinin azaldığı bildirilmiştir (47,48). Bunun yanında dendritik hücreler, naif T lenfositlerini antijen sunmaları için aktive etmekte ve SSc'de verilen immün yanıtları etkilemektedir. SSc hastalarında plazmasitoid dendritik hücrelerin yüzeylerinde artmış toll benzeri reseptör (TLR)-8 ekspresyonunun deriye interferon- α (IFN- α) ve küçük kemokin trombosit faktör 4 (CXCL4) salgılanmasına neden olduğu bildirilmiştir (49).

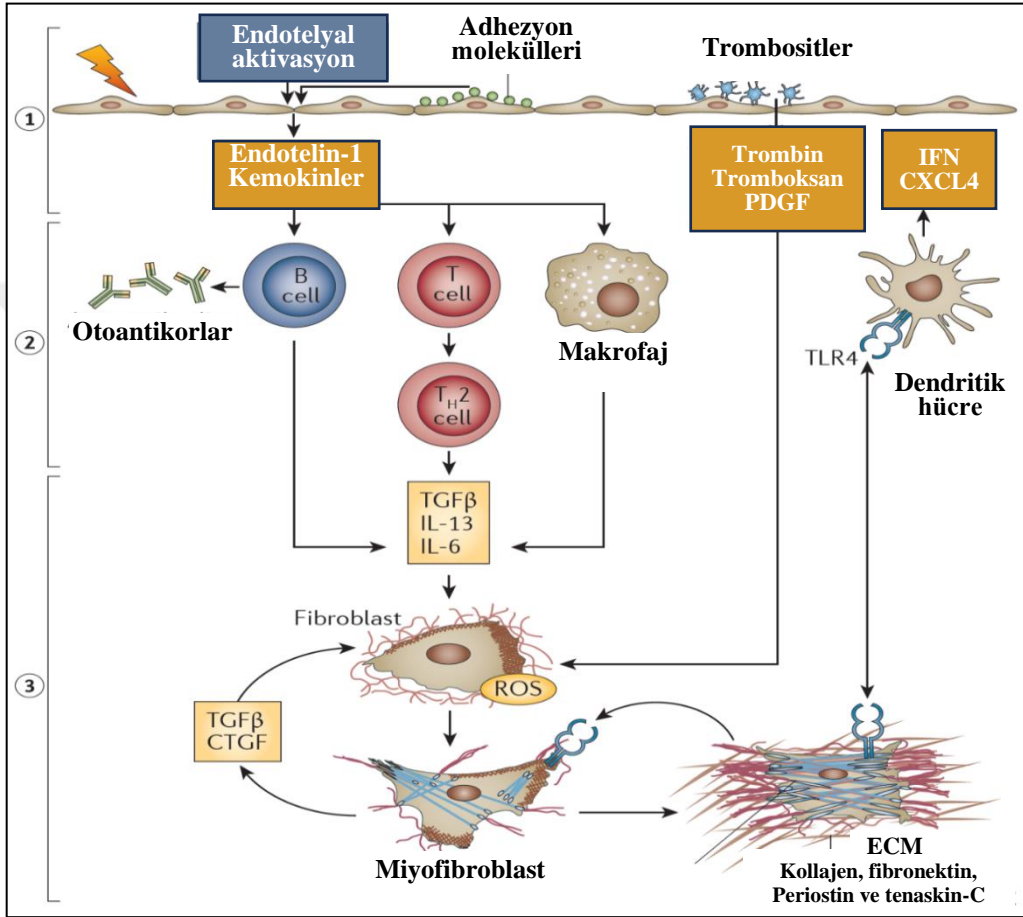
2.1.2.3. Fibrozis

Fibrozis, SSc'nin üç patolojik özelliğinden biridir. İnflamatuar profibrojenik sitokinler ve büyüme faktörleri fibroblastları aktive etmektedir. Otonomik ve uzun süreli aktivite kazanan bu fibroblastlar miyofibroblast özellikleri göstermektedir (50). Aktive olmuş şekilde devam eden miyofibroblastlar, ECM proteinlerinin kontrolsüz bir şekilde sentezlenmesi, depolanması ve yeniden şekillendirilmesine neden olmaktadır. Bunun sonucu fibrotik bir doku meydana gelmekte ve geri dönüşümü olmayan organ yetmezlikleri ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle fibrozis, SSc patogeneğinde morbidite ve mortaliteye neden olan ve bu nedenle hastalığın ölümcül bir bileşeni olarak kabul edilmektedir.

Miyofibroblastlar stres fiberlerinde α -düz kas aktin (α -SMA) ekspresyonu, kontraktıl özellikleri olan ve yara iyileşmesinde rol oynayan hücrelerdir. TGF- β gibi profibrotik sitokinler salgılamakta; kolajenler, elastin, glikoproteinler ve proteoglikanlar gibi ECM bileşenleri sentezlemektedir. Miyofibroblast normal dokuda nadir olarak bulunurken SSc'de azalmış apoptoz ve artan transdiferansiyasyon nedeniyle fazla sayıda bulunmaktadır (51,52). Normal doku

iyileşmesi sırasında myofibroblastlar dokudaki onarım görevlerini tamamladıklarında, anti-apoptotik Bcl-2 proteinin azalması sonucu apoptotik eşik hücre içinde düşürülerek hücreler apoptozise uğramaya daha yatkın duruma gelmektedir. Bunun sonucu miyofibroblastlar pro-apoptotik Bim proteini aracılığıyla apoptozise yönlendirilmektedir (53). Miyofibroblastların pro- ve anti-apoptotik dengesinde mikroRNA'ların (miRNA) da rol oynadığı belirtilmiştir. SSc dermal fibroblastlarda miRNA21 ekspresyonunun arttığı ve pro-apoptotik Bax mRNA'sına bağlandığı gösterilmiştir. Bu durumun miyofibroblastlarda apoptotik eşiği yükselttiği ve sağ kalım mekanizması olarak işlev gösterdiği belirtilmiştir. Bunun sonucu olarak ECM sentezleyen miyofibroblastlar aktive durumda devam edebilmektedir. (54). Profibrotik bir sitokin olan TGF- β , SSc'deki fibrotik süreçte rol oynayan en önemli faktördür (55). SSc'de azalmış apoptozis yanında hem miyofibroblastların aktivasyonu hem de miyofibroblastlara transdiferansiyasyon artmaktadır. TGF- β , transdiferansiyasyonu indükleyen temel büyüme faktörüdür ve ECM birikimine neden olmaktadır (56). SSc'de ilk hasarın oluşmasıyla hücreler TGF- β ve PDGF sentezlemekte, bunun sonucu olarak miyofibroblasta transdiferansiyasyonu gerçekleşmektedir (57). Fibrozisde miyofibroblast artışına birçok hücre tipi katkıda bulunmaktadır. Bunlar arasında dokuya yerleşik fibroblastlar, dolaşımdaki monosit kaynaklı mezenkimal progenitör hücreler (fibrositler), epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), EndoMT ve perisitler bulunmaktadır (58-60). Miyofibroblasta transdiferansiyasyonun aynı zamanda mekanik gerilime de bağlı olduğu ve SSc'de dokuların ECM yapısında mekanik gerilimin arttığı bildirilmiştir (61). Mekanik gerilim fibroblastlara integrinler yoluyla iletilmektedir (62). İntegrinler, mekanik ve biyokimyasal sinyalleri hücre membranı boyunca ileterek hücrenin çevresel koşullara uyumunu sağlamaktadır (63). İntegrin aracılı gerilim ECM'de latent formda bulunan TGF- β 'nin salınımını sağlamaktadır (64). Fibrozis, etkilenen dokuların ECM'de kolajenler, elastin, glikozaminoglikanlar tenaskin ve fibronektin birikiminden kaynaklanmaktadır (65). SSc hastalarının ECM'sinde sağlıklı kontrollere göre artmış düzeylerde kolajen tip I, III, V ve VI'nın yanı sıra fibronektin ve proteoglikanlar bulunmaktadır. Ayrıca SSc ECM'sinde tenaskin-C, fibronektin-EDA gibi DAMP'ların miktarlarında artış bulunmaktadır (66,67). Bu DAMP'ler profibrotik gen ekspresyonunu, miyofibroblasta

diferansiyasyonu ve TLR4 yolu üzerinden TGF- β 'nın fibroblastlar üzerindeki etkilerini artırmaktadır (68). Sonuç olarak, SSc fibrozisi kronik fibroblast aktivasyonu, miyofibroblast apoptozisinin azalması, ultrastrüktürel olarak değişmiş ECM birikimi ve azalmış ECM degradasyonu sonucu oluşmakta ve dokulara geri dönüşü olmayan hasar vermektedir.



Şekil 1. SSc patogenezinde rol oynayan mekanizmalar (69).

2.2. Otoantikorlar

SSc hastalarının ilk tanı anında %95'inde otoantikör pozitifliği görülmektedir. SSc spesifik antikörlerin organ tutulumu açısından risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. SSc'li hastalarda birçok otoantikörün varlığı gösterilmiştir. Bu otoantikörlardan hastalıkla ilgili en iyi bilinenleri ATA, ACA ve anti-RNA polimeraz

I, II ve III antikorlarıdır. Otoantikorların yüksek titrelerinin hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (70).

2.3. Tanı

SSc tanısı, klinik bulgulara göre yapılmakta ve laboratuvar bulguları tanıyı destekleyici olarak kullanılmaktadır. Hastalar, SSc için ilk bulgulardan biri olan RP ve deri tutulumu, pulmoner tutulum, pulmoner hipertansiyon, GİS tutulumu, böbrek tutulumu ve kas-eklem-tendon tutulumuna göre analiz edilmekte ve Amerikan Romatoloji Derneği/Avrupa Romatizma Birliği (ACR/EULAR) tarafından 2013 yılında güncellenen puanlama sistemine göre değerlendirilmektedir. Toplamda 9 ve daha fazla puana sahip olan hasta SSc tanısı almaktadır. Puanlama sistemi Tablo 1’de gösterilmiştir (71).

Tablo 1. ACR/EULAR SSc Puanlama Sistemi

BULGULAR	ALT TIPLERİ	PUAN
Her iki elde parmaklar ve metakarpofalangeal eklemlerin proksimalinde deri kalınlaşması (Yeterli kriter)	-	9
Parmaklarda deri kalınlaşması (yalnızca yüksek olanı skorlayın)	Şiş parmaklar	2
	Sklerodaktili	4
Parmak ucu lezyonları (yalnızca yüksek olanı skorlayın)	Dijital ülser	2
	Dijital ülser skarı	3
Telenjektazi	-	2
Anormal tırnak yatağı kapiller değişiklikleri	-	2
Pulmoner arteryal hipertansiyon ve/veya interstisyel akciğer hastalığı (maksimum skor 2)	Pulmoner arteryal hipertansiyon	2
	İnterstisyel akciğer hastalığı	2
Raynaud’s Fenomeni	-	3
SS ile ilişkili otoantikorlar (maksimum skor 3)	Anti-sentromer Anti-topoizomeraz (anti-Scl-70) Anti-RNA polimeraz III	3

Sistemik skleroz kalsifikasyonu için toplam skor ≥ 9 olmalı (Sensitivite %91, Spesifite %92)

2.4. Alt gruplara sınıflandırma

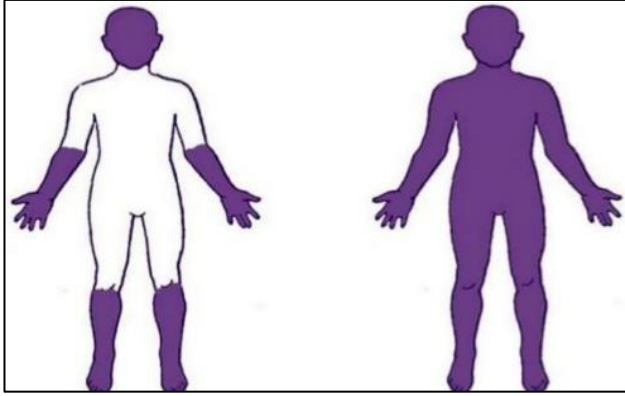
1988 yılında uluslararası uzmanların bir araya geldiği sempozyumda SSc'nin klinik olarak iki alt grubu tanımlanmış ve sonradan yaygın kabul görmüştür (Şekil 2) (72). Bu alt gruplar arasında klinik geçişlerin nadiren görüldüğü ve otoantikör tiplerinin farklı olması, organ tutulum şiddetleri arasında farklılıkların bulunması, prognoz ve sağ kalım gibi parametrelerde ayrıcalıkların saptanmasından dolayı önerilen bu alt gruplara göre SSc'li hastaların gruplandırılması bir klasik haline gelmiştir. SSc, klinik olarak sınırlı (lcSSc) ve diffüz (dcSSc) olarak sınıflandırılmaktadır (6). lcSSc'de, başlıca dirsek ve dizlerin distalindeki deri bölgeleri ve yüz derisi tutulumu görülmekte, buna iç organ tutulumlarından özellikle GIS, akciğerler, kalp ve pulmoner arter tutulumları eşlik etmektedir. dcSSc'de ise ekstremitelerin proksimal bölgeleri ve gövdenin de dahil olduğu daha büyük çapta deri tutulumu ile daha fazla ve yaygın iç organ tutulumu bulunmaktadır (73).

2.4.1. Sınırlı deri tutulumlu SSc

Bu SSc alt grubunda, Raynaud fenomeni deri tutulumundan yıllarca önce ortaya çıkabilir. Deri tutulumu; dirsek distalindeki deri, diz distalindeki deri ve yüz ile sınırlıdır. Sınırlı deri tutulumlu sistemik sklerozda pulmoner arteriyel hipertansiyon görülebilmektedir. Bu alt grupta Genellikle anti-sentromer antikör pozitif iken anti-Sc1-70 antikör ise negatiftir (74).

2.4.2. Diffüz deri tutulumlu SSc

Diffüz deri tutulumlu SSc'de ise eller, yüz ve ayakların tutulumu yanında gövde derisi tutulumu da vardır. Bu alt grupta çoğunlukla Raynaud fenomeni bulunmaktadır. Diffüz deri tutulumunda tendonlarda krepitasyon, daha yüksek oranda pulmoner fibrozis, GIS tutulumu, renal kriz, kalp yetmezliği ve kardiyak aritmi görülebilmektedir. Genellikle ATA pozitif, ACA ise negatiftir (74).



Şekil 2. SSc alt grupları (solda lcSSc, sağda dcSSc)

2.5. Modifiye Rodnan deri skoru

17 vücut alanında (yüz, göğüs, karnı, ayrıca sağ/sol ayrı ayrı olacak şekilde el parmakları, eller, ön kollar, kollar, uyluklar, bacaklar, ayaklar) deri, parmaklar arasında sıkıştırılarak deri kalınlaşması 0-3 arasında skleroderma klinik olarak değerlendirilir. 0= normal sertlik, 1= ılımlı sertlik, 2= orta sertlik, 3= ciddi sertlik (maksimum skor: 51 olabilir) Şekil 3'te gösterilmiştir (75).

0	Tutulum yok	1	Hafif	2	Orta	3	Ağır
<input type="checkbox"/>	Yüz	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Üst kol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Batın	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Ön kol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	El	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Parmak	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Uyluk	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacak	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Ayak	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Şekil 3. SSc'de modifiye Rodnan deri skorlaması

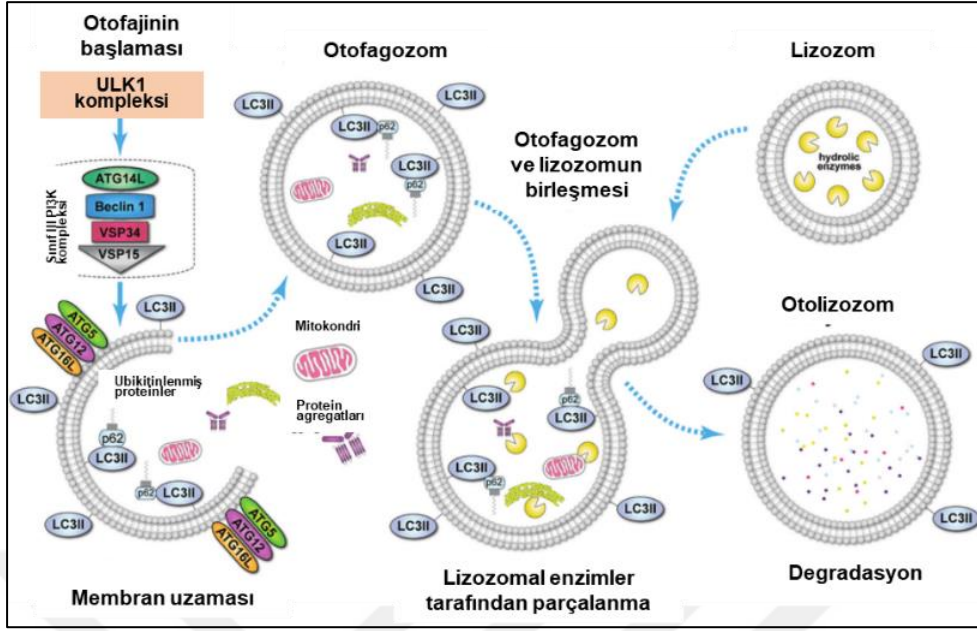
2.6. Otofaji mekanizması

Otofaji, hücre içerisindeki biyomoleküllerin, proteinlerin ve organellerin kesecik içine alınıp lizozomlara yönlendirilerek füzyonu ve burada parçalanması sonucu gerçekleşen, hücre içinde geri dönüşümü, yıkılan ürünlerin yeniden kullanılabilmesini sağlayan evrimsel olarak korunmuş hemostaz mekanizmasıdır (76,77). Temel olarak hücre koruyucu bir süreçtir ve hücrenin besin yoksunluğu, oksidatif stres, kronik stimülasyon ve işlevsiz organellerin ve proteinlerin hücre içi birikimi gibi çeşitli stres koşullarına uyumunu sağlamaktadır (78). Ayrıca hücreleri mikrobiyal, viral patojenlere, hasarlı yapılara (79) ve hipoksiye (80) karşı immün hücre yanıtlarını düzenlemektedir (81). Otofaji genel olarak makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı tofaji olmak üzere üç tip olarak sınıflandırılmaktadır. Çalışmalarda tofaji olarak bahsedildiğinde genellikle makrotofaji anlaşılmaktadır ve farklı hücre tipinde bazal düzeyde gerçekleşen tofaji makrotofajidir. Makrotofaji sistemi, mayadan omurgalılara kadar birçok türde yüksek oranda korunmuş olan tofaji ile ilişkili gen (ATG) ailesi ve proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Otofaji yollarını aydınlatmak amacıyla yapılan çalışmalarda 30'dan fazla tofaji bağlantılı protein tespit edilmiştir (82). Mikrotofaji, tomurcuklanan sitozolik kargo veziküllerinin membran invajinasyonları yoluyla lizozomal lümene taşınması şeklinde gerçekleşir (83). Şaperon aracılı tofaji, açlığa verilen ikincil yanıtta rol oynar ve özellikle diğer iki form, katlanmamış proteinlerin HSC70 şaperonlarının yardımıyla LAMP-2a taşıyıcısı aracılığıyla lizozomal membran (84) boyunca bir konsensüs peptid dizisi ile doğrudan translokasyonunu içermektedir (85).

Makrotofaji (bundan sonra tofaji olarak kullanılacaktır), rapamisin kompleksinin memeli hedefi 1 (mTORC1) - ATG1/unc-51 benzeri tofaji aktive edici kinaz (ULK1) eksenini, AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ve sirtuin 1 (SIRT1) gibi çeşitli sinyal yolları tarafından düzenlenmektedir (86). Otofaji, çekirdeklenme (İzolasyon membranı ve fagoforun oluşumu), uzama (İzolasyon membranının uzaması), olgunlaşma (otofagozomun tamamlanması ve taşınması), birleşme (otofagozom ile lizozomun kaynaşması ve birleşimi) ve parçalanma (kargoların otolizozom içinde yıkımı) aşamalarından oluşmaktadır (87). mTORC1,

besin açısından zengin koşullar altında ULK1'in fosforilasyonunu inhibe ederek otofajiyi negatif olarak düzenlemektedir (88). Amino asit yokluğu gibi besin eksikliği koşullarında, mTOR'un inhibisyonu ULK1 kompleksinin (ULK1/2, ATG13, FIP200 ve ATG101) aktivasyonuna ve dolayısıyla otofajinin başlamasına yol açmaktadır (89). Alternatif olarak, besin eksikliğinde AMPK aktive olarak hem ULK1'i aktive etmekte hem de mTORC1'i inhibe ederek otofajinin başlamasını sağlamaktadır. ULK1 kompleksi, otofaji başlatma bölgesine alındıktan sonra sınıf III fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) aktivitesi bulunan Beclin1/Vps34'ü doğrudan veya AMBRA1 fosforilasyonu yoluyla dolaylı olarak fosforile ederek aktive etmektedir (90). PI3K kompleksi, fosfatidilinozitolün fosfatidilinozitol-3-fosfat'a (PI3P) dönüşümünü sağlar ki bu da fagoforun çekirdeklenmesi için gereklidir (91). Fagofor daha sonra uzamakta ve çift membranlı bir otofagozom oluşturarak kapanmaktadır. Bu süreç, iki ubikitin benzeri (UBL) protein konjugasyon sistemi ve fosfoinositit ile etkileşen WD-tekrarı olan protein (WIPI) gibi PI3P bağlayıcı proteinler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (92). Fagofor uzama fazında, ubikitin-ligaz benzeri ATG7 ve ATG10 (sırasıyla E1 ve E2) ile ATG5 ve ATG12 arasında kovalent konjugasyon meydana gelmekte ve ATG16L1 daha sonra bu komplekse alınmaktadır (89). İlk ubikitin benzeri konjugasyon sisteminin tamamlanmasıyla oluşan ATG12/ATG5/ATG16L1 kompleksi WIPI2 proteini aracılığı ile izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır ve ATG8 ortoloğu olan mikrotübülle ilişkili protein hafif zincir 3 (MAP1LC3, genellikle LC3 olarak kısaltılmaktadır) proteininin zar yüzeyindeki fosfatidiletanolamine (PE) bağlanmasını sağlamaktadır. Sitoplazmada bulunan serbest LC3 proteini, LC3-I olarak adlandırılır ve izolasyon membranlarının ve otofagozomların tespiti için kullanılmaktadır (93). Fosfatidiletanolamine konjuge olmuş ve otofajik veziküllere bağlı LC3 ise LC3-II olarak adlandırılmaktadır. Otofaji uyarımı sonrası LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmesi, otofaji bilimsel topluluğu tarafından otofagozomların mikroskopik olarak belirlenmesinde otofaji belirteci olarak kabul edilmektedir (94). LC3-II ve gama-aminobütirik asit A reseptör ailesi proteinleri otofagozomal membranın uzaması ve kapanmasında rol oynamaktadır (95). Otofaji sürecinin son adımı, lizozomal asit hidrolazlar tarafından tutulan içeriklerin parçalanması için lizozomun kapalı otofagozom ile füzyonu ile otofagolizozomun oluşmasıdır (Şekil 4). Otofajinin

bileşenlerin parçalanmasında seçici olmayan bir davranışa sahip olduğu düşünülürken, organeller, proteinler ve mikroorganizmalar bazında seçici olarak hareket ettiği belirlenmiştir (96). Bu seçicilik, LC3 etkileşim bölgeleri içeren kargo-spesifik adaptör proteinler tarafından sağlanmaktadır. Otofaji ayrıca besin açlığına yanıt olarak artan NAD⁺ düzeyleri ile aktive olan bir deasetilaz SIRT1 tarafından da kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda SIRT1'in otofajiyi doğrudan ATG proteinlerin deasetilasyonu yoluyla kontrol ettiği tespit edilmiştir. SIRT1 ayrıca otofajiyi, transaktif otofaji genleri olan forkhead box O (FoxO) üyelerinin aktivasyonu veya deasetilasyonu yoluyla dolaylı olarak da kontrol etmektedir (97). LC3B bağlayıcı protein SQSTM1 / p62 (Bundan sonra p62 olarak kullanılacaktır) otofajiden kaynaklanan protein agregatlarının oluşumunu düzenlemektedir. Azalan p62 ile birlikte LC3-II'deki artış, otofajik akışın arttığını gösteren en bilinen belirteçtir (98). Bu nedenle, otofajik yıkımın bir işareti olarak işlev görür (99,100). Şekil 4'te otofaji sinyal yolu mekanizması gösterilmektedir. Otofajik aktivite bozuklukları böbrek (101), eklem hastalıkları (102), miyopati (103), nöronal dejenerasyon (104), mikrobiyal enfeksiyon (105), inflamatuvar bağırsak hastalığı (106,107), yaşlanma (108) ve kanser (109) gibi çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik bozukluklarda bildirilmiştir. Birçok çalışma otofajinin böbrek, akciğer ve kalp gibi çeşitli dokulardaki fibroziste koruyucu bir rol oynadığını göstermektedir (110-113). Ayrıca otofajinin genetik veya kimyasal olarak engellenmesi, stres koşulları altında hücrelerin ölümüyle sonuçlanmaktadır (114). Yetersiz otofajik aktivite, TGF- β düzeylerinin artmasına, fibroblasttan miyofibroblasta farklılaşmaya ve aşırı kolajen sentezine neden olmaktadır (115).



Şekil 4. Otofaji sinyal mekanizması (116).

2.7. SSc patogenezi ve otofaji mekanizması

SSc patogenezi aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar, otofaji mekanizmasının önemli rol oynadığını göstermektedir. Yoshizaki ve ark. tarafından tight skin (TSK+) ve bleomisin ile fibrozis indüklenmiş fare modellerinde yapılan çalışmada, mTOR inhibitörü olan rapamisin'in TGF- β ile IL-4, -6 ve -17 sitokin düzeylerini azalttığı belirlenmiştir (117). Rapamisin, farelerde bleomisin ile indüklenen deri ve akciğer fibrozisini azaltmıştır. TSK+ farelerden izole edilen dermal fibroblastlarda rapamisin uygulamasının kolajen üretimini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca rapamisin uygulanan TSK+ farelerde serum ATA düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir (117). Del Pricipe ve ark. tarafından 2011 yılında yazılan bir derlemede SSc patogenezinin önemli bir özelliği olan fibrozisin gelişiminde otofaji mekanizmasının rol oynayabileceği ifade edilmiştir (118). Bu derlemenin yayımlanmasını izleyen yıllarda SSc patogenezinde otofajinin rolünün araştırıldığı çalışmalar yayımlanmaya başlamıştır.

Castello-Cros ve ark. tarafından yapılan çalışmada caveolin (Cav-1) $-/-$ fare modeli oluşturulmuştur (119). Cav-1 proteinin otofagozomların oluşumunda rol oynayan ATG5, ATG12, ATG16L1 ve LC3B gibi moleküllerin hem serbest hem de

konjuge formlarının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (120). Cav-1 aynı zamanda SSc hastalarından izole edilen dermal fibroblastlarda azaldığı bildirilmiştir (121). Cav-1 -/- farelerde dermis tabakasındaki LC3 (otofaji belirteci) ve BCL2 etkileşimli protein 3-benzeri (BNIP3L) (mitofaji belirteci) proteinlerinin wild tip fare dermisine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (119).

Frech ve ark. tarafından yapılan çalışmada 33 SSc hastası ve 6 sağlıklı kontrolden alınan deri biyopsilerinde immünfloresan (IF) yöntemle LC3 boyaması ile otofaji değerlendirilmiştir (122). LC3 boyanması 33 SSc hastasının 29'unda tespit edilmiş, ancak 4 sağlıklı kontrolde ise belirlenememiştir. SSc hastalık süresi kısa olan hastalarda LC3 boyanmasının uzun süreli hastalığı olanlara göre daha yoğun olduğu gösterilmiştir. Ayrıca otofagozom kompleksinin oluşumunu temsil eden çift membranlı veziküller, elektron mikroskobu (EM) ile görüntülenen 17 SSc hasta kesitinin 16'sında tespit edilmiş, 4 sağlıklı kontrolde ise tespit edilmemiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre otofajinin SSc patogenezinde rol oynadığı ve hastalığın erken evrelerinde otofajik akışın daha yüksek olduğu belirlenmiştir (122). Dumit ve ark. tarafından yapılan *in vitro* çalışmada ise 3 SSc hastasından hazırlanan primer dermal fibroblast hücrelerinde LC3 protein ekspresyonunun 3 sağlıklı kontrolden hazırlanan dermal fibroblast hücrelerine göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (123). Bu çalışmanın sonuçlarına göre azalmış otofajinin ECM proteinlerinin birikmesine neden olduğu belirtilmiştir.

Birçok genetik faktörün, özellikle majör histokompatibilite kompleksinin (MHC), SSc'ye duyarlılıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), MHC sınıf II bölgesinin SSc'deki en önemli genetik bölge olduğunu ortaya koymuştur. İmmunochip dizisi, yüksek yoğunlukta otoimmün hastalıkların lokuslarını haritalayan ve düşük maliyet açısından kullanışlı olan tek nükleotid polimorfizmi (SNP) genotipleme dizisidir. Mayes ve ark. (124) tarafından yapılan bir kohort çalışmada, otofagozom uzamasında rol oynayan ATG'deki rs9373839 SNP'sinin SSc ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Maugeri ve ark. tarafından yapılan çalışmada, SSc hastalarının kanındaki aktive trombositlerden mikropartiküllerin (SSc-mikropartikül) salındığı ve DAMP molekülü olan yüksek mobilite grup kutusu 1 (HMGB-1) eksprese ettiği

belirlenmiştir (125). HMGB1, otofajiyi indükleyen bir molekül olarak bilinmektedir. HMGB1'in nötrofilleri aktive ettiği ve otofajik aktivasyonlarını artırdığı gösterilmiştir (125). Ayrıca SSc hastalarının trombosit kaynaklı mikropartiküller fareye verildiğinde vaskülopatiye neden olduğu ve fibrozisi başlattığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada trombosit kaynaklı mikropartikül ilişkili HMGB1'in nötrofil otofajisine neden olarak hastalık patogenezinde rol oynadığı ve yeni bir tedavi hedefi olabileceği vurgulanmıştır.

Liu ve ark. tarafından yapılan çalışmada ilk kez tanı almış 5 SSc hastası ve 5 sağlıklı kontrolden dermal biyopsi örnekleri alınmıştır (126). Yapılan transmisyon elektron mikroskopu incelemesinde, SSc hastalarının fibrotik dermisinde kontrol grubuna göre artmış sayıda otofagolizozom tespit edilmiştir. SSc hastalarından izole edilen dermal fibroblastlarda LC3, COL-I ve bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) protein ekspresyon düzeylerinin normal fibroblastlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. SSc fibroblastlarının hipoksiye maruz bırakılması LC3, COL-I ve CTGF protein ekspresyon düzeylerinin ve LC3 IF boyama yoğunluğunu artmıştır. Hipoksiye maruz bırakılan SSc dermal fibroblastlara otofagozom parçalanmasını inhibe eden bafilomisinA1 uygulandığında LC3 ve p62 protein ekspresyonları artmış, COL-I ve CTGF protein ekspresyonları ise azalmıştır. Ayrıca hipoksi uygulanan insan umbilikal ven endotel hücrelerinde endoMT arttığı ve bafilomisinA1 uygulamasının endoMT'yi azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, SSc'de hipoksinin otofajiyi aktive ederek fibrozisi ve endoMT'yi artırdığını göstermektedir (126).

Mori ve ark. tarafından yapılan çalışmada, bleomisin ile skleroderma fare modeli oluşturulmuştur (127). Bleomisin verilen farelerin dermal tabakalarında dört hafta sonunda fibrozis tespit edilmiştir. Bunun yanında IF boyama sonuçlarına göre dermal tabalardaki LC3 pozitif punkta sayısının kontrol grubu farelere göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (127). Aynı çalışmada ödematöz ve sklerotik faz SSc hastalarından alınan deri biyopsileri de incelenmiştir. Hematoksilen ve eozin (HE) boyamasında, sklerotik faz SSc hastalarında dermal fibrozisin ödematöz SSc hastalarına göre daha şiddetli olduğu, alt dermiste üst dermise göre daha yoğun kollajen demetlerin bulunduğu bildirilmiştir. Deri kesitlerinin IF boyama

incelemesinde, sklerotik SSc hastalarının alt dermisinde kontrollerin dermisine, ödematöz SSc ve sklerotik SSc hastaların üst dermisine göre daha fazla LC3 pozitif punkta sayısı tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçları, SSc kesitlerindeki otofajik mekanizmanın, hafif fibrotik dermisten ziyade şiddetli fibrotik dermiste daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışma, SSc hastalarının patolojik evreleri ile otofaji arasındaki ilişki açısından daha detaylı bilgi sağlamakta, hastalığın ileri evrelerinde otofajinin SSc patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

SSc hastalarının PBMC'lerinde yapılan çalışmada; LC3, Beklin1 ve ATG3 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu belirtilmiştir. ATG5, ATG12 ve ATG 16L1 mRNA ekspresyon düzeylerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Ayrıca LC3'ün yaş ve eritrosit sedimentasyon hızı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (128).

Koaktivatörler, transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek gen transkripsiyonunda rol oynayan proteinlerdir. Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama koaktivatörü-1 α (PGC-1 α), peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama (PPAR γ) koaktivatör ailesinin en iyi çalışılmış üyesidir (129). PGC-1 α 'nın, SSc'nin patogenezinde de yer alan hücrel farklılaşma, anjiyogenez, inflamasyon ve mitokondriyal metabolizma gibi çeşitli metabolik işlevlerde rol oynadığı bildirilmiştir. Bunlara ek olarak, PGC-1 α 'nın otofaji ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu modüle edebileceği de bildirilmiştir (130). Zhang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 7 SSc hastasının deri biyopsilerinde IF boyamada PGC-1 α pozitif fibroblast sayısının sağlıklı kontrollere göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (131). SSc hastalardan izole edilen dermal fibroblast hücrelerinde de PGC-1 α mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Farelerde bleomisin ile indüklenen fibrozis ve miyofibroblast sayısının fibroblast spesifik PGC-1 α knockout yapılarak azaldığı belirlenmiştir. Fare dermal fibroblastlarda PGC-1 α knockout yapılması TGF- β ile uyarılan fibroblast aktivasyonunu ve kolajen sentezini azaltmıştır. Ayrıca TGF- β ile uyarılan fare dermal fibroblastlarda kontrollere göre daha fazla olan ATG7 ve Beklin1 IF boyamaları ve yüksek LC3 protein ekspresyon düzeyleri PGC-1 α knockout yapılması ile azalmış ve otofaji inhibe edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları,

PGC-1 α koaktivatörünün otofajiyi azaltarak SSc'de artmış fibroblast aktivasyonu ve fibrozisi önlemede hedef olabileceğini göstermektedir (131).

Zehender ve ark., SSc hastalarında ve bleomisin ile fibrozis indüklenmiş fare modelinde TGF- β ve otofaji arasındaki ilişkiye yönelik deri dokularında ve *in vitro* dermal fibroblastlarda araştırma yapmışlardır (132). SSc hastalarının fibrotik deri dokularında IF yöntem ile Beklin1 ve ATG7 boyamalarının kontrollere göre daha fazla olduğu, p62 boyamasının ise daha az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SSc hastalarının deri dokularında artmış Beklin1 ve ATG7 mRNA ekspresyon, artmış LC3 protein ekspresyon ve azalmış p62 protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bleomisin ile fibrozis indüklenmiş farelerin deri ve akciğer dokularında da artmış Beklin1 ve ATG7 mRNA ekspresyon ve azalmış p62 mRNA ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. SSc hastalarından izole edilen dermal fibroblastlarda artmış LC3 protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. SSc hastalarından izole edilen dermal fibroblastlarda *in vitro* Beklin1'in aşırı ekspresyonu ile otofaji aktivitesi artmış, miyofibroblasta diferansiyasyon uyarılmış ve kontrol fibroblastlarına göre TGF- β ve kollajen salınımı artmıştır. Ayrıca bleomisin ile fibrozis indüklenmiş farelerde Beklin1'in aşırı ekspresyonu otofajiyi aktive etmiş, miyofibroblasta diferansiyasyon uyarılmış, kollajen salınımı artmış, deri ve pulmoner fibrozis ilerlemiştir. SSc hastalarının dermal fibroblastlarında *in vitro* ATG7 veya Beklin1'in susturulmasıyla otofajinin inhibe edilmesi sonucu kontrol fibroblastlarına göre miyofibroblastların diferansiyasyonu ve kollajen salınımını azalmıştır. Bunun yanında TGF- β , SSc dermal fibroblastlarda Beklin1 ve ATG7 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini artırmış, p62 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini azaltmış, LC3 IF boyamasını artırmıştır. Bu hücrelerde SMAD3 geni susturulduğunda Beklin1 ve ATG7 mRNA ekspresyon düzeyleri arttığı ve TGF- β 'nın etkisinin SMAD3 yolu üzerinden olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca TGF- β , SSc dermal fibroblastlarda histon H4 lizin 16 histon asetiltransferaz (H4K16) MYST1 ekspresyonunu azaltarak otofajiyi indüklemiştir. SSc hastalarının deri dokularında MYST1 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin kontrol derilere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. MYST1'in *in vitro* dermal fibroblastlarda ve *in vivo* farelerde susturulmasıyla TGF- β 'nın gösterdiği etkiler gibi Beklin1 ve ATG7 mRNA ve protein ekspresyon

düzelelerini artırmış, p62 mRNA ve protein ekspresyon düzelelerini azaltmıştır. MYST1'in in vitro dermal fibroblastlarda ve in vivo farelerde aşırı ekspresyonunda TGF- β 'ya bağılı otofajide görülen etkiler ortadan kalmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, otofajinin SSc fibrozisinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca otofajinin epigenetik mekanizmalar da düzenlendiğini ve bu mekanizmaların fibrozisin ilerlemesine yönelik tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir (132).

Frenger ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 30 SSc hastasından izole edilen PBMC'lerde LC3 düzeylerinin sağlıklı kontroller ile farklılık göstermediği belirtilmiştir. (133) Periferik kandan izole edilen B lenfositler kültüre edilmiş ve *in vitro* bafilomisinA1 ile inkübe edildiğinde LC3 düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca periferik kandan izole edilen monositler M0, M1 ve M2 makrofajlara diferansiye edilmiş ve bu makrofajlara özgü belirteçler incelenmiştir. Yapılan analizlerde makrofajların M1 özelliklerinin bozulduğu ve daha çok M2 makrofaj özellikleri taşıdığı tespit edilmiştir. Bunun yanında SSc hastalarından hazırlanan M0 makrofajlarında LC3 ilişkili fagositoz aktivitelerinin sağlıklı kontrollere göre daha az olduğu belirlemiştir. LC3 ilişkili fagositoz içinde otoantijenlerin bulunduğu apoptotik hücrelerin temizlenmesinde, inflamatuvar yanıtın ve otoimmünitinin azaltılmasında rol oynadığı belirtilmektedir (134). Bu çalışmanın sonuçları, LC3 ilişkili fagositozun SSc patogeneğinde inflamasyon ve otoimmünitede rol oynadığını göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. Araştırmanın Tipi

Olgu-kontrol çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmamız Ağustos 2021 ile Ağustos 2022 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı İmmünoloji-Romatoloji Bilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın örneklemi

Araştırma, olgu-kontrol çalışması olarak planlanmıştır. Olgu grubu için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Romatoloji Polikliniğinde 2013 ACR/EULAR sınıflandırma kriterlerine göre SSc tanısı almış ve izlenmekte olan hastalar dahil edilmiştir. Çalışma, %95 güven aralığında ve %80 güç alınarak hesaplanan örnek büyüklüğü göz önüne alınarak planlanmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin periferik kan örneklerinden hazırlanan mononükleer hücrelerdir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

3.5.1. Bağımsız değişkenler: SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ve protein ekspresyon düzeyleridir.

3.5.2. Bağımlı değişkenler: Olgu ve kontrol olma durumudur.

3.6. Veri Toplama Araçları:

3.6.1. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

Tablo 2. Projede kullanılan kimyasal malzeme ve kitlerin listesi

No	Ad	Marka (Kat. No.)	Kullanım Amacı
1	96 kuyucuklu plak	Greiner	Protein konsantrasyon ölçümü
2	PBS	Cegrogen (H0500-540)	PBMC izolasyonu
3	Serolojik pipet	Jet Biofill	PBMC izolasyonu
4	Total RNA Miniprep Kit	New England Biolabs (T2010S)	RNA izolasyonu
5	ProtoScript First Strand cDNA sentez kiti	New England Biolabs (E6300S)	cDNA sentezi
6	iTaq universal SYBR Green supermix	Bio-Rad (1725127)	Gerçek zamanlı PCR
7	PCR mikroplak (96 kuyucuk)	Axygen (PCR-96-LP-AB-C)	Gerçek zamanlı PCR
8	Akrilamid/bis-akrilamid	Sigma-Aldrich	SDS-PAGE jel hazırlanması
9	TEMED	Applichem (A1148,0025)	SDS-PAGE jel hazırlanması
10	APS	Sigma (A3678)	SDS-PAGE jel hazırlanması
11	SDS	Applichem (A2263)	SDS-PAGE jel hazırlanması
12	Tris	Applichem (A1087)	SDS-PAGE jel hazırlanması
13	LC3 rabbit antikoru	Novus Biologicals (NB100-2331)	Western blot analizi
14	p62 rabbit antikoru	Novus Biologicals (NBP1-48320)	Western blot analizi
15	Beklin I rabbit antikoru	Novus Biologicals (NB500-249)	Western blot analizi
16	β -Aktin goat antikoru	Santa Cruz (sc-1615)	Western blot analizi
17	ECL Western blot substratı	Thermo Fisher (34580)	Protein bandı görüntülenmesi
18	RIPA lizis tamponu	Cell Signaling Technology (9806S)	Hücre lizisi
19	BCA protein analiz kiti	Thermo Scientific (23225)	Protein konsantrasyon ölçümü
20	Color Prestained Protein Standard	New England Biolabs (7719S)	SDS-PAGE
21	PVDF membran	Millipore	Blotlama

22	Histopaque	Sigma Aldrich (10771)	PBCM İzolasyonu
23	Pipet uçları	Greiner	Pipetleme
24	HRP-işaretli rabbit Sekonder antikor	Cell Signaling Technology (7074S)	Western blot

Tablo 3. Projede kullanılan cihazların listesi

No	Ad	Marka	Kullanım Amacı
1	Santrifüj	Hettich	PBMC izolasyonu
2	Santrifüj	Hettich Rotofix 32	PBMC yıkanması
3	Nanodrop	Thermo Scientific	RNA konsantrasyonu ölçümü
4	Gerçek zamanlı PCR	Applied Biosystem 7500 Fast qPCR	mRNA düzeyi ölçümü
5	Soğutmalı santrifüj	Sigma 2K15C	RNA ve protein izolasyonu
6	Vorteks	Wised (VM-10)	Çözeltilerin karıştırılması
7	Termal cycler	Bio-Rad	cDNA sentezi
8	Distile su cihazı	Reservoir USF-Elga	Saf su elde etme
9	Elektroforez sistemi	ATTO AE6220	Elektroforez
10	Blotlama cihazı	ATTO AE-6675	Membran transferi
11	Mikroplak okuyucu	Biotek Synergy HT	Protein konsantrasyon ölçümü
12	Görüntüleme cihazı	Vilber Lourmart Chemi-Smart 3000	Protein bantlarının görüntülenmesi
13	Buzdolabı	Profilo	Çözeltileri saklama
14	Derin dondurucu	Thermo Scientific	RNA ve protein örneklerini saklama

3.6.2. Araştırmaya dahil olma kriterleri

SSc hastaları için:

- 18 yaş ve üstü yaş aralığında bulunmak.
- ACR/EULAR kriterlerine göre SSc tanısı almış olmak.

- UCLA GIT 2.0 anketini doldurabilecek kapasitede okur yazar olmak. Hastaların SSc hastalığına özgü semptomatik ya da organ bazlı almakta oldukları tedavilerine herhangi bir müdahale yapılmamıştır.
- SSc'de kullanılan immünoşüpresif tedaviler, kortikosteroidler, nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar, periferik vazodilatatör tedavileri gerekli olduğu hallerde almaya devam etmişlerdir.

Sağlıklı kontroller için:

- 18 yaş ve üstü yaş aralığında bulunmak.

3.6.3. Araştırmadan dışlama kriterleri

SSc hastaları için:

- SSc dışında otoimmün veya kronik bir hastalık (malignite, kronik böbrek hastalığı, lösemi-lenfoma gibi malign hematolojik hastalıklar, diyabet, pulmoner arteriyel hipertansiyon) bulundurmamak.

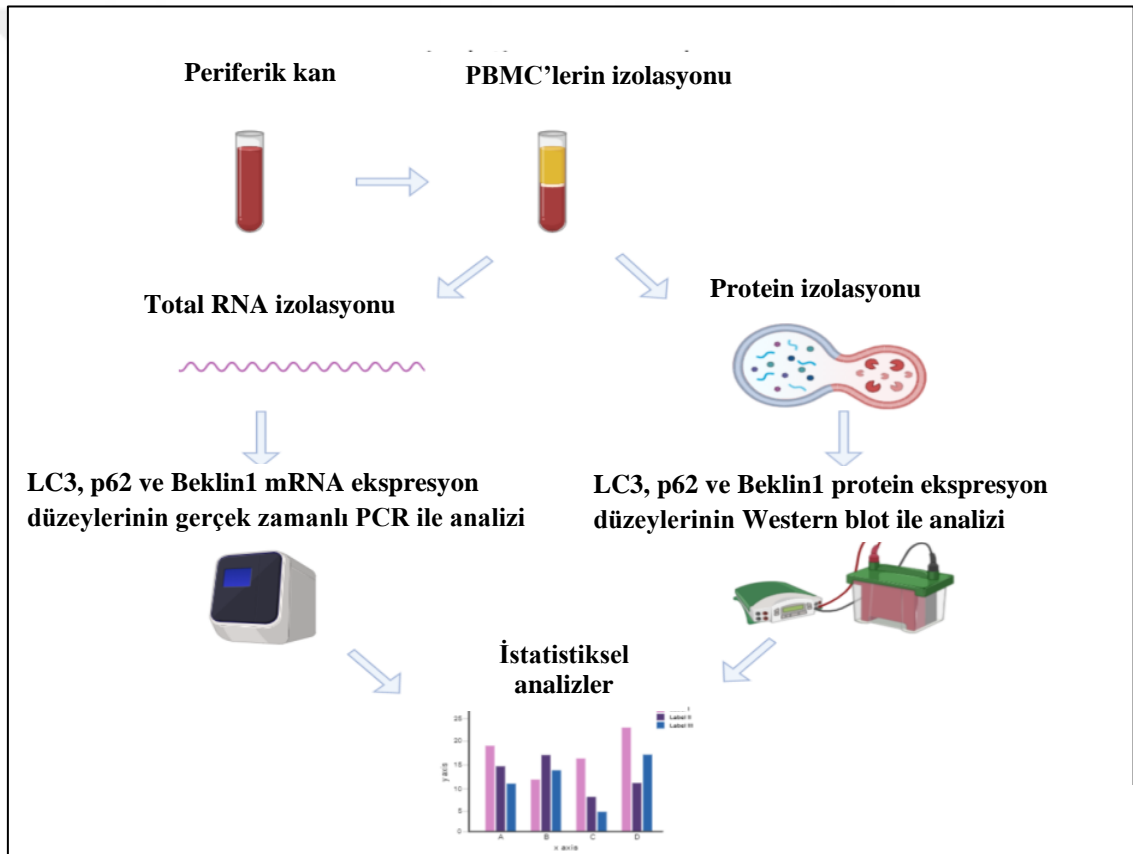
Sağlıklı kontroller için:

- Herhangi bir otoimmün veya kronik hastalık (malignite, kronik böbrek hastalığı, lösemi-lenfoma gibi malign hematolojik hastalıklar, diyabet, pulmoner arteriyel hipertansiyon) bulundurmamak.

3.6.4. Hasta ve kontrol periferik kan örneklerinin toplanması ve alt grupların belirlenmesi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı'nda takip edilen 18 yaş üstü, Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu (BGOF) imzalayarak gönüllü olmayı kabul eden 81 SSc hastası Ağustos 2021 ve Ağustos 2022 tarihleri arasında çalışmaya dahil edilmiştir. Deri tutulumunun derecesine göre SSc hastaları dcSSc (36 hasta) ve lcSSc (45 hasta) olarak sınıflandırılmıştır (72). SSc hastaları 2013 ACR/EULAR sınıflandırma kriterlerine göre sınıflandırılmıştır (71). Deri tutulumunun derecesi mRSS (0-51 skor arası) kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca SSc hastaları ATA ve ACA otoantikör pozitif veya negatif durumlarına göre sınıflandırılmıştır. Dışlama kriterleri (i) diğer sistemik otoimmün hastalıklar veya

overlap sendromları (ii) tedavi edilmemiş sistemik enfeksiyonlar (iii) altta yatan maligniteler olarak belirlenmiştir. Otoimmün ya da kronik hastalığı olmayan 18 yaş üstü 30 sağlıklı gönüllü bu çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Onay numarası 2018/22-49, 13 Eylül 2018) ve Helsinki Bildirgesi'ne göre gerçekleştirilmiştir. Çalışma popülasyonunun demografik ve klinik parametrelerine ilişkin veriler kaydedilmiştir. SSc hastalarının mevcut tedavileri de toplanmıştır. Hastalık başlangıcı, SSc'nin bildirilen ilk RP dışı semptomundan bu yana geçen süre olarak tanımlanmıştır.



Şekil 5. Deneysel protokollerin iş akışı.

3.6.5. PBMC'lerin İzolasyonu

SSc hastalarından ve sağlıklı kontrollerden iki-potasyum (K^{+2}) etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (K^{+2} -EDTA) tüplerinde periferik venöz kan

örnekleri toplanmıştır. Kan örnekleri 1:1 (v/v) oranında fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile seyreltilip Histopaque (Sigma-Aldrich, MO, ABD) üzerine aktarılmıştır. Ardından oda sıcaklığında 30 dak boyunca 400 g'de en düşük ivmelenme ve sıfır frenlemeyle yoğunluk gradyan santrifüjü yapılmıştır. Santrifüj bittikten sonra PBMC fraksiyonu toplanmış ve oda sıcaklığında her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez 1500 rpm'de santrifüjleme yoluyla PBS ile yıkanmıştır.

3.6.6. LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ekspresyonunun gerçek zamanlı PCR ile analizi

3.6.6.1. RNA izolasyonu

Total RNA, SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinden Monarch Toplam RNA Miniprep Kiti kullanılarak izole edilmiştir. Hücre pelleti üzerine kit içeriğindeki lizis tamponundan 300 µL eklenip pipetleme yapılarak homojenize edilmiştir. Parçalanmış hücrelerden oluşan hücre süspansiyonu, kitte bulunan gDNA Removal kolona aktarılmış ve 30 sn 16.000 g'de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra kolon atılmış, santrifüj tüpündeki süspansiyona 300 µL hacminde %99 moleküler kalitede etanol eklenmiştir. Pipetleme işlemi ile homojenize edilen örnek, kitte yer alan RNA saflaştırma kolonuna eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Pipetleme sonrası 16.000 g'de 30 sn santrifüjlenerek RNA'ların silika kolona bağlanmaları sağlanmıştır. Santrifüj sonrası toplama tüpünde kalan sıvı uzaklaştırılmış, kolonun içerisine kitte bulunan 300 µL RNA yıkama çözeltisi eklenmiş ve 16.000 g'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Altta toplanan sıvı uzaklaştırılmış ve silika membran üzerine 80 µL hacminde DNaz eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından kit içeriğindeki Prime Buffer ile DNaz uzaklaştırılmış ve yıkama yapılmıştır. Bu amaçla kolona 500 µL hacminde RNA yıkama çözeltisi eklenmiş ve 30 sn süreyle 16.000 g'de santrifüj edilmiştir. İkinci kez yıkama işlemi için 500 µL hacminde RNA yıkama çözeltisi eklenmiş ve 2 dk 16.000 g'de santrifüj edilmiştir. Total RNA izolasyonunun son aşamasında kolon yeni bir tüpe konulmuştur. Kolon içerisine kitte bulunan nükleaz içermeyen sudan 40 µL eklenerek 16.000 g'de 30 sn santrifüj yapılmış ve 2 µL RNA konsantrasyon ve kalite ölçümleri için ayrılmıştır. Tüpte kalan RNA sonraki deneyler için -80°C'ye kaldırılmıştır. RNA konsantrasyon ve kalitesi

NanoDrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür. İzole edilen RNA'ların saflığı A260/A280 ve A260/A230 oranlarında değerlendirilmiş ve 1.8 ile 2.2 arasında olan örnekler kaliteli olarak kabul edilmiştir. İki dcSSc ve iki lcSSc hastası, düşük kaliteli RNA örnekleri nedeniyle çalışmaya dahil edilememiştir.

3.6.6.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi 1 µg toplam RNA'dan ProtoScript Birinci Zincir cDNA Sentez Kiti kullanılarak yapılmıştır. RNA örneklerinin ölçülen konsantrasyonlarına göre 1 µg RNA'ya karşılık gelen hacim hesaplanmış ve RNaz içermeyen steril PCR tüplerine alınmıştır. RNA üzerine 2 µL Random Primer ve nükleaz içermeyen su eklenmiş ve total hacim 8 µL yapılmıştır. Daha sonra RNA, 5 dk 70°C'de thermal cyclerda inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Tüp içerisine 10 µL M-MuLV reaksiyon karışımı ve 2 µL M-MuLV enzim karışımı eklenmiş ve total hacim 20 µL yapılmıştır. Sentez, random primer için 25°C'de 5 dk, 42°C'de 60 dk ve enzim inaktivasyonu için 80°C'de 5 dk olacak şekilde thermal cyclerda gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sentezlenen cDNA üzerine 30 µL nükleaz içermeyen su eklenmiş ve total hacim 50 µL yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar sonraki deneyler için -20°C'ye kaldırılmıştır.

3.6.6.3. Gerçek zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR, iTaq evrensel SYBR Green süpermiks ve hedef genlere özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu plakta her kuyucuk içerisinde toplam hacim 10 µL olacak şekilde; 5 µl SYBR Green içeren 2X master karışımı, 1 µL cDNA, 1 µL forward ve reverse primer ve 3 µL nükleaz içermeyen su eklenmiştir. Plağın üzeri optik adheziv film ile kapatılmış ve plak 1100 rpm'de 45 sn santrifüj edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu için 95°C'de 20 sn, 95°C'de 3 sn, 60°C'de 30 sn 40 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. Her genin ifade düzeyi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar gliseral-dehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)'a göre normalize edilmiştir. Gruplar arası kat değişim farkları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanmış ve relatif kat değişimi analizi yapılmıştır (135).

Tablo 4. Kullanılan primerlerin listesi

Gen sembolü		Primer dizisi
MAP1LC3A	F	5'-GAGCGAGTTGGTCAAGATCA-3'
	R	5'-TCCTCGTCTTTCTCCTGCT-3'
SQSTM1/p62	F	5'-CTGCCTTGTACCCACATCTC-3'
	R	5'-CCGATGTCATAGTTCTTGGTCTG-3'
Beklin1	F	5'-ACAGCTCCATTACTTACCACAG-3'
	R	5'-GAATCTGCGAGAGACACCATC-3'
GAPDH	F	5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3'
	R	5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'

3.6.7. LC3, p62 ve Beklin1 protein ekspresyonlarının Western blot ile analizi

3.6.7.1. Protein izolasyonu

PBMC'lerdeki hücre lizatları, RIPA lizis tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1X RIPA lizis tampon karışımı; 10X RIPA lizis tamponu, fenilmetilsülfonil florür (PMSF) ve proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak hazırlanmıştır. Ardından hücre pelleti üzerine 200 µL hacminde 1X RIPA lizis tampon karışımı eklenmiş, 15 sn pipetlenmiş ve tüpe aktararak buz üzerine konulmuştur. Tüp her 5 dk arayla 30 sn vortekslenmiş ve buz üzerinde bekletilmiştir. Bu işlemler, toplam 25 dk süre içerisinde devam ettirilmiştir. Daha sonra +4°C'de 15.000 g'de 15 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant faz alınıp temiz bir tüpe aktarılmıştır. Protein konsantrasyon ölçümü için 55 µL ayrılmış, kalan kısım sonraki deneyler için -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.6.7.2. Protein konsantrasyonu ölçümü

Protein konsantrasyonu, bikinkoninik asit (BCA) protein analiz kiti kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde, örneklerdeki protein BCA çözeltisiyle birleştiğinde mavi-mor tonunda renk değişimi göstermektedir. Kuyucuktaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak renkte koyulaşma meydana gelmektedir. Ölçüm sırasında standart protein olarak albümin kullanılmıştır. Albüminin stok

konsantrasyonu olan 2000 µg/mL'den seri dilüsyonlar ile 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 ve 25 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı albümin standart konsantrasyonları ve örnekler 96 kuyucuklu plak kuyucuklarına 25 µL hacminde albümin yüklenmiştir. Daha sonra her kuyucuk içerisine 200 µL hacminde BCA reaktifi eklenmiş ve karanlık bir ortamda 30 dk 60°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra absorbans değerleri 562 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda okutulmuş ve örneklerdeki protein konsantrasyonları µg/mL olarak hesaplanmıştır (136).

3.6.7.3. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein örnekleri, hazırlanan %15'lik ayırıcı jel ve %4'lük paketleyici jel içerisinde yürütülmüştür. %15'lik ayırıcı jel ve %4'lük paketleyici jel bileşenlerinin içerikleri Tablo 5 ve 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. SDS-PAGE için %15'lik ayırıcı jel hazırlanması

Ayırıcı Jel (%15)	
Akrilamid / Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	10 mL
1.5 M Tris-HCl, pH: 8.8	5 mL
% 10 SDS	0.2 mL
Distile su	4.8 mL
% 10 (w/v) APS	100 µL
TEMED	20 µL

Tablo 6. SDS-PAGE için %4'lük paketleyici jel hazırlanması

Paketleyici Jel (%4)	
Akrilamid/ Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	1.3 mL
0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8	2.5 mL
% 10 (w/v) APS	50 µL
Distile su	6.1 mL
% 10 SDS	0.1 mL
TEMED	10 µL

Tablo 7. 10X Yürütme tamponu hazırlanması

10X Yürütme Tamponu	
Tris	15.1 g
SDS	5 g
Glisin	72 g
Saf su	1000 mL

Cam plaklar arasında hazırlanan ayırıcı ve paketleyici jel polimerleştikten sonra dikey jel elektroforez sistemine yerleştirilmiştir. Daha sonra kuyucukların içindeki taraklar çıkarılmış ve kuyucuklar distile su ile temizlenmiştir. Tankın içerisine 1 L hacimde 1X yürütme tamponundan eklenmiş (tablo 7) ve jeldeki kuyucuklara 20 µg/kuyucuk şeklinde protein örnekleri ve 5 µL prestained protein standardı yüklenmiştir. Elektroforez sistemi güç kaynağına bağlanmış ve 100 volt sabit voltajda elektroforetik yürütme yapılmıştır.

3.6.7.4. Blotlama, antikor uygulaması, görüntüleme

Jeldeki proteinlerin blotlama işlemi için yarı kuru transfer sistemi kullanılmıştır. Transferde kullanılan poliviniliden diflorür (PVDF) membran ve filtre kağıtları jelin büyüklüğüne uygun olacak şekilde kesilmiştir. PVDF membran ultrasaf metanolde 5 dk fikse edilmiş ve filtre kağıtlarıyla birlikte transfer tampon içerisinde tutulmuştur. Transfer işlemi, 100 mA sabit akımda 110 dk olarak yapılmıştır. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran oda sıcaklığında %5 (w/v) yağsız süt tozu içeren TBST tamponu içerisinde 1 sa çalkalayıcı üzerinde bloklanmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra bloklama çözeltisi dökülmüş ve 5 dk 2 kez TBST ile yıkanmıştır. Daha sonra membranı tamamen örtecek şekilde LC3A, p62 ve Beklin1 antikorları bulunan primer antikor solüsyonu eklenmiş ve +4°C'de gece boyu çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Ertesi gün membran, 5 dk 3 kez TBST ile yıkanmış ve 1:2000 seyreltme ile horseradish peroksidaz konjuge sekonder antikorla oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 60 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlanınca 5 dk süreyle 3 kez TBST ile membran yıkanmış ve membran üzerine

Supersignal West Pico PLUS geliştirilmiş kemilüminesans reaktifi eklenmiştir. Daha sonra protein bantları Chemi-Smart 5100 görüntüleme cihazında dijital olarak görüntülenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir. β -aktin proteini 1:500 seyreltme ile yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bant yoğunlukları ImageJ yazılımı (National Institutes of Health, ABD) kullanılarak analiz edildi ve β -aktine göre normalize edilmiştir (137).

Tablo 8. Kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları

Antikor	Marka	Seyreltme Oranı
LC3A	Novus Biologicals (NB100-2331)	1/1000
p62	Novus Biologicals (NBP1-48320)	1/1000
Beklin1	Novus Biologicals (NB500-249)	1/1000
β -Aktin	Santa Cruz sc-1615	1/500
Sekonder antikor	Cell Signaling (7074)	1/2000

3.7. Araştırmanın planı

Tablo 9. Araştırma Planı

Şubat-Eylül 2018	Etik kurul onayı
Ocak-Aralık 2019	Tez önerisinin hazırlanması
Ocak-Haziran 2020	Tez önerisi sunumu ve kabulü
	Proje önerisinin hazırlanması ve DEÜ BAP Koordinasyon Birimine başvuru
Aralık 2020-Haziran 2021	Projenin kabul edilmesi
	Malzeme alımları
Temmuz 2021-Temmuz 2022	SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinin izolasyonu
Temmuz 2022-Mart 2023	PBMC'lerden total RNA ve protein izolasyonları
	Gerçek zamanlı PCR çalışmaları

Mart-Aralık 2023	SDS-PAGE ve Western blot çalışmaları
Aralık 2023-Haziran 2024	İstatistiksel analizler
Haziran-Kasım 2024	Tez yazım aşaması

3.8. Verilerin değerlendirilmesi

İstatistik analiz için SPSS 24 programı kullanılmıştır (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Olgu ve kontrol gruplarından elde edilen tanımlayıcı sürekli değişkenler parametrik koşulda ortalama \pm standart sapma (SD) ve parametrik olmayan koşulda medyan (min-maks) olarak ifade edilmiştir. Kategorik değişkenler sayı (n) ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Tek değişkenli analitik yaklaşımda, olgu ve kontrol grupları arasındaki fark parametrik koşulda t-testi, parametrik olmayan koşulda Mann-Whitney U testi ve frekans farkları için ki-kare analizi ile analiz edilmiştir. Olgular hastalık süresine göre 2 gruba ayrıldığında, 3 bağımsız grubun (erken evre, geç evre, kontrol) farkları parametrik koşulda ANOVA ve parametrik olmayan koşulda Kruskal Vallis testi ile karşılaştırılmıştır. SSc hastaları ve sağlıklı kontroller, alt gruplar, hastalık süresi, mRSS ve otoantikör durumu arasında otofaji moleküllerinin ayırt edici performansını belirlemek için SPSS 29.0 paketi kullanılarak farklı modellerde alıcı işlem karakteristik (Receiver Operating Characteristic, ROC) eğrileri çizilmiştir. 0.05'ten küçük *p* değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamız kesitsel bir çalışma olarak tasarlanmıştır. Bu nedenle PBMC'lerde ATG moleküllerinin SSc hastalık ilerlemesinin prediktif biyobelirteçleri olarak kullanılmasının uygunluğunu belirlemek için hastaların takip edildiği uzunlamasına çalışma gereklidir. İkinci olarak, örneklem büyüklüklerimiz SSc'nin düşük prevalansı nedeniyle nispeten küçüktür. Ancak güç analizinde hesaplanan olgu ve kontrol sayılarına ulaşılmıştır. Üçüncüsü, yeni tanı almış hasta olmaması nedeniyle ilaç kullanmamış hasta çalışmaya dahil edilememiştir.

3.9. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu
13.09.2018 tarih ve 2018/22-49 no'lu kararı ile onaylanmıştır (EK-1).



4. BULGULAR

4.1. SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin bilgileri

81 SSc hastasından (36 dcSSc hastası, 45 lcSSc hastası) ve 30 sağlıklı kontrolden kan örnekleri toplanmış ve ardından PBMC'ler izole edilmiştir. İki dcSSc ve iki lcSSc olmak üzere dört SSc hastası (3, 33, 44 ve 55 numaralı hastalar) düşük kaliteli RNA örnekleri nedeniyle çalışmaya dahil edilememiştir. Bu hastalardan izole edilen protein örneklerinde ise Western blot analizi yapılmış, protein bant görüntüleri elde edilmiş ve şekillerde gösterilmiştir (Şekil 16, 17, 19 ve 21). Ancak mRNA ve protein sonuçları arasında oluşabilecek bias ve varyansı dışlamak için bu hastaların protein bant yoğunlukları çalışmamızda istatistiksel analize dahil edilmemiştir. Dört hastanın dışlanmasıyla 77 SSc hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklı kontrol bilgileri Tablo 10 ve 11’de gösterilmiştir.

Tablo 10. SSc hasta bilgileri

Hasta no	SSc tipi	Cinsiyet	Yaş (yıl)	Hastalık süresi (yıl)	mRSS	Otoantikor
1	diffüz	kadın	49	18	9	ATA
2	diffüz	kadın	68	14	42	ATA
3	diffüz	kadın	56	3	12	ATA
4	diffüz	kadın	66	4	18	ATA
5	diffüz	kadın	51	9	0	ATA
6	diffüz	kadın	66	17	0	ATA
7	diffüz	kadın	42	10	8	ATA
8	diffüz	kadın	71	4	18	ATA
9	diffüz	kadın	57	12	27	-
10	diffüz	kadın	52	17	6	ATA
11	diffüz	kadın	65	9	2	-
12	diffüz	kadın	55	5	18	ATA
13	diffüz	kadın	55	7	6	ATA

14	diffüz	kadın	41	13	26	ATA
15	diffüz	kadın	74	7	10	ATA
16	diffüz	kadın	64	10	11	ATA
17	diffüz	kadın	69	14	14	ATA
18	diffüz	kadın	50	16	5	ATA
19	diffüz	kadın	44	12	5	ATA
20	diffüz	kadın	64	12	11	ATA
21	sınırlı	kadın	47	15	5	-
22	diffüz	kadın	55	3	16	-
23	diffüz	kadın	38	4	7	ATA
24	diffüz	kadın	81	13	21	ACA
25	diffüz	kadın	65	17	6	ATA
26	diffüz	erkek	52	9	6	ATA
27	diffüz	erkek	62	14	9	ACA
28	diffüz	kadın	56	5	16	-
29	diffüz	kadın	52	8	10	-
30	sınırlı	kadın	56	24	2	-
31	diffüz	kadın	58	14	6	ATA
32	sınırlı	kadın	62	17	2	ATA
33	diffüz	kadın	63	19	7	ATA
34	diffüz	kadın	53	14	4	ATA
35	diffüz	erkek	58	9	4	ATA
36	sınırlı	kadın	67	13	0	ACA
37	sınırlı	kadın	54	7	0	ATA
38	sınırlı	kadın	57	32	8	ATA
39	sınırlı	kadın	57	13	2	-
40	sınırlı	kadın	58	10	2	ACA
41	sınırlı	kadın	63	6	0	ATA

42	sınırlı	kadın	63	17	0	-
43	sınırlı	kadın	69	19	2	-
44	sınırlı	kadın	71	7	2	ACA
45	sınırlı	kadın	75	17	2	ACA
46	diffüz	erkek	60	15	6	ATA
47	diffüz	kadın	33	8	6	ATA
48	diffüz	kadın	28	7	12	ATA
49	sınırlı	kadın	70	7	4	ACA
50	sınırlı	kadın	63	15	4	-
51	sınırlı	kadın	85	23	0	ACA
52	sınırlı	kadın	54	3	0	ATA
53	sınırlı	kadın	57	17	2	ATA
54	diffüz	kadın	76	4	10	ATA
55	sınırlı	kadın	59	1	2	ACA
56	sınırlı	kadın	70	21	4	ACA
57	sınırlı	kadın	76	11	2	-
58	sınırlı	erkek	72	21	2	ATA
59	sınırlı	kadın	70	13	0	ATA
60	sınırlı	kadın	39	2	2	-
61	sınırlı	kadın	43	12	2	-
62	sınırlı	kadın	69	12	4	ACA
63	sınırlı	kadın	52	11	0	-
64	sınırlı	kadın	37	11	2	ACA
65	sınırlı	kadın	73	14	0	ACA
66	sınırlı	kadın	63	15	8	ACA
67	sınırlı	kadın	51	14	2	ACA
68	sınırlı	kadın	68	10	5	-
69	sınırlı	kadın	62	7	5	ATA

70	sınırlı	kadın	54	7	2	-
71	sınırlı	kadın	69	5	0	-
72	sınırlı	kadın	46	7	5	ATA
73	sınırlı	kadın	43	6	4	-
74	sınırlı	kadın	64	11	3	ACA
75	sınırlı	kadın	47	8	2	ACA
76	sınırlı	kadın	61	4	1	ATA
77	sınırlı	kadın	64	16	2	ACA
78	sınırlı	kadın	51	6	0	ACA
79	sınırlı	kadın	46	3	0	ATA
80	sınırlı	kadın	70	8	2	ATA
81	sınırlı	kadın	43	3	0	ACA

Tablo 11. Sağlıklı kontrol bilgileri

Kontrol no	Cinsiyet	Yaş (yıl)
1	Erkek	42
2	Erkek	42
3	Kadın	51
4	Kadın	41
5	Kadın	43
6	Kadın	40
7	Kadın	37
8	Kadın	49
9	Erkek	44
10	Kadın	40
11	Kadın	53
12	Kadın	52
13	Kadın	25
14	Kadın	34
15	Kadın	36
16	Kadın	38

17	Kadın	46
18	Kadın	49
19	Erkek	60
20	Kadın	47
21	Kadın	58
22	Erkek	32
23	Kadın	48
24	Kadın	45
25	Kadın	41
26	Kadın	39
27	Kadın	50
28	Kadın	50
29	Kadın	24
30	Kadın	32

Çalışmaya dahil edilen SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin demografik özellikleri Tablo 12’de sunulmuştur. Dahil edilen hastaların 72’si kadın (%93.5), 5’i erkektir (%6.5). Çalışmada 43 lcSSc ve 34 dcSSc yer almaktadır. 77 SSc hastasının (72 kadın ve 5 erkek) ortalama yaşı çalışma sırasında 58.3 ± 11.5 , 43 lcSSc hastasının ortalama yaşı 59.3 ± 11.1 ve 34 dcSSc hastasının ortalama yaşı çalışma sırasında 56.7 ± 12.0 ’dır. 30 sağlıklı kontrolün (25 kadın ve 5 erkek) ortalama yaşı 42.9 ± 8.6 ’dır.

4.2. SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin demografik özellikleri

Tablo 12. SSc hastalarının ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	SSc hastaları (n=77)	Kontrol grubu (n=30)	<i>p</i> değeri
Yaş (yıl)	Diffüz (34): 56.7 ± 12.0	42.9 ± 8.6	< 0.001*
	Sınırlı (43): 59.3 ± 11.1		
Cinsiyet, n (%)			
Kadın	72 (93.5)	25 (83.3)	0.087**
Erkek	5 (6.5)	5 (16.7)	

Veriler, n (yüzde) veya ortalama \pm SD olarak gösterilmiştir. *t-testi, **Yates ki-kare düzeltmesi.

4.3. SSc hastalarının klinik ve laboratuvar özellikleri ve kullandıkları ilaçlar

SSc hastalarının klinik ve laboratuvar özelliklerinin dağılımı Tablo 13'te gösterilmiştir. 77 SSc hastasının 34'ü (%44.2) dcSSc, 43'ü (%55.8) lcSSc'dir. SSc hastalarının ortalama hastalık süresi 11.3 ± 5.7 yıldır. SSc'de iç organ tutulumunun genellikle hastalığın başlangıcından itibaren ilk 5 yıl içinde meydana geldiği bildirilmektedir (RP dışı ilk semptom olarak tanımlanır) (122). SSc hastaları hastalık süresine göre 5 yıldan kısa (0-5 yıl) 13 SSc hastası ve 5 yıldan uzun (>5 yıl) 64 SSc hastası olarak sınıflandırılmıştır. 40 hasta (%51,9) ATA pozitif, 18 hasta (%23.4) ACA pozitif ve 19 hasta (%24.7) ise her iki otoantikör için negatiftir. SSc hastaları ayrıca mRSS'ye göre gruplandırılmıştır. SSc hastalarının medyan mRSS'si 4 olarak yer almıştır (0-42 skor arası). Hastalar arasında 36 (%46.7) kişide düşük mRSS (0-3), 32 (%41.6) kişide orta mRSS (4-14) ve 9 (%11,7) kişide yüksek mRSS (>14) yer almıştır. SSc hastalarının ilaçları da tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. SSc hastalarının klinik ve laboratuvar özellikleri ile kullandıkları ilaçların dağılımı

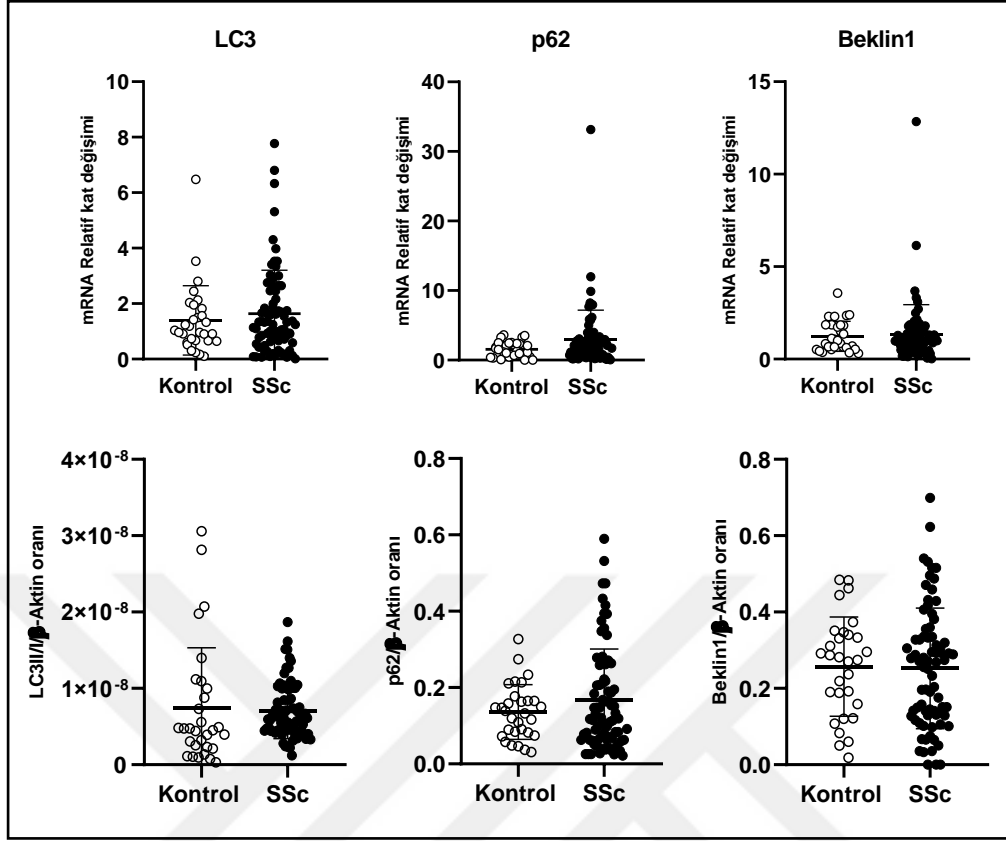
Hastalık süresi (yıl) ort \pm SD	11.3 \pm 5.7
0-5 yıl, n (%)	13 (16.9)
>5 yıl, n (%)	64 (83.1)
SSc tipi, n (%)	
Sınırlı	43 (55.8)
Diffüz	34 (44.2)
Antikor, n (%)	
ATA	40 (51.9)
ACA	18 (23.4)
Negatif	19 (24.7)
mRSS medyan (min-maks)	4 (0-42)
mRSS 0-3, n (%)	36 (46.7)
mRSS 4-14, n (%)	32 (41.6)
mRSS >14, n (%)	9 (11.7)

İlaçlar, n (%)	
Düşük doz glukokortikoid	45 (58.4)
Methotreksat	18 (23.4)
Azatioprin	23 (29.9)
Mikofenolat mofetil	7 (9.1)
Rituximab*	4 (5.2)
Siklofosfamid*	4 (5.2)
Kalsiyum kanal blokeri	56 (72.8)
Asetil salisik asit	56 (72.8)
Pentoksifilin	28 (36.3)
ERA (Bosentan)	8 (10.3)
PDE-5 inhibitör (Sildenafil/Tadalafil)	4 (5.2)
Nintedanib	1 (1.3)
İliomedin	2 (2.6)

Veriler, n (yüzde) veya ortalama \pm SD veya medyan (min-maks) olarak gösterilmiştir. *Geçmiş tedavi öyküsü. lcSSc, sınırlı kutanöz sistemik skleroz; dcSSc, diffüz kutanöz sistemik skleroz; ATA, anti-topoizomeraz I antikoru; ACA, antisentromer antikoru; mRSS, modifiye Rodnan deri skoru; ERA, endotelin reseptör antagonisti; PDE-5, fosfodiesteraz 5 inhibitörü.

4.4. SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri

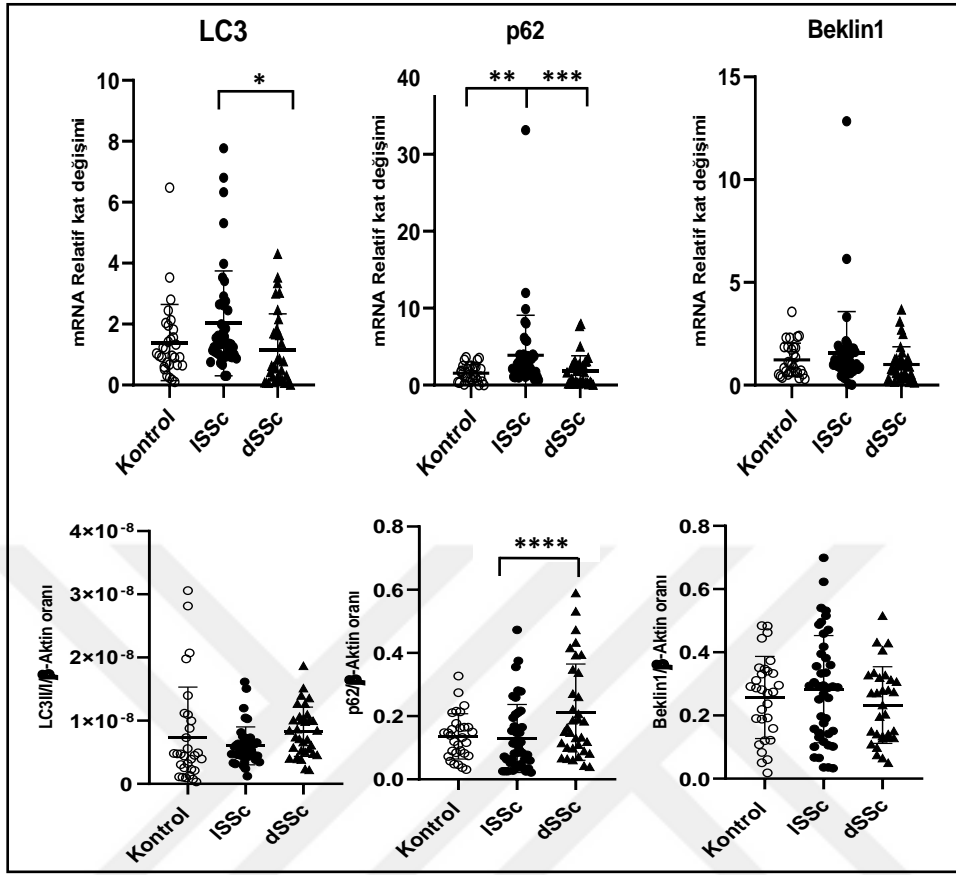
Yapılan çalışmalarda otofaji mekanizmasındaki değişikliklerinin çeşitli otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynadığını göstermiştir (138). Otofaji çalışmasındaki bozukluğun SSc patogeneğinde de önemli rol oynadığı düşünülmektedir (139). Araştırmamızda ilk olarak hem lcSSc hem de dcSSc alt grupların dahil edildiği SSc hastalarının PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir ve Tablo 14'te istatistiksel olarak anlamlı veriler yer almaktadır. Sonuçlarımız, SSc hastaları ve sağlıklı kontroller arasında LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir (Şekil 6).



şekil 6. SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri. Kontroller için $n = 30$, SSc hastaları için $n = 77$. Her sembol ayrı bir örneği temsil etmektedir. Her veri noktası ortalama \pm SD'dir.

4.5. lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri

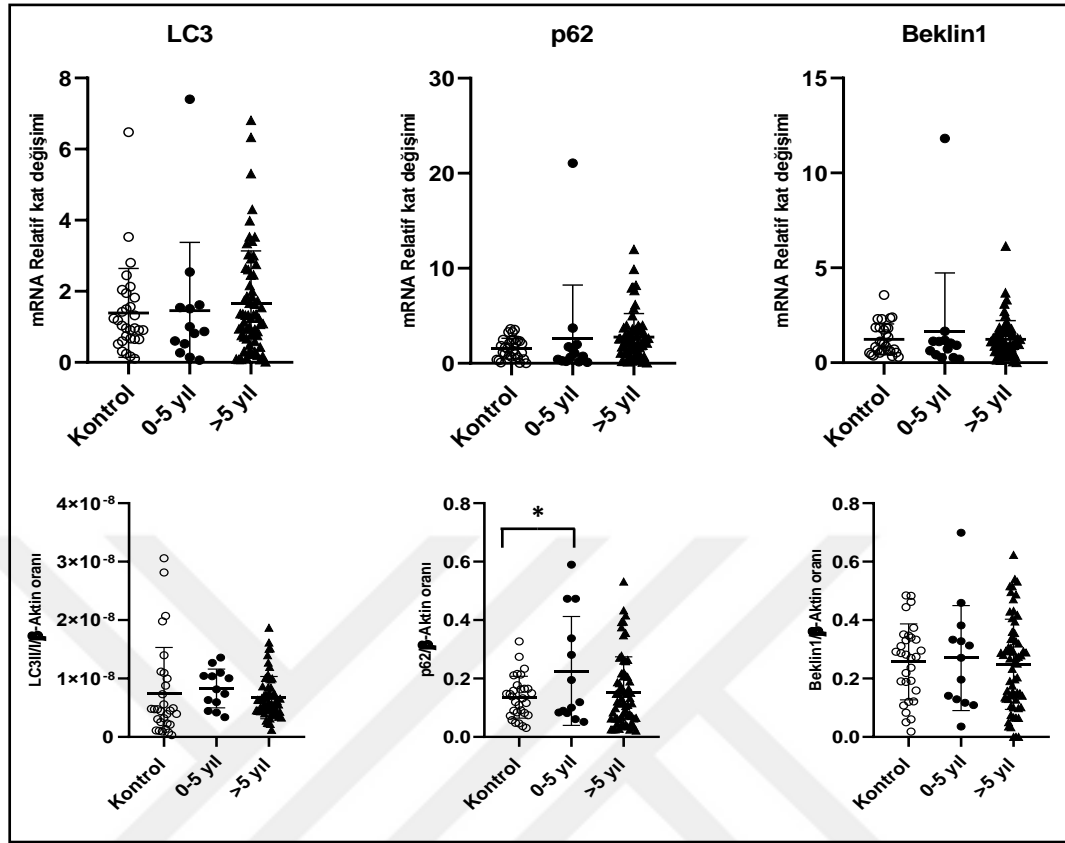
SSc, deri tutulumunun dağılımına göre klinik olarak lcSSc veya dcSSc olarak tanımlanmaktadır. lcSSc'de deri kalınlaşması distal ekstremelerde ve yüzde meydana gelmektedir. dcSSc'li hastalarda ise tüm uzuvları, yüzü ve gövdeyi içeren daha yaygın deri kalınlaşması hastalığın başlangıcını karakterize etmektedir (72). LC3 mRNA ekspresyon düzeylerinin lcSSc hastalarında dcSSc hastalarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p = 0.026$). p62 mRNA ekspresyon düzeyleri de lcSSc hastalarında dcSSc hastalarına ve sağlıklı kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p = 0.025$ ve $p = 0.013$). p62 protein ekspresyon düzeyleri dcSSc hastalarında lcSSc hastalarına göre daha yüksek bulunmuştur ($p = 0.005$) (şekil 7).



şekil 7. lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri. Kontroller için n = 30, lcSSc hastaları için n = 45, dcSSc hastaları için n = 36. Her sembol ayrı bir örneği temsil etmektedir. Her veri noktası ortalama ± SD'dir. * $p = 0.026$, ** $p = 0.013$, *** $p = 0.025$, **** $p = 0.005$.

4.6. Hastalık süresi 5 yıldan kısa veya 5 yıldan uzun olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri

SSc'deki iç organ tutulumunun çoğunluğu genellikle hastalığın başlangıcından itibaren ilk beş yıl içinde meydana geldiği belirtilmektedir (140). p62 protein ekspresyon düzeylerinin, hastalık süresi 5 yıldan kısa olan SSc hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p = 0.047$) (şekil 8).

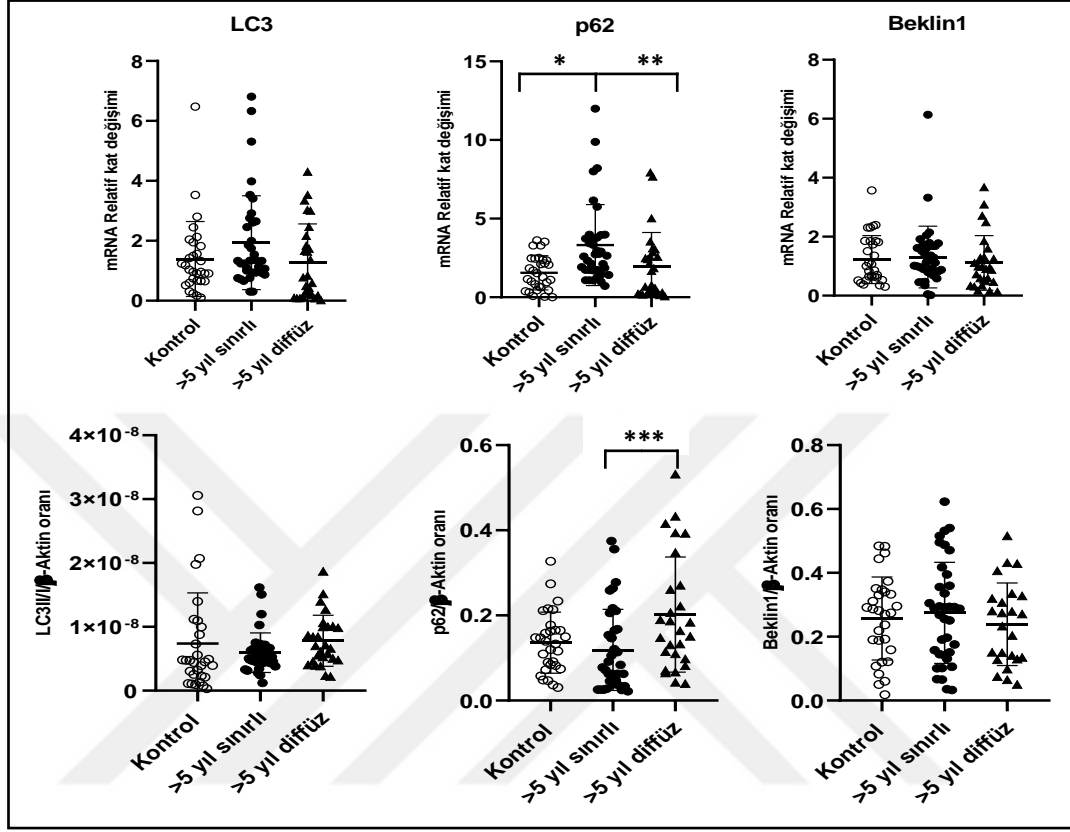


Şekil 8. Hastalık süresi 5 yıldan kısa veya 5 yıldan uzun olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri. Kontroller için $n = 30$, hastalık süresi 5 yıldan kısa olan SSc hastaları için $n = 13$, hastalık süresi 5 yıldan uzun olan SSc hastaları için $n = 64$. Her sembol ayrı bir örneği temsil etmektedir. Her veri noktası \pm SD'dir. * $p = 0.047$.

4.7. Hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri

Hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc hastalarında p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, hastalık süresi 5 yıldan uzun olan dcSSc hastalarına göre daha yüksek tespit edilmiştir ($p = 0.002$). p62 mRNA ekspresyon düzeyleri ayrıca hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur ($p = 0.024$). p62 protein ekspresyon düzeyleri hastalık süresi 5 yıldan

uzun olan dcSSc hastalarında hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc hastalarına göre daha yüksek saptanmıştır ($p = 0.004$) (Şekil 9).

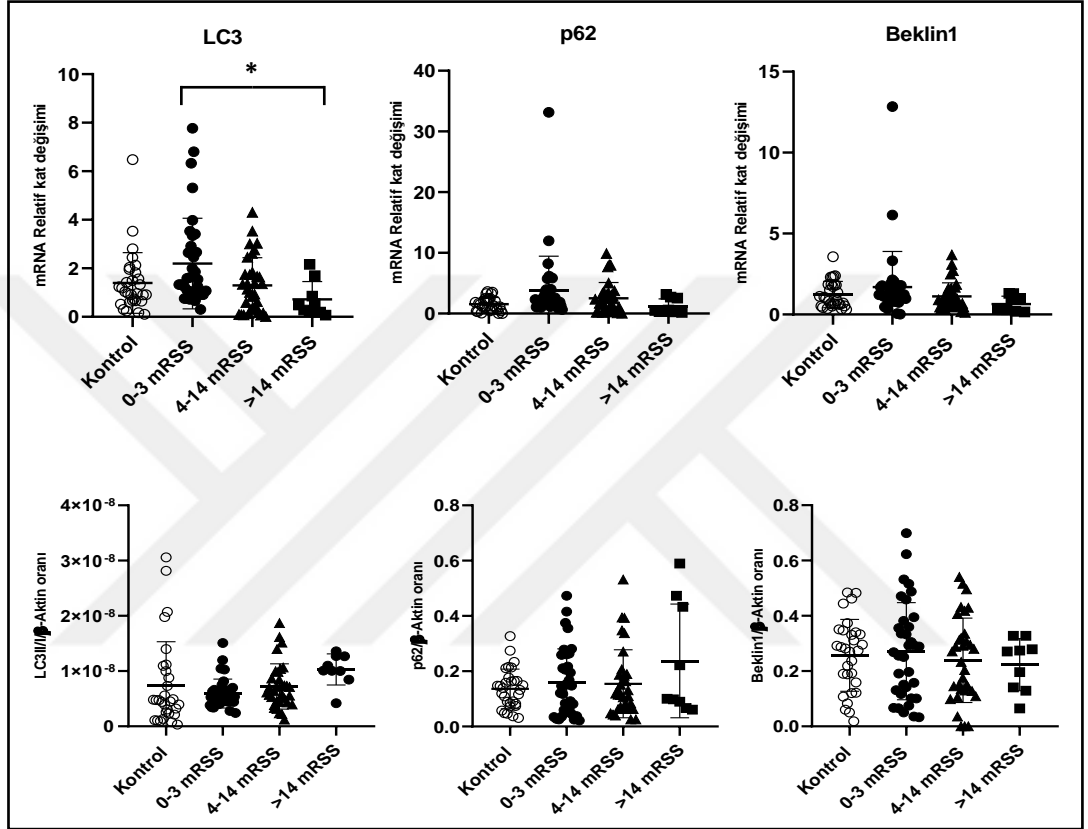


Şekil 9. Hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri. Kontroller için $n = 30$, hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc hastaları için $n = 37$, hastalık süresi 5 yıldan uzun olan dcSSc hastaları için $n = 27$. Her sembol ayrı bir örneği temsil etmektedir. Her veri noktası ortalama \pm SD'dir. * $p = 0.002$, ** $p = 0.024$, *** $p = 0.004$.

4.8. mRSS (0-3), (4-14) ve (>14) olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri

mRSS, 17 farklı vücut bölgesindeki deri kalınlığının bir ölçüsü olarak kullanılmakta (toplam skor 0 ile 51 arasında) ve 0 (normal) ile 3 (şiddetli) arasında puanlanmaktadır. mRSS, deri fibrozisinin klinik şiddetini ve kapsamını değerlendirmek için kullanılmaktadır (141). Avrupa Skleroderma Denemeleri ve

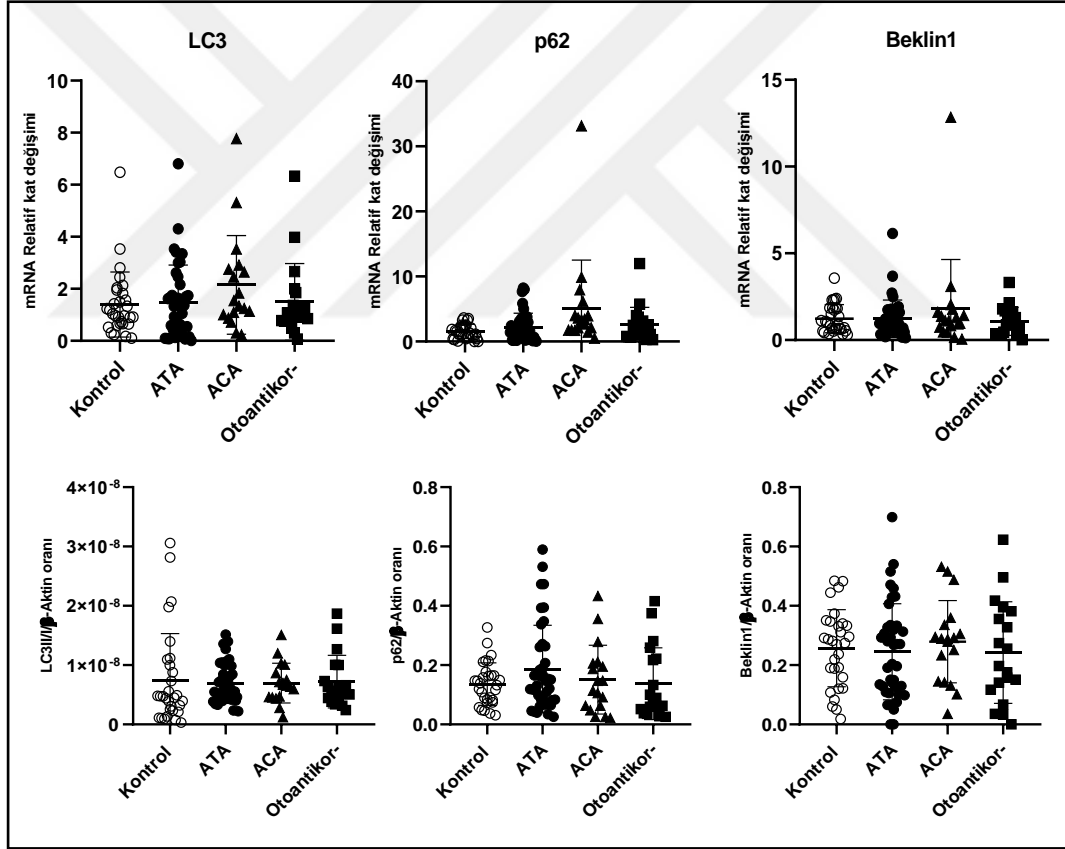
Araştırmaları (EUSTAR) veri tabanından elde edilen tahmin modelleri, tanı anındaki mRSS'nin hastalık seyrinde kötü prognoz göstergesi olduğunu göstermiştir (142). SSc hastaları mRSS'ye göre gruplandırıldığında, LC3 mRNA ekspresyonunun mRSS (0-3) olan hastalarda mRSS (4-14) olan hastalara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p = 0.019$) (Şekil 10).



Şekil 10. mRSS (0-3), (4-14) ve (>14) olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri. Kontroller için $n = 30$, mRSS (0-3) olan SSc hastaları için $n = 36$, mRSS (4-14) olan SSc hastaları için $n = 32$, mRSS (>14) olan SSc hastaları için $n = 9$. Her sembol ayrı bir örneği temsil etmektedir. Her veri noktası ortalama \pm SD'dir. * $p = 0.019$.

4.9. ATA veya ACA pozitif veya otoantikör negatif olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde ve LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri

İmmün sistemdeki anormalliğin göstergeleri olan otoantikörler, SSc'li hastaların %95'inden fazlasında tespit edildiği belirtilmektedir. 2013 ACR/EULAR SSc sınıflandırma kriterleri, hastalığa özgü otoantikörleri puanlama kriteri olarak dahil etmiştir (71). SSc hastaları ATA veya ACA pozitif veya otoantikör negatif olma durumuna göre gruplara ayrıldığında, SSc hastalarında LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri grupları arasında farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 11).

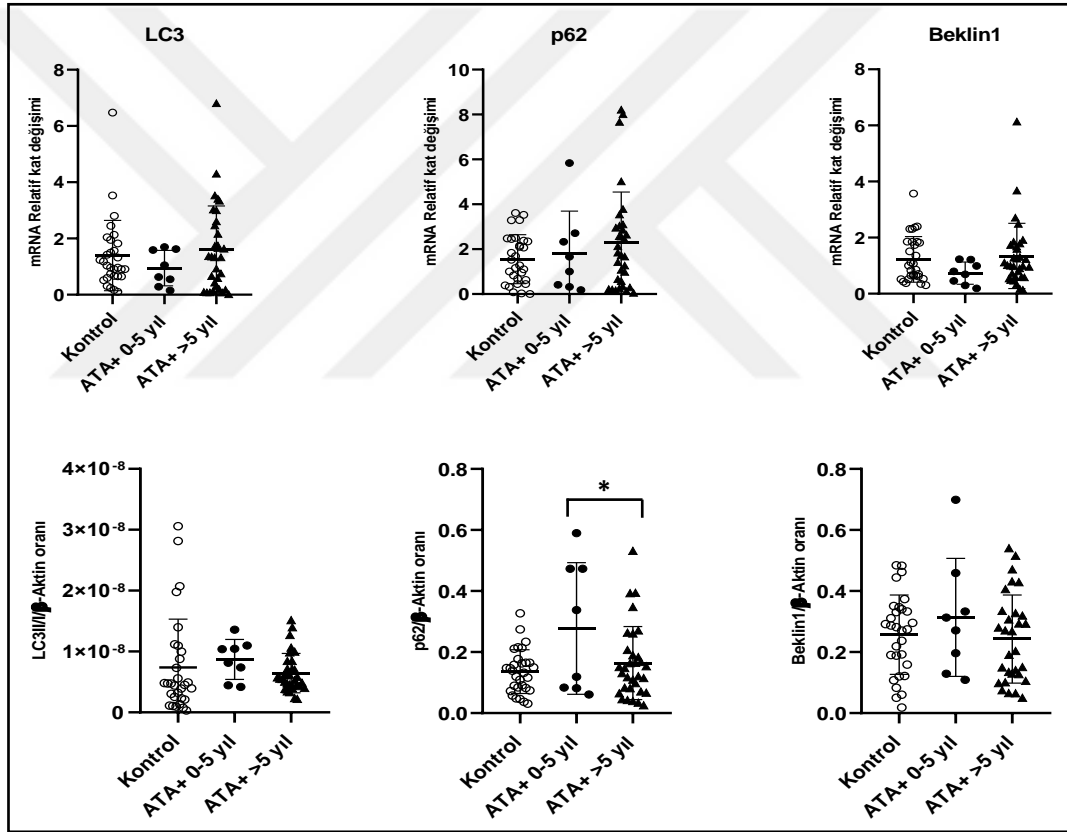


Şekil 11. ATA veya ACA pozitif veya otoantikör negatif olan SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri. Kontroller için n = 30, ATA pozitif olan SSc hastaları için n = 40, ACA pozitifliği olan SSc hastaları için n = 18, otoantikör negatifliği olan SSc

hastaları için $n = 19$. Her sembol ayrı bir örneği temsil etmektedir. Her veri noktası ortalama \pm SD'dir.

4.10. Hastalık süresi 5 yıldan kısa veya 5 yıldan uzun ATA pozitif SSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde ve LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri

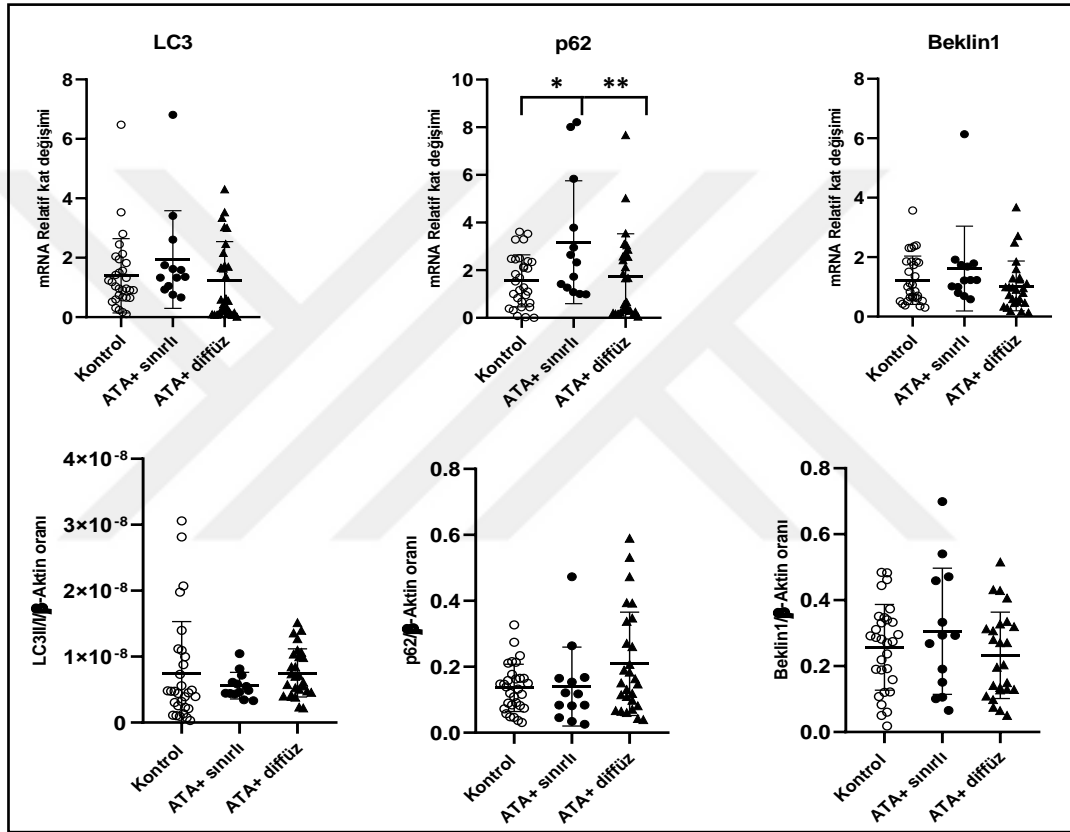
ATA pozitifliğinin SSc hastalarında hastalığın şiddeti ve iç organ tutulumu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (143). ATA pozitif SSc hastalarında, p62 protein ekspresyon düzeylerinin, 5 yıldan kısa hastalığı olan hasta grubunda, 5 yıldan uzun hastalığı olan gruba göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p = 0,033$) (Şekil 12).



Şekil 12. Hastalık süresi 5 yıldan kısa veya 5 yıldan uzun olan ATA pozitif SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri. Kontroller için $n = 30$, hastalık süresi 5 yıldan kısa olan ATA pozitif SSc hastaları için $n = 40$, hastalık süresi 5 yıldan uzun olan ATA pozitif SSc hastaları için $n = 40$. Her sembol ayrı bir örneği temsil etmektedir. Her veri noktası ortalama \pm SD'dir. * $p = 0.033$.

4.11. ATA pozitif lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri

ATA pozitifliğinin dcSSc ile yakından ilişkili olduğu bilinmekle birlikte lcSSc'li hastalarda da bulunabildiği belirtilmektedir (144,145). p62 mRNA ekspresyonunun, ATA pozitif lcSSc hastalarında, ATA pozitif dcSSc hastalarına ve sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p = 0,011$ ve $p = 0,027$) (Şekil 13).



Şekil 13. ATA pozitif lcSSc ve dcSSc hastalarının ve sağlıklı kontrollerin PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri. Kontroller için $n = 30$, ATA pozitif lcSSc hastaları için $n = 36$, ATA pozitif dcSSc hastaları için $n = 36$. Her sembol ayrı bir örneği temsil etmektedir. Her veri noktası ortalama \pm SD'dir. * $p = 0.011$, ** $p = 0.027$.

SSc hasta alt grupları ve sağlıklı kontroller arasında LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinde tespit edilen değişiklikler Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14. SSc hasta alt grupları ve sağlıklı kontroller arasında LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinde tespit edilen değişiklikler

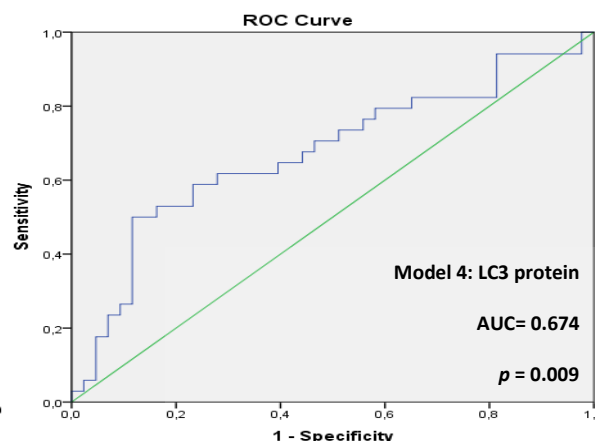
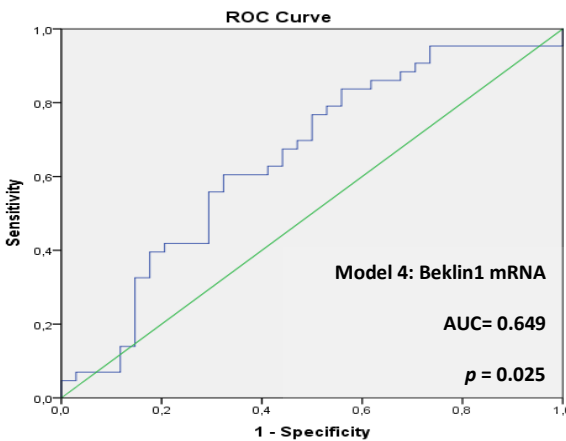
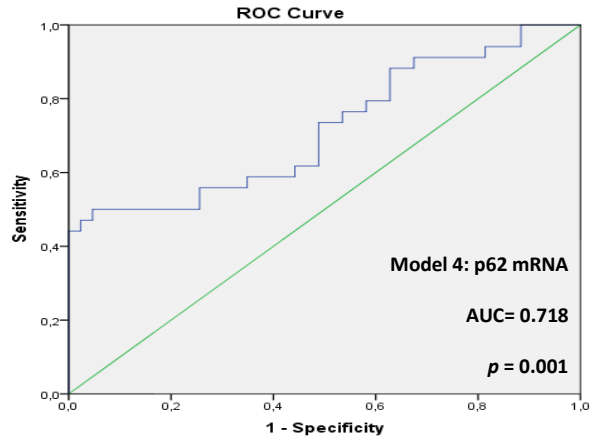
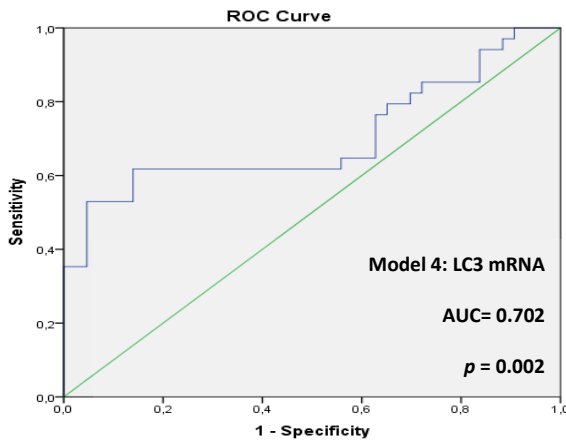
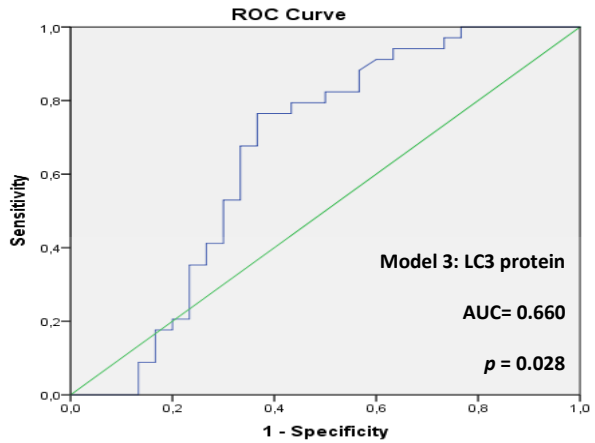
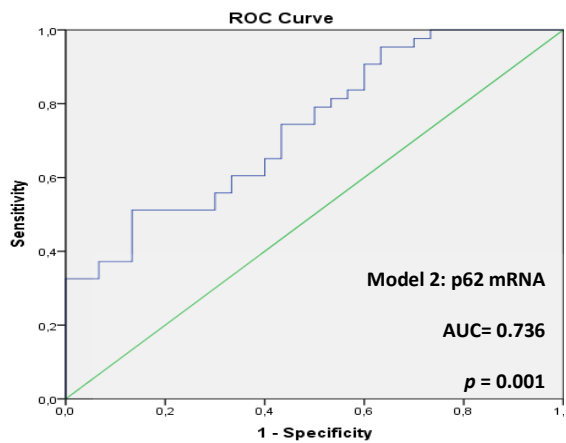
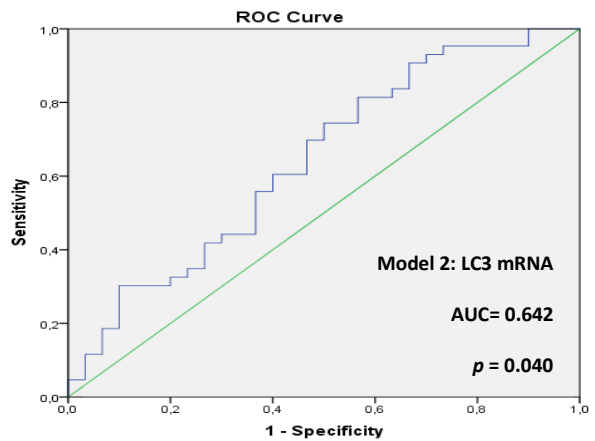
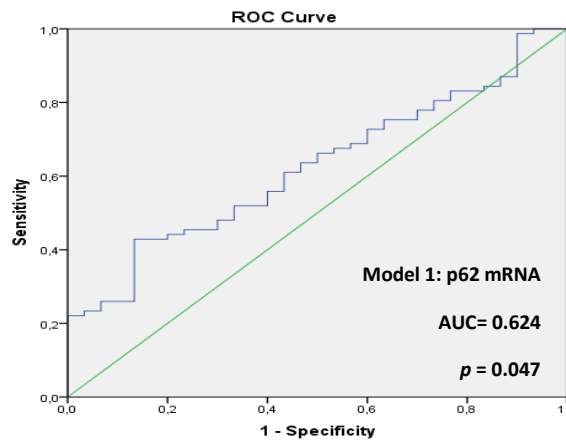
<i>Bulgu</i>	<i>p değeri</i>
lcSSc'de dcSSc'ye göre: LC3 mRNA ↑	0.026
p62 mRNA ↑	0.025
lcSSc'de kontrole göre: p62 mRNA ↑	0.013
dcSSc'de lcSSc'ye göre: p62 protein ↑	0.005
0-5 yıl SSc'de kontrole göre: p62 protein ↑	0.047
>5 yıl lcSSc'de >5 yıl dcSSc'ye göre: p62 mRNA ↑	0.024
>5 yıl lcSSc'de kontrole göre: p62 mRNA ↑	0.002
>5 yıl dcSSc'de >5 yıl lcSSc'ye göre: p62 protein ↑	0.004
0-3 mRSS'de >14 mRSS'ye göre: LC3 mRNA ↑	0.019
ATA pozitif 0-5 yıl SSc'de >5 yıl SSc'ye göre: p62 protein ↑	0.033
ATA pozitif lcSSc'de dcSSc'ye göre: p62 mRNA ↑	0.027
ATA pozitif lcSSc'de kontrole göre: p62 mRNA ↑	0.011

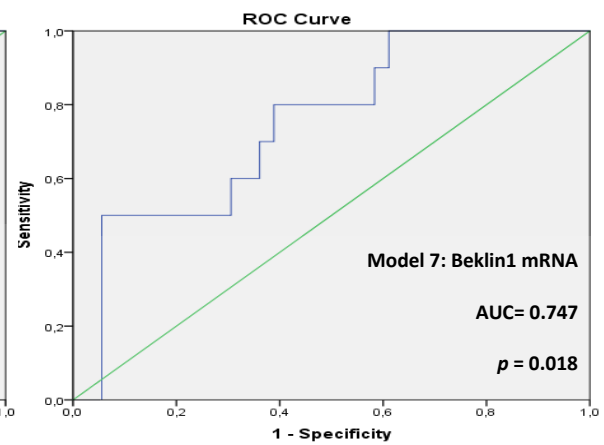
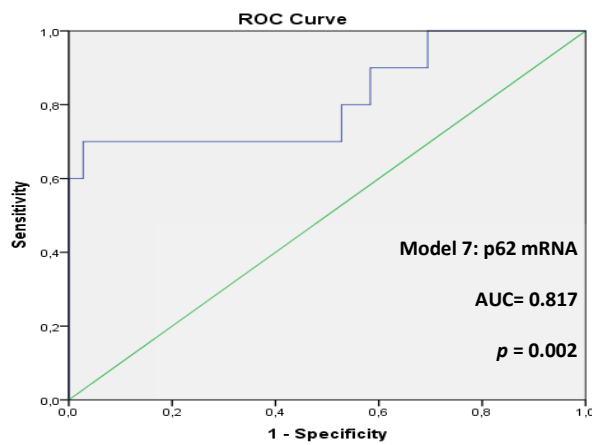
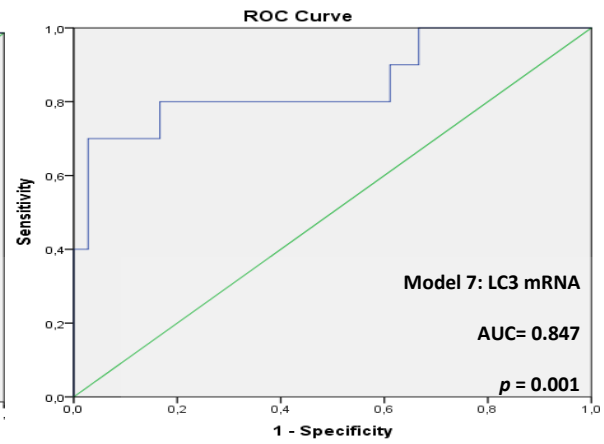
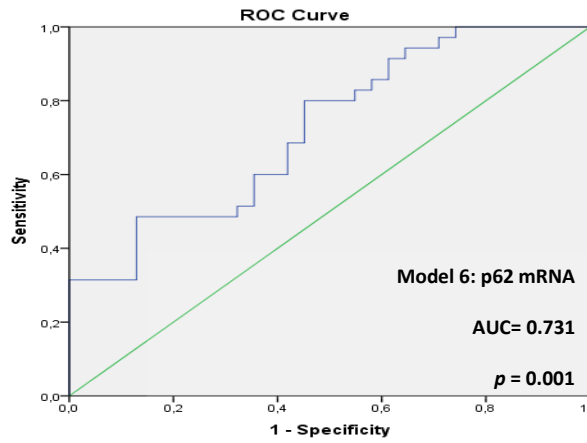
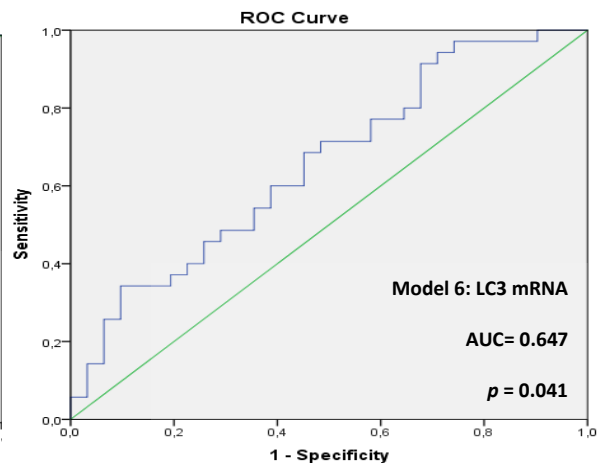
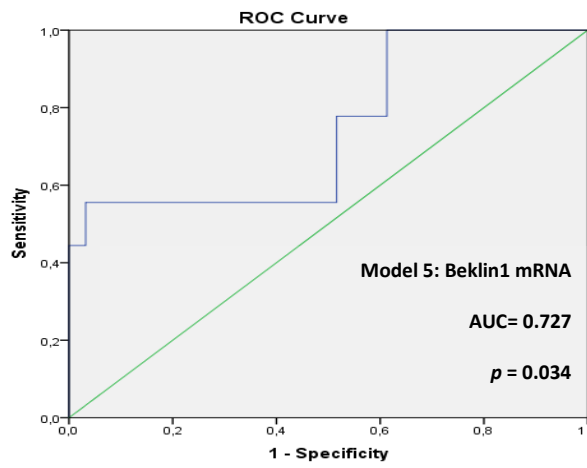
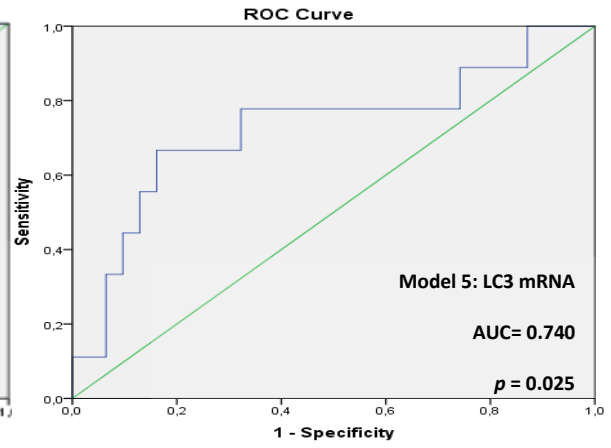
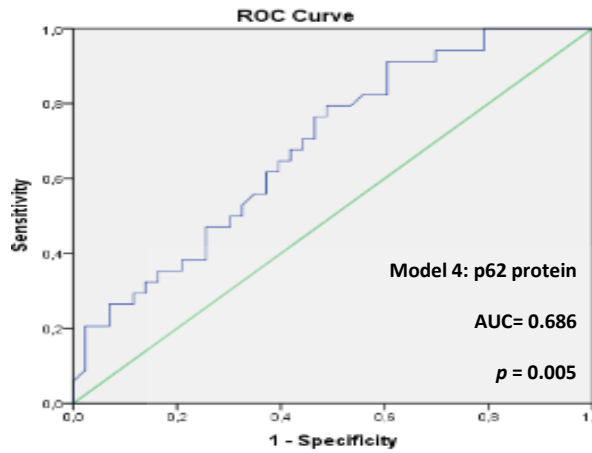
↑ : ekspresyon düzeyi yüksek.

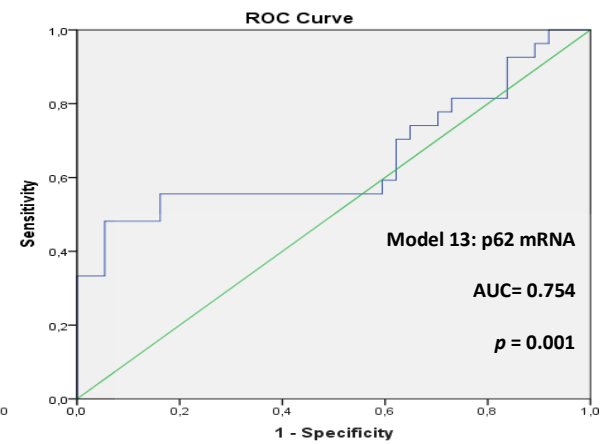
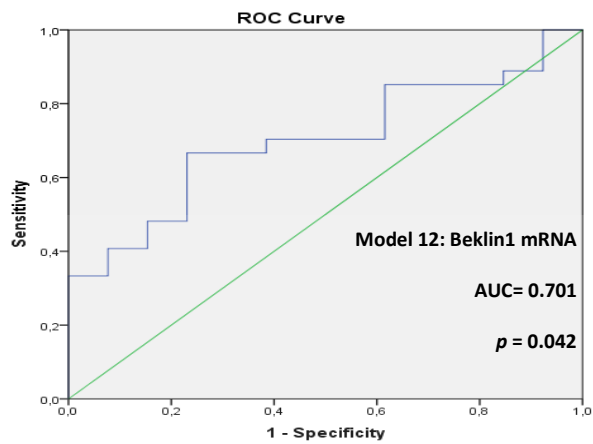
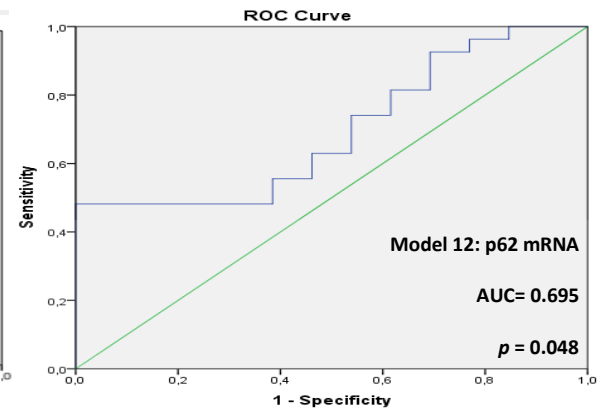
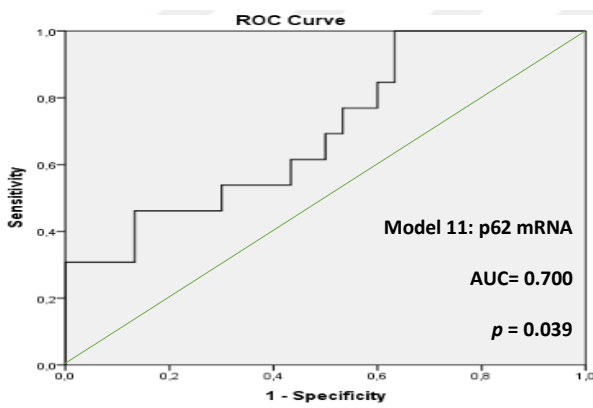
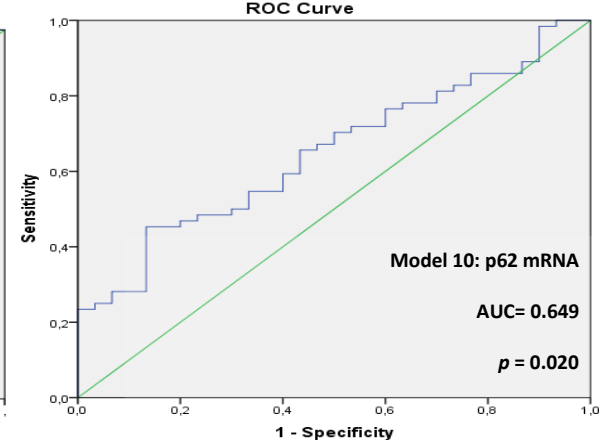
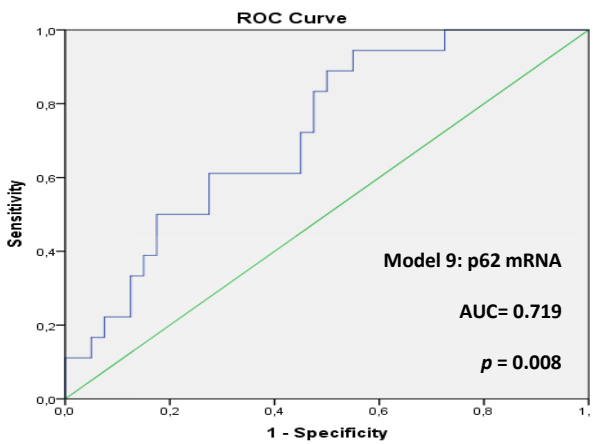
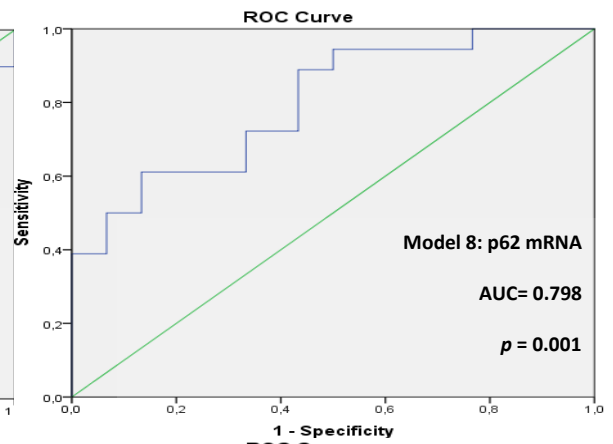
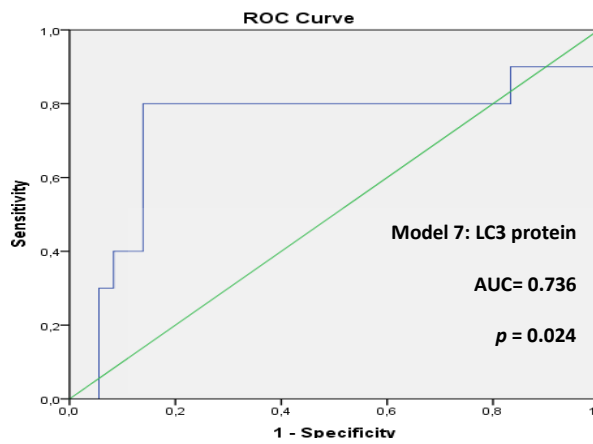
4.12. LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin ROC eğrisi analizleri

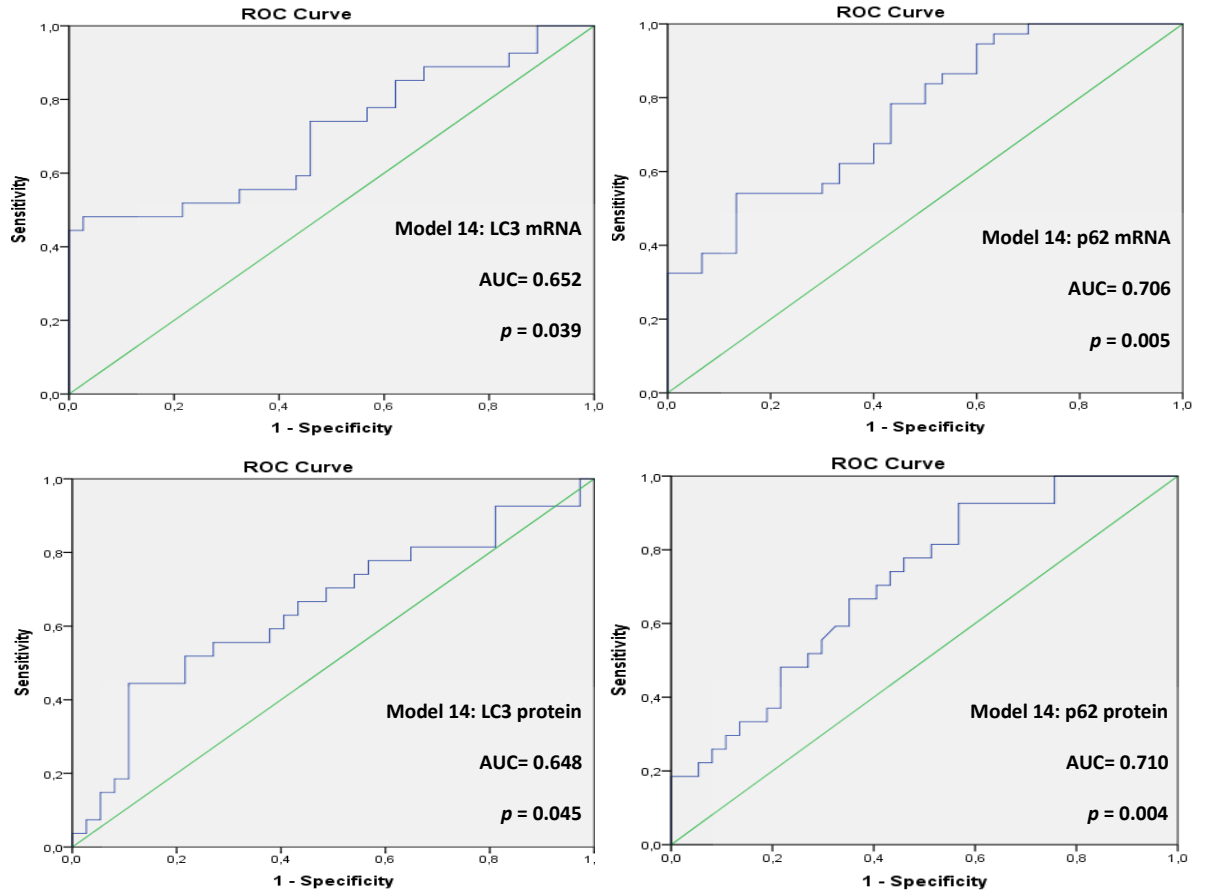
ROC eğrileri, farklı modellerde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin sensitivite ve spesifisite değerlendirmek için kullanılmıştır (Şekil 11). Tablo 15 istatistiksel olarak anlamlı ayırt etme performansı gösteren modellerin ROC eğrisi altında kalan alanlarını (AUC), sensitivite, spesifisite ve *p* değerlerini göstermektedir. p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, %86.7 spesifisite ile SSc hastaları ve sağlıklı kontroller arasında ayırt edici bulunmuştur (AUC 0.624, *p* = 0.047). LC3 ve p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, LC3 için %81,4 sensitivite ve p62 için %86.7 spesifisite ile lcSSc hastaları ve sağlıklı kontroller arasında ayırım yapmıştır (AUC sırasıyla 0.642 ve 0.736 ve sırasıyla *p* = 0.040 ve *p* = 0.001). LC3 protein ekspresyon düzeyleri dcSSc hastaları ve sağlıklı kontroller arasında %73.3 spesifisite ile ayırt edici bulunmuştur (AUC 0.660 ve *p* = 0.028). LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ekspresyon düzeyleri dcSSc hastalarını lcSSc

hastalarından LC3 için %90.0 spesifisite ve p62 için %89.5 spesifisite ile ayırt etmiştir (AUC sırasıyla 0,702, 0,718 ve 0,649 ve sırasıyla $p = 0.002$, $p = 0.001$ ve $p = 0.025$). LC3 ve p62 protein ekspresyon düzeyleri de dcSSc ve lcSSc hastaları arasında LC3 için %88.4 spesifisite ve p62 için %91.2 sensitivite ile ayırt edici bulunmuştur (AUC sırasıyla 0.674 ve 0.686 ve sırasıyla $p = 0.009$ ve $p = 0.005$). LC3 ve Beklin1 mRNA ekspresyon düzeyleri, mRSS (>14) olan SSc hastaları ile LC3 için %83.9 spesifisite ve Beklin1 için %96.8 spesifisite ile sağlıklı kontroller arasında ayırım yapmıştır (AUC sırasıyla 0.740 ve 0.727 ve sırasıyla $p = 0.025$ ve $p = 0.034$). LC3 ve p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, mRSS (0-3) olan SSc hastaları ile sağlıklı kontroller arasında %91.4 sensitivite ile LC3 ve %80.0 spesifisite ile p62 için ayırt edici bulunmuştur (AUC sırasıyla 0.647 ve 0.731 ve sırasıyla $p = 0.041$ ve $p = 0.001$). LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ekspresyon düzeyleri, mRSS (0-3) ve (>14) olan SSc hastaları arasında %97.2 LC3 spesifisite, %97.2 p62 spesifisite ve %94.4 Beklin1 spesifisite ile ayırım yapmıştır (AUC sırasıyla 0.847, 0.817 ve 0.747 ve sırasıyla $p = 0.001$, $p = 0.002$ ve $p = 0.018$). LC3 protein ekspresyon düzeyleri ayrıca mRSS (0-3) ve (>14) olan SSc hastaları arasında %80.0 sensitivite ve %86.1 spesifisite ile ayırt edici bulunmuştur (AUC 0.736, $p = 0.024$). p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, ACA pozitifliği olan SSc hastaları ile sağlıklı kontroller arasında %86.1 spesifisite ile ayırt edicidir (AUC 0.798 ve $p = 0.001$). p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, ACA pozitifliği olan SSc hastalarını ATA pozitifliği olan SSc hastalarından ayırt etmede %94.4 sensitiviteye sahiptir (AUC 0.719 ve $p = 0.008$). p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, 5 yıldan uzun hastalığı olan SSc hastaları ile sağlıklı kontroller arasında %87.9 sensitivite ile ayırt edici bulunmuştur (AUC 0.649 ve $p = 0.020$). p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, 5 yıldan uzun hastalığı olan lcSSc hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırt etmede %86.7 spesifisiteye sahiptir (AUC 0.754 ve $p = 0.001$). LC3 ve p62 mRNA ekspresyon düzeyleri, 5 yıldan uzun hastalığı olan dcSSc hastaları ile 5 yıldan uzun hastalığı olan lcSSc hastaları arasında LC3 için %94.6 spesifisite ve p62 için %97.3 spesifisite ile ayırım yapmıştır (AUC sırasıyla 0.652 ve 0.706 ve sırasıyla $p = 0.039$ ve $p = 0.005$). LC3 ve p62 protein ekspresyon düzeyleri ayrıca, 5 yıldan uzun hastalığı olan dcSSc hastaları ile 5 yıldan uzun hastalığı olan lcSSc hastaları arasında LC3 için %89.2 spesifisite ve p62 için %92.6 sensitivite ile ayırım yapmıştır (AUC sırasıyla 0.648 ve 0.710 ve sırasıyla $p = 0.045$ ve $p = 0.004$).









Şekil 14. SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin ROC eğrisi analizleri ile öngörüselleme çalışması. Grafikler, otofaji molekülleri için AUC ve p değerini içeren ROC eğrilerini göstermektedir. ROC: alıcı çalışma karakteristik eğrisi; AUC: eğri altındaki alan.

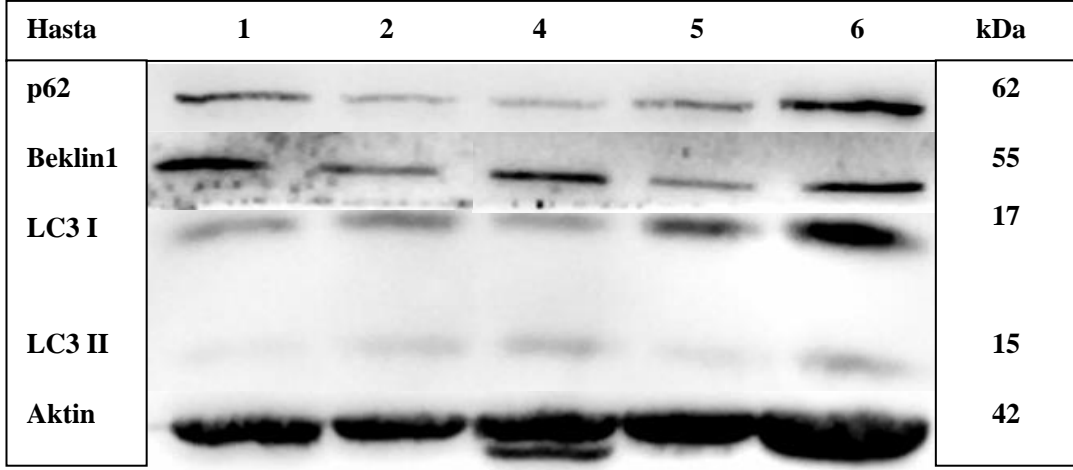
Tablo 15. Farklı modellerde LC3, p62 ve Beklin1'in mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin AUC, sensitivite, spesifisite ve *p* değeri

			AUC (%95 CI)	<i>p</i> değeri	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
Model 1	mRNA	p62	0.624 (0.414-0.644)	0.047	42.9	86.7
Model 2	mRNA	LC3	0.642 (0.511-0.733)	0.040	81.4	43.3
		p62	0.736 (0.623-0.850)	0.001	51.2	86.7
Model 3	Protein	LC3	0.660 (0.517-0.804)	0.028	38.2	73.3
Model 4	mRNA	LC3	0.702 (0.575-0.829)	0.002	71.9	90
		p62	0.718 (0.599-0.837)	0.001	70.7	89.5
		Beklin1	0.649 (0.522-0.776)	0.025	32.4	40.5
	Protein	LC3	0.674 (0.548-0.799)	0.009	50.0	88.4
		p62	0.686 (0.569-0.804)	0.005	91.2	39.5
Model 5	mRNA	LC3	0.740 (0.544-0.936)	0.025	66.7	83.9
		Beklin1	0.727 (0.537-0.917)	0.034	55.6	96.8
Model 6	mRNA	LC3	0.647 (0.514-0.781)	0.041	91.4	32.3
		p62	0.731 (0.610-0.851)	0.001	80	54.8
Model 7	mRNA	LC3	0.847 (0.686-1.000)	0.001	70	97.2
		p62	0.817 (0.638-0.996)	0.002	70	97.2
		Beklin1	0.747 (0.585-0.910)	0.018	50	94.4
	Protein	LC3	0.736 (0.518-0.954)	0.024	80.0	86.1
Model 8	mRNA	p62	0.798 (0.669-0.928)	0.001	61.1	86.7
Model 9	mRNA	p62	0.719 (0.586-0.853)	0.008	94.4	45.0
Model 10	mRNA	p62	0.649 (0.537-0.616)	0.020	87.9	42.6
Model 11	mRNA	p62	0.700 (0.531-0.869)	0.039	63.3	40.6
Model 12	mRNA	p62	0.695 (0.529-0.861)	0.048	51.9	0.0
		Beklin1	0.701 (0.539-0.863)	0.042	66.7	76.9
Model 13	mRNA	p62	0.754 (0.640-0.868)	0.001	54.1	86.7
Model 14	mRNA	LC3	0.652 (0.503-0.800)	0.039	48.1	94.6
		p62	0.706 (0.570-0.841)	0.005	48.1	97.3
	Protein	LC3	0.648 (0.507-0.789)	0.045	44.4	89.2
		p62	0.710 (0.585-0.835)	0.004	92.6	43.2

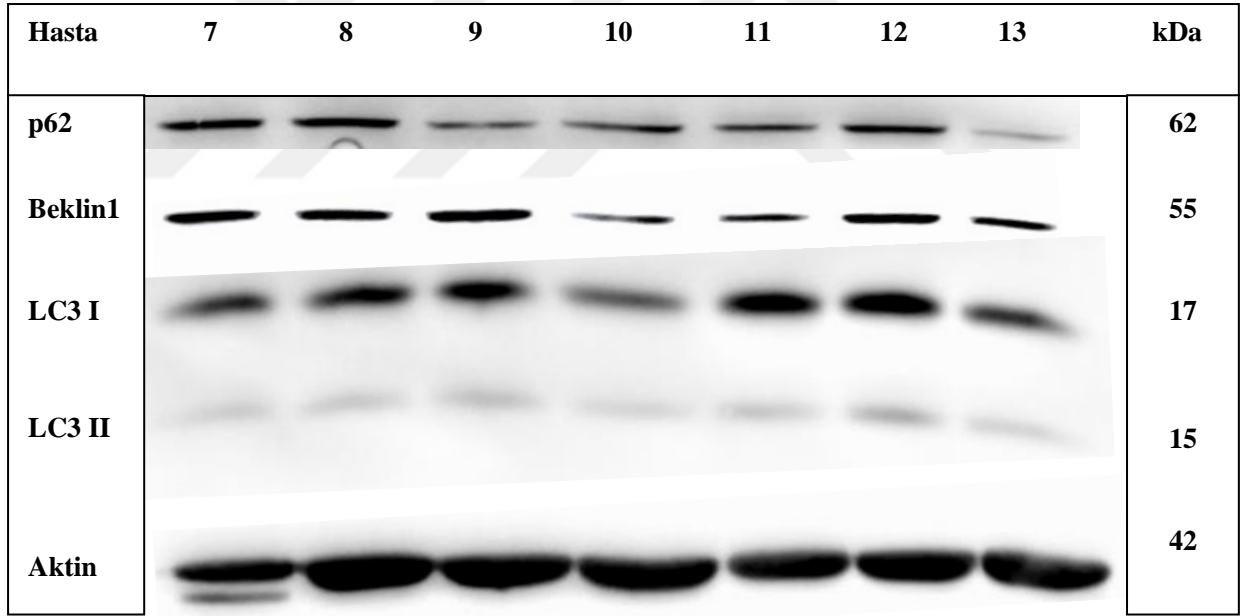
Parantez içindeki sayılar %95 güven aralığını temsil eder. CI, güven aralığı; AUC, eğrinin altında kalan alan.

Tablo 16. SSc hastaları ve sağlıklı kontrollerin ROC modelleri

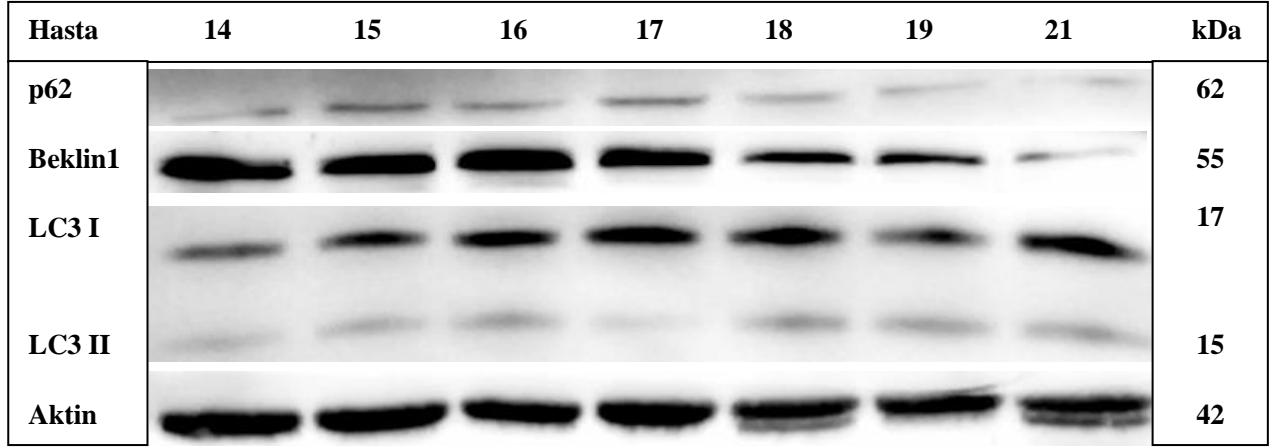
Model 1	SSc hastaları ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: SSc hastaları)
Model 2	lcSSc hastaları ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: lcSSc hastaları)
Model 3	dcSSc hastaları ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: dcSSc hastaları)
Model 4	dcSSc ve lcSSc hastaları (Pozitif grup: dcSSc hastaları)
Model 5	mRSS (>14) olan SSc hastaları ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: mRSS (>14) olan SSc hastaları)
Model 6	mRSS (0-3) olan SSc hastaları ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: mRSS (0-3) olan SSc hastaları)
Model 7	mRSS (0-3) ve (>14) olan SSc hastaları (Pozitif grup: mRSS (>14) olan SSc hastaları)
Model 8	SSc hastaları ACA pozitifliği ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: ACA pozitifliği olan SSc hastaları)
Model 9	ACA pozitifliği ve ATA pozitifliği olan SSc hastaları (Pozitif grup: ATA pozitifliği olan SSc hastaları)
Model 10	5 yıldan uzun süredir hastalığı olan SSc hastaları ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: 5 yıldan uzun süredir hastalığı olan SSc hastaları)
Model 11	ATA pozitifliği olan lcSSc hastaları ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: ATA pozitifliği olan lcSSc hastaları)
Model 12	ATA pozitifliği olan dcSSc hastaları ve ATA pozitifliği olan lcSSc hastaları (Pozitif grup: ATA pozitifliği olan dcSSc hastaları)
Model 13	5 yıldan uzun süredir hastalığı olan lcSSc hastaları ve sağlıklı kontroller (Pozitif grup: 5 yıldan uzun süredir hastalığı olan lcSSc hastaları)
Model 14	dcSSc ve lcSSc hastaları 5 yıldan uzun süredir hastalık (Pozitif grup: 5 yıldan uzun süredir hastalığı olan dcSSc hastaları)



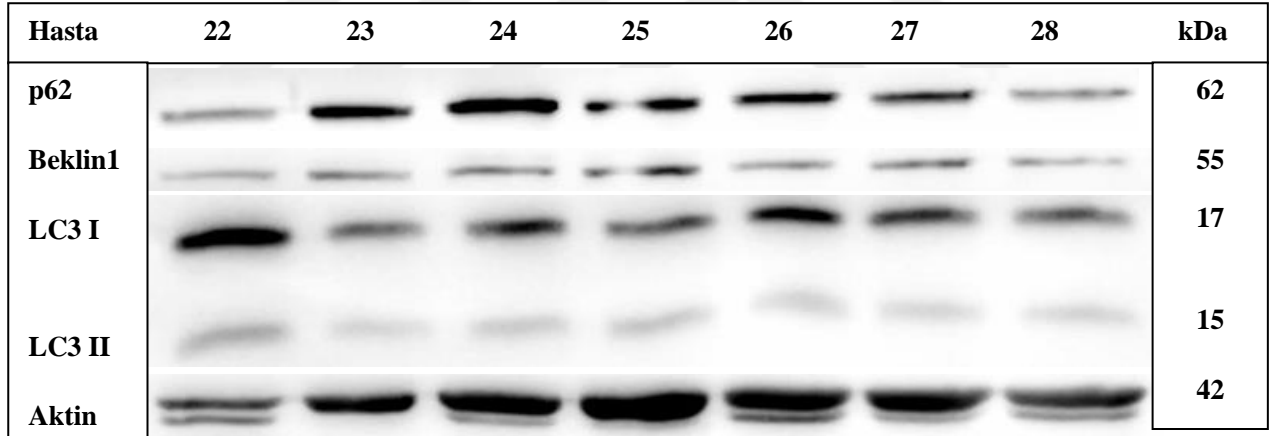
Şekil 15. 1, 2, 4, 5 ve 6 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



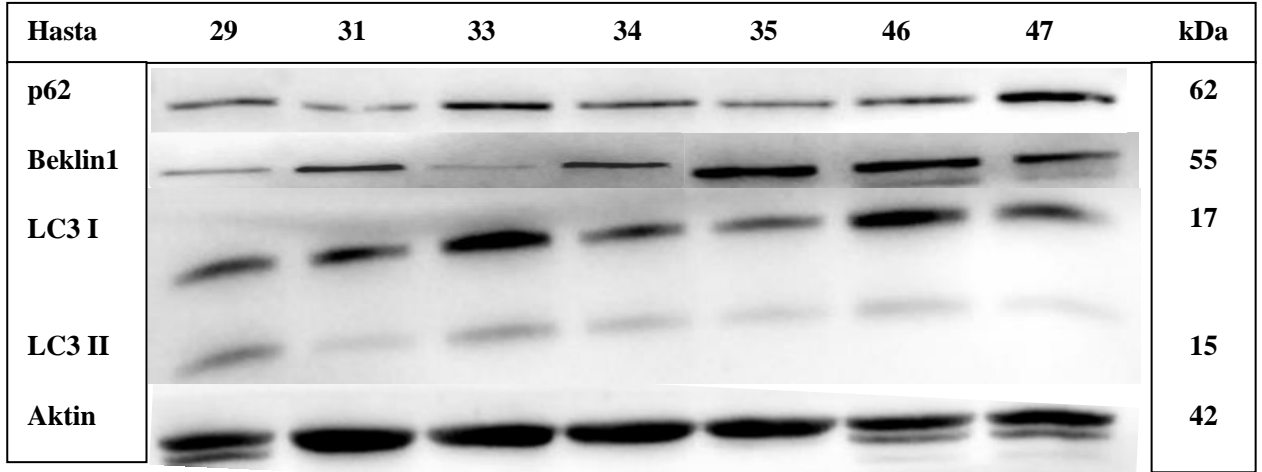
Şekil 16. 7, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



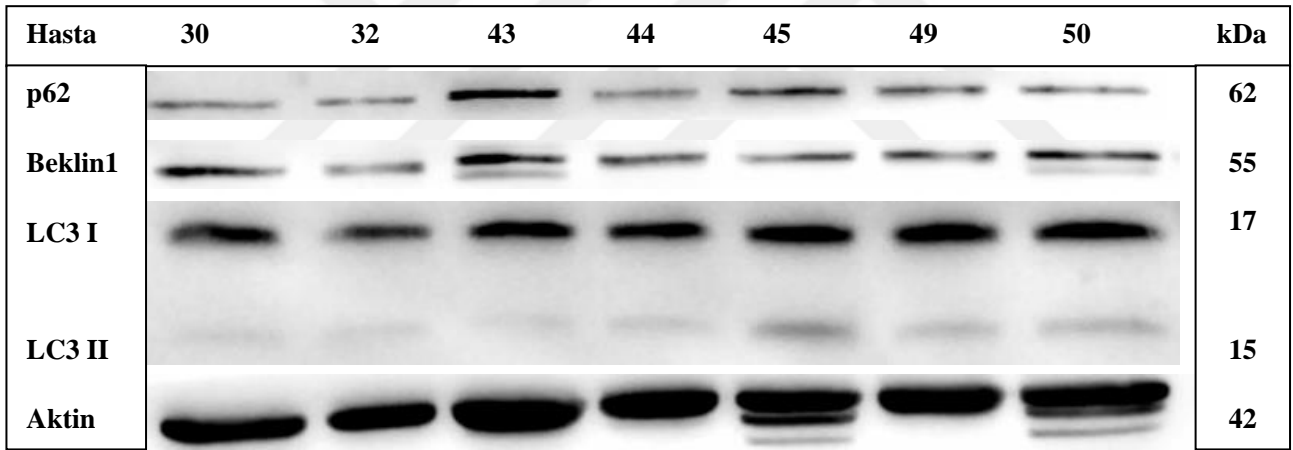
Şekil 17. 14, 15, 16, 17, 18, 19 ve 21 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



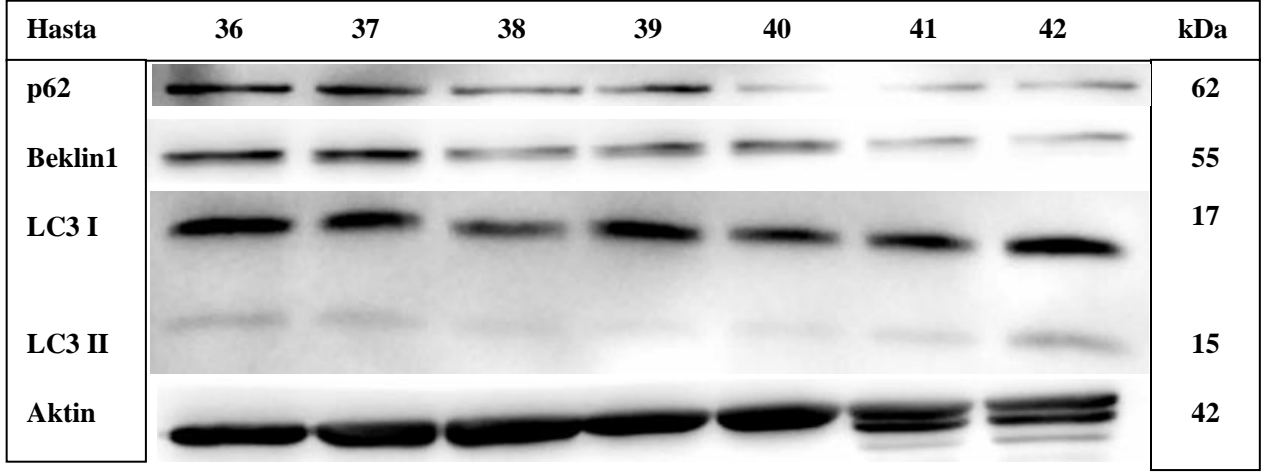
Şekil 18. 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



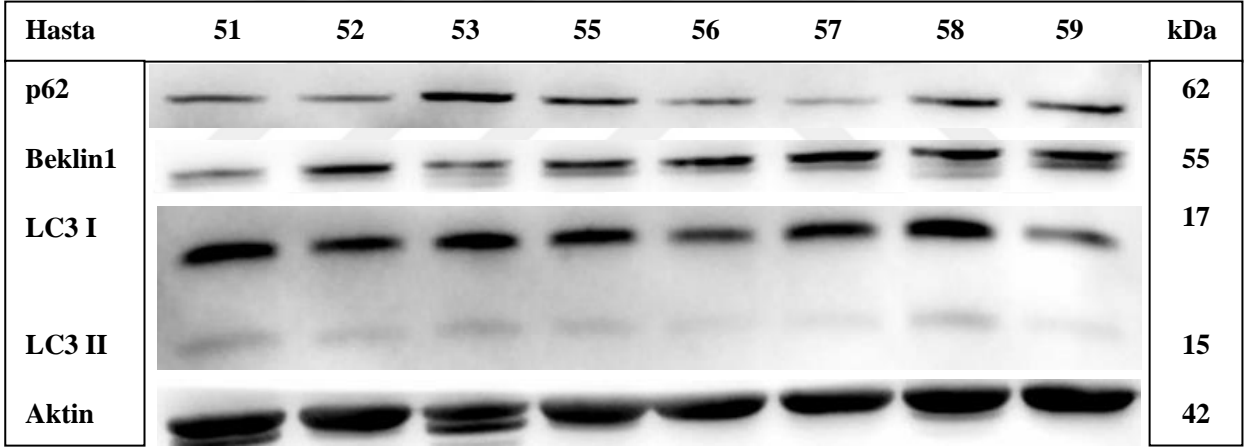
Şekil 19. 29, 31, 33, 34, 35, 46 ve 47 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



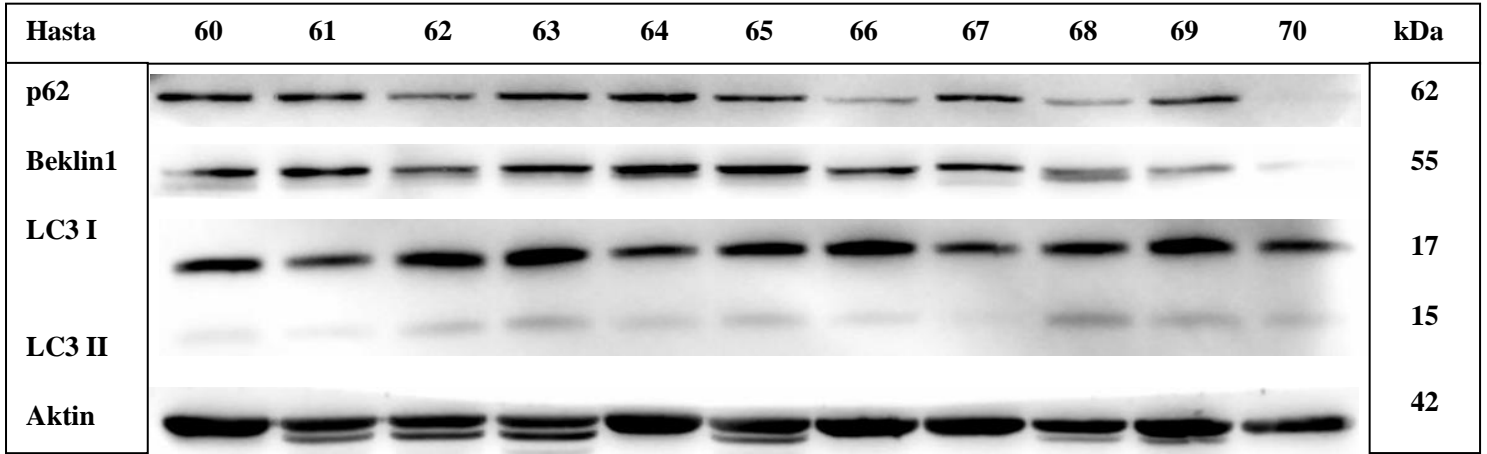
Şekil 20. 30, 32, 43, 44, 45, 49 ve 50 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



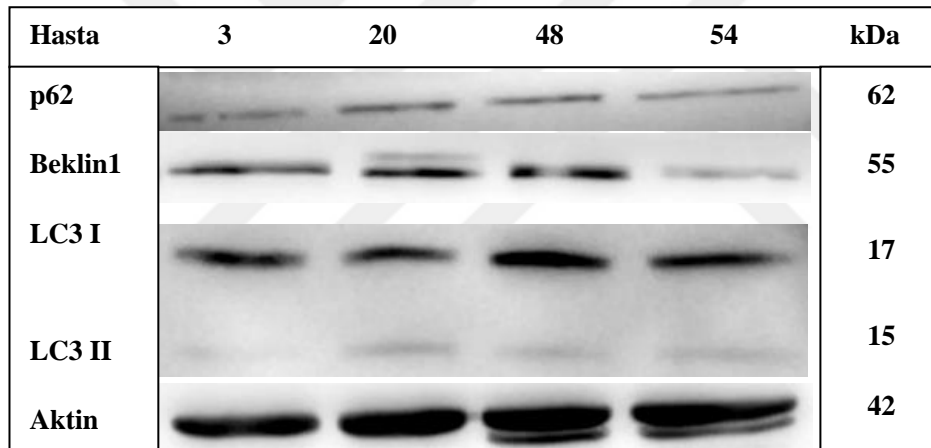
Şekil 21. 36, 37, 38, 39, 40, 41 ve 42 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



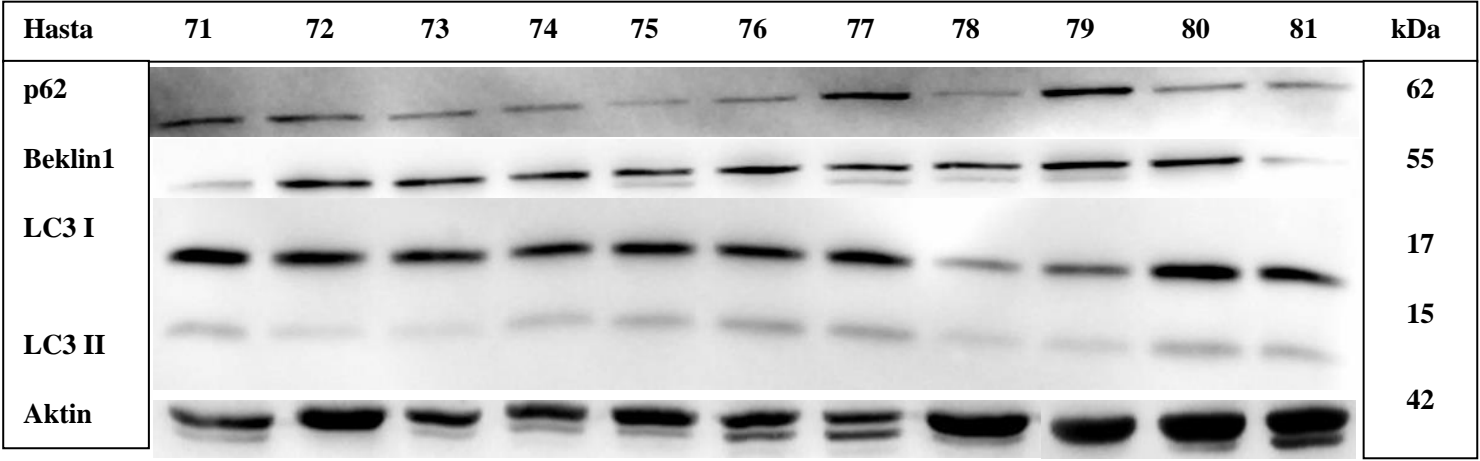
Şekil 22. 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58 ve 59 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



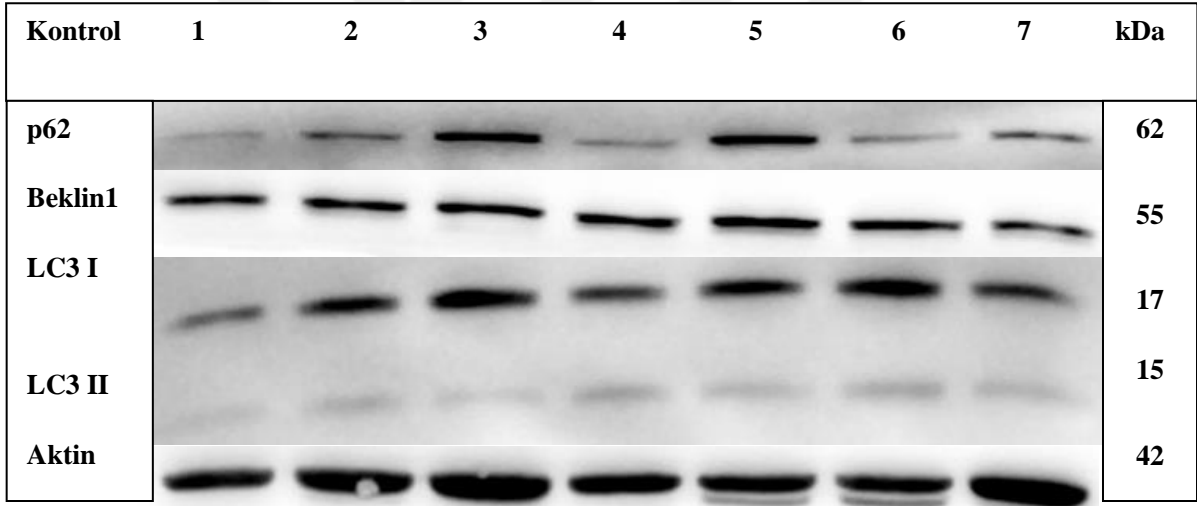
Şekil 23. 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ve 70 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



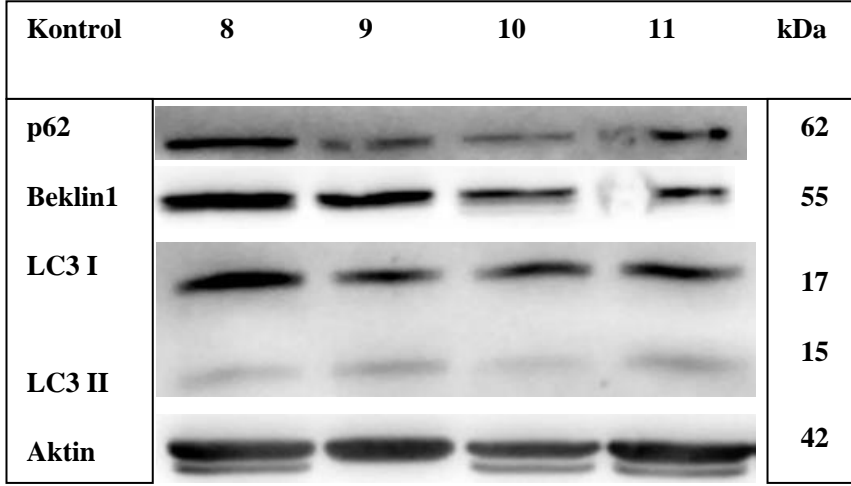
Şekil 24. 3, 20, 48 ve 54 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



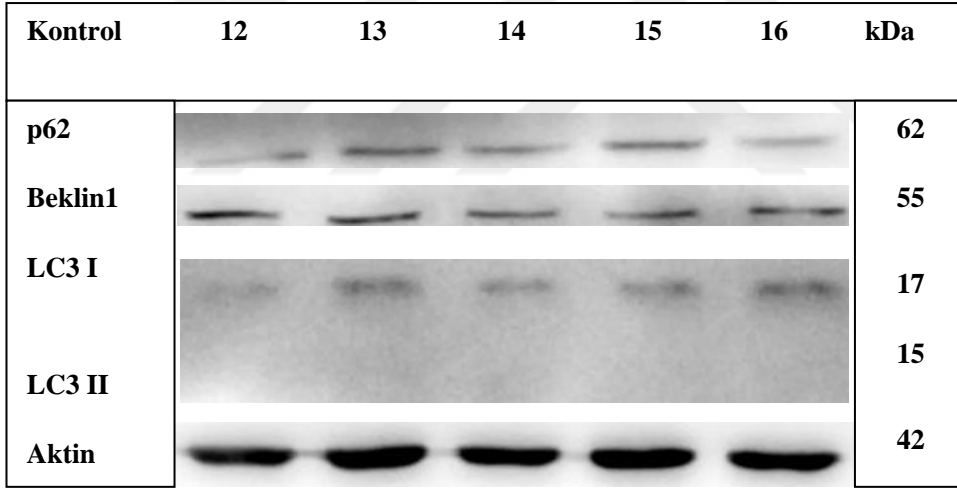
Şekil 25. 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 ve 81 numaralı SSc hasta örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



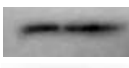














Şekil 26. 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri














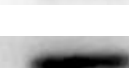








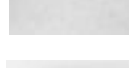
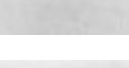

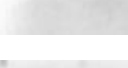
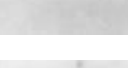
Şekil 27. 8, 9, 10 ve 11 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



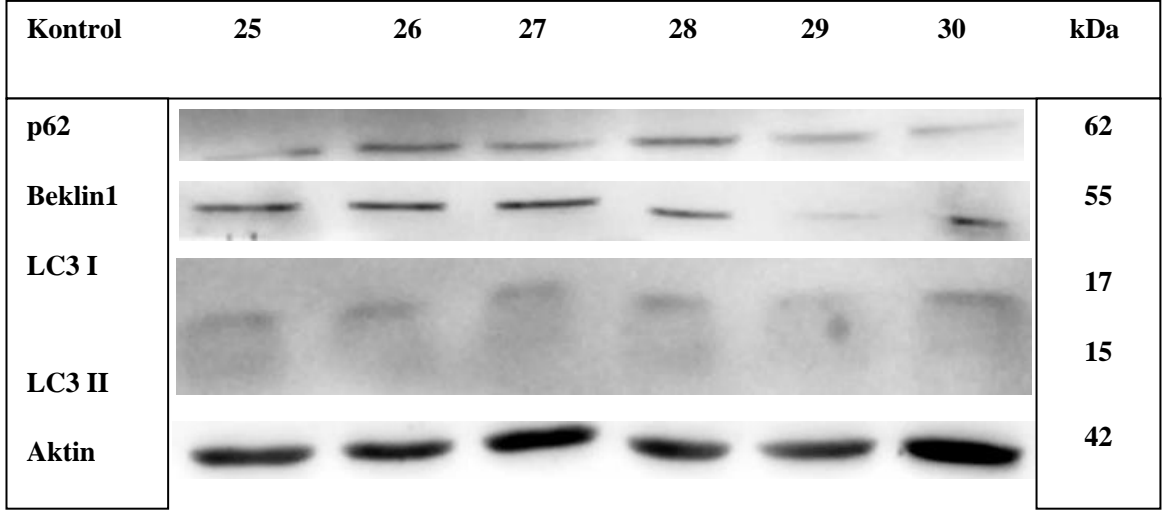
Şekil 28. 12, 13, 14, 15 ve 16 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri

Kontrol	17	18	19	kDa
p62				62
Beklin1				55
LC3 I				17
LC3 II				15
Aktin				42

Şekil 29. 17, 18 ve 19 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri

Kontrol	20	21	22	23	24	kDa
p62						62
Beklin1						55
LC3 I						17
LC3 II						15
Aktin						42

Şekil 30. 20, 21, 22, 23 ve 24 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri



Şekil 31. 25, 26, 27, 28, 29 ve 30 numaralı sağlıklı kontrol örneklerine ait Western blot analiz görüntüleri

5. TARTIŞMA

SSc, klinik olarak heterojen özellikler gösteren kronik bağ dokusu hastalığıdır (146). SSc'nin kesin etiyolojisi hala bilinmemektedir. SSc patogenezi; vaskülopati, otoantikör üretimine yol açan immünite anormallikleri ve deri ve iç organlarda ilerleyici fibrozis ile karakterizedir. Hastalığın morbidite ve mortalite oranı hala yüksek seyretmektedir (146).

Otofaji, hasarlı organelleri ve yanlış katlanmış proteinleri yıkım ve geri dönüşüm için lizozomlara taşıyarak hücrel homeostazı koruyan endojen bir mekanizmadır. Otofaji mekanizmasındaki bozuklukların kanser, nörodejeneratif, kardiyovasküler, enfeksiyöz, metabolik ve pulmoner hastalıkların patogeneziinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (147). Yapılan çalışmalar otofajinin SSc hastalığı patogeneziinde de rol oynadığı göstermiştir. Ancak SSc hastalarının PBMC'lerinde LC3, p62 ve Beklin1 ekspresyon düzeylerinin hastalık alt tiplerini ayırt etmedeki önemi, bu ATG moleküllerinin SSc hastalarında deri tutulumunun şiddetine katkısı ve ekspresyon düzeylerinin hastalık süresi ile karşılaştırılması konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu araştırmada, SSc'li hastaların PBMC'lerinde LC3 ve p62 ekspresyon düzeylerinde değişiklikler saptanmıştır. Bu değişiklikler, otofajinin SSc hastalığı patogeneziinde rol oynadığını göstermektedir. Çalışmamızda LC3 ve p62 mRNA düzeyleri, lcSSc hastalarında dcSSc hastalarına göre daha yüksek ve p62 mRNA düzeyleri lcSSc hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek belirlenmiştir. Ayrıca p62 protein ekspresyon düzeyleri dcSSc hastalarında lcSSc hastalarına göre daha yüksek tespit edilmiştir. Otofajinin ilerlemediği ve inhibe olduğu durumlarda p62 molekülü hücrelerde birikmektedir. dcSSc hastalarında tespit edilen daha yüksek p62 protein ekspresyon düzeylerinin otofajinin inhibe olduğunu ve deri fibrozisinin şiddeti ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. lcSSc hastalarında belirlenen daha düşük p62 ekspresyon düzeylerinin ise artan otofajik akışa bağlı p62 degradasyona bağlı olabileceğini göstermektedir. Ayrıca p62 mRNA ekspresyon düzeylerinin SSc hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırt etme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında LC3 ve p62 mRNA ekspresyon düzeylerinin lcSSc hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırt etme potansiyelinin bulunduğu tespit edilmiştir. LC3 ve

p62 mRNA ve protein düzeylerinin dcSSc hastalarını lcSSc hastalarından ayırt etme potansiyelinin olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar, SSc patogenezinde otofaji mekanizmasının rol oynadığını göstermiştir. SSc hastalarının deri punch biyopsilerinde yapılan çalışmada, IF yöntemle LC3 boyaması tespit edilmiş, ancak sağlıklı kontrollerde LC3 boyaması belirlenmemiştir. Ayrıca hastalık süresi daha kısa olan hastaların LC3 boyanmasının daha yoğun olduğu, hastalık süresi uzadıkça LC3 boyanmasının yoğunluğunun azaldığı da belirtilmiştir (122). Dumit ve ark. tarafından yapılan *in vitro* çalışmada 3 SSc hastasından hazırlanan primer dermal fibroblastlarda, LC3 proteini ekspresyonunun sağlıklı kontrolden hazırlanan dermal fibroblastlara göre daha düşük olduğu gösterilmiş ve azalmış otofajinin ECM proteinlerinin birikmesine neden olduğu belirtilmiştir (123). Liu ve ark. tarafından yapılan çalışmada ilk kez tanı almış 5 SSc hastasının dermal biyopsi örneklerinin transmisyon elektron mikroskobu incelemesinde, SSc hastalarının fibrotik dermisinde kontrol grubuna göre artmış sayıda otofagolizozom tespit edilmiştir (126). Ayrıca SSc hastalarından izole edilen dermal fibroblastlarda LC3, COL-I ve CTGF protein ekspresyon düzeylerinin normal fibroblastlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (126). Mori ve ark. tarafından yapılan çalışmada, bleomisin enjekte edilen farelerin dermal tabakalarında dört hafta sonunda fibrozis tespit edilmiştir (127). Bleomisin uygulanan farelerin dermisinde LC3 pozitif punkta sayısının PBS enjekte edilen farelere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sklerotik faz SSc hastalarında dermal fibrozisin ödematöz SSc hastalarına göre daha şiddetli olduğu, alt dermiste üst dermise göre daha yoğun kollajen demetlerin bulunduğu bildirilmiştir. Sklerotik SSc hastalarının alt dermisinde LC3 pozitif punkta sayısı kontrollerin dermisine, ödematöz SSc ve sklerotik SSc hastaların üst dermisine göre daha fazla tespit edilmiştir. Bu sonuçlar SSc'nin sklerotik fazında bozulmuş otofajiyi ve bunun hastalığın ilerlemesi üzerindeki potansiyel etkisini düşündürmektedir (127). Zehender ve ark. tarafından yapılan çalışmada, SSc hastalarının fibrotik deri dokularında IF yöntem ile Beklin1 ve ATG7 boyamalarının kontrollere göre daha fazla olduğu, p62 boyamasının ise daha az olduğu tespit edilmiştir (132). Ayrıca SSc hastalarının deri dokularında artmış Beklin1 ve ATG7 mRNA ekspresyonu, artmış LC3 protein ekspresyonu ve

azalmış p62 protein ekspresyonu düzeyleri saptanmıştır. Bleomisin ile fibrozis indüklenmiş farelerin deri ve akciğer dokularında da artmış Beklin1 ve ATG7 mRNA ekspresyonu ve azalmış p62 mRNA ekspresyonu düzeyleri tespit edilmiştir. Bu farelerde *in vivo* Beklin1'in aşırı ekspresyonu otofajiyi aktive etmiş, miyofibroblasta diferansiyasyon uyarılmış, kollajen salınımı artmış, deri ve pulmoner fibrozis ilerlemiştir. SSc hastalarından izole edilen dermal fibroblastlarda artmış LC3 protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. SSc hasta dermal fibroblastlarında *in vitro* Beklin1'in aşırı ekspresyonu ile otofaji aktivasyonu sonucu miyofibroblasta diferansiyasyon uyarılmış ve kontrol fibroblastlarına göre TGF- β ve kollajen salınımı artmıştır. SSc hasta dermal fibroblastlarında *in vitro* ATG7 veya Beklin1'in susturulmasıyla ise otofajinin inhibe edilmesi sonucu kontrol fibroblastlarına göre miyofibroblastların diferansiyasyonu ve kollajen salınımını azalmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, otofajinin SSc fibrozisinde önemli rol oynadığını göstermektedir (132).

Yukarıda belirtilen çalışmalar *in vivo* olarak insan ve fare derisinde ve *in vitro* olarak dermal fibroblastlarda gerçekleştirilmiş olmakla birlikte SSc hasta PBMC'lerinde tespit ettiğimiz LC3 ve p62 ekspresyon değişiklikleri SSc'de otofajinin bozulduğuna dair önceki çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Yapılan bir çalışmada, SSc hastalarının PBMC'lerinde LC3, Beklin1 ve ATG3 mRNA ekspresyon düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (128). Ancak bu araştırmada SSc hastalarının alt grupları, hastalık süresi, şiddeti ve antikor profiline yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Liu ve ark. tarafından biyoinformatik teknikler kullanılarak yapılan çalışmada, SSc ile bağlantılı 12 otofaji ile ilişkili farklı gen ekspresyonu (DEG) tanımlanmıştır (148). Bu 12 otofaji ilişkili DEG arasında CD93 ve SFRP4'ün yüksek sensitivite ve spesifisite gösterdiği belirlenmiştir. Üç SSc hastasının kanındaki CD93 ve SFRP4 mRNA ekspresyon düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (148).

SSc'de iç organ tutulumunun çoğu genellikle hastalığın başlangıcından itibaren ilk beş yıl içinde ortaya çıkmaktadır (ilk RP dışı semptom olarak tanımlanmaktadır) (140). SSc hastalarını hastalık süresine göre gruplara ayırmak tarama ve tedavi stratejilerine olanak sağlamaktadır. Çalışmamızda SSc hastaları hastalık süresine

göre 5 yıldan kısa (0-5 yıl) ve 5 yıldan uzun (>5 yıl) olarak sınıflandırılmıştır. Hastalık süresi 5 yıldan kısa olan SSc hastalarında p62 protein ekspresyon düzeyleri sağlıklı kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç hastalık süresi kısa olan SSc hastalarında otofajinin inhibe olduğunu düşündürmektedir. Hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc hastalarında, p62 mRNA ekspresyon düzeyleri 5 yıldan uzun hastalığı olan dcSSc hastalarına ve sağlıklı kontrollere göre daha yüksek saptanmıştır. Ayrıca hastalık süresi 5 yıldan uzun olan dcSSc hastalarında, p62 protein ekspresyon düzeyleri 5 yıldan uzun hastalığı olan lcSSc hastalarına göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç dcSSc hastalarında otofajinin inhibisyonunu düşündürmektedir. Bunun yanında p62 molekülünün deri fibrozisi için bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, p62 mRNA ekspresyon düzeylerinin hastalık süresi 5 yıldan uzun olan SSc hastalarını sağlıklı kontrollerden, hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırt etme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. LC3 ve p62 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin, hastalık süresi 5 yıldan uzun olan dcSSc hastalarını hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc hastalarından ayırt etme potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar LC3 ve p62'nin hastalık süresi 5 yıldan uzun olan dcSSc hastaları ile hastalık süresi 5 yıldan uzun olan lcSSc hastalarını ayırt edebileceğini göstermektedir.

Deri kalınlığının bir ölçüsü olan mRSS, deri fibrozisinin klinik şiddetini ve yaygınlığını değerlendirmek için ve klinik çalışmalarda birincil sonuç ölçütü olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (141). LC3 mRNA ekspresyon düzeyleri, mRSS (0-3) olan hastalarda mRSS (4-14) olan hastalara göre daha yüksek saptanmıştır. Bu sonucun daha hafif deri tutulumu olan hastalarda artmış otofagozom oluşumunu veya azalmış otofagozom degradasyonunu yansıttığı düşünülmektedir. Ayrıca LC3 ve Beklin1 mRNA ekspresyon düzeylerinin mRSS (>14) olan SSc hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırt etme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. LC3 ve p62 mRNA ekspresyon düzeylerinin mRSS (0-3) olan SSc hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırt etme potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır. LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ekspresyon düzeylerinin mRSS (0-3) olan SSc hastalarını mRSS (>14) olan SSc hastalarından ayırt etme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. LC3 protein düzeylerinin de mRSS (0-3) olan SSc hastalarını mRSS (>14) SSc

hastalarından ayırt etme potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, LC3 ve p62 ekspresyon düzeylerinin hastaları mRSS'a göre ayırt edebileceğini göstermektedir. LC3, p62 ve Beklin1 mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri, ATA veya ACA pozitifliği veya otoantikör negatifliğine göre ayrılan hasta grupları arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte p62 protein ekspresyon düzeyleri, hastalık süresi 5 yıldan kısa olan ATA pozitif SSc hasta grubunda, hastalık süresi 5 yıldan uzun olan ATA pozitif SSc hasta grubuna göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bu sonuç p62'nin erken otoimmün aktivasyon için bir belirteç olabileceğini göstermektedir. ATA pozitif olan lcSSc hastalarının ATA negatif olan lcSSc hastalarına göre dcSSc geliştirme olasılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (149). ATA pozitif lcSSc hastalarında daha yüksek p62 mRNA ekspresyon düzeylerinin daha ilerleyici bir hastalık seyri ile ilişkili olabileceği ve artmış immün sistem aktivasyonu ve yeniden doku şekillenmesini yansıtabileceği düşünülmektedir. Ayrıca p62 mRNA ekspresyon düzeylerinin ACA pozitif SSc hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırdığı tespit edilmiştir. p62 mRNA ekspresyon düzeylerinin ATA pozitif SSc hastalarını ACA pozitif SSc hastalarından ayırdığı da saptanmıştır. Sonuçlarımız p62'nin hastaları antikör durumlarına göre ayırt edebileceğini göstermektedir.

İnterstisyel akciğer hastalığı (İAH) SSc'de en sık görülen akciğer tutulumudur ve hastalıkla ilişkili ölümlerin önde gelen nedeni olarak kabul edilmektedir (150). Pulmoner fibrozis SSc hastalarının yaklaşık %80'inde görülmektedir (151). Nintedanib, antifibrotik etkiye sahip tirozin kinaz inhibitörüdür. İdiyopatik pulmoner fibrozis fibroblastlarında ECM salgılanmasını azalttığı ve TGF- β sinyalini inhibe ettiği ve Beklin1 bağımlı, ATG7'den bağımsız otofajiyi indüklediği gösterilmiştir (152). Yapılan klinik çalışmada Nintedanib'in SSc hastalarında akciğer hastalığının ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir (153). Nintedanib, 2019 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından SSc- İAH tedavisi için onaylanmıştır (154). Çalışmamızın sonuçları, SSc için şu anda kullanılan tedavi seçenekleri yanında otofajiyi modüle edici tedavi stratejileri geliştirmenin hastalar açısından umut verici bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Wilhelm ve ark. tarafından yapılan çalışmada, lupuslu hastaların serumunda, şaperon aracılı otofaji yoluyla parçalanması hedeflenen sitozolik proteinler için bir reseptör olan lizozomal ilişkili membran proteini 2A (LAMP2A) ile reaksiyona giren otoantikörlerin varlığı tanımlanmıştır (155). LAMP2A ile reaksiyona giren otoantikörlerin MRL/lpr farelere uygulanmasının hastalığın ilerlemesini hızlandırdığı gösterilmiştir (138). SSc hastalığında da otofaji otoantijenlerine yönelik otoantikörlerin tanımlanmasının otofajinin SSc patogenezindeki rolünü aydınlatmada ve yeni terapötik hedefleri belirlemede önemli olabileceğini düşünmekteyiz.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

SSc, hastalar arasında klinik özellikler, hastalığın ilerleme hızı ve tedaviye yanıt açısından değişkenlik gösteren otoimmün bir hastalıktır. Çalışmamızın sonuçları, otofajinin dcSSc hastalarını lcSSc hastalarından ayırt etmede önemli olduğunu göstermektedir. Bunun yanında otofajinin deri tutulumunun şiddeti ve hastalık süresine göre hasta alt gruplarını ayırt etmede de önemli bir rolü olduğunu da göstermektedir. Bu şekilde hastalığı tedavi etmeye yönelik otofajiyi modüle eden ilaçlar geliştirilebilir. Ayrıca hastalarda otofaji düzeylerinin tespit edilmesiyle hastalık alt grupları ayırt edilerek ve hastalık şiddeti belirlenerek doğru tedavi yöntemleri uygulanması sağlanabilir.

Hastaların otofaji düzeylerinin hastalığın seyrini belirlemedeki rolünün araştırılması için uzunlamasına çalışma yapılarak prediktif modeller oluşturulması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Asano Y. Systemic sclerosis. *J Dermatol.* 2018;45(2):128-138.
2. Silman AJ. Epidemiology of Scleroderma. *Ann Rheum Dis.* 1991;50:846-853.
3. Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E ve ark. Increased prevalence of systemic sclerosis in a native American tribe in Oklahoma: association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum.* 1996;39(8):1362-1370.
4. Geirsson AJ, Steinsson K, Gudmundsson S, Sigurdsson V. Systemic Sclerosis in Iceland. A Nationwide Epidemiological Study. *Ann Rheum Dis.* 1994;53(8):502-505.
5. Monaco AL, Bruschi M, Corte RL, Volpinari S, Trotta F. Epidemiology of Systemic Sclerosis in a District of Northern Italy. *Clin Exp Rheum.* 2011;29:10-14.
6. LeRoy EC, Medsger Jr TA. Criteria for the Classification of early systemic sclerosis. *The Journal of Rheumatology.* 2001;28(7):1573-576.
7. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med.* 1997;103(3):242-248.
8. Broen JC, Radstake TR, Rossato M. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(11):671-681.
9. Martinis MD, Ciccarelli F, Sirufo MM, Ginaldi L. An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis. *Expert Rev Clin Immuno.* 2016;12:465-478.
10. Altorok N, Kahaleh B. Epigenetics and systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2015;37:453-462.
11. Wei P, Yang Y, Guo X, Hei N, Lai S, Assassi S ve ark. Identification of an association of *tnfrsf3* polymorphisms with matrix metalloproteinase expression in fibroblasts in an integrative study of systemic sclerosis – associated genetic and environmental factors. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68:749-760.
12. Mostmans Y, Cutolo M, Giddelo C, Decuman S, Melsens K, Declercq H ve ark. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review. *Autoimmun Rev.* 2017;16:774-786.
13. Bruni C, Frech T, Manetti M, Rossi FW, Furst DE, De Paulis A ve ark. Vascular Leaking, a Pivotal and Early Pathogenetic Event in Systemic Sclerosis: Should the Door Be Closed? *Front Immunol.* 2018;9:2045.
14. Vega AV, Avila G. CGRP, a vasodilator neuropeptide that stimulates neuromuscular transmission and EC coupling. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010;8:394-403.

15. Iwamoto N, Distler O. Molecular targets for therapy in systemic sclerosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5:19.
16. Cutolo M, Soldano S, Smith V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15:753-764.
17. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in physiology and in the pathogenesis of human diseases. *Physiol Rev*. 2019;99:1281-1324.
18. Piera-Velazquez S, Mendoza FA, Jimenez SA. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of human fibrotic diseases. *J Clin Med*. 2016;5:45.
- 19- Wigley FM, Flavahan NA. Raynaud's Phenomenon. *N Engl J Med*. 2016;375:556-565.
20. Cutolo M, Smith V, Furst DE, Khanna D, Herrick AL. Points to consider-Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2017;56:45-48.
21. Toledo DM, Pioli PA. Macrophages in systemic sclerosis: novel insights and therapeutic implications. *Curr Rheumatol Rep*. 2019;21:31.
22. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA Jr, Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum*. 1984;27:645-53.
23. Hasegawa M, Sato S, Ihn H, Takehara K. Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:612-617.
24. Denton CP, Abraham DJ. Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13:505-511.
25. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1997;24:328-332.
26. Belperio JA, Dy M, Burdick MD, Xue YY, Li K, Elias JA ve ark. Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27:419-427.
27. McGaha T, Saito S, Phelps RG, Gordon R, Noben-Trauth N, Paul WE ve ark. Lack of skin fibrosis in tight skin (TSK) mice with targeted mutation in the interleukin-4R

alpha and transforming growth factor-beta genes. *J Invest Dermatol.* 2001;116:136-143.

28. Ong C, Wong C, Roberts CR, Teh HS, Jirik FR. Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol.* 1998;28:2619-2629
Chizzolini C, Boin F. The role of the acquired immune response in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2015;37(5):519-528.

29. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today.* 1994;15:19-26

30. Doucet C, Brouty-Boyé D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol.* 1998;10:1421-433.

31. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V ve ark. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 2001;194:809-821.

32. Oriente A, Fedarko NS, Pacocha SE, Huang SK, Lichtenstein LM, Essayan DM. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292:988-994.

33. Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:616-630.

34. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R128.

35. Khalil N, Bereznay O, Sporn M, Greenberg AH. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med.* 1989;170:727-737.

36. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol.* 2014;5:508.

37. Vona R, Giovannetti A, Gambardella L, Malorni W, Pietraforte D, Straface E. Oxidative stress in the pathogenesis of systemic scleroderma: an overview. *J Cell Mol Med.* 2018;22:3308-3314.

38. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020;36:191-218.

39. Abraham D, Lupoli S, McWhirter A, Plater-Zyberk C, Piela TH, Korn JH ve ark. Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 1991;34:1164-1172.

40. Boin F, De Fanis U, Bartlett SJ, Wigley FM, Rosen A, Casolaro V. T cell polarization identifies distinct clinical phenotypes in scleroderma lung disease. *Arthritis Rheum.* 2008;58(4):1165-1174.
41. MacDonald KG, Dawson NAJ, Huang Q, Dunne JV, Levings MK, Broady R. Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135:946-955.
42. 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.
43. François A, Chatelus E, Wachsmann D, Sibia J, Bahram S, Alsaleh G ve ark. B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15:R168.
44. Mehra S, Walker J, Patterson K, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2013;12:340-354.
45. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M ve ark. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354:2667-2676.
46. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Köhl AA, Günther J, Radic M ve ark. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R29.
47. Frantz C, Auffray C, Avouac J, Allanore Y. Regulatory T cells in systemic sclerosis. *Front Immunol.* 2018;9:2356.
48. Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M. Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55:263-267.
49. Dominique MAK, Tripodo C, Fernandez D, Kirou KA Spieramary RF, Crow MK. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. *Sci Transl Med.* 2018;10:eaam8458.
50. Caam AV, Vonk M, Hoogen FVD, Lent PV, Kraan PVD. Unraveling SSc Pathophysiology; The Myofibroblast. *Front Immunol.* 2018;9:2452.
51. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2230-2239.

52. Hinz B, Lagares D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16:11-31.
53. Lagares D, Santos A, Grasberger PE, Liu F, Probst CK, Rahimi RA ve ark. Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaal3765.
54. Jafarinejad-Farsangi S, Farazmand A, Gharibdoost F, Karimizadeh E, Noorbakhsh F, Faridani H ve ark. Inhibition of MicroRNA-21 induces apoptosis in dermal fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Int J Dermatol*. 2016;55:1259-1267.
55. Lafyatis R. Transforming growth factor β -at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:706-719.
56. Di Benedetto P, Ruscitti P, Berardicurti O, Vomero M, Navarini L, Dolo V ve ark. Endothelial-to-mesenchymal transition in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2021;205:12-27.
57. Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med*. 1992;175:1227-1234.
58. Nikitorowicz-Buniak J, Denton CP, Abraham D, Stratton R. Partially evoked epithelial-mesenchymal transition (EMT) is associated with increased TGF β signaling within lesional scleroderma skin. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134092.
59. Manetti M, Romano E, Rosa I, Guiducci S, Bellando-Randone S, De Paulis A ve ark. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:924-934.
60. Rajkumar VS, Sundberg C, Abraham DJ, Rubin K, Black CM. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:930-941.
61. Sawant M, Hinz B, Schönborn K, Zeinert I, Eckes B, Krieg T, et al. A story of fibers and stress: matrix-embedded signals for fibroblast activation in the skin. *Wound Repair Regen*. 2021;29:515-530.
62. Blumbach K, Zweers MC, Brunner G, Peters AS, Schmitz M, Schulz JN, et al. Defective granulation tissue formation in mice with specific ablation of integrin-linked kinase in fibroblasts - role of TGF β 1 levels and RhoA activity. *J Cell Sci*. 2010;123:3872-3883.
63. Nüchel J, Ghatak S, Zuk AV, Illerhaus A, Mörgelin M, Schönborn K ve ark. TGF β 1 is secreted through an unconventional pathway dependent on the autophagic machinery and cytoskeletal regulators. *Autophagy*. 2018;14:465-486.

64. Munger JS, Sheppard D. Cross talk among TGF- β signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3:a005017.
65. Distler JHW, Györfi AH, Ramanujam M, Whitfield ML, Königshoff M, Lafyatis R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15:705-730.
66. Bhattacharyya S, Tamaki Z, Wang W, Hinchcliff M, Hoover P, Getsios S ve ark. FibronectinEDA promotes chronic cutaneous fibrosis through toll-like receptor signaling. *Sci Transl Med.* 2014;6:232ra50.
67. Bhattacharyya S, Wang W, Morales-Nebreda L, Feng G, Wu M, Zhou X et al. Tenascin-C drives persistence of organ fibrosis. *Nat Commun.* 2016;7:11703.
68. Bhattacharyya S, Varga J. Endogenous ligands of TLR4 promote unresolving tissue fibrosis: implications for systemic sclerosis and its targeted therapy. *Immunol Lett.* 2018;195:9-17.
69. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP ve ark. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;23:15002.
70. Senécal JL, Hénault J, Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (Scleroderma). *J Rheumatol.* 2005;32:1643-1649.
71. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A ve ark. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 2013;72:1747-1755.
72. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Rowell N ve ark. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 1988;15:202-205.
73. Krieg T, Takehara K. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. *Rheumatology.* 2009;48(iii):14-18.
74. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet.* 2017;7:1685-1699.
75. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S ve ark. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1995;22:1281-1285.
76. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000;290:1717-1721.
77. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest.* 2015;125(1):85-93.

78. Yang Z, Goronzy JJ, Weyand CM. Autophagy in autoimmune disease. *J Mol Med.* 2015;93(7):707-17.
79. Francois A, Terro F, Quellard N, Fernandez B, Chassaing D, Janet T ve ark. Impairment of autophagy in the central nervous system during lipopolysaccharide-induced inflammatory stress in mice. *Mol Brain.* 2014;7:56.
80. Mizushima N and Klionsky DJ. Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:19-40.
81. Levine B, Mizushima N, Virgin H. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011;469: 323-335.
82. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M ve ark. Mammalian autophagy: how does it work? *Annu Rev Biochem.* 2016;85:685-713.
83. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:1125-1136.
84. Dice JF. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.* 2007;3(4):295-299.
85. Schmid D, Münz C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity.* 2007;27:11-21.
86. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. *Cell.* 2014;159(6):1263-1276.
87. Morel E, Mehrpour M, Botti J, Dupont N, Hamaï A, Nascimbeni AC ve ark. Autophagy: a druggable process. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017;57:375-98.
88. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13:132-141.
89. Green DR, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell.* 2014;157:65-75.
90. Arbogast F, Gros F. Lymphocyte Autophagy in Homeostasis, Activation, and Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2018;9:1801.
91. Zhang L, Wang K, Lei Y, Li Q, Nice EC, Huang C. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:452-465.
92. Wang K, Chen Y, Zhang P, Lin P, Xie N, Wu M. Protective features of autophagy in pulmonary infection and inflammatory diseases. *Cells.* 2019;8:123.

93. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Münz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol.* 2015;16:1014-1024.
94. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A ve ark. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 2016;12:1-222.
95. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N ve ark. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature.* 2000;408:488-92.
96. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2018;20:233-242.
97. Ng F, Tang BL. Sirtuins' modulation of autophagy. *J Cell Physiol.* 2013;228:2262-2270.
98. Fernández ÁF. Autophagy and proteases: basic study of the autophagic flux by western blot. *Methods Mol Biol.* 2018;1731:73-81.
99. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A ve ark. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005;171:603-614.
100. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T ve ark. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell.* 2007;131:1149-1163.
101. De Rechter S, Decuypere JP, Ivanova E, van den Heuvel LP, De Smedt H, Levtschenko E ve ark. Autophagy in renal diseases. *Pediatr Nephrol.* 2016;31:737-752.
102. Gros F. Effects of autophagy on joint inflammation. *Joint Bone Spine.* 2017;84:129-32.
103. Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Saftig P, Nishino I. Lysosomal myopathies : an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscul Disord.* 2008;18:521-529.
104. Winslow AR, Rubinsztein DC. Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782:723-729.
105. Orvedahl A, Levine B. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ.* 2009;16:57-69.
106. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK ve ark. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* 2008;456:259-263.

107. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, ve ark. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature*. 2008;456:264-268.
108. Yen WL, Klionsky DJ. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology*. 2008;23:248-262.
109. Jin S, White E. Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress. *Autophagy*. 2008;4:563-566.
110. Kim SI, Na HJ, Ding Y, Wang Z, Lee SJ, Choi ME. Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem*. 2012;287:11677-11688.
111. Li H, Peng X, Wang Y, Cao S, Xiong L, Fan J ve ark. Atg5-mediated autophagy deficiency in proximal tubules promotes cell cycle G2/M arrest and renal fibrosis. *Autophagy*. 2016;12:1472-1486.
112. Luciani A, Villella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina D, Settembre C ve ark. Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol*. 2010;12:863-875.
113. Liu S, Chen S, Li M, Zhang B, Shen P, Liu P ve ark. Autophagy activation attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Arch Biochem Biophys*. 2016;590:37-47.
114. Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N ve ark. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2005;25:1025-1040.
115. Ghavami S, Yeganeh B, Zeki AA, Shojaei S, Kenyon NJ, Ott S ve ark. Autophagy and the unfolded protein response promote profibrotic effects of TGF- β 1 in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018;314: L493-L504.
116. Ndoye A, Weeraratna AT. Autophagy- An emerging target for melanoma therapy. *F1000Res*. 2016;29(5):F1000 Faculty Rev-1888.
117. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, ve ark. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2476-2487.
118. Del Principe D, Vona R, Giordani L, Straface E, Giammarioli AM. Defective autophagy in fibroblasts may contribute to fibrogenesis in autoimmune processes. *Curr Pharm Des* 2011;17:3878-3887
119. Castello-Cros R, Whitaker-Menezes D, Molchansky A, Purkins G, Soslowsky LJ, Beason DP ve ark. Scleroderma-like properties of skin from caveolin-1-deficient mice:

implications for new treatment strategies in patients with fibrosis and systemic sclerosis. *Cell Cycle*. 2011;10:2140-2150.

120. Chen ZH, Cao JF, Zhou JS, Liu H, Che LQ, Mizumura K ve ark. Interaction of caveolin-1 with ATG12-ATG5 system suppresses autophagy in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306:L1016-L1025.

121. Del Galdo F, Sotgia F, de Almeida CJ, Jasmin JF, Musick M, Lisanti MP ve ark. Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2008;58:2854-2865.

122. Frech T, De Domenico I, Murtaugh MA, Revelo MP, Li DY, Sawitzke AD ve ark. Autophagy is a key feature in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatol Int*. 2014;34:435-439.

123. Dumit VI, Küttner V, Käßler J, Piera-Velazquez S, Jimenez SA, Bruckner-Tuderman L ve ark. Altered MCM protein levels and autophagic flux in aged and systemic sclerosis dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2014;134:2321-2330.

124. Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, Martin JE, Zhou X, Chen WV ve ark. ImmunoChip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2014;94:47-61.

125. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C ve ark. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost*. 2014;12:2074-2088.

126. Liu C, Zhou X, Lu J, Zhu L, Li M. Autophagy mediates 2-methoxyestradiol-inhibited scleroderma collagen synthesis and endothelial-to-mesenchymal transition induced by hypoxia. *Rheumatology*. 2019;58:1966-1975.

127. Mori T, Tamura N, Waguri S, Yamamoto T. Autophagy is involved in the sclerotic phase of systemic sclerosis. *Fukushima J Med Sci*. 2020;66:17-24.

128. Qing YF, Zheng J, Wang SB, Dai F, Jiang Y, He YX ve ark. Expression And Clinical Significance Of Autophagy-Related Genes In Peripheral Blood Mononuclear Cells Of Systemic Sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2021;80:443.

129. Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 2006;116:615-622.

130. Vainshtein A, Tryon LD, Pauly M, Hood DA. Role of PGC-1 α during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;308:710-719.

131. Zhang Y, Shen L, Zhu H, Dreissigacker K, Distler D, Zhou X ve ark. PGC-1 α regulates autophagy to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(9):1227-1233.
132. Zehender A, Li YN, Lin NY, Stefanica A, Nüchel J, Chen CW, ve ark. TGF β promotes fibrosis by MYST1-dependent epigenetic regulation of autophagy. *Nat Commun* 2021;12:4404.
133. Frenger Q, Lucas J, Petitdemange A, Path L, Wadier N, Depauw S ve ark. LC3-associated phagocytosis is impaired in monocyte-derived macrophages from systemic sclerosis patients. *bioRxiv* 2024.03.21.586112
134. Heckmann BL, Boada-Romero E, Cunha LD, Magne J, Green DR. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. *J Mol Biol.* 2017;429:3561-3576.
135. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-408.
136. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD ve ark. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85.
137. Yuksel Egrilmez M, Kocturk S, Aktan S, Oktay G, Resmi H, Simsek Keskin H ve ark. Melatonin prevents UVB-induced skin photoaging by inhibiting oxidative damage and MMP expression through JNK/AP-1 signaling pathway in human dermal fibroblasts. *Life.* 2022;12(7):950.
138. Wu DJ, Adamopoulos IE. Autophagy and autoimmunity. *Clin Immunol.* 2017;176:55-62.
139. Xue S, Lin Y, Chen H, Yang Z, Zha J, Jiang X ve ark. Mechanisms of autophagy and their implications in dermatological disorders. *Front Immunol.* 2024;15:1486627.
140. Bellando-Randone S, Del Galdo F, Lepri G, Minier T, Huscher D, Furst DE, Allanore Y ve ark. Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis collaborators. Progression of patients with Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a five-year analysis of the European Scleroderma Trial and Research group multicentre, longitudinal registry study for Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis (VEDOSS). *Lancet Rheumatol.* 2021;3:e834-843.
141. Hanna, D.; Furst, D.E.; Clements, P.J.; Allanore, Y.; Baron, M.; Czirjak, L.; Distler, O.; Foeldvari, I.; Kuwana, M.; Matucci-Cerinic, M.; et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* 2017;2:11-18.

142. Becker M, Graf N, Sauter R, Allanore Y, Curram J, Denton CP ve ark. Predictors of disease worsening defined by progression of organ damage in diffuse systemic sclerosis: a European Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) analysis. *Ann Rheum Dis.* 2019;78: 1242-1248.
143. Kayser C, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis: Unanswered Questions. *Front Immunol.* 2015;6:167.
144. Boonstra M, Mertens BJA, Bakker JA, Ninaber MK, Ajmone Marsan N, van der Helm-van Mil AHM, Scherer HU ve ark. To what extent do autoantibodies help to identify high-risk patients in systemic sclerosis? *Clin Exp Rheumatol* 2018;36(Suppl):10-117.
145. Walker UA, Tyndall A, Cziráj L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O ve ark. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: A report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:754-763.
146. Truchetet ME, Brembilla NC, Chizzolini C. Current concepts on the pathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2023;64:262-283.
147. Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P ve ark. Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal* (2021) 40: e108863.
148. Liu C, Guo X, Wei M, Xie J, Zhang X, Qi Q ve ark. Identification and validation of autophagy related genes in SSc. *Open Medicine.* 2024;19:20240942.
149. Kranenburg P, van den Hombergh WMT, Knaapen-Hans HKA, van den Hoogen FHJ, Franssen J, Vonk MC. Survival and organ involvement in patients with limited cutaneous systemic sclerosis and antitopoisomerase-I antibodies: determined by skin subtype or auto-antibody subtype? A long-term follow-up study. *Rheumatology.* 2016;11:2001-2008.
150. Bukiri H, Volkman ER. Current advances in the treatment of systemic sclerosis. *COPHAR.* 2022;64:102211.
151. Khanna D, Tashkin DP, Denton CP, Renzoni EA, Desai SR, Varga J. Etiology, risk factors, and biomarkers in systemic sclerosis with interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;201:650-660.
152. Rangarajan S, Kurundkar A, Kurundkar D, Bernard K, Sanders YY, Ding Q ve ark. Novel mechanisms for the antifibrotic action of nintedanib. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54:51-59.
153. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes MD ve ark. Nintedanib for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *N Engl J Med.* 2019;380:2518-2528.

154. FDA approves first treatment for patients with rare type of lung disease [Internet]. [Erişim tarihi 21 Kasım 2024]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-patients-rare-type-lung-disease#:~:text=The%20U.S.%20Food%20and%20Drug,for%20this%20rare%20lung%20condition> ().

155. Wilhelm M, Bonam SR, Schall N, Bendorius M, Korganow AS, Lumbroso C ve ark. Implication of a lysosomal antigen in the pathogenesis of lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2021;120:102633.



KATKI

Bu araştırma, Dokuz Eylöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi 2020.KB.SAG.067 ve Törkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 223S546 sayılı projeleri tarafından desteklenmiştir.



EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Mehtap Yüksel Eğrilmez

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4249-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input type="checkbox"/> DOKTORA <input checked="" type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sistemik Skleroz Hastalarında Alt Gruplar ve Hastalık Süresi ile Otofaji Arasındaki İlişkinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI-ve UZMANLIK ALANI	Dr.Öğr.Üyesi Mehtap Yüksel Eğrilmez Sağlık Bilimleri Ens.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/22-49	Tarih:13.09.2018
	Dr.Öğr.Üyesi Mehtap Yüksel Eğrilmez'in sorumlusu olduğu "Sistemik Skleroz Hastalarında Alt Gruplar ve Hastalık Süresi ile Otofaali Arasındaki İlişkinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

EK-2: ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Şubat 2018 - Şu Anda (6 yıl 10 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.94 / 4.0

01 Ocak 2014 - 01 Ocak 2017 (3 yıl 1 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BOTANİK (YL)
Tez Başlığı: Biyokömür Uygulamalarının, Toprak Tuzluluğunun Bitkide Negatif Etkilerini İyileştirme Potansiyeli
Tez Konusu: Tuz Ve Kuraklık Stresi Altındaki Phaseolus Vulgaris Sp Bitkisinde Toprak İyileştiricisi Olarak Biyokömür Kullanımı.
Tarih: 2015
Diploma Numarası: 27.01.2017
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.65 / 4.0

01 Eylül 2007 - 01 Haziran 2012 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 20.06.2012
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.72 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Nisan 2021 - Şu Anda (3 yıl 8 ay) (Tam Zamanlı)
ÖĞRETİM GÖREVLİSİ, İZMİR TINAZTEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK HİZMETLERİ
MESLEK YÜKSEKOKULU TIBBİ HİZMETLER VE TEKNİKLER BÖLÜMÜ PATOLOJİ
LABORATUVAR TEKNİKLERİ PR. (TAM BURLU)

Mayıs 2013 - Mart 2017 (3 yıl 11 ay) (Tam Zamanlı)
TEKNİK PERSONEL, ÖZEL TIBBİ GÜNEŞ PATOLOJİ LABORATUVARI
İdari Görev: TEKNİK PERSONEL

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Anahtar Kelimeler

Skleroderma

Otofaji

Otoimmünite

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

H. Y. YALÇIN, U. KARABAY, T. ÇİNLETİ, P. T. KISA, M. Y. EĞRİLMEZ, A. AYAZ & N. AYDIN, Expression of Autophagy-Related Proteins in Microlissencephaly Associated with a Novel Variant in the WDR81 Gene, *Molecular Syndromology*, 2024, 1661-8769.

U. KARABAY, S. A. BAKAN, R. B. HÜSEMOĞLU & M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, A Potential Plant For Wound Dressing: Evaluation of the Pharmacological Activities of *Polygonum Cognatum* Meissn. With A 3D Cell Culture Perspective., *IZTU Journal of Medical and Health Sciences*, 2022, 2791-9749, 1, 2, 75-80.

U. KARABAY, S. AYDEMİR, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, B. BAYKARA & R. B. HÜSEMOĞLU, An in vitro assessment of the responses of human dermal fibroblast seeded on 3D printed thermoplastic polyurethane scaffold, *Journal of Medical Innovation and Technology*, 2021, 2667-8977, 3, 2, 23-27.

U. KARABAY, R. B. HÜSEMOĞLU, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ & H. HAVİTÇIOĞLU, A review of current developments in three-dimensional scaffolds for medical applications, *Turkish Journal of Plastic Surgery*, 2021, 2528-8644, 29, 5, 38-43.

U. KARABAY, R. B. HÜSEMOĞLU, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, S. AYDEMİR GÜNÇ, B. BAYKARA, S. ÇAĞIRAL & H. HAVİTÇIOĞLU, Comparison of the Biological Behaviour of Human Dermal Fibroblasts seeded on 3D Printed Polylactic acid, Polycaprolactone and Polyethylene Terephthalate Scaffolds in vitro, *Journal of Medical Innovation and Technology*, 2021, 2667-8977, 3, 1, 7-13.

N. KANIT, N. E. D. BEKAR, U. KARABAY, G. TUNA, E. ÖZER & G. H. İŞLEKEL, CURRENT STATUS OF CoHE 100/2000 SCHOLARSHIP HOLDERS: EXPERIENCE OF PHD STUDENTS AT DOKUZ EYLUL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES, *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 2021, 2458-8938, 5, 2, 148-155.

U. KARABAY, A. TOPTAŞ TAĞ, J. YANIK & L. AKTAŞ, Does Biochar Alleviate Salt Stress Impact on Growth of Salt-Sensitive Crop Common Bean, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2021, 1532-2416, 52, -, -.

M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, U. KARABAY, S. AYDEMİR, B. BAYKARA & R. B. HÜSEMOĞLU, The cellular responses of human macrophages seeded on 3D printed thermoplastic polyurethane scaffold, *Journal of Medical Innovation and Technology*, 2021, 2667-8977, 3, 2, 40-45.

U. KARABAY, R. B. HÜSEMOĞLU, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ & H. HAVİTÇIOĞLU, 3D Printed Polylactic Acid Scaffold For Dermal Tissue Engineering Application: The Fibroblast Proliferation in Vitro. , *Journal of Medical Innovation and Technology* , 2019, 2667-8977, 1, 2, 51-56.

Bildiriler

U. KARABAY, S. A. BAKAN, R. B. HÜSEMOĞLU, K. HEMMATVAND & M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, Building a scientific research environment by introducing new biotechnological technologies for undergraduates, *Poster Sunumu, 47th FEB5 Congress*, 08 Temmuz 2023, 12 Temmuz 2023, 2211-5463, 13, 2, 256 - 256.

U. KARABAY, T. Y. İNEL, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, F. A. ÖZTÜRK, H. VAYVADA & A. M. BİRLİK, The activation of NLRP3 inflammasome in the dermal fibroblasts of systemic sclerosis patients., Poster Sunumu, 47th FEBS Congress, 08 Temmuz 2023, 12 Temmuz 2023, 2211-5463, 13, 2, 245 - 246.

K. HEMMATVAND, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ & U. KARABAY, Lipopolysaccharide Inhibits Autophagy In Human Dermal Fibroblasts In Vitro, Özet Bildiri, Journal of Advanced Research in Health Sciences, 09 Ağustos 2022, 09 Ağustos 2022.

U. KARABAY, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, R. B. HÜSEMOĞLU, S. AYDEMİR, O. ÇOLPANKAN GÜNEŞ, A. ZİMLAN, B. BAYKARA, F. A. ÖZTÜRK, S. E. ATALMIŞ & C. DEMİRDÖVER, Investigation of Cellular Behaviour of Human Dermal Fibroblasts Seeded On 3D Printed PDMS And TPU Scaffolds., Sözlü Sunum, VII.Turkey in vitro Diagnostic Symposia: Inflammation. Turk J Biochem, 27 Nisan 2022, 27 Nisan 2022, 1303-829X, 47, 1, 45 - 45.

M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, U. KARABAY, S. AYDEMİR, B. BAYKARA & R. B. HÜSEMOĞLU, INVESTIGATION OF THE CELLULAR RESPONSES OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS AND MACROPHAGES SEEDED ON 3D PRINTED THERMOPLASTIC POLYURETHANE SCAFFOLDS, Sözlü Sunum, TBS International Biochemistry Congress 2021 - 32nd National Biochemistry, 27 Ekim 2021, 30 Ekim 2021, 1303-829X, 46, 2, 31 - 31.

U. KARABAY, R. B. HÜSEMOĞLU, S. AYDEMİR, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ, B. BAYKARA, S. ÇAĞIRAL & H. HAVİTÇİOĞLU, Comparison of 3D printed polylactic acid, poly-ε-caprolactone and polyethylene terephthalate scaffolds seeded with human dermal fibroblasts in vitro, Sözlü Sunum, The 45th FEBS Virtual Congress, 03 Temmuz 2021, 07 Temmuz 2021, 2211-5463, 11, 1, 345 - 346.

U. KARABAY, R. B. HÜSEMOĞLU, M. YÜKSEL EĞRİLMEZ & H. HAVİTÇİOĞLU, DERMAL DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMASI İÇİN 3B BASKILI DOKU İSKELESİ: İN VİTRO FİBROBLAST PROLİFERASYONU, Sözlü Sunum, V. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu, 19 Şubat 2020, 21 Şubat 2020, 1303-829X, 45, 1, 13 - 24.

M. KANT, G. TUNA, M. YILMAZ, N. E. DAL BEKAR, N. KANIT, U. KARABAY & G. H. İŞLEKEL, Evaluation of the Theoretical and Practical Course on DNA Damage, Repair and Its Measurement by Tandem Mass Spectrometry., Poster Sunumu, FEBS Workshop on Molecular Life Sciences: Training Tomorrow's Scientists, 05 Eylül 2018, 07 Eylül 2018, 1303-829X, 43, 4, 19 - 20.

G. TUNA, N. E. DAL BEKAR, N. KANIT, U. KARABAY & G. H. İŞLEKEL, Molecular Medicine ORPHEUS-PhD Program in Dokuz Eylül University Graduate School Of Health Sciences. , Poster Sunumu, Biyotıp ve Sağlık Alanında Lisansüstü Danışmanlık: ORPHEUS Yaklaşımı, 21 Haziran 2018, 22 Haziran 2018, 1303-829X, 43, 3, 20 - 20.

N. KANIT, N. E. D. BEKAR, U. KARABAY, G. H. İŞLEKEL & E. ÖZER, POSTER SUNUM ÖZETLERİ / POSTER PRESENTATION ABSTRACTS, Poster Sunumu, Workshop on PhD Supervision in Biomedicine and Health Sciences: ORPHEUS Perspective, 20 Haziran 2018, 22 Haziran 2018, 1303-829X, 43, 3, 19 - null.

N. KANIT, N. E. DAL BEKAR, U. KARABAY, G. H. İŞLEKEL & E. ÖZER, YÖK 100/2000 Doktora Burslu Dokuz Eylül Üniversitesi ORPHEUS Doktora Program Öğrencileri., Poster Sunumu, Biyotıp ve Sağlık Alanında Lisansüstü Danışmanlık: ORPHEUS Yaklaşımı, 21 Haziran 2018, 22 Haziran 2018, 1303-829X, 43, 3, 20 - 20.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Dış Kulak Malformasyonun Kişiyi Özel Anatomi Rekonstrüksiyonuna Yönelik 3 Boyutlu Basım Tekniği ile Oluşturulmuş Biyomalzeme ve Hücre Kültürlerinin in vitro ve in vivo İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), BURSİYER, Sistemik Skleroz Hastalarında Alt Gruplar ve Hastalık Süresi İle Otofaji Arasındaki İlişkinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TEMEL ARAŞTIRMA, ARAŞTIRMACI, Sistemik Sklerozis Hastalarında NEK7-NLRP3 İnflamazom Yolağının Ekspresyonu ve Fibrozis ile İlişkisi, Yürütülen Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi Romatoloji Anabilim Dalı (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Aralık 2020, 01 Temmuz 2023.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Biyokömür Uygulamalarının, Toprak Tuzluluğunun Bitkide Negatif Etkilerini İyileştirme Potansiyelinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), 01 Nisan 2015, 01 Aralık 2016.

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Uluslararası, 45. FEBS Kongresi Genç Bilim İnsanı Bursu, Kongreye kayıt ve sözlü sunum, Ödül Alınan Kurum: Federation Of European Biochemical Societies (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), SLOVENYA, 03 Temmuz 2021.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, YÖK 100/2000 Doktora Bursu, Doktora sırasında burs desteği, Ödül Alınan Kurum: YÜKSEKÖĞRETİM KURULU BAŞKANLIĞI , TÜRKİYE, 25 Ağustos 2017.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

2235546, Sistemik Skleroz Hastalarında Alt Gruplar ve Hastalık Süresi ile Otofaji Arasındaki İlişkinin Araştırılması, Yürütücü, Yürürlükte, SBAG - Sağlık Bilimleri? Araştırma Destek Grubu, 1002 - Hızlı Destek / Hızlı Destek - B, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrıma Tarihleri: 01.12.2023 - (), Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.12.2023 - 01.06.2024.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	ÜİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0

EK-3: VERİ TOPLAMA FORMU ÖRNEĞİ

VERİ KAYIT ÖRNEĞİ FORMU

HASTA BİLGİLERİ	
HASTA KODU:	
TLF:	
YAŞ:	
İLK TANI TARİHİ:	
MODİFİYE RODNAN DERİ SKORU:	
UCLA-GIT 2.0 ANKET SKORU:	
KULLANILAN İLAÇLAR:	

EK-4: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU ÖRNEĞİ

1. Çalışmanın adı:

Sistemik Skleroz Hastalarında Alt Gruplar ve Hastalık Süresi İle Otofaji Arasındaki İlişkinin Araştırılması

2. Araştırmacıların adları, kurumları ve iletişim numaraları:

Dr. Öğretim Üyesi Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ahmet Merih BİRLİK

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmunoloji-Romatoloji Bilim Dalı

3. Araştırma amacının anlaşılır ve özet açıklaması:

Hastalığınızla ilgili bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Lütfen biraz zaman ayırın ve aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun, isterseniz başkalarıyla tartışın. Açık olmayan bir bölüm varsa ya da daha ayrıntılı bilgiye ihtiyaç duyuyorsanız lütfen bizi arayın. Ancak araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

Sistemik skleroz hastalığı nadir görülen bir hastalık olması nedeniyle, günümüzde hastalıkla ilgili bilgimiz sınırlı kalmıştır. Bu yüzden hastalığın tanısı ve tedavisi için sizin gibi hastaların katılımıyla araştırma yapmak ileride daha erken tanı koymamız ve hastalığı tedavi edebilmemiz için bilgi edinmemizi sağlayacaktır. Bu çalışmada hastalığa yol açtığını düşündüğümüz mekanizmayı araştırmak istiyoruz. Bu amaçla kanda araştıracağımız moleküller aracılığı ile hastalığınızın mekanizmasını inceleyeceğiz. Böylece ileriki zamanlarda hastalığınızın nasıl seyredeceğini tahmin edebilmemize olanak sağlanacaktır.

4. Neden ben seçildim?

Sistemik skleroz hastalığı tanısı konulduğu ve bu nedenle Romatoloji polikliniğinde takip edildiğiniz için bu çalışmaya seçildiniz. Bu çalışmaya, sizin de dahil olduğunuz, yaklaşık 52 sistemik skleroz hastası ve 52 kontrol gönüllüsü kişinin katılması planlanmaktadır.

5. Araştırmaya katılmak / bir kez katıldıktan sonra sonuna kadar devam etmek zorunda mıyım?

Araştırmaya gönüllü olarak katılmaktasınız. Katılmayı reddettiğinizde ya da kabul ettikten sonra vazgeçtiğinizde herhangi bir yaptırım (para cezası veya kınama) uygulanmayacaktır. Çalışmadan ayrılmanızın çalışmaya herhangi bir zararı olmayacaktır. Hastalığınız için tedaviniz takip edilmekte olduğunuz Romatoloji kliniğinde eskisi gibi devam edecektir.

6. Araştırmanın nerede yapılacağı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı İmmünoloji-Romatoloji Bilim Dalı'nda gerçekleştirilecektir.

7. Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:

Haziran 2021, 1 yıl

8. Katılmayı kabul edersem bana ne yapılacak?

Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, poliklinik kontrolleriniz sırasında bilgilerinizin kaydedileceği bir form doldurulacaktır. Bu formda yaşıınız, hastalığınızın ne zaman ortaya çıktığı, kullandığınız ilaçlar, deri muayene bilgileriniz ile ilgili bilgiler yer alacaktır. Rutin kontrolleriniz sırasında alınan kan örneğine ek kan örneği alınacaktır. Bu kan örneği rutin laboratuvar işlemleriniz sırasında bir kez alınacak ve tekrar işlem yapılmayacaktır. Araştırmanın sonunda sizin gibi hastalardan toplanılan ek kan örneğinde hastalığınızın mekanizmasını açıklayacak moleküller araştırılacaktır. Araştırma için ayıracağınız zaman poliklinik kontrolleriniz sırasında yaklaşık yirmi dakikadır. Kan örneği dışında araştırma için yapılacak işlemler rutin kontrolleriniz sırasında yaptığımız işlemlerle aynıdır. Sizden alınacak olan kan örneği başka bir çalışmada kullanılmayacaktır. Kontrol grubu gönüllülerden de bir kez kan alınacaktır. Bu alınan kan normal hastaneye geldiğinizde yapılan basit rutin incelemelerinde alınan kan işleminden daha fazla risk taşımamaktadır. Kan örnekleriniz, Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarında alınacaktır. Alınan örnekler çalışma bitiminde imha edilecektir.

9. Araştırmaya katılmanın olası dezavantajları ve riskleri nelerdir?

Araştırmaya katılmanızın sizin açınızdan herhangi bir riski bulunmamaktadır.

10. Araştırmaya katılmanın olası yararları nelerdir?

Araştırmaya katılmanın size hemen dönecek bir faydası bulunmamaktadır. Hastalığınız nadir görülen bir hastalık olduğundan, araştırma sonucunda elde ettiğimiz bilgiler sizin gibi hastaların tanısına ve tedavisine katkı sağlayacaktır. Hastalığınızın nasıl seyredeceğini, ilerde sizi nasıl sorunların beklediğini ve ne tür tedavi önlemleri almamız gerektiği konusundaki bilgilerimize katkı sağlayacaktır.

11. Araştırma masrafları:

Herhangi bir yan etkisi ya da gönüllüye zararı bulunmayan araştırma için yapılan incelemeler için gerekli masraflar siz veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum ya da kuruluşa ödetilmeyecektir. Bununla birlikte çalışmaya katılımınızla ilgili size bir ödeme yapılmayacaktır.

12. Araştırmada ters giden bir şey olursa?

Araştırma sırasında sağlığınız açısından hiçbir risk bulunmamaktadır.

13. Kimlik bilgilerim ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak?

Araştırma süresince sizden elde edilen tüm bilgiler gizli kalacaktır. Gizlilik için gönüllülerin her birine bir numara verilecektir. Bilgilerinize yalnızca araştırmada yer alan kişiler ulaşabilecektir.

Kimlik bilgileriniz gizli tutularak, hastalığınızla ilgili bilgiler depolanacak ve yalnızca bu hastalıkla ilgili eğitim amaçlı toplantı ve bilimsel yayınlar için kullanılacaktır.

14. Araştırma sonunda bana bilgi verilecek mi?

Araştırmanın sonunda arzu ettiğiniz takdirde sonuçlar ile ilgili size bilgi verilecektir. Sonuçların ve yayınların kopyası temin edilecektir. Bunun için aşağıdaki telefonda araştırmacılara ulaşabilirsiniz.

15. Araştırma sonuçlarına ne olacak?

Araştırma sonuçları bilimsel bir dergide yazı olarak veya bilimsel bir toplantıda poster olarak sunulması planlanmaktadır. Hiçbir yayında kişisel bilgileriniz yer almayacaktır.

16. Daha ayrıntılı bilgi için,

Haklarınız ve araştırmayla bağlantılı olarak bilgi almak için irtibat kurulacak kişiler:

Dr. Öğretim Üyesi Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ahmet Merih BİRLİK

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmunoloji-Romatoloji Bilim Dalı

17. Teşekkür:

Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz için teşekkür ederiz.

GÖNÜLLÜNÜN ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı.

(.....
.....) kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (Kan) sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına ve bu koşullarla söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün; (El yazısı ile):

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Telefon:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)
Vasinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Telefon:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin; (El yazısı ile):

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Telefon:

Araştırma yapan araştırmacının; (El yazısı ile):


Adı Soyadı:



Tel:

Tarih:

İmza:



Expression of Autophagy-Related Proteins in Microlissencephaly Associated with a Novel Variant in the *WDR81* Gene


Subject Area:  Genetics


Hatice Yelda Yalçın ; Ufkay Karabay; Tayfun Cinleti; Pelin Teke Kısa ;
Mehtap Yüksel Eğrilmez; Akif Ayaz; Nihal Aydın

Mol Syndromol 1–10.

<https://doi.org/10.1159/000540339>  Article history

 Share 

 Tools 

 Get Permissions

Abstract

Introduction: Microlissencephaly is a subtype of congenital microcephaly characterized by extreme microcephaly with simplified gyral pattern. Other brain malformations may accompany it. *WDR81* encodes a multi-domain transmembrane protein that is predominantly expressed in the brain and is thought to play a role in endolysosomal trafficking and autophagy. **Methods:** We reported two siblings with microlissencephaly born to consanguineous Turkish parents and reviewed all previously reported patients with *WDR81* variants presenting with severe microcephaly accompanied by congenital brain malformations. Whole-exome sequencing was performed on both siblings. Sanger DNA sequencing was performed on the patients' parents. We also examined LC3, p62, and Beclin 1 mRNA and protein expression levels from blood samples of both siblings using real-time PCR and Western blotting, respectively. **Results:** Whole-exome sequencing revealed a novel biallelic c.4157+5G>A splice variant in the *WDR81* gene in both siblings. In our study, LC3, p62, and Beclin 1 mRNA expression levels were high, LC3 protein expression level was also high and p62 and Beclin 1 protein expression levels were low. **Conclusion:** High LC3 and low p62 protein expression levels supported studies concluding that *WDR81* inhibits autophagy through PI3KC3 inhibition, while low Beclin 1 protein expression level supported studies concluding that autophagy is suppressed in case of loss of function variants in the *WDR81* gene. We suggest that due to its role in endolysosomal trafficking, *WDR81*-related diseases should be included in vesicular trafficking disorders.

Journal Section: [Original Article](#)

Keywords: [WDR81](#), [Novel](#), [Microlissencephaly](#), [Endolysosomal trafficking](#), [Autophagy](#)

Hatice Yelda Yalçın, Ufkay Karabay, Tayfun Cinleti, Pelin Teke Kısa, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Akif Ayaz, Nihal Aydın; Expression of Autophagy-Related Proteins in Microlissencephaly Associated with a Novel Variant in the *WDR81* Gene. *Mol Syndromol* 2024; <https://doi.org/10.1159/000540339>

The activation of NLRP3 inflammasome in the dermal fibroblasts of systemic sclerosis patients



U. Karabay^I, T. Yuce Inel^{II}, M. Yuksek Egrilmez^I, F.A. Ozturk^{III}, H. Vayvada^{IV}, M. Birlik^{II}

ufky.karabay@duzce.edu.tr

^IDepartment of Molecular Medicine, Institute of Health Sciences Dokuz Eylul University, Izmir, Türkiye,

^{II}Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Türkiye,

^{III}Department of Plastic, Reconstructive And Aesthetic Surgery, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Türkiye,

^{IV}Division of Wound Healing, Department of Plastic, Reconstructive And Aesthetic Surgery, Faculty of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Türkiye

INTRODUCTION & AIM

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic autoimmune disease characterized by progressive fibrosis. NLRP3 inflammasome is a key player in regulating host immune responses to infection. NLRP3 inflammasome activation is associated with autoimmune rheumatic diseases. Once NLRP3 is activated, NLRP3 interacts with NEK7, then recruits ASC and caspase1 assembling into NLRP3 inflammasome, which leads to maturation and excretion of proinflammatory cytokines IL1 β and IL18.

The aim of this study is to investigate gene expression levels of NEK7, caspase1, IL1 β , IL18, and type I collagen α 1 chain (COL1A1) in the dermal fibroblasts of SSc patients.

MATERIAL & METHODS

Nine patients with SSc and 3 healthy controls were enrolled in the study and obtained punch biopsy samples of the affected skin over the dorsal mid forearm from each individual. Dermal fibroblasts were prepared from skin samples of SSc patients and healthy controls. Total RNA was isolated from cells and cDNA synthesis was performed. The mRNA expression levels of NEK7, IL1 β , IL18, caspase1 and COL1A1 were measured by real time-PCR. Quantification of gene expression was calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. Data were analyzed using IBM SPSS 24.0 software (significance was accepted as p<0.05).

DERMAL FIBROBLAST ISOLATION

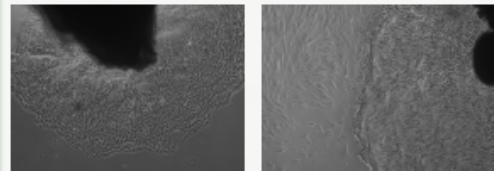
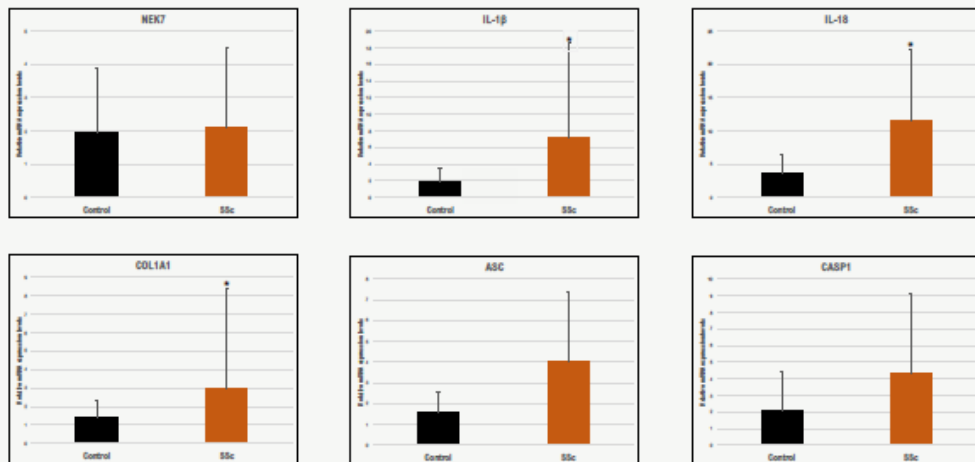


Figure 1. Budding of first fibroblast cells from dermal biopsies (left, 4X), papillary and reticular dermis fibroblasts (right, 10X).

RESULTS

Our results showed that mRNA levels of IL1 β , IL18, and COL1A1 were significantly increased in the dermal fibroblasts of SSc patients compared to healthy controls. Although NEK7 and caspase1 mRNA levels were higher in dermal fibroblasts of SSc patients compared to controls, no significant difference was found between groups.



CONCLUSION: According to our results, it was determined that there is upregulation of ASC, IL-1 β , IL-18, caspase1 and COL1A1 mRNA expression levels with the activation of NEK7-NLRP3 inflammasome pathway in SSc patients. The NEK7-NLRP3 inflammasome pathway is thought to be a potential therapeutic target to treat inflammatory diseases.

Karabay U, Inel TY, Egrilmez MY, Ozturk FA, Vayvada H, Birlik AM. (2023). The activation of NLRP3 inflammasome in the dermal fibroblasts of systemic sclerosis patients. FEBS Open Bio, 13: P-08.5-07. 10.1002/2211-5463.13646.