

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

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

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Berçem AFŞAR KARATEPE**

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

**ELAZIĞ
2015**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murad ATMACA

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA _____

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

TEŞEKKÜR

Ve bazıları ışığın, bazıları da gölgenin peşine düştü...

T.S. Eliot

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalına adım attığım 10 Şubat 2011 tarihinden itibaren ihtisas sürem boyunca katkılarını gördüğüm tüm hocalarıma, Prof. Dr. Emir DÖNDER'e, tez hazırlığı, yazım ve düzeltme aşamalarında yardımını hiçbir zaman esirgememiş olan, daima sabırla ve gülyüzüyle her türlü sorumuza cevap veren bize hem iyi bir ağabey hem de iyi bir hoca olabilen, sorduğumuz her soruya dair tüm ön tanımlarını ve yapmamız gereken tahlil ve tetkikleri 1 dakikaya sığdırabilen, kendisinden asistanlığım boyunca çok şey öğrendiğim çok değerli danışman hocam Romatoloji B D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA'ya, bir ağabey sıcaklığında her türlü problemimize yetişen, bize sürekli cesaret veren, iyi niyetli yaklaşımlarını koruyan ve beyefendiliklerini hiç kaybetmeyen isminin önünde olan ve ilerde olabilecek ünvanları fazlasıyla hak eden sevgili ağabeylerim Uzm. Dr. Servet YOLBAŞ, Uzm. Dr. Ahmet YILDIRIM ve Uzm. Dr. Ali GÜREL'e, tüm İç Hastalıkları AD. Öğretim Üyelerine, tez yapım aşamalarında katkılarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Fikret DURAN ve Sibel OYUCU ORHAN'a ve son olarak, yalnızca asistanlığım süresinde değil hayata gözümü açtığım ilk andan itibaren sevgisini, desteğini ve güvenini her zaman yanımda hissettiğim, başarabildiğim her türlü işte emeği herkesten fazla olan sevgili anne ve babama, uzakta da olsa ilgi ve desteğini eksik etmeyen sevgili kardeşim Duygu AFŞAR ÇOBAN'a ve sadece tezimin hazırlanması sırasında değil hayatımın her aşamasında büyük fedakarlığını ve desteğini gördüğüm sevgili **eşim, hayat arkadaşım Dr. Ümit KARATEPE'** ye teşekkür ederim.

Ve yalnızca bir teşekkürle bunca güzelliğin hakkını veremem, bilirim...

Dr. Berçem AFŞAR KARATEPE

ÖZET

Skleroderma, endotelial hasar ve diffüz interstisyel fibroz ile karakterize bir bağ dokusu hastalığı olup, hastalığın seyri sırasında görülen akciğer fibrozi mortalite ve morbititenin en önemli nedenlerinin başında gelmektedir. Sklerodermanın patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte vaskülopati ve immün aktivasyonun patogeneizde önemli roller aldığı düşünülmektedir. Lapatinib, 4-anilinoquinoline türevi olan bir tirozin kinaz inhibitörüdür. EGFR-1 ve 2'nin intraselüler tirozin kinaz bölgelerine reversibl olarak bağlanır ve substrat fosforilasyonunu inhibe eder. Böylece, MAPK ve PI3K gibi önemli pek çok yolağın akışını durdurur. Sonuç olarak, hücre siklus ilerlemesi, apoptoz, anjiogenez ve hücre adhezyonunu etkilemektedir. Çalışmamızın amacı, bleomisin (BLM) ile oluşturulmuş deneysel skleroderma modelinde lapatinib uygulamalarının profilaktik ve teröpatik etkinliklerinin belirlenmesidir.

Çalışmaya ortalama 6 hafta yaşında ve 20-25 gram ağırlıklarında, 60 adet Balb/c dişi fare alınarak 6 eşit gruba ayrıldı (her grupta n=10). Bleomisin uygulanmayacak olan kontrol grubu farelere (grup A ve grup D), her gün sc fosfat ile tamponlanmış salin (FTS) uygulandı. BLM, FTS içerisinde çözündürülerek, B ve C grubundaki farelere 3 hafta boyunca, E ve F grubundaki farelere 6 hafta boyunca her gün sc 100 µL (100 µg) dozunda uygulandı. BLM'e ek olarak, C grubu (profilaktik lapatinib) farelere çalışmanın ilk gününden başlayarak, F grubu (teröpatik lapatinib) farelere ise 21. günden başlayarak, çalışma sonuna kadar her gün 30 mg/kg dozunda lapatinib sc yolla günde bir defa uygulandı. A, B ve C grup fareler 3. hafta; D, E ve F grubu fareler 6. hafta sonunda sakrifiye edildi ve yapılacak analizler için doku örnekleri alındı. Doku TGF-β1 ve fibronektin-1 mRNA ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile belirlendi. Tekrarlanan subkutan BLM uygulamaları sonucunda; erken ve geç evrede, dermal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, dermal fibroz ve dermal kalınlıkta artış meydana geldi. Benzer şekilde TGF-β1 ve fibronektin-1 mRNA ekspresyonları belirgin artı. Lapatinibin hem profilaktik hem de teröpatik uygulamalarında TGF-β1, ve fibronektin-1 mRNA ekspresyonları belirgin azaldı. Ek olarak, histopatolojik olarak dermal nekro inflamasyon ve dermal fibrozda gerileme tespit edildi.

Sonuç olarak lapatinib BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinde anti-fibrotik etkiler sergileyebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel skleroderma, tirozin kinaz, lapatinib

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF LAPATINIB TREATMENT ON BLEOMYCIN INDUCED EXPERIMENTAL SCLERODERMA MODEL

Scleroderma is a connective tissue disease characterized by endothelial damage and diffuse interstitial fibrosis. Pulmonary fibrosis occurring during the course of disease is one of the most important causes of morbidity and mortality. Although the pathogenesis of scleroderma is not exactly known, it is thought that vasculopathy and immune activation take important roles in pathogenesis. Lapatinib, a tyrosine kinase inhibitor, is a derivative of 4-anilinoquinol. It reversibly binds intracellular-tyrosine kinase regions of EGFR1 and 2, and inhibits substrate phosphorylation. Thus, it stops the flow of many important pathways such as MAPK and PI3K. Consequently, it affects cell cycle progression, apoptosis, angiogenesis and cell adhesion.

The purpose of our study is to determine the prophylactic and therapeutic efficacy of lapatinib on bleomycin (BLM) induced experimental model of scleroderma. 60 Balb/c female mice with average of 6 weeks of age and 20-25 grams in weight were included in this study and they were divided into 6 equal groups as 10 in each group. To the control mice (group A and group D), sc daily saline buffered with phosphate (PBS) was administered. BLM dissolving in FTS was administered daily for 3 weeks to the rats in groups B and C and for 6 weeks to mice in groups E and F sc at a dose 100 mcL (100 mcg). In addition to the BLM, rats in Group C (prophylactic lapatinib) starting from the first day of the study and group F (therapeutic lapatinib) from day 21, received sc lapatinib at a dose of 30 mg/ kg until the end of study. Mice in group A, B and C were sacrificed on third week and those in group D, E and F on sixth week and tissue samples were removed for analyzes. Tissue TGF- β 1 and fibronectin-1 mRNA expressions were determined by RT-PCR method.

Repeated subcutaneous administration of BLM caused, in early and late stages, dermal inflammatory cell infiltration, increase in dermal thickness dermal fibrosis. Similarly; TGF- β 1 and fibronectin-1 mRNA expressions were evidently increased. In both prophylactic and therapeutic applications of lapatinib, TGF- β 1 and fibronectin-1 mRNA expressions decreased markedly. In addition,

histopathologically dermal necro- inflammation and fibrosis wer detected to be decreased.

Lapatinib may exhibit anti-fibrotic effects in BLM-induced dermal fibrosis model. Studies show that lapatinib is a potential therapeutic agent but it needs to be confirmed with in vivo studies.

Keywords: Experimental scleroderma, tyrosine kinase, lapatinib.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Skleroderma	2
1.1.1.1. Tanı Ve Sınıflama	2
1.1.1.2. Epidemiyoloji	3
1.1.1.3. Etyoloji	3
1.1.1.4. Patogenez	4
1.1.1.4.1. Vasküler hasar	4
1.1.1.4.2. İmmun aktivasyon / inflamasyon	5
1.1.1.4.3. Fibroz	5
1.1.1.5. Klinik bulgular	6
1.1.1.5.1 Cilt Tutulumu	8
1.1.1.5.2. Raynaud Fenomeni	9
1.1.1.5.2.1. Primer Raynaud fenomeni	9
1.1.1.5.2.2. Sekonder Raynaud fenomeni	10
1.1.1.5.3. Gastrointestinal Sistem Tutulumu	10
1.1.1.5.4. Akciğer Tutulumu	11
1.1.1.5.5. Kalp Tutulumu	12
1.1.1.5.6. Böbrek Tutulumu	12
1.1.1.5.7. Kas-İskelet Sistemi Tutulumu	12
1.1.1.5.8. Baş-Boyun Tutulumu	13
1.1.1.5.9. Sinir Sistemi Tutulumu	13

1.1.1.6. Ayırıcı Tanı	13
1.1.1.7. Tedavi	14
1.1.1.7.1. Raynaud Fenomeni	14
1.1.1.7.2. GİS Tutulumu	15
1.1.1.7.3. Cilt Tutulumu	15
1.1.1.7.4. Pulmoner Tutulum	15
1.1.1.7.5. Renal Kriz	17
1.1.1.7.6. Kalsinoz	17
1.1.1.7.7. Kök Hücre Transplantasyonu	17
1.1.2 Bleomisin (BLM)	17
1.1.2.1 Bleomisin ile uyarılan dermal fibroz	18
1.1.3. Lapatinib	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Deney Hayvanları	20
2.2. Çalışma grupları ve uygulamalar	20
2.2.1. Kontrol grupları	21
2.2.2. Bleomisin ve Lapatinib uygulamaları;	21
2.3. Doku örneklerinin toplanması	21
2.4. Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler	21
2.5. Doku mRNA düzeylerinin belirlenmesi	22
2.6. İstatistiksel Analizler	22
3. BULGULAR	23
3.1. BLM ile Uyarılmış Dermal Fibroz	23
3.2. BLM ile Uyarılmış Dermal Fibrozun Lapatinib ile Tedavisi	26
4. TARTIŞMA	27
5. KAYNAKLAR	31
6. ÖZGEÇMİŞ	42

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	ACR/EULAR 2013 sistemik skleroz klasifikasyon kriterleri	3
Tablo 2.	Sklerodermaya özgü otoantikorlar ve bu otoantikorların skleroderma alt grupları ve klinik bulgular ile ilişkileri	5
Tablo 3.	Skleroderma grubu hastalıkların sınıflandırılması	7
Tablo 4.	Raynaud Fenomeni Nedenleri	10
Tablo 5.	Skleroderma ayırıcı tanı	14
Tablo 6.	Gruplara göre dermal inflamatuvar hücre sayıları ve dermal kalınlıklar	25

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Skleroderma Patogenezi	6
Şekil 2. Çalışma grupları ve uygulanan tedaviler	20
Şekil 3. Çalışma Grupları histopatolojik bulgular (hemoteksilen eozin, x200)	23
Şekil 4. Çalışma gruplarında ortalama dermal inflamatuvar hücre sayıları	24
Şekil 5. Çalışma gruplarında ortalama dermal kalınlıklar	24

KISALTMALAR LİSTESİ

ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
ACR	: American College of Rheumatology
AECA	: Anti-endotelyal hücre antikoru
ANA	: Anti-nükleer antikor
Anti-Scl-70	: Anti-topoizomeraz I
BLM	: Bleomisin
CEPs	: Endotelyal progenitör hücre
CMV	: Sitomegalovirüs
CTGF	: Kollojen doku büyüme faktörü
dcSSC	: Yaygın cilt tutulumlu sistemik skleroz
DLCO	: Karbonmonoksit difüzyon kapasitesinde
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EBV	: Epstein bar virüs
EGF	: Epidermal growth factor
EGFR	: Epidermal growth factor reseptör
ELUAR	: Avrupa Romatizma Birliği
ERK1	: Ekstraselüler sinyal bağımlı kinaz-1
ESM	: Ekstraselüler matriks
ET	: Endotelin
FTS	: Fosfat ile tamponlanmış salin
FUHADEK	: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
GİS	: Gastrointestinal sistem
GÖR	: Gastroözefagial Reflü
HLA	: İnsan lökosit antijenleri
HPF	: Dermal inflamatuvar hücre sayısı
HRCT	: Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi
ICAM-1	: İnterselüler adhezyon molekülü 1
IL	: İnterlökin
ILD	: İnterstisyel akciğer fibrozu

iv	: İntrevenöz
KKB	: Kalsiyum kanal blokerleri
KML	: Kronik myeloid lösemi
LAP	: Lapatinib
lcSSc	: Sınırlı cilt tutulumlu sistemik skleroz
MAPK	: Mitojen-aktive protein kinaz
MCTD	: Mikst bağ doku hastalığı,
MHC	: Major histokompatibilite kompleksi
MIP-1	: Makrofaj inflamatuvar protein-1
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NO	: Nitrik oksit
PAH	: Pulmoner arteriyel hipertansiyon
PDE-5	: Fosfodiesteraz tip 5
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PI3K	: Fosfatidylinositol 3-kinaz
PM/Scl	: Polimiyozit/skleroderma
RA	: Romatoid Artrit
RF	: Raynaud fenomeni
RNA	: Ribonükleik asit
RNP	: Ribonükleoprotein
RT-PCR	: Real-time polymerase chain reaction
Sc	: Subkutan
SF	: Serum fizyolojik
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
SRC	: Skleroderma renal krizi
SSc	: Sistemik skleroz
STAT	: Signal transducers and activators of transcription
TGF- beta	: Transforme edici büyüme faktörü
TK	: Tirozin kinaz
TNF-alfa	: Tümör nekroz faktör alfa
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Skleroderma (SSc), deri ve iç organlarda ilerleyici fibroz ile karakterize bir bağ dokusu hastalığıdır. Patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte vaskülopati, immün bozukluk ve birçok organda yaygın fibroz ile karakterizedir. Birçok sistemi etkilemekle birlikte organ tutulumunun şiddeti oldukça heterojendir. Gelişen fibroz ve mikrovasküler patolojiye bağlı olarak kalp, akciğer, böbrek ve gastrointestinal sistem etkilenebilmektedir (1).

Skleroderma hastalarının deri biyopsilerinde T lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar başta olmak üzere inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptanmıştır (2). Ek olarak, skleroderma hastalarında tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin (IL)-2, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin serum düzeylerinin yükseldiği ve deri tutulumunun şiddeti ile korele olduğu gösterilmiştir (3). Aktive endotelial hücreler ve inflamatuvar hücreler hücre-hücre etkileşimi ile doğrudan ve çeşitli sitokin, adhezyon molekülü ve büyüme faktörü üretimi ile dolaylı olarak fibroblastları aktive edebilmektedir. Transforming growth factor (TGF)- β bu aşamalarda önemli görevler üstlenmektedir (4).

Ek olarak, epidermal growth factor (EGF) SSc patogenezinde rol alan hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunda önemli görevler üstlenmektedir (5). İnsan dermal fibroblast hücre kültüründe, in vitro EGF uygulamaları TGF- β reseptörü tip II (TGF β RII)'nin ekspresyonunu uyarmıştır (6). Yaygın cilt tutulumlu skleroderma (dcSSc) hastalarından elde edilen inflamatuvar hücrelerde (7) ve skleroderma dermal fibroblastlarda (8). EGF ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir.

Epidermal growth factor ve TGF- α , tip 1 tirozin kinaz reseptör ailesi, ErbB (ErbB1, ErbB2, ErbB3 ve ErbB4'ten oluşur) reseptörlerini uyaran peptid ligand ailesindedir. ErbB1 EGF reseptörü-1 (EGFR-1), ErbB2 ise EGFR-2 (HER2) olarak da bilinir (9). Ekstaselüler liganda bağlanma ile EGFR uyarıldığında, sinyal kaskadındaki proteinleri harekete geçer ve tirozin otofosforilasyonu ve tirozin kinaz aktivitesi başlar. Mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phospholipase C γ ve signal transducers and activators of transcription (STAT) gibi çok sayıda sinyal yolları EGFR tarafından aktive edilmektedir (10).

Lapatinib, 4-anilinoquinoline türevi olan bir tirozin kinaz inhibitörüdür (11). EGFR-1 ve -2'nin intraselüler tirozin kinaz bölgelerine reversibl olarak bağlanır ve substrat fosforilasyonunu inhibe eder (12). Böylece MAPK ve PI3K gibi önemli pek çok intraselüler yolağın akışını durdurur. Böylece, SSc patogenezine etkileri olan, hücre siklus, apoptozis, anjiogenezis ve hücre adhezyonu etkilenmektedir (12, 13). Lapatinibin ifade edilen reseptör, hücre içi yollar ve hücre davranışları üzerine olan bu etkileri SSc tedavisinde etkin olabileceğini düşündürmektedir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1 Skleroderma

Skleroderma cilt ve iç organlarda fibroz gelişimi ile karakterize etyolojisi bilinmeyen bir bağ dokusu hastalığıdır.

1.1.1.1. Tanı Ve Sınıflama

Skleroderma terimi ciltte görülen kalınlaşmayı tanımlamakta ve sistemik sklerozis dışında birçok klinik tabloda ortaya çıkabilmektedir. American College of Rheumatology (ACR) grubunun belirlediği sınıflandırma kriterlerine göre 1 major ve 2 minor kriter varlığında % 91 duyarlılık ve % 99 özgüllük ile SSc tanısı koyulabilmektedir (14).

ACR Skleroderma Sınıflandırma Kriterleri:

Major: Metakarpofalangeal eklemlerin proksimaline kadar uzanan cilt sertliği

Minor: Sklerodaktili

- Parmak uçlarında ülser skarı

- Bibaziler pulmoner fibroz

Ek olarak, 2013' de SSc için yeni tanı kriterleri yayınlanmıştır (Tablo 1).

Bu kriter setinde Raynaud fenomeni (RF), parmaklarda ödem, anormal kapilleroskopik bulgular ve otoantikörler eklendiğinden, erken tanı imkanı sağlamaktadır.

Tablo 1. ACR/EULAR 2013 sistemik skleroz klasifikasyon kriterleri

Her iki elde parmaklar ve Metakarpofalangeal eklemlerin proksimalinde deri kalınlaşması		9
Parmaklarda deri kalınlaşması (Yalnızca yüksek olamı)	Şiş (puffy) parmaklar	2
Parmak ucu lezyonları (Yalnızca yüksek olamı)	Sklerodaktili	4
Telenjiektazi	Parmak ucu ülserleri	4
Anormal tırnak yatağı kapiller	Pitting skar	3
PAH ve veya İnterstisyel Akciğer Hastalığı (maksimum skor 2)		2
RF	PAH	2
Sistemik skleroz ilişkili otoantikolar (maksimum skor 3)	İnterstisyel Akciğer Hastalığı	2
	Anti-sentroner Ak	3
	Anti-Scl 70 Ak	3
	Anti-RNA polimeraz III Ak	3

Sistemik skleroz klasifikasyonu için toplam skor >9 olmalıdır.

1.1.1.2. Epidemiyoloji

Skleroderma insidans ve prevalansı populasyonlara göre farklılık göstermekte, bu da genetik predispozisyonun ve çevresel faktörlerin epidemiyolojide rol oynadığını düşündürmektedir. Prevalansı yaklaşık milyonda 250 iken, insidansı milyonda 20'dir. Kadınlarda 3 kat daha sık görülmektedir (15, 16).

1.1.1.3. Etiyoloji

Skleroderma gelişiminde çevresel ve genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir.

Sklerodermada en göze çarpan genetik faktör cinsiyettir. Diğer bir risk faktörü de insan major histokompatibilite kompleksi (MHC) olup, sklerodermada class I ve II MHC allellerinin sıklığında artış bildirilmiştir. Diğer taraftan, MHC allellerinin doğal seyirleri ve diğer genlerle (HLA Bw35, DR1, DR5 veya HLA I-B8-DR3 vb.) olan ilişkileri tartışmalıdır (17). İnsan lökosit antijenleri (HLA) ile skleroderma arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada, HLA A23, B18 ve DR11 sklerodermalı hasta popülasyonunda yüksek saptanmıştır. Skleroderma alt tipleri ve HLA antijenleri arasında bir korelasyon bulunmazken, HLA B18 ve HLA DR11'in sklerodermanın daha ağır seyirli formlarıyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (18).

Silika tozları, vinil klorid, L-triptofan, meme silikon implantları ve organik çözücüler skleroderma ile ilişkilendirilen çevresel faktörlerdir (19). Mesleki uğraşlar nedeniyle vinil klorid ile karşılaşan işçilerin çoğunda RF ve sklerodermaya özgü deri bulguları gözlenmektedir (20).

Bakteriyel ve viral çeşitli enfeksiyöz ajanların (helikobakter pilori, sitomegalovirüs [CMV], parvovirus B19, epstein bar virus [EBV] ve retroviruslar) skleroderma etiyojisinde rol alabileceği düşünülmüştür (21).

1.1.1.4. Patogenez

Skleroderma, tek bir teori ile açıklanması mümkün olmayan oldukça karışık bir patogeneze sahiptir. Klinik ve patolojik bulgulardan sorumlu üç ana mekanizma olduğu düşünülmektedir (15).

1. Vasküler hasar (özellikle mikrodolaşımda)
2. İmmun sistem aktivasyonu / inflamasyon
3. Fibroz

1.1.1.4.1. Vasküler hasar

Sistemik skleroz (SSc) patogenezinde, vasküler disfonksiyonun en erken evre olduğu düşünülmektedir (22). Özellikle mikrodolaşımda görülen endotelial hasar, aktifleşmiş lenfositler tarafından üretilen sitokinlerle ve endotelial hücrelere karşı gelişen antikorlarla oluşmaktadır (23, 24).

Aktive lenfositler, TGF- β , CTGF ve PDGF salgılamaktadır. TGF- β , endotelial hasara ve MHC ile intersellüler adhezyon molekülünün (ICAM-1) ekspresyonuna yol açmaktadır. PDGF, endotel hücre proliferasyonunu uyarmakta ve VEGF miktarını azaltmakta, sonuç olarak neovaskülarizasyonu uyarmaktadır (22).

Endotelial hasar ve aktivasyon oluştuğundan sonra, vazokonstriktör bir madde olan endotelin-1 (ET-1) artmakta ve vazodilatör mediatör olan nitrik oksit (NO) azalmakta ve sonuç olarak normal vazomotor tonus kaybolmaktadır (24). Ayrıca inflamatuvar hücreler kemoatraksiyon ile hasar bölgesine gelmekte ve damar duvarına yapışmaktadır (25, 26). Subendotel ile temas eden trombositler adhezyona uğrayarak fibrin birikimi ve intravasküler trombüs oluşturmaktadır. Damar duvarındaki kas hücreleri de aktive olarak intimaya doğru ilerlemekte ve myofibroblastlara dönüşmektedir. Bu değişiklikler sonucunda vasküler proliferasyon, damar lümeninde küçülme, kan akımında azalma oluşmakta ve klinik bulgular olan Raynaud fenomeni, parmak iskemisi ve ülserler ortaya çıkmaktadır. İleri evrelerde damar kaybı ve neoanjiogenez ortaya çıkmaktadır (27).

1.1.1.4.2. İmmun aktivasyon / inflamasyon

Sklerodermada ortaya çıkan otoantikoklar, humoral immunitenin patogeneizde rol oynadığını düşündürmektedir. Hastaların % 90'ında antinükleer antikor (ANA) pozitif saptanmaktadır. Anti Scl70 antikor yaygın cilt tutulumlu sistemik skleroz (dcSSc)'lu hastaların büyük çoğunluğunda bulunurken, sınırlı cilt tutulumlu sistemik skleroz (lcSSc)'lu hastaların % 30-40'ında pozitif saptanmaktadır. Antisentromer antikorlar ise lcSSc'li hastaların % 80-90'ında pozitif bulunmaktadır (15).

Sklerodermada hastalığa özgü otoantikokların saptanması, otoantikok tipi ile hastalık fenotipleri arasındaki ilişki (Tablo 2) ve hipergamaglobulinemi, B lenfositlerin SSsc patogeneizindeki rolüne işaret etmektedir.

Tablo 2. Sklerodermaya özgü otoantikoklar ve bu otoantikokların skleroderma alt grupları ve klinik bulgular ile ilişkileri

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

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

Diğer taraftan, SSsc'de B lenfosit homeostazında değişiklik, poliklonal hiperaktivasyon, duyarlı B lenfositlerde artış ve hafıza B lenfositlerde azalma olduğu gösterilmiştir (28). Ek olarak, endotelyal hasara yol açan anti-endotelyal hücre antikoru (AECA) B lenfositler tarafından üretilmektedir.

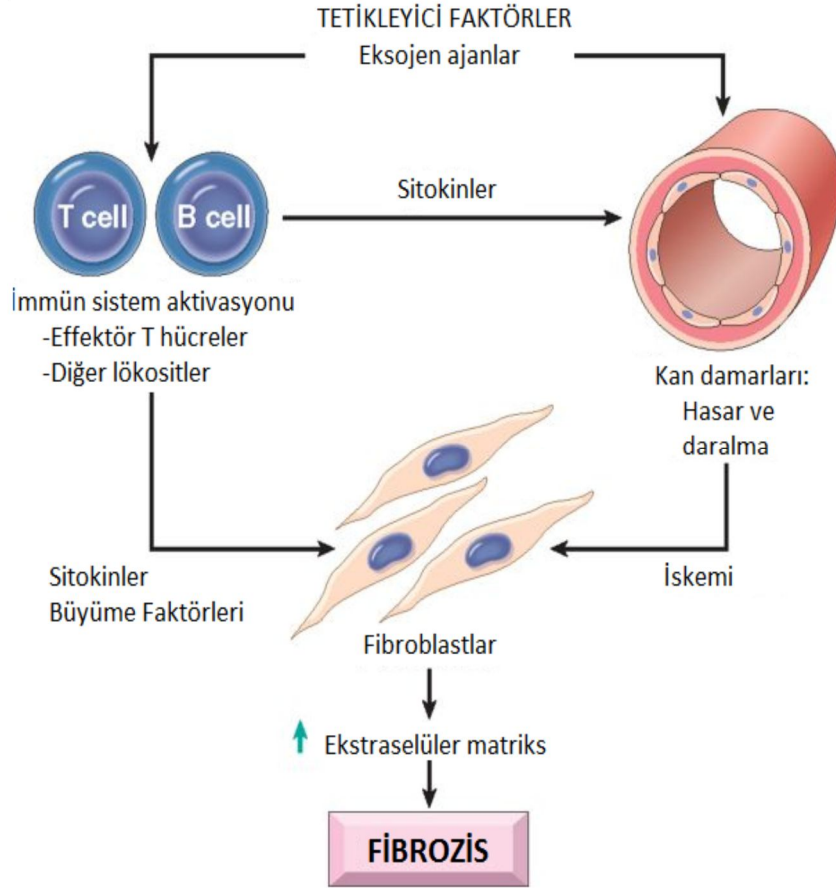
Cilt ve visseral organlarda mononükleer hücre infiltrasyonunun saptanması, hücrel immunité aktivasyonunun bir göstergesidir. Mononükleer hücreler özellikle CD4 T lenfositten oluşmaktadır (29, 30).

1.1.1.4.3. Fibroz

Sklerodermalı hastalarda, fibroblastlar tarafından üretilen Tip 1 ve Tip 3 kollojen miktarında artış görülmektedir. Bağ dokusundaki aşırı ekstrasellüler matriks (ESM) birikiminin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte bilinmeyen bir hasara

cevap olarak yada matriks protein gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki değişimlere bağlı olarak geliştiği düşünölmektedir. Dokudaki inflamatuvar hücrelerden salınan birçok sitokin ve büyüme faktörlerinin kollojen gen ekspresyonuna yol açtığı bilinmektedir (31).

Transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β , aktive lenfosit ve monositlerden salınmakta ve ESM sentezini uyararak, SSc'deki fibroz gelişiminde temel rolü oynamaktadır (32). Ayrıca kollojeni yıkan matriks metalloproteinazlarının üretimini azaltmakta ve proteaz inhibitörlerinin üretimini arttırmaktadır. Böylece ESM yıkımını önlemektedir (33). Bir diğer doku fibroz mediatörü kollajen doku büyüme faktörü (CTGF) olup, cilt ve akciğer fibroblastları tarafından sentez edilmektedir (34).



Şekil 1. Skleroderma Patogenezi

1.1.1.5. Klinik bulgular

Skleroderma klinik bulgularına göre, temelde lokalize ve sistemik skleroderma olarak iki alt gruba ayrılır. Lokalize formlarda (Tablo 3), sistemik sklerodermadan farklı olarak RF, yapısal vasköler zararlanmalar (dijital ülserler,

pulmoner arteriyler hipertansiyon [PAH] vb.), otoimmün belirteçlerde olumluluk ve iç organ tutulumları bulunmamaktadır. En sık görülen lokalize skleroderma formu olan morfea, morfolojik paterni ve etkilenen deri dokusunun genişliğine göre alt gruplara ayrılmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Skleroderma grubu hastalıkların sınıflandırılması (22, 35).

Lokalize (35)	Sistemik (22)
1. Plak morfea	1. Pre-skleroderma
a. Plak morfea	2. Sınırlı kutanöz sistemik skleroz (lcSSC)
b. Guttat morfea	3. Diffüz kutanöz skleroderma (dcSSC)
c. Pasini ve Perini atrofodeması	4. Sklerodermasız skleroderma
d. Keloid morfea	5. Çakışma sendromları
2. Yaygın morfea	
3. Büllöz morfea	
4. Derin morfea	
a. Subkutanoz morfea	
b. Eozinofilik fasiit	
c. Morfea profunda	
5. Lineer skleroderma	
a. Lineer morfea	
b. <i>En coup de sabre</i> skleroderma	

Sistemik formlarda (Tablo 3), deri tutulumuna vaskülopati, otoimmünite kanıtları veya iç organ tutulumuna ilişkin klinik bulgular eşlik etmektedir. Hastalardaki ilk yakınmalar ve klinik bulgular çoğu zaman nonspesifiktir. RF, halsizlik yorgunluk ve kas-iskelet sistemi yakınmaları başlıca klinik bulgulardır. Bu klinik bulgular haftalar aylar boyunca devam edebilir. İlk spesifik bulgu, el ve parmak derisindeki şişlik ile başlayan sertleşmedir. Bu aşamadan sonraki klinik seyir oldukça değişkendir. Klinikte en sık karşılaşılan sistemik formlar olan dcSSC ve lcSSc, temel olarak cilt tutulumu lokalizasyonu ve genişliğine göre ayrılmış olmakla birlikte, pekçok yönüyle farklılıklar göstermektedirler. Preskleroderma ve sklerodermasız skleroderma (scleroderma sine scleroderma) nadir karşılaşılan diğer sistemik klinik formlardır (Tablo 3). Preskleroderma, tipik deri tutulumu olmaksızın, RF ve SSc'ye özgü otoantikörlerin pozitif olduğu veya tırnak yatağı kapilleroskopik anormalliklerinin eşlik ettiği klinik formdur. Sklerodermasız sklerodermada ise SSc'ye özgü deri tutulumu bulunmaksızın, SSc'nin tipik iç organ tutulumları gözlenmektedir.

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

Cilt tutulumunun ekstremitelerin proksimaline ve gövdeye kadar ilerlediği form dcSSc olarak adlandırılmaktadır. lcSSc'den farklı olarak, dcSSc'de RF ile deri tutulumu başlangıcı arasındaki süre daha kısadır. Bu grup hastalarda, sıklıkla anti-sentromer antikor negatif, anti-scl-70 (anti-topoizomeraz-I) antikoruna ise pozitifdir. dcSSc'de, iç organ tutulumu (akciğer, kalp, böbrek ve gastrointestinal sistem) daha siktir ve prognoz daha kötüdür.

1.1.1.5.1. Cilt Tutulumu

Skleroderma cilt tutulumunda sırasıyla ödematöz, enduratif ve atrofik fazlar birbirlerini izler. Hastalar başlangıçta, özellikle sabahları ortaya çıkan parmaklardaki gerginlik ve şişlikten yakınır (ödematöz faz). Çoğu olguda şişlik devamlı bir hal alır. Ödem genellikle ağrısız ve gode bırakmamasına karşın, gode bırakan ödem de görülebilir. Bu fazın süresi değişkendir. Çoğu zaman, ödem daha sonra deri sertliği ile yer değiştirmektedir. Deri sertliği dcSSc'de birkaç ay içinde, lcSSc'de ise birkaç yılda ortaya çıkabilir. Deri sertliğine ek olarak, etkilenen deri zamanla parlaklık kazanmaya, gerginleşmeye ve cilt altı dokusuna sıkıca yapışmaya başlar. Endurasyon fazında dermiste önemli derecede kalınlaşma, epidermiste ise incelmeye gözlenir. Dermiste kollajen birikimi, deride kıvrım (pili) oluşmasının kaybına ve kıl foliküllerinin, ter bezlerinin, yağ bezlerinin kaybına neden olur.

Sonuçta, saç kaybı ve terlemede azalma başlar. Eritem gözlenebilir, ancak sıklıkla hiperpigmentasyon veya hipopigmentasyon alanları bulunmaktadır. Yüzdeki değişiklikler karakteristiktir. 'Sıkılmış burun' görünümü vardır. lcSSc'de telenjektaziler daha belirgindir. Yıllar sonra deri sertliği yumuşamaya başlar veya

normal kalınlığına geri döner ya da normal deriden daha ince bir hal alır (atrofik faz) (36).

Skleroderma hastalarında deri ülserinin etiyolojisi multifaktöryeldir. Parmak ülserleri sıklıkla iskemi nedeniyle oluşur. Kemik çıkıntıları ve proksimal interfalangeal eklemler düzeyindeki ve dirseklerdeki ülserler olasılıkla kontraktür, gerginlik, cilt inceliği ve travma sonucu gelişir.

Diffüz SSc veya lcSSc'li hastalarda, ilerleyen yıllarda, sıklıkla değişik büyüklükte subkutan ve/veya intrakutan kalsinoz (kalsiyum depozitleri) oluşur. Bu depozitler en çok parmak yastıkçıklarında ve periartiküler dokularda gözlenir. Ayrıca olekranon bursası, önkolun ekstensör yüzeyi, patella üzeri ve kalçalar gibi tekrarlayan basınç travması olan bölgelerde de bulunabilir (36).

1.1.1.5.2. Raynaud Fenomeni

Sklerodermalı hastaların % 95'inden fazlasında RF görülür. RF, soğuk veya strese karşı aşırı vasküler yanıt olarak tanımlanmaktadır. Bu vasküler yanıt, deride belirgin renk değişikliğine neden olur. Parmaklar daha sık etkilenir, yüzde de ataklar görülebilir. Tipik RF atağı, 3 fazlı bir olaydır. İlk faz, solukluk ile karakterizedir. Bu fazı siyanoz izler, daha sonra kan akımının yeniden sağlanması ile ağırlı eritem şeklinde 3. faz gözlenir. Bu 3 faz sırasıyla vazokonstriksiyon, iskemi ve reperfüzyon nedenleriyle oluşmaktadır. Ağır formlarda parmak uçlarında küçük iskemik nekroz alanları gözlenebilir (36).

Raynaud fenomeni, Le Roy ve Medsger (37) tarafından önerildiği şekilde, primer ve sekonder tip olarak sınıflandırılmaktadır

1.1.1.5.2.1. Primer Raynaud fenomeni

Primer RF, altta yatan herhangi bir neden bulunmaksızın meydana gelir. Sıklıkla, 15–30 yaşlar arasındaki kadınlarda görülmektedir. Hastaların yaklaşık % 30'nun birinci derece akrabalarında, RF öyküsü bulunmaktadır. Bu grupta sedimantasyon hızı normal, otoantikolar negatif ve normal kapilleroskopi bulguları vardır. Periferik nabızlar normaldir, parmaklarda ülser ve skar gözlenmez (37).

1.1.1.5.2.2. Sekonder Raynaud fenomeni

Sekonder RF'nin en sık nedenleri skleroderma, SLE ve diğer bağ dokusu hastalıklarıdır (Tablo 4). Sekonder RF'li hastalarda genellikle ciddi parmak iskemisi, dijital ülserler ve sıklıkla ağrı bulunmaktadır. Bu grupta otoantikolar pozitif ve anormal tırnak yatağı kapilleroskopi bulguları vardır (37).

Tablo 4. Sekonder Raynaud Fenomeni Nedenleri

Bağ dokusu hastalıkları	Mesleki Nedenler
Polimiyozit- Dermatomyozit	Vibratörlerle çalışma
	Yapısal Arter Hastalıkları
Skleroderma	Ateroemboli
Sjögren Sendromu	Ateroskleroz
SLE	Torasik Outlet Sendromu
Sistemik vaskülitler	Takayasu Arteriti
Farklılaşmamış Bağ Dokusu Hastalığı	Burger Hastalığı
İlaç ve Toksinler	Hematolojik Hastalıklar
Sempatomimetik ajanlar	Soğuk Aglutinin Hastalığı
P Blokerler	Kriyoglobulinemi
Klonidin	Paraproteinemi
Metiserjid	Polisitemi
Ergotamin	Diğer Nedenler
Östrojen	Hipotroidi
Vinblastin, Bleomisin	Paraneoplastik Sendromlar
Kokain	Domna
Siklosporin	Kayıp Tünel Sendromu
İnterferonlar	POEMS (Polrnöropati. Organomegali. Endokrinopati. Monoklonal Gammopati ve Cilt Değişiklikleri).

1.1.1.5.3. Gastrointestinal Sistem Tutulumu

Sklerodermada, gastrointestinal sistem deriden sonra en sık etkilenen bölgedir. Tüm hastaların % 75-90'ında gastrointestinal sistem tutulumu olduğu varsayılmaktadır (38). Gastrointestinal sistem tutulumunun karakteristik özelliği, düz kas fibrozudur (39). Hastaların yaklaşık % 80'inde özefageal disfonksiyon gelişmektedir. Hastalarda alt özefagus sfinkter basıncında azalma, özefageal klirenste bozulma ve gastrik boşalmada gecikme olması nedeniyle gastroözefageal reflü (GÖR) hastalığı gelişir (36).

Sklerodermanın gastrik tutulum belirtileri, gastrik vasküler değişikliklerin neden olduğu gastrik antral vasküler ektazi, gastroparezi ve telenjektazi olarak sıralanabilir. Bazı hastalarda, postprandiyal abdominal distansiyon ve kramp tarzında

abdominal ağrı saptanabilir (38). Ayrıca, üst gastrointestinal sistem kanaması da olabilir.

Hastalığın ince barsak tutulumunda 2 klinik tablo ile karşılaşılır. Birincisi, aşırı bakteri çoğalması nedeniyle gelişen diyare ve malabsorbsiyon, ikincisi ise mekanik ileus semptomlarını taklit eden fonksiyonel ileustur (psödoobstrüksiyon).

Kolonik ve anorektal tutulumda ise şiddetli konstipasyon gözlenir. Kolonik tutulumda, ek olarak megakolon ve divertikül gelişebilir. Anorektal kapasite, motilite ve komplians azalması ile sfinkter basıncında azalma, rektal prolapsus ve fekal inkontinansa neden olabilir (38).

1.1.1.5.4. Akciğer Tutulumu

Sklerodermada gastrointstnol sistemden sonra en sık tutulan organ akciğerlerdir. Akciğer tutulumu, % 40–90 sıklığında bildirilmektedir. Erkek cinsiyet, dcSSc, difüzyon kapasitesinde azalma ve inflamatuvar belirteçler akciğer tutulumunun şiddeti ile ilişkilendirilmektedir (40).

SklerodermadaILD ve Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) olmak üzere iki tip pulmoner tutulum izlenmektedir (41).ILD, hem IcSSc hem de dcSSc tiplerlerinde en sık karşılaşılan pulmoner tutulum tipidir.ILD prevalansı tanının akciğer grafisi, yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (HRCT) veya solunum fonksiyon testleriyle konulmasına göre % 33–90 arasında değişmektedir (42).

Sklerodermada, akciğerlerdeki fibroblastların kollajen yapımı artmıştır. Hastalığın erken dönemlerinde, akciğer hasarı başlamadan önce, alveollerde inflamatuvar hücre birikimi olmaktadır. Sklerodermada, akciğer fibrozu alveolit geliştikten sonra başlamaktadır. Sklerodermadaki alveolit alveoler makrofaj, lenfosit, nötrofil ve eozinofillerin birikimiyle karakterizedir. Sklerodermada akciğer fibrozu akciğer fonksiyonlarında bozulmaya, respiratuvar volümde ve difüzyon kapasitesinde azalmaya neden olur (43).

Pulmoner arteriyel hipertansiyon, hastaların yaklaşık % 10-15'inde görülmektedir. Ancak, sağ kalp kateterizasyonu ve ekokardiyografi ile hastaların % 20-40'ında PAH saptanabilir. PAH, IcSSc'de dcSSc'den daha sık görülmektedir (36).

Pulmoner arteriyel hipertansiyon, sklerodermada başta gelen ölüm nedenlerindedir. PAH varlığında 5 yıllık sağ kalım oranları, % 90'dan % 50-70'lere

inmektedir (44). PAH'da arteriollerde konsantrik intima proliferasyonu, mediada hipertrofi ve miksomatoid dejenerasyon görülmektedir. Sonuçta, damar lümeninde daralma ve pulmoner sirkülasyon basıncında artış görülür (40). CREST sendromunda, fibroz bulunmaksızın irreversible PAH gelişebilmektedir (45). PAH'ın en iyi tarama yöntemi, doppler ekokardiyografidir (40).

1.1.1.5.5. Kalp Tutulumu

Patoloji serilerinde, hastaların % 81'inde yama tarzında myokardiyal fibroz bulgusuna rastlandığı bildirilmektedir (46). Myokardiyal tutulumun hastaların yaşam beklentisinde önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (47). Ancak myokard ve ileti sisteminin tutulumu genellikle subklinik seyretmektedir. Myokardiyal Raynaud fenomeninin bir sonucu olarak kardiyak iskemi ve ileti sisteminin tutulumu nedeniyle taşiaritmiler ortaya çıkabilmektedir. Aritmiler çoğu zaman subklinik seyretmekle birlikte fatal de olabilmektedir (48).

1.1.1.5.6. Böbrek Tutulumu

Sklerodermanın iç organ tutulumları arasında en kötü prognoz ve en yüksek mortalite nedeni böbrek tutulumudur. Klinik olarak, skleroderma hastalarının % 10–40'ında böbrek tutulumu bulunmaktadır. Ancak, bu oran otopsilerde % 80'lere ulaşmaktadır (49). Diffüz deri tutulumlu hastalar, görme bozuklukları ve baş ağrılarının görüldüğü malign arteriyel hipertansiyonla karakterize akut skleroderma renal kriz (SRK) için yüksek risk taşırlar (50). Ek olarak, Anti-RNA polimeraz III antikör varlığı da akut SRK ile ilişkilendirilmiştir (51). Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, SRK'ye bağlı ölümleri azaltmıştır. ACE inhibitörlerinin kullanımından önce, SRK çoğunlukla ölümlerle sonuçlanırdı. ACE inhibitörlerinin kullanımı ile diyaliz gereksinimi ya tamamen ortadan kalkmakta ya da geçici diyaliz gerekmektedir (49). SRK, çoğunlukla ilk 4 yılda gelişmektedir. Ancak, SRK'nin kronik formu yıllar sonra ortaya çıkar ve hastaların % 50'sinde renal fonksiyonlarda ılımlı azalma dışında klinik bulgu göstermez. Proteinüri, azotemi, arteriyel hipertansiyon (>140/90 mmHg) ve glomerüler filtrasyon hızında azalma belirlendiğinde SRK olasılığı düşünülmelidir (50).

1.1.1.5.7. Kas-İskelet Sistemi Tutulumu

Sklerodermalı hastalarda, kas güçsüzlüğü çok yaygın olarak gözlenen bir bulgudur (% 60–70). Sklerodermadaki kas tutulumu, kreatin kinaz ve aldolaz

düzelelerindeki minimal artış ve elektromiyografideki polifazik motor ünit potansiyelleri ile gösterilebilmektedir. Bununla birlikte, hastaların % 6–12'sinde inflamatuvar poliartrit ile polimiyozit ayırt edilemeyebilir (52). Sklerodermalı hastaların 2/3'ünde, ilk bulgu artrit olabilir. Sıklıkla, artrit tipik cilt değışikliklerinden sonra ortaya çıkmaktadır. Hastalık başlangıcında yakınmalar RA ile benzerlik göstermesine karşın, skleroderma RA'ya göre daha az destrüktif bir hastalıktır. Sklerodermadaki kontraktürler, tendon ve periartiküler bölgedeki yapıların fibrozundan kaynaklanmaktadır. Tendonların etrafındaki bölgeler etkilendiğinde, eklemlerin aktif ve pasif hareket açıklığı kısıtlı ve ağrılıdır (53). dcSSc'de sıklıkla simetrik poliartralji, sinovit ile birlikte veya sinovit bulunmaksızın eklemlerde sertlik, miyalji ve deride şişlik gözlenebilir (36).

Skleroderma hastalarının % 6'sında kemik tutulumu görülebilir. Proksimal falankslar ve metakarpal kemiklerde erozyonlar, terminal falankslarda taft rezorbsiyonu ve eklem komşuluğunda osteoporoz görülebilir. Sklerodermada, hastaların % 9–15'inde eklem aralığında daralma ve marjinal erozyonlar görülebilir.

1.1.1.5.8. Baş-Boyun Tutulumu

Skleroderma hastalarında, gözyaşı ve tükürük bezi tutulumlarına bağılı olarak ağız kuruluğı ve göz kuruluğı sık gözlenir. Ayrıca, blefarit ve retinal hemorajiler saptanabilir. Ligament fibrozu nedeniyle ağız açıklığında azalma olabilir. Tükürük salgısında azalma sonucu yutma güçlüğü, oral kandidiyazise yatkınlık ve diş çürükleri gözlenebilir (36).

1.1.1.5.9. Sinir Sistemi Tutulumu

Sklerodermalı hastaların % 40'ında nörolojik tutulum görülebilmektedir (54). Kranial ve periferik sinir tutulumları ve otonom nöropati bulunabilir. Santral sinir sistemi tutulumu, renal veya kardiyopulmoner tutulumlara ikincil olarak gelişmektedir. Nöropati, asemptomatik olabilir. Ancak, otonom sinir sistemi tutulumu yaşamı tehdit edebilir (55).

1.1.1.6. Ayırıcı Tanı

Eozinofilik fasiit, derin fasyanın inflmasyonu ve kalınlaşması ile karakterizedir. Erkekler de daha sıktır. Ekstremiteler ve gövde de progresif sertleşme mevcuttur. Tanı epidermisten kasa kadar uzanan biyopsi ile konur. Biopside derin

fasya, cilt altı ve dermisin skleroz ve inflamasyonu bulunur. Kortikosteroid sempatik iyilik sağlar. Tedavi edilmeyen olgularda 2-5 yıl içinde klinik iyileşme görülür.

Eozinofili myalji sendromunda, triptofan alımını takiben SSc' ye benzer cilt bulguları görülür. Eozinofili, periferik nöropati, myalji ile karakterizedir. Kortikosteroid tedavisi ile eozinofili hızla düzelir ancak semptomlar genellikle kronik seyirlidir.

Nefrojenik fibrozan dermopati; kronik diyaliz programında olan veya yeni dönemde böbrek nakli yapılmış son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda godolinyum içeren kontrast madde sonrası gelişen ve yeni tanımlanan fibrozla karakterize bir durumdur.

Tablo 5. Skleroderma ayırıcı tanısı (56, 57)

1. Raynaud Fenomeni ile birlikte giden hastalıklar	C. Visseral tutulum yapan hastalıklar
2. Ciltte sertleşme ile birlikte olan hastalıklar	
A. El parmaklarını tutan hastalıklar	<ul style="list-style-type: none">• Primer pulmoner HT• Primer biliyer siroz• İdiyopatik interstisyel akciğer fibrozu• İnfiltratif kardiyomyopati• Kollajen kolit
<ul style="list-style-type: none">• Miks tip konnektif doku hastalığı• Diabetik parmak sklerozu• Vinil klorür hastalığı• Bleomisine bağlı skleroderma• Primer amiloidoz• Mukozis fungoides• Erişkin çölyak hastalığı• Kronik refleks sempatik distrofi• Toksik yağ sendromu	D. Fibroz yapan diğer nedenler
B. El parmaklarını tutmayan hastalıklar	<ul style="list-style-type: none">• Kronik "graft-versus-host" hastalığı• İnsüline bağımlı diabetes mellitus• Lokal lipodistrofi• Myelom• Fenilketonüri• POEMS• Porfiria kutenea tarda• Progeria• Werner• Nefrojenik fibrozan dermopati

1.1.1.7. Tedavi

Sistemik sklerozisde tedavi teorik olarak erken inflamatuvar fazda daha fibrotik değişiklikler ortaya çıkmadan yapılmalıdır. Bununla birlikte mevcut tedaviler büyük oranda semptomatiktir. Hastalığın gelişmesini engelleyen veya geciktiren "hastalık modifiye edici" uzun etkili bir ilaç yoktur. Mevcut tedaviler yaşam kalitesini düzeltme ve mortaliteyi azaltmada yardımcıdır.

1.1.1.7.1. Raynaud Fenomeni

Öncelikle ortam sıcaklığının ayarlanması ve soğuğa maruziyetten kaçınılması gerektiği bilinmelidir. Sigara kullanımı, soğuk algınlığı ilaçları gibi semptomimetik

ajanlar, propranolol gibi non selektif β blokerler ve narkotikler gibi RF'yi kötüleştirecek ilaçlardan uzak durulmalıdır. İlaç tedavisi sistemik vazodilatörleri, antiplatelet ajanları ve antioksidanları kapsar. Kalsiyum kanal blokerleri skleroderma hastalarındaki RF tedavisinde atakların sıklığını ve şiddetini azaltır (58). Losartan ve nifedipinin karşılaştırıldığı bir çalışma da kısa dönem RF tedavisinde losartan daha etkili bulunmuştur (59). Alfa-1 inhibitörü olan prazosin ile plesebo karşılaştırmalı iki randomize kontrollü çalışmada; SSc'ye sekonder RF tedavisinde plesebadan üstün olduğu gözlenmiştir (60). İntravenöz iloprost kullanımının, SSc'ye sekonder RF sıklığında, şiddetinde ve parmak ülserlerinde belirgin azalma sağladığı gözlenmiştir (60). Serotonin uptake inhibitörü fluoksetinle yapılan bir çalışmada RF'nin semptomlarının iyileştiği gösterilmiştir (61). Etkilenen parmağa lokal olarak lidokain ya da bupivakain ile yapılan kimyasal sempatektominin hızlı bir rahatlama sağladığına yönelik çalışmalar vardır (62, 63). Özellikle dirençli vakalarda sempatektomi düşünülmelidir.

1.1.1.7.2. GİS Tutulumu

Sklerodermada GÖR ve komplikasyonlarını önlemek amacıyla proton pompa inhibitörleri kullanılabilir. Bununla birlikte, muskuler tabaka intakt olduğunda, SSc'nin erken dönemlerinde domperidon, metoklopropamid, eritromisin gibi prokinetik ajanlar faydalıdır. Ancak hastalığın geç dönemlerinde musküler tabaka yapısı bozulduğundan dolayı yararları azalır (64). Barsaktaki motilite bozukluğuna bağlı gelişen semptomlara yönelik olarak prokinetik ajanlar ve antibiyotikler kullanılabilir.

1.1.1.7.3. Cilt Tutulumu

Ellerin temizliğine özen gösterilmesi, topikal nemlendiriciler, cilt ülserlerine karşı topikal antibiyotik uygulamaları önerilir. Buna karşın cilt fibrozunun etkin bir tedavisi yoktur. Ödematöz fazda immünsupresif tedavi faydalı olabilmektedir.

1.1.1.7.4. Pulmoner Tutulum

Alveolit varlığında siklofosfamid gibi immünsupresif ilaçlar kullanılmaktadır. Siklofosfamid hastalığın progresyonunu yavaşlatır. Hayat kalitesini önemli ölçüde düzeltir (65). Siklofosfamid lökopeni (% 10-15), enfeksiyon (% 7-10), hemorajik sistit (% 5-15) ve alopesi (% 3) gibi yan etkilere neden olabilmektedir (66).

Tedaviden uzun süre sonra % 3-5 sıklığında mesane kanseri görülebilmektedir. Ayrıca, infertilite görülme sıklığı da fazladır.

Epoprostenol vasküler endotel tarafından salınan güçlü, kısa etkili trombosit agregasyonunu engelleyen bir maddedir. Vasodilatör etkisinin yanında pulmoner dirençte ve trombosit agregasyonunda azalma, kardiyak outputta artış, damar yenilenmesi gibi etkileri vardır. Epoprostanolun PAH hastalarında egzersiz kapasitesini arttırdığı, kardiyopulmoner hemodinamide iyileşme sağladığı, yaşam kalitesini arttırdığı ve süresini uzattığı gösterilmiştir (67).

İnhale iloprost tedavisinin hemodinamik ve fiziksel fonksiyonlarda iyileşme yönünde PAH hastalarında etkili olduğu kabul edilmektedir (68). Oral olarak kullanılmakta olan bosentan, ET-1 reseptör antagonistidir. Potent bir vazokonstriktör ve düz kas mitojeni olan ET-1'i antagonize ederek, PAH'ı iyileştirmektedir (69). Yapılan bir çalışmada semptomları son derece ağır, egzersiz toleransı düşük olan hastalarda ilk tercih olarak bosentan kullanımının yaşam süresini uzattığı ve yaşam kalitesini arttırdığı gözlenmiştir (70). Randomize plasebo kontrollü bir çalışmada (71). Bosentanın egzersiz kapasitesini, pulmoner vasküler rezistansı ve PAH'ı azalttığı gösterilmiştir. En sık gözlenen yan etkisi, karaciğer toksisitesidir. % 10-14 sıklığında, karaciğer fonksiyon testlerinde normal değerlerin 3 katı veya daha fazla artış gözlenmekte ve bu durum doz ayarlanması ile kontrol altına alınabilmektedir (72). Ek olarak, endotelin reseptör inhibitörleri gibi oral yolla kullanılabilen fosfodiesteraz tip 5 (PDE-5) inhibitörü sildenafille ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (73). Sildenafil, bir PDE-5 inhibitörüdür. Oral olarak, 3x20 mg/gün dozunda kullanılır. Pulmoner vasküler rezistans indeksini azaltır ve şiddetli akciğer fibrozu ve sekonder PAH olan hastalarda gaz değişimini artırmaktadır (74). Sildenafil, prostanoid (iloprost) ve nitrik oksit ile ilişkili PAH vazodilatasyonu artırır (75). RF olan hastalarda, periferik kan akımında artış sağlar (74). Sıklıkla baş ağrısı, flaşing, nazal konjesyon ve dispne gibi yan etkileri görülebilir. Sildenafilin yan etkisi düşük dozlarda daha az görülür. Yüksek dozlarda kullanıldığında, nadiren miyokard infarktüsü, sistemik hipertansiyon ve retinal yan etkileri nedeniyle görme bozukluğu yapabilir (76).

Ciddi akciğer fibrozi gelişmiş olan PAH hastalarında tüm gelişmelere rağmen vazodilatatör tedavilere daha az yanıt alınır, prognoz kötüdür. Bununla birlikte

tedaviye yanıt vermeyen şiddetli ve ilerleyici PAH'ı bulunan hastalarda akciğer transplantasyonu gerekli olabilir (77).

1.1.1.7.5. Renal Kriz

Renal krizi olan hastaların diyalize alınmasıyla böbrek fonksiyonlarında aylar sonra düzelme olabilir. Tedavi başarısındaki en önemli nokta ACE inhibitörleri ile agresif kan basıncı kontrolü yapmaktır. ACE inhibitörleri hem diyaliz ihtiyacını azaltmakta hemde mortaliteyi azaltmaktadır. Serum kreatinin seviyesi >3mg/dl olan hastalarda prognoz kötüdür (78).

1.1.1.7.6. Kalsinoz

Kalsinozun önlenmesi veya oluşmuş kalsinozun tedavisi için yararı kanıtlanmış bir tedavi protokolu bulunmamaktadır. Kontrollü çalışmalar bulunmamasına karşın, litotripsi kalsinoz tedavisinde kullanılmaktadır (36). Bazı durumlarda, kalsinoz cerrahi olarak çıkarılabilir.

1.1.1.7.7. Kök Hücre Transplantasyonu

Şiddetli progresif skleroderması olan 70'den fazla hastaya kök hücre transplantasyonu uygulanmıştır (66). Kök hücre transplantasyonu öncesinde, yüksek doz siklofosfamid ve antitimosit globülin, total vücut ışınlanması ile birlikte veya total vücut ışınlanması yapılmadan kullanılabilir. Transplantasyon ile ilgili mortalite % 9-17 sıklığında bildirilmektedir (79).

1.1.2 Bleomisin (BLM)

Bleomisin, "Streptomyces verticillus" adlı bakteri tarafından üretilen bir kemoterapötik ajandır. Skleroderma oluşturmak üzere hayvan deneylerinde kullanımının temeli BLM'nin insan kemoterapisindeki majör advers ilaç etkisi olan fibroz özelliği temeline dayanmaktadır. BLM'yi lenfoma, sokuamoz hücreli karsinomlar, germ hücreli tümörler ve intraplevral uygulama ile malign plevral efüzyonun tedavisinde kullanılmaktadır. İlacın tümör hücrelerindeki tek ve çift sarmal DNA'da kırıklara yol açıp hücre siklusunu engelleyerek etkili olduğu düşünülmektedir. Bu etki, metal iyonlarının şelasyonu ile süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açan pseudo enzim reaksiyonu ile olur. Reaktif oksijen

radikallerinin aşırı üretimi pulmoner toksisiteye yol açan bir inflamatuvar cevaba neden olabilir (80).

1.1.2.1 Bleomisin ile uyarılan dermal fibroz

Mountz ve ark. (81) 1983 yılında, iki hafta ara ile tekrarlanan yüksek dozlarda BLM uygulamalarının ratlarda 58. haftada dermal fibroz oluşturduğunu bildirmişlerdir. 1999 yılında, Yamamoto ve ark. (82) BLM ile uyarılmış skleroderma fare modelini geliştirmişlerdir. Bu modelde, araştırmacılar BLM'yi fosfat ile tamponlanmış salin (FTS) içerisinde çözündürerek, değişik dozlarda (0.1, 1, 10 ve 100 µg; tüm dozlar 100 µl FTS içerisinde), Balb/c farelerin tıraş edilmiş sırt derisine, her gün, subkutan (sc) olarak enjekte etmişlerdir.

Araştırmacılar, 1 µg ve daha yüksek dozlarda, tekrarlanan BLM uygulamalarının 3-4. haftadan sonra skleroderma benzeri histopatolojik ve biyokimyasal bulgulara yol açtığını bildirmişlerdir (82, 83). BLM uygulamaları sonlandırıldıktan sonra da skleroderma bulgularının en az 6 hafta devam ettiği ve günasırı uygulamaların da benzer histopatolojik bulguları oluşturabildiği gösterilmiştir (82).

Sklerodermada, hastalığın erken evrelerinde dokularda inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmekte ve ilerleyen evrelerde inflamasyon yerini belirgin fibroza bırakmaktadır. Böylece, BLM ile uyarılan dermal fibroz modeli ve diğer modeller ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, sklerodermanın erken dönemini taklit etmekte ve hastalığın ilerleyen dönemleri konusunda yeterli bilgi sunamamaktadır. Srimatkandada ve ark. (84), 6 hafta, günasırı 50 µg BLM uygulandığında 3. haftada fibroz geliştiğini gözlemlemişlerdir. Srimatkandada ve ark. (84) 6 haftalık deneyin ilk 3 haftasını hastalığın erken evresi, sonraki 3 haftasını ise geç evre (yerleşmiş fibroz evresi) olarak yorumlamışlar, tedavi uygulamalarını da sonraki 3 haftada yapmışlardır. Bu modifikasyon, hastalığın geç evresinde tedavi yanıtının değerlendirilmesi açısından uygun bir yöntemdir.

1.1.3. Lapatinib

Tip 1 Tirozin kinaz reseptörler ailesi ErbB1, ErbB2, ErbB3 ve ErbB4'ten oluşur. ErbB1 EGFR-1, ErbB2 ise EGFR-2 (HER2) olarak da bilinir (9). Çok bölgeli (multidomain) protein yapısındaki bu reseptörler; ekstraselüler ligand bağlanma

bölgesi (ligand-binding domain), transmembran bölgesi ve intraselüler tirozin kinaz bölgesi içerirler (85). ErbB3, tirozin kinaz aktivitesine sahip değildir. Ancak, ligand bağlanma bölgesi içermektedir. EGF ve transforming growth factor- α , ErbB reseptörlerini uyaran peptid ligand ailesindedir. Ekstraselüler liganda bağlanma ile reseptör uyarıldığında, sinyal kaskadındaki proteinler harekete geçer ve tirozin otofosforilasyonu ve tirozin kinaz aktivitesi başlar. HER2'nin ekstraselüler ligand bağlanma bölgesi yoktur ve diğer ErbB reseptörlerine yardımcı (coreseptör) olarak çalışır (10).

Mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phospholipase C γ ve signal transducers and activators of transcription (STAT) gibi çok sayıda sinyal yolları ErbB reseptörleri tarafından aktive edilmektedir (10). Sonuçta; hücre-siklus ilerlemesi, apoptoz, anjiyenez ve hücre adhezyon fonksiyonları düzenlenir (10). ErbB hedefli tirozin kinaz inhibitörleri, klinik uygulamalara girmiştir.

Onkoloji pratiğinde kullanılan bazı ilaçlar bulunmaktadır. Ancak, romatizmal inflamatuvar hastalıklarda, henüz kullanımı onaylanmış bir tirozin kinaz inhibitörü bulunmamasına karşın, prelinik çalışmalarda etkin sonuçlar gözlenmektedir.

Lapatinib (Tykerb®) 4-anilinoquinoline türevi olup EGFR (HER1) ve HER2'nin intraselüler tirozin kinaz kısmına reversibl olarak bağlanarak, reseptörün fosforilasyonu ve aktivasyonunu inhibe eden oral bir tirozin kinaz inhibitördür. Reseptörün fosforilasyon ve yollarının inhibisyonuna yol açarak hücre sel büyüme ve proliferasyonu durdurur, apoptozisin artmasına neden olur. HER2'ye karşı geliştirilen monoklonal antikörlerden farklı olarak dual inhibisyon yapar ve p95 HER2 olarak adlandırılan, ekstraselüler kısmını kaybetmiş reseptörlerin aktivasyonunu önler (86). Sonuç olarak, hücre siklus ilerlemesi, apoptoz, anjiyenez ve hücre adhezyonunu etkilemektedir (12, 13).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

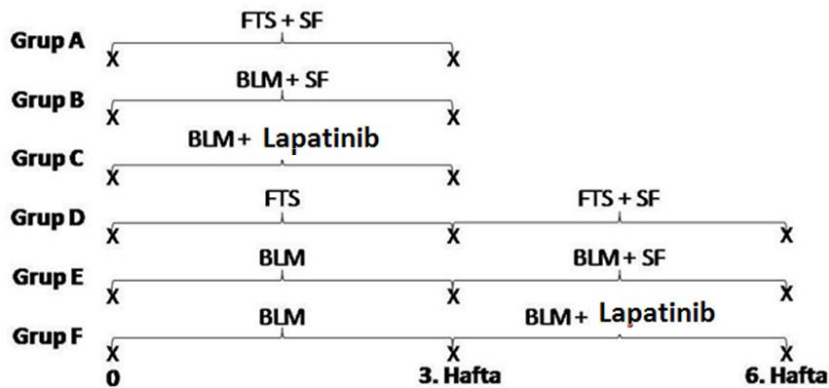
Bu çalışmaya, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulun (FUHADEK) 12.07.2013 Tarih ve 2013/06-81 sayılı onayı alınarak başlandı. Çalışma, standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde yapıldı.

2.1. Deney Hayvanları

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

2.2. Çalışma grupları ve uygulamalar

Bu çalışmada, BLM ile uyarılmış deneysel skleroderma modelinin erken ve geç (yerleşmiş fibroz) evrelerinde lapatinib tedavisinin etkinliği test edildi. Bu amaçla, erken evre grupları (grup A [kontrol grubu], B [bleomisin grubu], C [lapatinib grubu]) ve geç evre grupları (grup D [kontrol grubu], E [bleomisin grubu], F [lapatinib grubu]) olarak 6 grup oluşturuldu (Şekil 2). Erken dönem gruplarında BLM ile fibrozun uyarılmasına ve lapatinib tedavisine aynı gün baslandı. Geç dönem gruplarında ise ilk 3 hafta sadece BLM, 21. günden sonra BLM ve lapatinib birlikte uygulandı (Şekil 2).



Şekil 2. Çalışma grupları ve uygulanan tedaviler

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

2.2.1. Kontrol grupları

Bleomisin uygulanmayan erken (grup A) ve geç (grup D) dönem kontrol gruplarındaki farelere, sırt derisindeki tıras edilmiş bir bölgeden, her gün sc FTS ve ek olarak sc serum fizyolojik (SF) uygulandı. A grubundaki farelere bu uygulamalar ilk 3 hafta süresince, D grubundaki farelere ise sc FTS altı hafta süresince, Sc SF ise 3. ve 6. haftalar arasında uygulandı.

2.2.2. Bleomisin ve Lapatinib uygulamaları;

Bir mg BLM, 1 mL FTS içerisinde çözündürülerek, B ve C gruplarındaki farelere 3 hafta, E ve F gruplarındaki farelere ise 6 hafta, 100 µL (100 µg) dozunda, daha önce tanımlandığı şekilde (83), hergün sc uygulandı. Plasebo grupları olarak tanımlanan B grubu farelere ilk 3 hafta, E grubu farelere ise 21. günden çalışma sonuna kadar, haftada iki kez sc SF uygulandı.

Bleomisin ek olarak, tedavi gruplarından C grubundaki farelere ilk 3 hafta, F grubundaki farelere ise 21. günden çalışma sonuna kadar DMSO içerisinde çözündürülmüş lapatinib 30 mg/kg dozunda sc olarak uygulandı (% 30 'u DMSO % 70'i SF olacak şekilde karışım hazırlandı) (87).

2.3. Doku örneklerinin toplanması

Erken dönem gruplarındaki (A, B ve C grubu) fareler 3. haftanın, geç dönem gruplarındaki (D, E ve F grubu) fareler 6. haftanın sonunda, son tedavilerden 24 saat sonra, dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

Farelerin enjeksiyon uygulanmış olan sırt derileri daha sonraki incelemeler için eksize edildi. Doku örnekleri histopatolojik inceleme ve real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analizleri için ikiye bölündü. Bir bölüm doku % 10'luk formalin solüsyonu içine, RT-PCR analizleri için ayrılan diğer kısım ise alüminyum folyo içerisine konularak -80°C 'de çalışılacağı güne kadar saklandı.

2.4. Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler

Formalin solüsyonu içerisindeki doku örneklerinden, aynı gün içerisinde, parafin blokları hazırlandı. Bloklardan alınan kesitler Hematoksilen-Eosin ve Masson-Trichom ile boyanarak, ışık mikroskopunda (Olympus BX-50) X40, X100, X200 ve X400 büyütmede (uzman bir patolog tarafından incelenerek) inflamatuvar

hücre infiltrasyonu ve fibroz dereceleri belirlendi. Dermal kalınlık (epidermo-dermal bileşke ile dermis-subkutan yağ dokusu bileşkesi arası uzunluk) için, her bir denekte, en az iki farklı preparatta, X100 büyütmede, en az 5 farklı ölçümün ortalaması alındı.

2.5. Doku mRNA düzeylerinin belirlenmesi

Real-time polymerase chain reaction analizler için toplanan doku homejenatından, uygun RNA izolasyon kiti kullanılarak, TGF- β 1 ve fibronektin-1 mRNA ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile belirlendi.

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

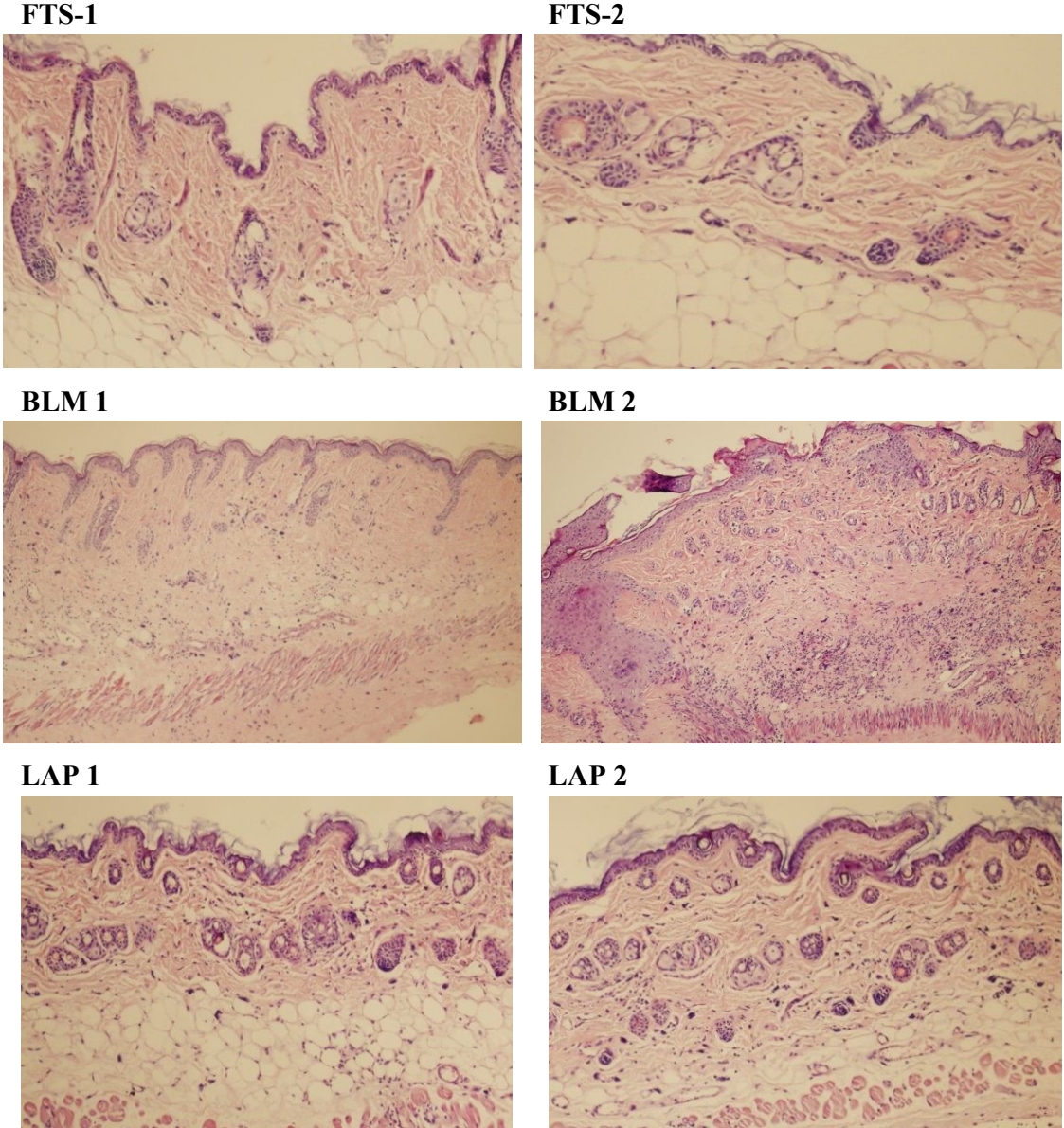
2.6. İstatistiksel Analizler

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

3. BULGULAR

3.1. BLM ile Uyarılmış Dermal Fibroz

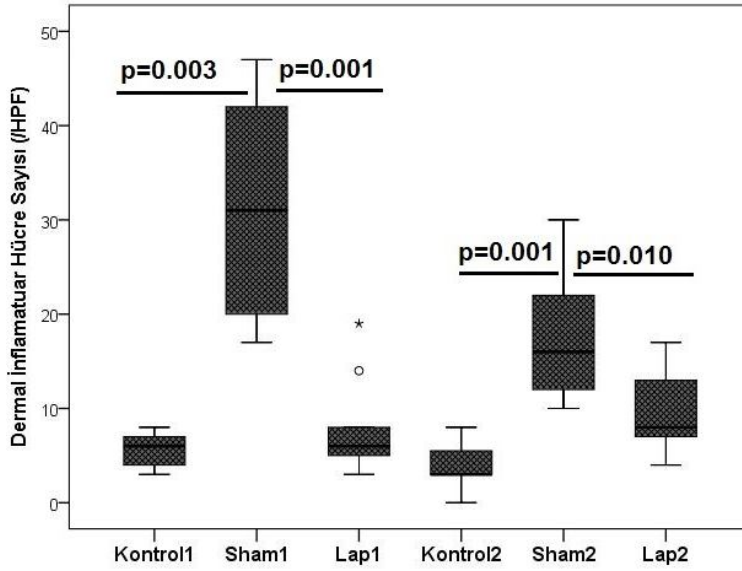
Üç ve 6 hafta FTS enjeksiyonu yapılan I. ve IV. gruptaki (erken ve geç evre kontrol grupları) farelerde histopatolojik değerlendirmede dermal fibrozun oluşmadığı görüldü (Şekil 3). Ancak, hem 3 hem de 6 hafta BLM uygulamaları dermal ve subkutan alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonuna ve dermal fibroza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



Şekil 3. Çalışma Grupları histopatolojik bulgular (hemoteksilen eozin, x200)

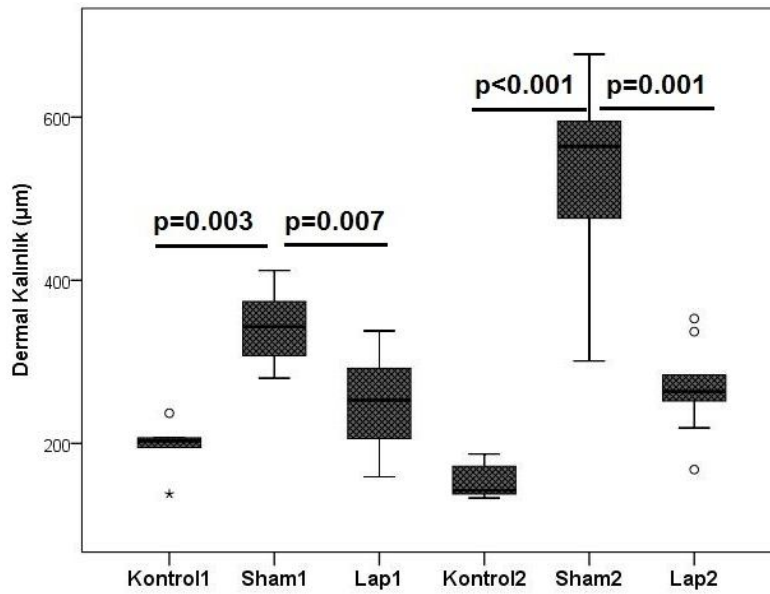
FTS; fosfat ile tamponlanmış salin, BLM; bleomisin, Lap: Lapatinib

Ortalama inflamatuvar hücre sayısı, B grubunda, A grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksek; C grubunda, B grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düşüktü (Şekil 4).



Şekil 4. Çalışma gruplarında ortalama dermal inflamatuvar hücre sayıları HPF; her büyük büyütme alanı, Sham; plasebo grubu, Lap.: Lapatiniip.

Dermal kalınlık, B grubunda, A grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksekti; C grubunda, B grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düşüktü; E grubunda, D grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksekti (Şekil 5).



Şekil 5. Çalışma gruplarında ortalama dermal kalınlıklar Sham; plasebo grubu, Lap: Lapatiniib

Tablo 6. Çalışma gruplarında dermal inflamatuvar hücre sayıları ve dermal kalınlıklar

	A grubu	B grubu	C grubu	D grubu	E grubu	F grubu
Dermal kalınlık (µm)	197.2±32.5	342.6±47.3	246.7±57.4	152.5±21.8	524.7±116.9	267.7±53.1
Dermal inflamatuvar hücre sayısı (/HPF)	5.7±1.9	31.3±12.7	8.1±5.2	4.7±2.3	17.4±6.8	9.4±4.1

Erken evre kontrol grubunda ortalama dermal inflamatuvar hücre sayısı 5.7±1.9 iken, sadece BLM alan grupta 31.3±12.7 idi ve anlamlı olarak artmıştı (p=0.003). BLM ile eş zamanlı profilaktik amaçlı lapatinib alan grupta ise ortalama dermal inflamatuvar hücre sayısı 8.1±5.2 idi ve erken evre plasebo grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı (p=0.001).

Geç evre kontrol grubunda ortalama dermal inflamatuvar hücre sayısı 4.7±2.3, geç evre BLM (plasebo) grubunda 17.4±6.8 idi ve anlamlı artış olduğu görüldü (p=0.001). BLM ile eş zamanlı terapötik amaçlı lapatinib alan grupta ise ortalama dermal inflamatuvar hücre sayısı 9.4±4.1 idi ve geç dönem plasebo grubuna göre anlamlı oranda azalmış olduğu görüldü (p=0.001).

Erken evre kontrol grubunda ortalama dermal kalınlık 197.2±32.5 µm iken, sadece BLM alan grupta 342.6±47.3 µm olarak saptandı (p=0,003). BLM ile eş zamanlı profilaktik amaçlı lapatinib alan grupta ise dermal kalınlık 246.7±57.4µm idi ve geç evre plasebo grubuna göre anlamlı azalmış olarak bulundu (p=0.007).

Geç evre kontrol grubunda dermal kalınlık 152.5±21.8 µm olarak ölçülmüş olup, geç evre sadece BLM alan grupta dermal kalınlık 524.7±116.9 µm idi ve yine artmış olarak ölçüldü (p<0.001). Diğer taraftan, inflamatuvar hücre sayısındaki artıştan farklı olarak geç evre BLM grubundaki dermal kalınlık artışı hem geç dönem kontrol grubundan hem de erken evre BLM grubundakinden daha yüksekti. BLM ile eş zamanlı terapötik amaçlı lapatinib alan grupta ise dermal kalınlık 267.7±53.1 µm idi ve geç evre plasebo grubuna göre anlamlı oranda azalmış olarak ölçüldü (p=0.001).

Sonuç olarak, lapatinib hem profilaksi hem de tedavi grubunda histopatolojik olarak dermal nekroinflamasyon ve fibrozu azaltmıştır.

Benzer şekilde, TGF-β1 ve fibronektin-1 mRNA ekspresyonları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BLM uygulamasıyla üç haftanın sonunda sırasıyla 40 ve 6 kat; 6 haftanın sonunda sırasıyla 690 ve 280 kat artmıştı. Diğer taraftan,

lapatinib tedavi grubunda TGF- β 1 ve fibronectin-1 mRNA ekspresyonları kontrol grubuna göre 100 ve 25 kat yüksekti ancak plasebo grubuna göre belirgin azalmıştı.

3.2. BLM ile Uyarılmış Dermal Fibrozun Lapatinib ile Tedavisi

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

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

Benzer şekilde, lapatinibin hem profilaktik hem de teröpatik uygulamalarında TGF- β 1 ve fibronectin-1 mRNA ekspresyonları belirgin azalmıştı.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, BLM ile uyarılmış deneysel skleroderma modelinde lapatinib uygulanmasının olası profilaktik ve tedavi edici etkinliği araştırılmıştır. Tekrarlanan BLM uygulamaları dermis inflamatuvar hücre infiltrasyonu, myofibroblastik hücre aktivitesi ve dermal kalınlıkta artışa neden olmaktadır. Lapatinib uygulamaları bu deneysel modelde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, myofibroblastik hücre aktivitesi ve dermal fibroz gelişimi önlemektedir.

Skleroderma deri ve iç organların yaygın fibrozu ile seyreden kronik inflamatuvar bir hastalık olup, vaskülopati, immun aktivasyon ve artmış fibrotik aktivite ile karakterizedir. Ancak, sklerodermanın patogenezi tam olarak bilinmemektedir ve henüz onaylanmış bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Sklerodermanın nadir görülen ve klinik olarak heterojen bir hastalık olması (16, 88) nedeniyle sklerodermada ideal bir klinik çalışma planlanması ve yapılması zorlaşmaktadır. BLM ile uyarılan deneysel skleroderma modeli oluşturulmasının kolaylığı, düşük maliyeti ve sklerodermanın birçok fenotipik özelliklerini sergileyebilmesi nedeniyle, günümüze kadar tanımlanmış olan deneysel skleroderma modellerinden en uygunudur (82, 83).

Skleroderma patogenezinde, vasküler hasarın en erken evre olduğu düşünülmektedir (22). Aktifleşmiş lenfositler tarafından üretilen sitokinler ve endotelial hücrelere karşı gelişen antikolar mikrodolaşımda görülen endotelial hasarı oluşturmaktadır (23, 24).

Lenfositler aktifleştince; CTGF, TGF- β ve PDGF salgılamaktadır. Salgılanan TGF- β ; endotelial hasara ve MHC ile birlikte ICAM-1 ekspresyonuna neden olmaktadır. PDGF; endotel hücre proliferasyonunu uyararak ve VEGF miktarını azaltarak neovaskülarizasyona neden olmaktadır (22). Endotelial hasar ve aktivasyonunu takiben vazokonstriktör bir madde olan ET-1 miktarında artış ve vazodilatör mediatör olan NO miktarında azalma olması nedeniyle vazomotor tonus kaybolmaktadır (23). Hasar bölgesine inflamatuvar hücreler kemoatraksiyon ile gelmekte ve damar duvarına yapışmaktadır (25, 26). Trombositler temas ettiği subendotel ile adhezyona uğrayarak fibrin birikimi ve intravasküler trombus oluşumuna neden olmaktadır. Damar duvarında mevcut olan kas hücreleri de aktive olup intimaya doğru ilerleyerek myofibroblastlara dönüşmektedir.

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

Skleroderma patogeneğinde kollajen ve diğer ESM moleküllerinin aşırı sentez ve depolanması ile fibroz oluştuğu bilinmektedir (89). ESM üretiminden aktif fibroblastlar (miyofibroblastlar) sorumludur (90). Aktive endotelial hücreler ve inflamatuvar hücreler hücre-hücre etkileşimi ile doğrudan ve çeşitli sitokin, adezyon molekülü ve büyüme faktörü üretimi ile dolaylı olarak fibroblastları aktive edebilmektedir. TGF- β bu aşamalarda önemli görevler üstlenmektedir (4).

Sklerodermada IL-2, IL-4, IL-6 gibi sitokinlerin serum düzeylerinin arttığı ve hastalık sürecine katkı yapıyor olabileceği bildirilmiştir (3). BLM ile oluşturulmuş olan deneysel skleroderma modelinde, çeşitli sitokinlerin etkili olduğu gösterilmiştir (91). BLM, IL-4 ve IL-6 sentezini ve salınımını artırmaktadır. IL-4 ve TGF- β , sklerodermada major fibrojenik sitokinlerdir (92). IL-4, fibroblastlardan kollajen ve TGF- β üretimini artırmaktadır. TGF- β , kollajen ve matriks proteinlerinin üretimini artırır, metalloproteinazların yıkımını ise azaltır (92). Böylece kollajen yıkımını önler. BLM ile uyarılan deneysel skleroderma modelinde anti-TGF- β antikoru uygulanmasının deri fibrozunu önlediği gösterilmiştir (91).

Çalışmamızda, BLM ile uyarılan dermal fibroz modelinde TGF- β 1 mRNA ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Ayrıca, BLM uygulamaları ile inflamatuvar hücre düzeyinde artış belirlenmesi, immün aktivasyonun hastalık sürecine katkı yapıyor olduğunu göstermektedir.

Lapatinib HER2/ErbB2 tirozin kinazını (TK) inhibe ederek sinyal iletimini önleyen çift etkili selektif inhibitördür (93). Lapatinib etkisini intraselüler olarak TK'nın ATP bağlayan kısmına bağlanarak göstermektedir. TK'nın fosforilasyon ve aktivasyonuna engel olmaktadır. Bu sayede sinyal iletimi en baştan bloke ederek,

ekstraselüler sinyal bağımlı kinaz-1 (ERK1) ve fosfotidilinozitol-3 kinaz (PI3K) gibi birçok yolağın aktivasyonuna da engel olunmaktadır (94, 95). EGFR-1, VEGF reseptörüne benzer şekilde TK reseptör ailesi karakteristiğini taşır. HER1, EGFR'nin 19 altgruplarından birisidir (96). Bu ailenin aktivasyonu, hücre proliferasyonu, aktivasyonu ve devamlılığı açısından önemlidir. HER1 birçok molekül ile aktive olmaktadır. Bunlar arasında, EGF ve TGF- α yer almaktadır. EGFR'nin ligand ile birleşimi dimerizasyonuna neden olur. EGFR reseptör ailesi aktivasyonunda dimerizasyon ile homodimerler ve heterodimerler oluşmaktadır. HER1'in uyarılması TK aktivasyonu sonucunda protein kinaz ve fosfotidilinozitol-3-OH kinaz yolunu aktive etmektedir (97). Yapılan çalışmalar sonucunda HER1 aktivasyonunun hücre migrasyonunu proliferasyonunu, adhezyonunu ve apoptozun önlenmesinde etkili olduğu ve neovaskülarizasyona neden olduğu gösterilmiştir (98). EGFR aktivasyonu ile VEGF gibi anjiyogenik moleküllerin salınımını artırarak anjiyogenezin hızlandığı bilinmektedir (99). EGFR inhibitörleri sayesinde anjiyogenezin engellenebileceği gösterilmiştir (100). İnsan EGFR-2, lapatinib etkili olduğu ikinci reseptördür ve anjiogenezde önemli rolü vardır. HER2 nin HER1'e oranla anjiogenez üzerine etkisi daha çok araştırılmıştır. HER2'nin aktivasyonu EGF'nin reseptöre bağlanmasını indükler, PI3K ve mitojen aktive protein kinaz kaskadını içeren multipl hücre sel sinyal yolu aktive olur. HER2 reseptörü normal hücrelerin proliferasyon ve differansiasyonunda kritik rol oynar (101). Bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, invazyon, artmış tümör hücre motilitesi, anjiogenez ve apoptoz inhibisyonu ile ilişkilidir (102). İn vitro çalışmalarda da lapatinib'in HER1 ve HER2 reseptörlerinin ikisini birden inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda lapatinib'in HER1 ve HER2 reseptör blokörü olarak, tek başına HER1 reseptör blokörlerinden daha etkin olduğu gösterilmiştir (94).

Yapılan bir çalışmada A549 hücre serisi verilerek farelerde akciğer kanseri oluşturulmuştur. Tümör dokusundaki anjiyogenez yoğunluğu ise CD31 ile tümör kesitleri boyanarak değerlendirilmiş ve lapatinipin, kontrol grubuna ve radyoterapi alan gruba göre anjiyogenez anlamlı derecede geriletildiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada anjiyogenezde önemli yere sahip, dolaşımdaki endotelial progenitör hücrelerin (CEPs) yoğunlukları da flow sitometrik ölçümlerle periferik kanda değerlendirilmiştir. Lapatinib tedavisi alan grubun istatistiksel olarak anlamlı olmasa da CEPs miktarı kontrole göre düşük tespit edilmiştir. Tek başına radyoterapi alan

grubun kontrole oranla CEPs düzeyi yüksek çıkmasına rağmen, radyoterapi ile beraber lapatinib alan grubun kontrole göre CEPs düzeyi daha düşük çıkmıştır (103). Çalışmanın sonunda lapatinib'in anjiyogenezi kontrol grubuna göre yaklaşık % 80 oranında geriletildiği tespit edilmiştir. Lapatinib bu etkisini EGFR reseptör sinyal iletimini bloke ederek anjiyogenik faktörlerin (VEGF ve IL-8) salınımını azaltarak göstermektedir. Bunun yanında Olausen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada lapatinibin A549 hücre serilerinde VEGFR1 fosforilasyonunu % 70 oranında engellediğini göstermişlerdir. Bu inhibisyon henüz endotel hücrelerinde gösterilemese dahi direk anjiyogenezi inhibe eden bir yolak olarak büyük öneme sahiptir (103, 104).

Epidermal growth factor reseptör ve HER-2 TK inhibitörü lapatinibin akciğer kanser modelindeki antitümör ve antianjiyogenik etkisini gösteren Roque ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise görülmüşki; lapatinib G1 fazında hücrelerin durmasını, apoptotik hücre ölümünü, siklin A ve B fazlarına indirgenmiş olan S ve G2M hücre döngüsü aşamalarını sırasıyla uyarır. İn vivo deneylerde lapatinib ile tedavi edilen tümör hücresi taşıyan farelerde kontrol grubuna göre belirgin şekilde küçülme olmuş. Buna ek olarak, lapatinib ile tedavi edilmiş tümörlü farelerde anjiyogeneze düşüklük gösterilmiştir (105).

Huang ve ark. (106) yaptığı bir başka çalışmada; bir deneysel model olarak K 562 hücreleri içeren KML de lapatinibin apoptozis, otofaji ve megakaryositik değişikliklere benzeyen eş zamanlı morfolojik değişimleri uyardığı bulunmuş. Lapatinib apoptozu iki yolakla gerçekleştirir.

- 1- Mitokondrial transmembran potansiyelinde azalma
- 2- Caspas bağımlı yolağı aktive ederek.

Lapatinibin sebep olduğu apoptoz ve otofajik hücre ölümü, megakaryositik değişimler insan KML –K 562 hücrelerinde daha fazladır. KML hücrelerindeki bu değişimler lapatinibin potansiyel bir tedavi edici ajan olduğunu göstermektedir. (106).

Doku fibrozu, organ yemezliği ve ölüm ile sonlanan Ssc'de antifibrotik tedavilerin etkileri tam olarak mevcut değildir. TK inhibitörü olan imatinib c-abl-kinaz (profibrotik) ve PDGF reseptörlerini bloke eder. Bu ilaç prelinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. Deneysel modelde imatinib etkin bir şekilde olan deri fibrozunu önlemiş ve azaltmıştır. İlk klinik vaka çalışmalarında, seçilmiş hastalar üzerinde (SSc

ve diğerk fibroik hastalıklarda) imatinibin antifibrotik etkileri gösterilmiştir. Kronik sklerozu olan Greft Versus Host hastalığında ise umut verici sonuçlar elde edilmiştir. İmatinibin yanı sıra 2 yeni TK inhibitörü olan nilotinib ve dasatinibin de Skleroderma deneysel modellerindeki etkinliğı kanıtlanmıştır (107). Selektif olarak SU6656 veya c-abl ve PDGF kombinasyonunu inhibe eden dasatinib, imatinib ve nilotinib gibi antifibrotik etkiler göstermiştir. İmatinib, nilotinib, dasatinib ve SU6656 doz bağımlı olarak hücre dışı matriks proteini üretimini in vitro olarak azaltmış ve BLM ile indüklenmiş dermal fibroz modelinde farelerde fibrozu önlemiştir (108). Klinik kullanım öncesinde, ancak kontrollü çalışmalarda, farklı fibrotik hastalıkları olan hastalarda farklı TK inhibitörlerinin etkinliğinin yanısıra tolerabilitelerinin incelenmeleri gerekir (107).

Farklı TK inhibitörleri ile yapılan bu deneysel çalışmaların ışığında, biz de bir TK inhibitörü olan lapatinibin BLM ile oluşturulmuş deneysel skleroderma modelindeki etkinliğini ortaya koyduk.

Sonuç olarak çalışmamızda, lapatinibin hem profilaktik hem de teröpatik uygulamalarında histopatolojik olarak dermal nekroinflamasyon ve dermal fibrozda gerilemeye sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca, TGF-β1 ve fibronektin-1 mRNA ekspresyonlarının azalmış olduğu da gösterildi.

Lapatinib BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinde anti-fibrotik etkiler sergileyebilmektedir. Bu anti-fibrotik etkileri TGF-β üretimini baskılaması ile ilişkilendirilebilir.

5. KAYNAKLAR

1. Edward DH, Ralph CB, Gary SF. Kelley's textbook of Rheumatology, 2005: 1279-1303.
2. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38: 132-160.
3. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW. Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 67-72.
4. Varga J, Pasche B. Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 200-206.
5. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 184-189.
6. Yamane K, Ihn H, Tamaki K. Epidermal growth factor up-regulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in human dermal fibroblasts by phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway: resistance to epidermal growth factor stimulation in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1652-1666.
7. Brown M, Postlethwaite AE, Myers LK, Hasty KA. Supernatants from culture of type I collagen-stimulated PBMC from patients with cutaneous systemic sclerosis versus localized scleroderma demonstrate suppression of MMP-1 by fibroblasts. *Clin Rheumatol* 2012; 31: 973-981.
8. Tokiyama K, Yokota E, Niho Y. Epidermal growth factor receptor of fibroblasts from patients with scleroderma. *J Rheumatol* 1990; 17: 1463-1468.
9. Tevaarwerk AJ, Kolesar JM. Lapatinib: a small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer. *Clin Thera* 2009; 31: 2332-2348.
10. Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 151-159.

11. Schroeder RL, Stevens CL, Sridhar J. Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer. *Molecules* 2014; 19: 15196-15212.
12. Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2001; 1: 85-94.
13. Hirata A, Ogawa S, Kometani T, Kuwano T, Naito S, Kuwano M, et al. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 2002; 62: 2554-2260.
14. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1980. 23: 581-590.
15. Scleroderma. EULAR online course. 2007-2009. Module 20: 1-30
16. Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008; 66: 198-202.
17. Black CM, Welsh KI. Genetics of scleroderma. *Clin Dermatol* 1994; 12: 337-347.
18. Favalli E, Ingegno F, Zeni S, Fare M, Fantini F. HLA Typing in Systemic Sclerosis. *Reumatismo* 2001; 53: 210-214.
19. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 520-526.
20. Veltman G, Lange CE, Jühe S, Stein G, Bachner U. Clinical manifestations and course of vinylchloride disease. *Ann NY Acad Sci* 1975; 246: 6-17.
21. Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev* 2008; 8: 36-40.
22. LeRoy EC Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 1996. 22: 675-694.
23. Renaudineau Y. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999. 6: 156-160.

24. Kahaleh BM. Lymphocyte interactions with the vascular endothelium in scleroderma. *Clin Dermatol* 1994; 12: 253-260.
25. Gruschwitz K. Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 184-189.
26. Kuryliszyn-Moskal A. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin, vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. *Clin Rheumatol* 2004; 24: 111-116.
27. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 155-160.
28. 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.
29. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995; 63: 48-56.
30. Chizzolini C. T lymphocyte and fibroblast interactions: the case of skin involvement in systemic sclerosis and other examples. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 431-450.
31. White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 695-708.
32. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor beta (TGFbeta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 1987; 247: 597-604.
33. Postlethwaite AE. Role of T cells and cytokines in effecting Fibrosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12: 247-258.
34. Leask A, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4: 36-42

35. Peterson LS, Nelson M, Su WP. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 1068-1076.
36. Chung L, Lin J, Furst DE, Fiorentino D. Systemic and localized scleroderma. *Clin Dermatol* 2006; 24: 374-392.
37. LeRoy EC, Medsger TA. Raynaud's phenomenon a proposal for classification. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 485-488.
38. Weinstein WM, Kadell BM. The gastrointestinal tract in systemic sclerosis. Clements P, Furst D (eds). *Systemic sclerosis*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 293-308.
39. Schuffler MD, Beegle RG. Progressive systemic sclerosis of the gastrointestinal tract and hereditary hollow visceral myopathy two distinguishable disorders of intestinal smooth muscle. *Gastroenterology* 1979; 77: 664-671.
40. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1283-1289.
41. Van Laar JM, Stolk J, Tyndall A. Scleroderma lung: pathogenesis, evaluation and current therapy. *Drugs* 2007; 67: 985-996.
42. Mouthon L, Berezne A, Brauner M, Kambouchner M, Guillevin L, Valeyre D. Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Presse Med* 2006; 35: 1943-1951.
43. Rossi GA, Bitterman PB, Rennard SI, Ferrans VJ, Crystal RG. Evidence for chronic inflammation as a component of the interstitial lung disease associated with progressive systemic sclerosis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 12-17.
44. Steen VD, Owens GR, Fino GJ, Rodnan GP, Medsger TA. Pulmonary involvement in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1985; 28: 759-767.
45. Stupi AM, Steen VD, Owens GR, Barnes L, Rodnan GP, Medsger TA. Pulmonary hypertension in the CREST syndrome variant of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 515-524.
46. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT. Pathologic observations in systemic sclerosis: A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med* 1969; 46: 428-440.

47. Medsger TA, Masi AT, Rodnan GP. Survival with systemic sclerosis: a life-table analysis of clinical and demographic factors in 309 patients. *Ann Intern Med* 1971; 75: 369-376.
48. Kostis JB, Seibold JR, Turkevich D. Prognostic importance of cardiac arrhythmias in systemic sclerosis. *Am J Med* 1988; 84: 1007-1015.
49. Steen VD. Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 861– 878.
50. Steen VD, Medsger TA, Osial TA, Ziegler GL, Shapiro AP, Rodnan GP. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 1984; 76: 779–786.
51. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 75–83.
52. Clements PJ, Furst DE, campion DS, Bohan A, Haris R, Levy J, Paulus HE. Muscle disease in progressive systemic sclerosis diagnostic and therapeutic considerations. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 62–71.
53. Baron M, Lee P, Keystone EC. The articular manifestations of progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 147–152.
54. Averbuch-Heller L, Steiner I, Abramsky O. Neurologic manifestations of progressive systemic sclerosis. *Arch Neurol* 1992; 49: 1292-1295.
55. Herrick A. Nervous system involvement in systemic sclerosis. Clements P, Furst D (eds). *Systemic sclerosis*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 309-317.
56. Koniçe M. Skleroderma: Büyüköztürk K, Atamer T, Dilmener M, Erzenin F, Kaysı A, Ökten A (eds). *İç Hastalıkları* 2007; 581: 2849-2856.
57. Turgay M. Sistemik skleroz: İliçin G. Biberöglü, K. Süleymanlar G, Ünal S (eds). *İç Hastalıkları* 2012; 419-3: 2536-2544.
58. Thompson AE, Shea B, Welch V, Fenlon D, Pope JE. Calcium-channel blockers for Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1841–1847.

59. Dziadzio M, Denton CP, Smith R, Howell K, Blann A, Bowers E. Losartan therapy for Raynaud's phenomenon and scleroderma: Clinical and biochemical findings in a fifteen-week, randomized, parallel-group, controlled trial. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2646–2655.
60. Pope J, Fenlon D, Thompson A, Shea B, Furst D, Wells G. Prazosin for Raynaud's phenomenon in progressive systemic sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; CD000956.
61. Coleiro B, Marshall SE, Denton CP. Treatment of Raynaud's phenomenon with the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40: 1038-1043.
62. Flatt AE. Digital artery sympathectomy. *J Hand Surg [Am]* 1980; 5: 550-556.
63. O'Brien BM, Kumar PA, Mellow CG, Oliver TV. Radical microarteriolysis in the treatment of vasospastic disorders of the hand, especially scleroderma. *J Hand Surg [Br]* 1992; 17: 447-52.
64. Elin C, Ebert. MD. Esophageal disease in progressive systemic sclerosis in current treatment options in gastroenterology 2008; 11: 64-69.
65. Tashkin DP, Elashof R, Clements PJ. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006; 22: 2655-2666.
66. Furst D, Pope J, Clements P. Systemic sclerosis. Tugwell P (ed). *Evidencebased rheumatology*. London, UK: BMJ Books 2004: 443-483.
67. Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD, Brundage BH, Rubin LJ, Wigley FM, et al. Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2000; 21: 425–434.
68. Olschewski H, Ghofrani HA, Schmehl T, Winkler J, Wilkens H, Hoper MM. Inhaled Iloprost to treat severe pulmonary hypertension. An uncontrolled trial. German PPH Study Group. *Ann Intern Med* 2000; 132: 435–443.
69. Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120: 1562- 1569.

70. McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, Barst RJ, Black C, Galie N. Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2005; 25: 244–249.
71. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358: 1119-1123.
72. Lin AT, Clements PJ, Furst DE. Update on disease-modifying antirheumatic drugs in the treatment of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29: 409-426.
73. Lee AJ, Chiao TB, Tsang MP. Sildenafil for pulmonary hypertension. *Ann Pharmacother* 2005; 39: 869–884.
74. Rosenkranz S, Diet F, Karasch T, Weihrauch J, Wassermann K, Erdmann E. Sildenafil improved pulmonary hypertension and peripheral blood flow in a patient with scleroderma-associated lung fibrosis and the Raynaud phenomenon. *Ann Intern Med* 2003; 139: 871-873.
75. Wilkens H, Guth A, König J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, et al. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104: 1218-1222.
76. Gresser U, Gleiter CH. Erectile dysfunction comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil review of the literature. *Eur J Med Res* 2002; 7: 435-446.
77. Rosas V, Conte JV, Yang SC, Gaine SP, Borja M, Wigley FM. Lung transplantation and systemic sclerosis. *Ann Transplant* 2002; 5: 38–43.
78. Wigley FM. Scleroderma (systemic sclerosis) L. Goldman, D, Ausiello, S. Ünal. (eds) *Cecil Textbook of medicine Elsevier and Saunders*, 2011: 2032-2041.
79. Binks M, Passweg JR, Furst D, McSweeney P, Sullivan K, Besenthal C, et al. Phase I/II trial of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis procedure related mortality and impact on skin disease. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 577-584.
80. Moeller A, Ask K, Warburton D. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 362-382.

81. Mountz JD, Downs Minor MB, Turner R, Thomas MB, Richards F, Pisko E. Bleomycin-induced cutaneous toxicity in the rat: analysis of histopathology and ultrastructure compared with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Dermatol* 1983; 108: 679-686.
82. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 456-462
83. Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin Immunol* 2002; 102: 209-216.
84. Srimatkandada P, Loomis R, Carbone R, Srimatkandada S, Lacy J. Combined proteasome and Bcl-2 inhibition stimulates apoptosis and inhibits growth in EBV-transformed lymphocytes: a potential therapeutic approach to EBV-associated lymphoproliferative diseases. *Eur J Haematol* 2008; 80: 407-418.
85. Tevaarwerk AJ, Kolesar JM. Lapatinib: a small-molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 tyrosine kinases used in the treatment of breast cancer. *Clin Thera* 2009; 31: 2332-2348.
86. Giampaglia M, Chiuri VE, Tinelli A, De Laurentiis M, Silvestris N, Lorusso V. Lapatinib in breast cancer: clinical experiences and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 2010; 36: 72-79.
87. Taskar KS, Rudraraju V, Mittapalli RK, Samala R, Thorsheim HR, Lockman J, et al. Lapatinib distribution in HER2 overexpressing experimental brain metastases of breast cancer. *Pharm Res* 2012; 29: 770-781.
88. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-205.
89. Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 4.
90. Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S. Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 733-738.

91. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K. Anti-sclerotic effect of transforming growth factor-beta antibody in a mouse model of bleomycin induced scleroderma. *Clin Immunol* 1999; 92: 6-13.
92. Kurosawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased IL-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 55-63.
93. Spector NL, Xia W, Burris H. Study of the biologic effects of lapatinib a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2502–2512.
94. Wood ER, Truesdale AT, Nonaka S, McDonald OB. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6652–6659.
95. Rusnak DW, Affleck K, Cockerill SG. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 7196–7203.
96. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
97. Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: From mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001; 19: 32- 40.
98. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 241-250.
99. Van C, Giaccone G, Hoekman K. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer* 2005; 117: 883- 888.
100. Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick G, Ellis L. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 397- 405.
101. Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2000; 103: 211-225.

- 102.** Rowinsky EK. Signal Events: Cell Signal Transduction and Its Inhibition in Cancer. *The Oncologist* 2003; 8: 5-17.
- 103.** Roque D, Paul A.N, Ricardo P. Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC Cancer* 2010; 10: 178-188.
- 104.** Olausson KA, Commo F, Tailler M, Lacroix L, Vitale I, Raza SQ, et al. Synergistic proapoptotic effects of the two tyrosine kinase inhibitors pazopanib and lapatinib on multiple carcinoma cell lines. *Oncogene* 2009; 28: 4249-4260.
- 105.** Roque D, Paul AN, Ricardo P, Carlos PS, Irene M, Miriam R, et al. Anti tumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model Diaz et al. *BMC Cancer* 2010; 10: 188.
- 106.** Huang HL, Chen YC, Huang YC, Yang KC, Pan HY, Shih SP, Chen YJ. Lapatinib Induces Autophagy, Apoptosis and Megakaryocytic Differentiation in Chronic Myelogenous Leukemia K562 Cells *PLoS ONE* *PLoS One* 2011; 6: 29014.
- 107.** Beyer C, Distler JH, Distler O. Are tyrosine kinase inhibitors promising for the treatment of systemic sclerosis and other fibrotic diseases? *Swiss Med Wkly* 2010; 140: 130-150.
- 108.** Distler JHW, Distler O. Intracellular tyrosine kinases as novel targets for anti-fibrotic therapy in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008; 47: 10-11.

6. ÖZGEÇMİŞ

01.06.1979 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve Lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1997 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 2003 yılında mezun oldum. Şubat 2011 yılında Tıpta Uzmanlık sınavını kazanarak F.Ü. Tıp Fak. İç Hastalıklar ABD'ında Uzmanlık eğitimime başladım. Halen eğitime devam etmekteyim. İngilizce bilmekteyim.