



T.C.

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜNDE JAK-STAT
SİNYAL YOLAĞI İNHİBİSYONUNUN KOLLAJEN
BİYOSENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MEHTAP ŞAHİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

SİVAS 2018

**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜNDE JAK-STAT
SİNYAL YOLAĞI İNHİBİSYONUNUN KOLLAJEN
BİYOSENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MEHTAP ŞAHİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Hüseyin AYDIN**

SİVAS-2018

“Fibroblast Hücre Kültüründe JAK-STAT Sinyal Yolağı İnhibisyonunun Kollajen Biyosentezi Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Doç. Dr. Ahmet ALTUN

Üye Prof. Dr. Eser KILIÇ

Üye (Danışman) Doç. Dr. Hüseyin AYDIN



ONAY

Bu tez çalışması, 05/06/2018 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyde AKIN POLAT
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 11.09.2014 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

[Proje No: T-714]



ÖZET
FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜNDE JAK-STAT SİNYAL YOLAĞI
İNHİBİSYONUNUN KOLLAJEN BİYOSENTEZİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Mehtap ŞAHİN
Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Hüseyin AYDIN
2018, 69 sayfa

Fibrozisin arttığı çeşitli hastalıklarda (hepatik fibroz, skleroderma gibi) kontrolsüz kollajen sentezi ve birikimi olmaktadır. Kollajen sentezini inhibe eden ajanlar oldukça sınırlıdır. Tofasitinib selektif JAK-kinaz (1/3) inhibitörüdür. Günümüzde romatoid artrit tedavisinde kullanılmaktadır. JAK yolağı inhibisyonun kollajen sentezine etkileri net olarak bilinmemektedir. Çalışmamızın amacı fibroblast hücre kültüründe JAK-STAT yolağı inhibisyonunun kollajen biyosentezi üzerine etkisini araştırmaktır. BJ-CRL1474® (cilt) ve BRL3A® (hepatik) fibroblast hücre kültürlerinin uygun ortamda çoğalması sağlandı. 96'lık flasklarda çoğalan fibroblast hücrelerine sırasıyla 25nM, 50nM, 100nM, 200nM, 400nM ve 800nM konsantrasyonlarında tofasitinib uygulandı. Hücre canlılığı ve miktarı spektrofotometreyle okundu. Ayrıca ELİSA yöntemi ile doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP-1), matris metalloproteinaz 3 (MMP-3), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-1 β) ve hidroksiprolin düzeyleri ölçüldü. Tofasitinib'in sitotoksik etkisi 100nM konsantrasyonda başladı (p<0,05). En yüksek etki ise 800nM'de elde edildi. Tofasitinib'in zamana bağlı sitotoksik etkisi 72. saatte, 24. ve 48. saate göre tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak daha yüksek saptandı (p<0,05). Kollajen sentezinin ana uyarıcısı olan TGF-1 β düzeyi 25nM konsantrasyonda dahi anlamlı olarak düşük saptandı (p<0,05). En düşük düzeye 800nM konsantrasyonlarında ulaşıldı. Konsantrasyonlar arasındaki farklar istatistiksel olarak bulundu (p<0,05). Yine sırasıyla MMP-3, TIMP-1 ve hidroksiprolin seviyelerinde kontrole göre anlamlı düşüş saptandı (p<0,05). Her üç biyobelirteçteki düşüş 100nM konsantrasyonunda başladı. Her iki hücre kültüründeki (hepatik ve deri) sonuçlar benzerdi ve istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). JAK-kinaz inhibitörü olan tofasitinib'in fibroblast hücre kültüründe fibroblast hücre proliferasyonunu zamana ve konsantrasyona göre baskıladığı gösterdik. Ancak bu etkinin klinik yansımaları için daha kapsamlı hayvan model ve insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kollajen biyosentezi, Fibroblast Hücre Kültürü, Tofasitinib, JAK-STAT

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF JAK-STAT SIGNAL INHIBITION ON COLLAGEN BIOSYNTHESIS IN FIBROBLAST CELL CULTURE

Uncontrolled collagen synthesis and deposition occur in various diseases such as hepatic fibrosis, scleroderma. The agents that inhibit collagen synthesis are very limited. Tofacitinib is a selective JAK-kinase (1/3) inhibitor. Currently it used in the treatment of rheumatoid arthritis. The effects of JAK pathway inhibition on collagen synthesis are not clearly known. The aim of the study is to investigate the effect of JAK-STAT pathway inhibition on collagen biosynthesis in fibroblast cell culture. BJ-CRL 1474® (skin) and BRL3A® (hepatic) fibroblast cell cultures were proliferated in the appropriate medium. Tofacitinib was administered to fibroblast cells proliferating on 96-well flasks at concentrations of 25nM, 50nM, 100nM, 200nM, 400nM and 800nM, respectively. Cell viability and quantity were read by spectrophotometer. Tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP-1), matrix metalloproteinase 3 (MMP-3), transforming growth factor (TGF-1 β) and hydroxyproline levels were measured by ELISA method. The cytotoxic effect of tofacitinib started at 100 nM concentration ($p < 0.05$). The highest effect was obtained at 800nM. The time-dependent cytotoxic effect of tofacitinib was significantly higher 72th hours than at 24th and 48th hours at all concentrations ($p < 0.05$). TFG-1 β , the major stimulus of collagen synthesis, was found to be significantly low even at 25 nM concentration ($p < 0.05$). The lowest concentration was reached at 800nM. The differences between the concentrations were statistically significant ($p < 0.05$). Again, there was a significant decrease in MMP-3, TIMP-1 and hydroxyproline levels, respectively ($p < 0,05$). The decline in all three biomarkers started at a concentration of 100nM. The results in both cell cultures (hepatic and skin) were similar and not statistically significant ($p > 0.05$). JAK kinase inhibitor, tofacitinib has been shown to inhibit fibroblast cell proliferation in fibroblast cell culture by time and concentration. However, more extensive animal model and human studies are needed for clinical manifestations of this effect.

Keywords: Collagen biosynthesis, Tofacitinib, Fibroblast Cell Culture, JAK-STAT

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitiminin her aşamasında desteğini ve emeğini esirgemeyen Prf. Dr. Sevtap Bakır hocama ve tez hocam Doç. Dr. Hüseyin Aydın'a teşekkür ederim. Bana hücre kültür deneylerini öğreten, tezimin her aşamasında yardımcı olan Doç. Dr. Ahmet Altun'a ve Uzm. Dr. Mehmet Emin Derin'e teşekkür ederim. Ayrıca Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Daire Başkanlığı'na projemize olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu uzun ve zorlu süreçte her zaman yanımda olan, bana inancını ve emeğini esirgemeyen sevgili eşim Ali Şahin'e, her zaman varlıklarıyla moral bulduğum çocuklarım Sedef'e ve Efe'ye...

Sivas, 2018

Mehtap Şahin

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR/SİMGELER.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ekstra Selüler Matriks (ESM).....	3
2.1.1.Fibroblastlar	3
2.1.2.Miyofibroblastlar	4
2.1.3.Diğer Fibroblast Benzeri Hücreler.....	4
2.2. Kollajen	5
2.2.1.Kollajenin Yapısı	5
2.2.2 Kollajen Tipleri.....	6
2.2.2.1.Fibriler Kollajen.....	6
2.2.2.2 Non-Fibriler Kollajen.....	6
2.2.3. Kollajen Sentezi	7
2.2.3.1.Kollajen Sentezinin Regülasyonu.....	9
2.2.3.2. Hücre Dışı Sinyaller-Etmenler	11
2.2.3.2.1. TGF- β	11
2.2.3.2.2. Konnektif Doku Büyüme Faktörü.....	11
2.2.3.2.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü.....	12
2.2.3.2.4. WNT/NOTCH Yolağı	12

2.2.3.2.5. İnterlökinler.....	13
2.2.3.2.6. Kemokinler	13
2.2.3.2.7. Biyoaktif Lipitler	13
2.2.3.2.8. Kollajen Üretiminde Doğal İmmunite etkisi	14
2.2.3.2.9. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	14
2.3. Hücre İçi Sinyal Yolakları.....	15
2.3.1. G-Proteinleri ile ilişkili Reseptörler.....	16
2.3.2. Enzimatik Etkisi Olan Reseptörler (Reseptör Tirozin Kinazlar).....	16
2.3.3.JAK-STAT Yolağı.....	19
2.3.3.1. JAK-STAT Proteinlerinin Yapısı.....	20
2.3.3.2. JAK-STAT Sinyalizasyonu	21
2.3.3.3. JAK-STAT İnhbisyonu	22
2.3.3.4. JAK-STAT ve Diğer Yolaklar	23
2.4. Tofastinib.....	23
2.5. Hücre Kültürü	24
2.5.1. Kaynaklarına Göre Hücre Kültürleri	25
2.5.1.1. Primer Hücre Kültürü.....	25
2.5.1.2. Diploid Hücre Kültürü	25
2.5.1.3. Devamlı Hücre Kültürü.....	25
2.5.2. Besiyeri	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç.....	27
3.1.1. Kullanılan Gereçler	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Tripan Mavisı Boyası Canlılık Testi	28
3.2.2. XTT Testi	29
3.3. Yöntem Prensipleri	30
3.2.1. Hücre Kültürü Teknikleri	31
3.2.2. 96'lık Plak Ekimi	31
3.2.3. Elisa Testi Aşamaları.....	33
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
5. ARAŞTIRMANIN ETİK YÖNÜ.....	35

6. BULGULAR.....	36
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
8. KAYNAKLAR.....	46
9. ÖZGEÇMİŞ.....	51
EKLER	53
EK-1 Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurul Karar Formu.....	53



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1a: Kollajenin Üçlü Heliks Yapısı.....	5
Şekil 2.1b: Kollajenin Şematik Resmi.....	6
Şekil 2.2: Kollajen Sentezinin Endoplazmik Retikulum'da başlayıp Golgi ve Ekstraselüler Alana Gönderilmesi.....	8
Şekil 2.3: Kollajenin Ekstraselüler Alanda Son Olgun Halini Alması.....	9
Şekil 2.4: G Protein Yapısındaki Reseptörler Ve İkincil Yolakları.....	16
Şekil 2.5: RTK'ların Aktifleşmesi Şematik Olarak.....	17
Şekil 2.6: Reseptör Tirozin Kinaz (RTK) ve ikincil haberci yolakları.....	18
Şekil 2.7: JAK-STAT Yolağı.....	19
Şekil 2.8: JAK Protein Yapısı.....	20
Şekil 2.9: STAT Protein Yapısı.....	21
Şekil 2.10: JAK-STAT Yolağının Şematik Olarak İnhibisyonu.....	22
Şekil 2.11: Tofasitinibin Moleküler Yapısı.....	23
Şekil 2.12: Tofasitinib'in JAK-STAT Üzerine Etkisi.....	24
Şekil 3.1: Tripan Mavis Boyası Canlı ve Ölü Hücrelerin Boyanması.....	27
Şekil 3.2: Neubauer Hemositometresi.....	29
Şekil 3.3: XTT'nin Formazana Dönüşmesi.....	30
Şekil 3.4: MTT ve XTT metotları.....	32

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1a: Elektron Mikroskopunda Normal Fibroblast Görünümü.....	4
Resim 2.1b: Elektron Mikroskopunda İnaktif Fibroblast Sitoplazması	4
Resim 2.1c: Elektron Mikroskopunda Aktif Fibroblast Sitoplazması.....	4
Resim 2.2: Elektron Mikroskopunda Kollajen Görüntüsü.....	5
Resim 2.3: Fibroblast Hücre Kültür Görüntüsü.....	25

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: Kollajenin Tipleri ve Dağıldığı Dokular	7
Tablo 2.2: Kollajen Sentezinde Ekstraselüler Sinyaller	10
Tablo 2.3: STAT Protein Ailesi, Aktivatörleri ve Hedef Genleri	20
Tablo 6.1: Tofasitinib'in Fibroblast Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkisinin Zamana ve Konsantrasyona Bağlı Değerlendirilmesi	38



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 6.1: Tofasitinib'in Fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı değerlendirilmesi	36
Grafik 6.2: Tofasitinib'in Fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin zamana bağlı değerlendirilmesi.....	37
Grafik 6.3: Tofasitinib uygulamasının TGF-1 β seviyeleri üzerindeki etkisi.....	38
Grafik 6.4: Tofasitinib uygulamasının MMP-3 seviyeleri üzerindeki etkisi	39
Grafik 6.5: Tofasitinib uygulamasının TIMP-1 seviyeleri üzerindeki etkisi.....	40
Grafik 6.6: Tofasitinib uygulamasının Hidroksiprolin seviyeleri üzerindeki etkisi.....	41

KISALTMALAR/SİMGELER

AML	Akut Miyeloid Lösemi
CTGF	Konnektif Doku Büyüme Faktörü
DAG	Diaçil Gliserol
DAMPs	Hasar İlişkili Moleküller
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EM	Elektron Mikroskopi
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK	Ekstraselüler Sinyal ile Aktifleşen Kinaz
ESM	Ekstra Selüler Matris
FACİT	Fibril İlişkili Kesintili Helikal Yapı
Fps/Fes	Fujinami Poultry sarkoma/felin sarkoma
GER	Granüllü Endoplazmik Retikulum
GLY	Glisin
HAM	Hücreler Arası Matris
IL	İnterlökin
JAK	Janus Kinaz
LIF	Lösemi inhibitör Faktör
LPA	Lizofosfoditik Asit
MAPK	Mitojenle Aktifleşen Kinaz
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
MMP	Matris MetalloProteinaz
PGDF	Platalet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGF-2	Prostaglandin F
PIAS	Aktive STAT İnhibitör Proteini
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SOCS	Sitokin Sinyal Supresörü
STAT	Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktör Beta
Th1	Yardımcı T hücresi 1
Th2	Yardımcı T hücresi 2
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF- α	Tümör Nekroze Edici Faktör Alfa
TYK2	Tirozin Kinaz2
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fibrozis ve fibrozisle seyreden hastalıkların (örneğin hepatik fibrozis, skleroderma, diyabetik nefropati, romatoid artrit, idiyopatik pulmoner fibrozis, arteriyosklerozis vb.) patogenezinde hücreler arası matriksin (ekstraselüler) aşırı sentezi, birikimi ve normal dokunun fonksiyonunun bozulması yatmaktadır (1). Doku tamiri ve yara iyileşmesi homeostazında en önemli rolü oynayan hücreler fibroblastlardır. Mezenşimal fibroblastların aktive olup, çoğalması ilgili alana göçü ve sonrasında farklılaşması hücreler arası matriksin (HAM) sentezi ve bu sentezin kontrol altına alınıp sonlandırılması gerekmektedir. Bu aşamada dengenin sağlanmasında birçok pro-fibrotik ve anti-fibrotik sitokin, protein ve enzimin de rolü olmaktadır (1).

Profibrotik proteinlere örnek olarak transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) ve konnektif-bağ doku büyüme faktörü (connective tissue growth factor, CTGF) verilebilir (1). Antifibrotik proteinlere ise tümör nekroze edici faktör (TNF- α) ve interferon- γ örnek verilebilir. Fibrotik yanıtın en önemli mediyatörü TGF- β dir. TGF- β özellikle kollajen tip-1 sentezi ve HAM yapımı uyarır. TGF- β ailesi yaklaşık 30 kadar protein içermektedir. Bunlara örnek olarak aktivinler, inhibinler, miyostatin, kemik morfojenik protein, antimüllerian hormon vb verilebilir (1). TGF- β 'nın başlıca 3 alt tipi mevcuttur (1). TGF- β -1, 2 ve 3 epitelyal hücre apoptozisini uyarır ve mezenkimal hücre proliferasyonu sonucu HAM sentezini artırdığı bildirilmiştir (1). TGF- β reseptörü hücre içi tirozin kinaz aktivitesine sahiptir (1). TGF- β reseptör aktivasyonu aynı zamanda hücre içi Smad yolaklarınca da regüle edilmektedir. TGF- β /Smad sinyal yolağı MAP-kinaz kaskadı tarafından kontrol edilmektedir.

Hücrelerin birbiri ile iletişimde ve hücre içi iletişimde en önemli aktörler hücre yüzeyinde yer alan reseptörlerdir (2). Bir sinyal molekülü reseptörüne bağlandığında hücre çoğalması, farklılaşması, hareketi, metabolizması, davranışı gibi olayların düzenlenmesinde görevli bir takım hücre içi yanıtları başlatır (2). Bu iletişimde hücre içinde bulunan tirozin kinazlar en önemli rolü oynarlar (2). Tirozin kinazlar protein fosforilasyonunu sağlayan ve hücre içinde; hücre bölünmesi, farklılaşması, hücre göçü ve apoptozis gibi birçok önemli biyolojik fonksiyonu kontrol eden enzimlerdir (2).

Tirozin kinazların iki sınıfı vardır: 1) reseptör tirozin kinazlar; 2) reseptör olmayan tirozin kinazlar. Birinci gruptakiler ligand bağlayan hücre dışı bir domeyne ve katalitik bir hücre içi kinaz domeynine sahip transmembran proteinlerdir. İkinci gruptakiler sitozolde, çekirdekte ve plazma membranının iç yüzünde bulunur ve Src ailesini, Fps/Fes'i (Fujinami poultry sarkoma/felin sarkoma) ve fes-ile ilişkili alt aileyi (Fer) içerir. Tirozin kinazlar bilinen en potent mitojenik ve transforme edici moleküller arasındadır.

Temel hücre içi sinyal yolları cAMP ve cGMP yolları, fosfolipaz C-Ca²⁺ yolağını, nükleer-faktör kapa-beta (NF-kB) transkripsiyon yolağını, Ca²⁺- kalmodülin, MAP kinaz yolağını ve JAK-STAT yolağını içerir (2).

Janus kinaz (JAK) - transkripsiyonun sinyal iletilicileri ve aktivatörleri (STAT) yolağının ise tirozin kinaz proteinleri ile transkripsiyon faktörleri arasında transkripsiyon faktörlerini doğrudan etkileyen sıkı bir ilişki kurduğu bildirilmiştir (2). STAT proteinleri sitoplazmada inaktif halde bulunan, SH2 domeynine sahip proteinlerdir (2). Reseptörüne bir ligandın bağlanması STAT proteinlerini bir araya getirir ve reseptörle ilişkili JAK protein tirozin kinazlara SH2 domeynleri boyunca bağlanmasına ve fosforillenmesine sebep olur. Fosforillenmiş STAT proteinleri dimerleşir ve çekirdeğe transloke olarak hedef genlerin transkripsiyonunu etkinleştirir (2).

Hücre membranında bulunan Janus kinaz (JAK) enziminin bilinen dört farklı tipi tanımlanmıştır: Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2. Hücre sitoplazmasında yer alan ve JAK tarafından aktive olan STAT'ların ise yedi farklı tipi tanımlanmıştır: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6 (3). JAK-STAT sinyal yolağının anormal aktivasyonu birçok hematolojik malignite ile ilişkili bulunmuştur (AML, MDS, vb..) (3). Jak1 proteini sınıf II sitokin reseptörü ile ilişkili sitokinler IL-2, IL-4, gp130 vb. ile interaksiyon sonucu metastaz, tümör progresyonu ve ilaç direncinden sorumludur (3). Jak2 proteinindeki çeşitli mutasyonlar (V617F) hematoproliferatif hastalıklarla ilişkili bulunmuştur (3-5). Tyk2 ise IL-6, IL-10 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerle ilişkili bulunmuştur (3-5).

Tofasitinib (CP 690.550): son yıllarda romatoid artrit tedavisinde oral olarak kullanılan, hastalık modifiye edici, hedefe yönelik ve immünmodülatuvar bir ilaçtır (6-9). Etkisini JAK-1 ve JAK-3 (özellikle)'ü bloke ederek etkisini gösterir. Bunun sonucunda yukarıda bahsedilen sitokinler, özellikle IL-2, -4, -7, -9, -15 ve IL-21 aracılı sinyalizasyon engellenir. Tofasitinibin inflamatuvar romatizmal hastalıklarda kullanımı ile ilgili bilgiler henüz yeterli değildir (8,9). Özellikle bu hastalıklarda birlikte kullanılan non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlarla olan in vivo etkileşimleri de net değildir.

Bu çalışmanın amacı fibroblastlarda bir Jak inhibitörü (JAK1-JAK3) olan Tofasitinib'in kollajen biyosentezi üzerine etkisini incelemektir. Ekstraselüler maktriğin ana bileşeni olan ve özellikle fibrozisle seyreden bağ dokusu hastalıklarında aşırı sentezi olan kollajenin yapımını fibroblastlarda in vitro olarak baskılamak hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ekstraselüler matriks

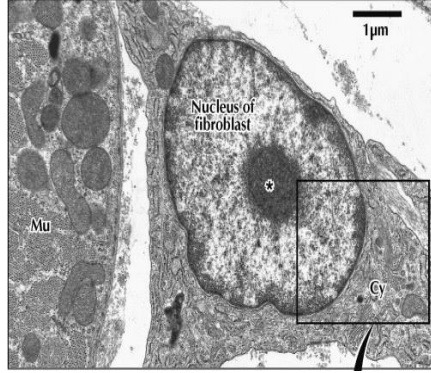
Ekstraselüler matriks (ESM) hücreler arasındaki boşluğu dolduran ve hücreler arası iletişimde, doku dayanıklılığında önemli rol oynayan ana destek yapısıdır. ESM büyük yapısal proteinlerden ve polisakkaritlerden oluşmaktadır (10). Bu protein yapıları kollajenler, proteoglikanlar, fibrillinler ve adezyon molekülleri örnek verilebilir. ESM dokularda yapısal dokuyu oluşturmakla birlikte stromal hücrelerin diferansiyasyon, migrasyon, adezyon, proliferasyon gibi aktif olaylarda rol oynar ve çeşitli büyüme faktörlerinin rezervuarı olarak da görev yapar (10). ESM yapılarını üreten ana hücreler fibroblastlar, kondroblastlar ve ostoblastlar olarak sayılabilir. Fibroblastlar çevresel etmenler, hipoksi, hücrel uyarımlar, biyokimyasal sinyaller gibi çeşitli sebeplere cevap olarak aşırı kollajen ve diğer konnektif doku proteinlerini üretirler (11).

2.1.1. Fibroblastlar

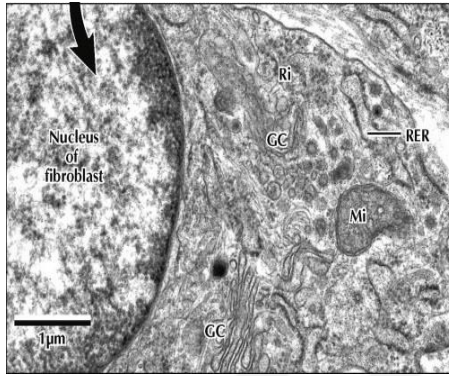
Bağ dokusunun ana hücrelerindedir. Farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden köken alırlar (12). Hemen hemen her dokuda (kornea, dermis, tendon, ligamen, kemik vb) bulunurlar. Ancak bazı dokularda fibroblast benzeri hücreler mevcuttur (12). Başlıca görevleri hücre dışı (ekstraselüler) matriks üretimi, yapısal destek (doku iskeleti), bariyer oluşturarak savunma sisteminde rol oynamak, hücreler arasında iletişim olarak sayılabilir (12).

Fibroblastlar dokularda aktif veya inaktif formda bulunurlar (Resim 2.1a, -b, -c). Fibroblastları tanımlamak amacıyla antikorlar geliştirilmiştir. Özgül antikor hala bulunmamakla birlikte FibAS01 ve Fib AS02 antikorları fibroblastlar için en özgün antikorlardır (13). Yapılan çalışmalarda bu antikorların yara iyileşmesi sırasında daha yüksek ekspresyona edildiği gösterilmiştir (13). Yine BF-45, BD-46 antikorları da tanımlanmıştır (14). Aktif fibroblastlar yıldız şeklinde yassılaştırmış hücrelerdir ve adeta kuyruk gibi uzanan sitoplazmik kısmı mevcuttur (15). Bu sitoplazmik kısmın hemotoksilen-eozin ile boyandığında kollajenden ayrımı oldukça güçtür. Elektron mikroskopi ile incelendiği zaman aktif yani herhangi bir uyarı ile ekstraselüler matriks oluşumlarını üreten fibroblastların genişlemiş golgi cisimciği ve granüllü endoplazmik retikulumları (GER) dikkat çekmektedir (15) (Resim 2.1c). Bu durum aktif üretim yaptığını göstermektedir. Fibrosit olarak adlandırılan inaktif formda olanlarda da aktif olanların tam aksine daha küçük ve oval hücrelerdir. Elektron mikroskopisindeki görüntüsünde aktif fibroblastlara göre daha küçük GER ve bol miktarda ribozom mevcuttur (Resim 2.1c). Sitoplazmaları ise daha asidofilik boyanır (15). Çeşitli dokulardaki özellikleri nedeniyle örneğin tendonların yapısında bulunan fibroblastların

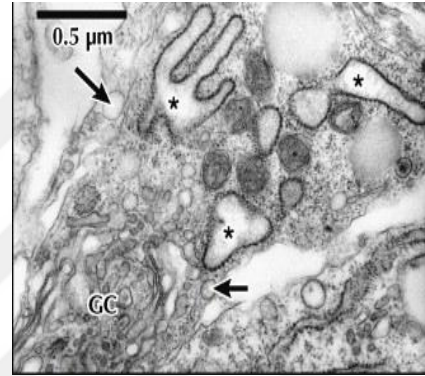
gerilme, düz kas yapısında bulunan miyofibroblastların kasılma gibi özellikleri bulunduğu için bu tür hücelere fibroblast benzeri hücreler olarak da tanımlayan araştırmacılar mevcuttur (16).



Resim 2.1a: Normal Fibroblastın Elektron mikroskopi (EM) görüntüsü (17)



Resim 2.1 b: İnaktif Fibroblast Sitoplazması (17)



Resim 2.1c :Aktif Fibroblast(genişlemiş GER ve ER)(17)

2.1.2. Miyofibroblastlar

Hem düz kas hücresi hem de fibroblast hücresi özelliklerini gösterebilen hücrelerdir (12). Yani kontraktıl yapıdadır ve matriks üretimi de yapabilmektedir. Fibroblastların transformasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir (18). Özellikle yara iyileşmesi sırasındaki granülasyon dokusunda ve tümör dokusunda yoğun olduğu gösterilmiştir. Herhangi bir doku parçalanması durumunda yara iyileşmesi için gerekli matriks üretimini yapar aynı zamanda kontraksiyon sağlayarak doku bütünlüğünü sağlar. Aşırı matriks salınımı olursa olay skarla sonuçlanabilir (12). Elektron mikroskopi ile incelendiğinde yine oldukça büyük GER ve uzunlamasına gözlenen aktin filamanları yer alır (19). Bu özelliğiyle birlikte düz kas hücresine benzemektedir. Etrafı daha çok fibronektinlerden oluşan adına fibroneksüs denilen yapıyla sarılmıştır. Hücre içi ve dışı filamanların birleştiği yer olarak bilinir(18).

2.1.3. Diğer Fibroblast Benzeri hücreler

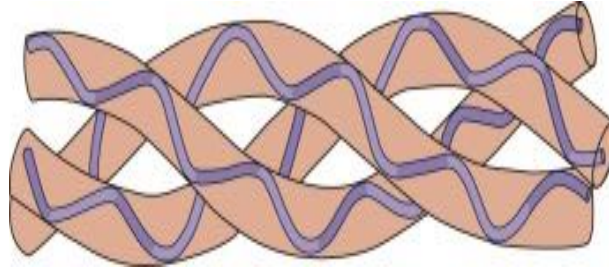
Birçok organda farklı özellikler göstermeleri nedeniyle bu adla adlandırılmışlardır. Perinöriyal hücreler, A vitamini depolayan hücreler, salgı yapan intersitisyel hücreler sayılabilir (12).

2.2 KOLLAJEN

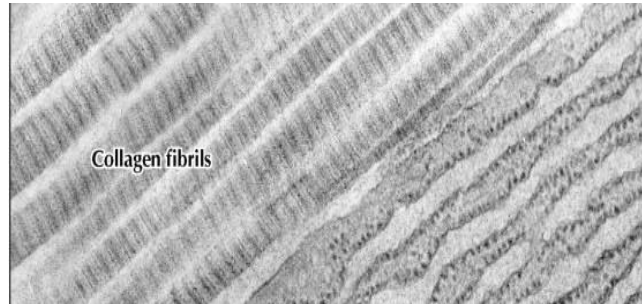
Kollajenler vücuttaki toplam protein miktarının yaklaşık %30 unu oluşturan, yaklaşık 25'den fazla farklı tipinin tariflendiği geniş bir protein ailesidir (20). Konnektif dokulardaki ESM' nin ana bileşenidir. Dokuların yapısında, dayanıklılık ve mimarisinde önemli rol oynar. Buldukları yapıya göre özellik gösterirler (20).

2.2.1. Kollajen'in Yapısı

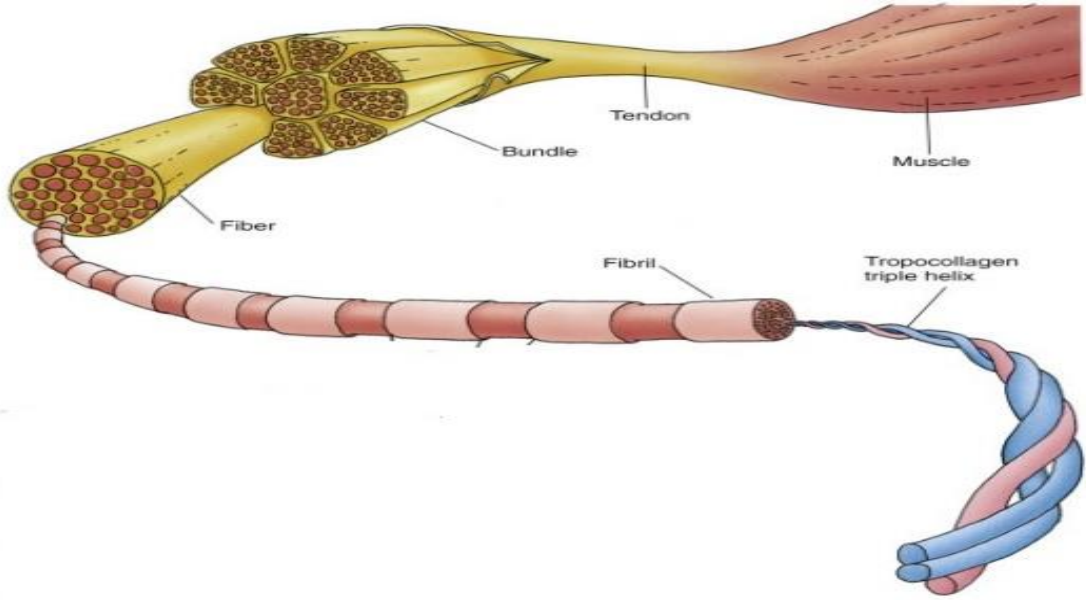
Kollajenler üçlü peptid zincirlerinin oluşturduğu heliks yapıda proteinlerdir (Şekil 2.1a, -b, Resim 2.2) (21). Heliks yapıyı oluşturan her bir zincir 3'lü aminoasid yapının tekrarlamasıyla oluşur. Üçlü tekrar eden aminoasidlerin üçüncü olanı kesinlikle glisindir. Yani glisin-X-Y-Glisin-X-Y olarak zincir devam eder (21). Glisin (GLY) en küçük yan zincire sahip olan olmazsa olmaz aminoasiddir. X ve Y ise herhangi bir aminoasid olabilmekte birlikte en çok X prolin, Y ise hidroksiprolin olarak karşımıza çıkmaktadır (21). Çünkü prolin ve hidroksiprolinin kısıtlı olan hacim ve dönüşleri, peptid zincir ve heliks yapının sağlamlılığını sağlamaktadır. Zincir içindeki ve zincirlerin birbiriyle bağlanmasını CO ve NH grupları arasındaki hidrojen bağları sağlamaktadır. X ve Y aminosidinin yan zincirleri bu bağlanmalardan sorumludur (21).



Şekil 2.1a : Kollajenin 3'lü heliks yapısı (21).



Resim 2.2: Elektron mikroskopi kollajen görünümü(22)



Şekil 2.1b: Kollajenin Şematik Resmi (23).

2.2.2 Kollajen Tipleri

Kollajen ailesi temelde fibriler ve fibril yapıda olmayan kollajenler olarak ikiye ayrılmaktadır.

2.2.2.1. Fibriler Kollajen

Fibriler kollajen tendon, ligamen ve cilde sağlamlık veren ana yapıdır (24). Tablo 2.1’de gösterildiği gibi tip 1, 2, 3, 5 ve 11 kollajenler fibriler yapıdadır. Dokularda kollajen tipleri karışık halde bulunabilir. Örneğin dermal yapıda tip 1 ve 3, kornea yapısında tip 1 ve 4 karışımı mevcuttur (24). En yaygın olanı tip 1 kollajendir. Dokulara esneklik ve sağlamlık sağlama da ana rol oynar. Tip 1 kollajen iki adet alfa 1, bir adet alfa 2 peptidinden oluşmuştur. Hemen hemen her zincir yaklaşık 1000 aminoasidden oluşmuştur (24).

2.2.2.2. Non-Fibriler Kollajen

Daha çok bazal membranların yapısında bulunur (21). Kollajen olmayan yapıların da arasına girdiği çeşitli uzunluktaki üçlü heliks yapıların birleşimi ile oluşan heterojen bir gruptur. Bu gruba Tip 4 kollajen, fibril ilişkili kesintili helikal yapı (FASİT) örnek verilebilir (21). Bazal membranlar epitelyal hücrelerin (schwann ve adiposit hücrelerde dahil), ekstraselüler matriksin ince bazal yapısıdır. Kollajen olmayan sekanslar da bazal membran yapısında bulunur (21).

Damar duvarlarında, böbrek gibi yapılarda seçici geçirgenlik, filtrasyon gibi önemli görevleri vardır (21). Tip 4 kollajene karşı oluşan bazı antikorlar sonrasında gelişen bazal membran hasarı ile karakterize çeşitli hastalıklar da mevcuttur (alport sendromu, good-pasture sendromu gibi)(24). Tablo 2.1 de kollajen tipleri ve dağıldıkları dokular gösterilmiştir.

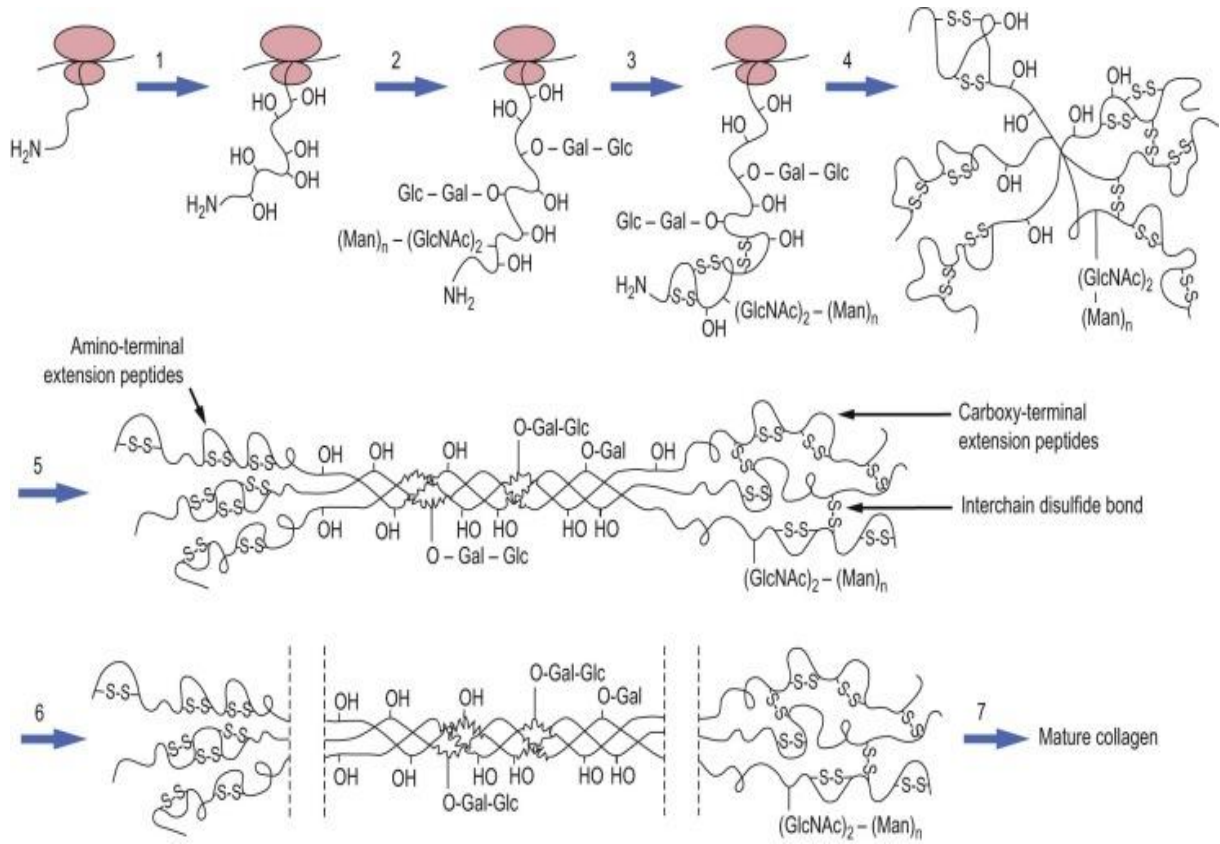
Tablo: 2.1 Kollajen Tipleri ve Dağıldıkları Dokular (21)

Tip	Sınıf	Dağılım
I	Fibriler	Deri, tendon, kemik
II	Fibriler	Kıkırdak, kornea
III	Fibriler	Konnektif dokular (deri, akciğer, damar)
IV	Non-Fibriler	Bazal membranlar
V	Fibriler	Karaciğer, kornea, mukoza
VI	Non fibriler	Konnektif dokular
IX	Fasit	Kıkırdak, vitröz sıvı
XI	Fibriller	Kıkırdak
XII	Fasit	Embriyomik tendon, deri
XIII	Transmembrane domain	Yaygın dağılık
XIV	Fasit	Fetal deri, tendon

2.2.3. Kollajen Sentezi

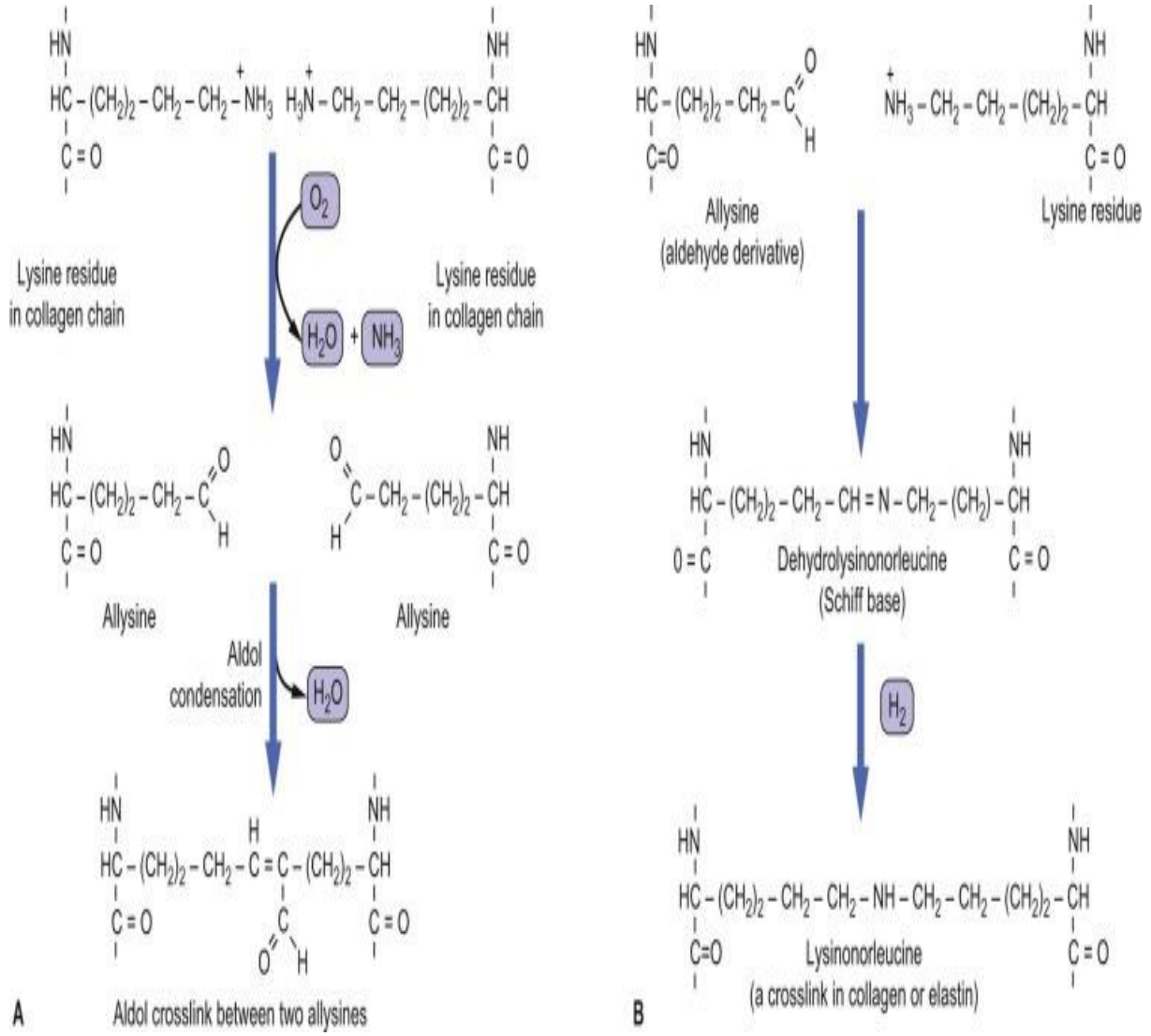
Kollajen sentezi Endoplazmik retikulumda (ER) başlar (23). İlk oluşan kollajen peptidi daha sonra birçok modifikasyona uğrar. Sırasıyla ER, golgi cisimciği ve ekstraselüler matriks boşluğunda son halini alır (23). Başta gelen sinyal peptidi ile ribozomların ER'ye bağlanması sonucu preprokollajen sentezi başlar. Sinyal peptidinin ER'den uzaklaşmasıyla post-translasyon başlar ve prokollajen olarak sentez devam eder. 3 farklı hidroksilaz, lizin ve prolin kalıntılarına hidroksil grubu ekleyerek onları hidroksiller ve 3,4-hidroksiprolin ve δ -hidroksilizin oluşturur (25). Hidroksillenme işlemi sırasında C vitamini de kofaktör olarak

görev alır. Hidroksilasyon sonrasındaki basamak glikolizasyondur. -O ve -N glikalizasyon hidroksilizine galaktozil kalıntılarının galaktozil transferaz ile bağlanması sonucu gerçekleşir. Hidroksilasyonun kapsamı kollajen tiplerine ve fibriller, non-fibriler kollajen türlerine göre değişiklik gösterebilir (25). Sağlamlık, uzunluk gibi özelliklerde bu işlem önemli bir rol oynar. Peptitler arası ve peptid içi disülfid bağları protein disülfid izomeraz tarafından C-terminal uçlarında oluşturulmaktadır. Bağlar sonrasında üçlü heliks yapıya kavuşur (25). Bu aşamada prokollajen çözünebilir ve aynı zamanda N ve C uçlarına sahip bir yapıdadır ve golgi aparatına transfer edilir. Golgi aparatında veziküllere alınarak ekzositoz ile ekstraselüler boşluğu gönderilir (Şekil 2.2) (21).



Şekil 2.2: Kollajen Sentezinin ER’da Başlayıp Golgi Ve Ekstraselüler Alana Gönderilmesi (21).

Ekstraselüler boşlukta prokollajen proteinazları ile N ve C terminal bölgeleri uzaklaştırılır. Aldehit türevi çapraz bağlar ile tropokollajen molekülleri stabilize edilerek çözünmez hale getirilir (25). Lizil oksidazlar lizin ve hidroksilizin kalıntılarında amino gruplarını deaminasyon yaparak allisin ve hidroksialisin olarak bilinen reaktif aldehit gruplarını oluşturur (25). Aldehit grupları diğer aldehit gruplarıyla aldol çapraz bağları oluştururlar. Ayrıca oksitlenmemiş lizin ve hidroksilizin bağlarıyla schiff bağlarını oluşturarak kollajenin son olgun yapısını meydana getirmiş olurlar (Şekil 2.3) (21).



Şekil 2.3: Kollajenin Ekstraselüler Alanda Son Olgun Halini Alması (21).

2.2.3.1 Kollajen Sentezinin Regülasyonu

Özellikle Tip 1 kollajen sentezi birçok ekstraselüler faktörden etkilenmektedir. Sitokinler, Reaktif oksijen Ürünleri (ROS), hipoksi, hücre-hücre iletişimi, hücre-matriks iletişimi sayılabilir (Tablo 2.2) (26).

Tablo 2.2: Kollajen Sentezinde Ekstraselüler Sinyaller (26)

Sinyal	Hücresel Kaynak
TGF- β	İnflamatuvar hücreler, Plateletler, fibroblastlar, makrofajlar
PDGF	Plateletler, fibroblastlar, makrofajlar, endotelial hücreler
CTGF/CCN2	Fibroblastlar
İnsülin benzeri büyüme Faktörü-1	Fibroblastlar
IL-1 α	Keratositler
IL-4, IL-13 Th2	Th2 lenfosit, mast hücreleri
IL-6	Makrofaj, B hücreleri, T hücre, Fibroblastlar
Kemokinler (MCP-1, MCP-3)	Nötrofil, Epitelial hücreler, endotelial hücreler, fibroblastlar
Fibroblast Büyüme Faktörü	Fibroblastlar
Endotelin 1	Endotelial hücreler
WNT ligand	Anormal aktivasyon sonucu gelişen yolaklar
NOTCH/jagged	Anormal aktivasyon sonucu gelişen yolaklar
Lizofosfoditik Asit	Yaralanmış dokular
Hipoksi	Hipoksik dokular
Reaktif Oksijen Ürünleri	İskemi reperfüzyonu sonrasında

Kollajen üretiminde transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler mevcuttur (26). Transkripsiyonu uyaran faktörlere Ets1, Smad2/3, Egr-1, and CCAAT-bağlayıcı faktör (CBF) örnek verilebilirken, Sp3, C/EBP, YB1, c-Krox, and Fli-1 adlı faktörlerde transkripsiyonu baskılayanlar arasında sayılabilir (27). Bu faktörler dış uyarılar sonucunda hücre içi yolaklar, kofaktörler, çeşitli enzimler ile etkileşime girerek kollajen sentezini regüle etmektedirler (27). Fibrozis gelişimi sadece ortamdaki fibroblastlardan oluşmamaktadır. Kemik iliği kökenli mezenşimal hücreler, endotelial hücreler de miyofibroblastlara dönüşerek kollajen sentezi yaparlar (26). Miyofibroblastlar aynı zamanda TGF- β 'nın da ana kaynağını oluşturur. Normalde herhangi bir doku hasarında yeterince ESM bileşenleri ve kollajen üretimi sonrasında apoptoza uğrar, ancak bazı durumlarda aşırı fibrotik yanıt oluşturur ki skleroderma bazı gibi hastalıklarda normal dokunun yerini fibrozisin aldığı bilinmektedir (26). Sebep ne olursa olsun sonuçta kontrolsüz kollajen üretimi mevcuttur. Düz damar duvarında intima ve endotel arasında

bulunan perisitler normalde vasküler hemostazis de rol oynarken uyarılar sonucunda kollajen üretimi yapan hücrelere dönüşmektedirler (27). Patolojik durumlarda (sistemik skleroz gibi) perisitlerde artmış PDGF reseptörlerine rastlanmıştır. Aşırı kollajen ve ESM bileşenleri üretimi yaparak damar duvarında hasara ve fonksiyon kaybına neden olurlar. Yine epitelyal hücreler çeşitli uyarılar sonucunda fibroblastlara dönüşebilirler (27). Embriyonel gelişimde de bu dönüşüm mevcuttur. Ancak karaciğer fibrozisi, renal fibrozis gibi patolojik durumlar da bu dönüşüm kontrolden çıkarak aşırı kollajen birikimi ile sonuçlanmıştır (27).

2.2.3.2 Fibrozisde Hücre Dışı Sinyaller-Etmenler

Kollajen üretiminde ve fibrozis oluşumunda daha önce de bahsedildiği gibi birçok faktör rol oynar. Hücre-hücre etkileşim, hipoksi, ROS, interlökinler, çeşitli büyüme faktörleri ve TGF- β majör uyarıcıdır (26).

2.2.3.2.1 TGF-Beta (β) sinyalizasyonu

TGF- β plateletler, monosit makrofaj, fibroblast ve daha birçok hücreden sentezlenen 3 izotipi bulunan bir sitokindir. ESM'de fibrilline bağlı olarak da latent formda bulunmaktadır (26). Mezenkimal hücrelerde kollajen üretiminin güçlü bir uyarıcısıdır ve fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü, migrasyon adezyon gibi hareketlerini düzenler. Epitelyal ve endotelyal hücrelerde de TGF- β hücrelerin fibroblastlara transformasyonunu sağlar (26). TGF- β uyarımı ile hücre içi SMAD adı verilen yolaklar kollajen üretimi için aktive olurlar (28) . Bu sentez uyarıcı yolakların SMAD7, BAMBI gibi inhibitör etkili endojen kontrol mekanizmaları da mevcuttur (29). TGF- β uyarımıyla aktive olan alternatif non-SMAD yolaklar da mevcuttur. Bu yolaklara Protein kinazlar (c-Abl, p38 ve JNK, integrin- ilişkili fokal adhezyon kinaz FAK, and TGF- β tarafından aktive edilen kinaz TAK1), PI3 kinaz gibi lipid kinazlar ve kalsiyum bağımlı kalsinörin fosfatazları örnek verilebilir (26) .

2.2.3.2.2. Konnektif Doku Büyüme Faktörü(CCN2-CTGF)

Konnektif doku büyüme faktörü (CNN2) 40 kDa büyüklüğünde sisteinden zengin bir faktördür. Yara iyileşmesinde ve normal anyiogenezde rol oynar (26). Yapılan çalışmalarda CNN2'den eksik fareler ölü olarak doğmuşlardır. Normal dokularda saptanması oldukça güçtür ancak sistemik skleroz gibi fibrozisin arttığı durumlarda ekspresyonunun fazla olduğu gösterilmiştir (26). TGF- β , IL-4 ve VEGF ile fibroblastlarda sentezi indüklenirken anti-TNF

alfa ve iloprost ile de sentezi inhibe edildiği çalışmalar mevcuttur (26). Transgenik farelerde aşırı konnektif doku büyüme faktörünün deri fibrozisi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (30). Profibrotik etkisi TGF- β ile paralellik göstermektedir. Bazı yazarlar TGF- β 'nin etkilerini bu faktör üzerinden yaptığını söylese de net olarak ispatlanmış değildir (26).

2.2.3.2.3. Plaketalet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF yara iyileşmesinde ana rol oynayan disülfid bağ içeren stromal hücreleri etkileyen heterodimerik yapıda bir proteindir (26). Esas olarak plaketaletlerden salınsa da makrofaj, endotel hücreleri ve fibroblastlardan da salınır. PDGF alfa ve beta reseptörleri aracılığıyla fibroblastlar için kuvvetli mitojen ve kemoatraktan olarak rol oynar. Kollajen, proteoglikan, fibronektin üretimini uyarır ayrıca TGF- β , IL-6 gibi sitokinlerin de salınımını artırır (31). PDGF alfa reseptörünün fazla olduğu transgenik farelerle yapılan çalışmalarda artmış fibrozise rastlanmıştır (32). Yine fibrozisin arttığı skleroderma gibi hastalıklarda PDGF miktarının bronkoalveolar lavajda arttığı gösterilmiştir (33).

2.2.3.2.4. WNT ve NOTCH Yolakları

Bu yolaklar özellikle normal hücre-hücre etkileşimde önemli rolleri olan proteoglikan ailesidir. Kolorektal kanser, Romatoid Artrit, Osteoporoz gibi hastalıklarda bu yolaklarda regülasyon bozukluğunun olduğu gösterilmiştir (34). WNT yolağı hücre içinde Beta-katenin üzerinden etkilemektedir. Doku remodeling ve fibrozisi etkileyen bir çok genin transkripsiyonu WNT, β -katenin tarafından indüklenmektedir (34). WNT 10b aşırı ekspresyonunu olduğu transgenik farelerle yapılan çalışmalarda ciltte aşırı fibrozisin geliştiği, doku iyileşmesinde normalden fazla kollajen sentezinin arttığı gösterilmiştir (35). Sklerodermanın akciğer tutulumunda yapılan biyopsilerde ise WNT ligandının, reseptörlerinin ve β -kateninin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (36).

NOTCH ise özellikle doku iyileşmesinde rol alan transmembran reseptörüdür. Endotel hücre ve fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünde rol aldığı bilinmektedir (37). Sklerodermalı fare modelinde yapılan çalışmalarda akciğer ve deride NOTCH sinyal yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (37).

2.2.3.2.5. İnterlökinler

İnterlökinler birçok hücreden salınan adeta hücreler arası haberleşmeyi sağlayan protein yapıda moleküllerdir. Organizmada oldukça fazla sayıda ve farklı etkilere sahip interlökinler mevcuttur (38). Sklerodermalı deri biyopsilerinde epidermal keratonisitlerin aktive olduğu ve IL-1 alfa salgıladığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Epidermal sklerodermalı keratinositlerin ve normal fibroblastların beraber ekildiği hücre kültüründe IL-1 alfa aracılığıyla fibroblastların miyofibroblastlara dönüştüğü gösterilmiştir (38). T hücrelerinin immun yanıtta önemli olduğu bilinmektedir. T helper 2 (Th2) yönüne kayan immun yanıtta fibrotik yanıtın arttığı yönünde çalışmalar mevcuttur (39). Yanıtın Th2 yönüne kaymasını sağlayan IL-4 dür. IL-4 fibroblast proliferasyonunu, kemotaksisi, kollajen üretimini aynı zamanda TGF- β ve CTGF salınımını da indüklemektedir. Yapılan çalışmalarda sklerodermalı hastalarda serum IL-4 seviyesinin arttığı gösterilmiştir. IL-6 da monosit, makrofaj, endotel ve fibroblastlarda salınan kollajen sentezini stimule eden bir interlökindir. IL-6 etkisini hücre içi JAK-STAT yolağı üzerinden göstermektedir. Kollajen sentezinin arttığı skleroderma hastalarının serumunda IL-6 düzeyinin arttığı bilinmektedir (39). Son zamanlarda astımlı hastalarda interlökin ailesinden olan IL-13 düzeyi ile birçok çalışma yapılmıştır. IL-13'ün fibrotik yanıtta katkısını ya fibroblastları direk uyararak ya da makrofajlarda TGF- β salınımını artırarak yaptığı düşünülmektedir. Bu interlökinlerin hedef alınması hastalıkların tedavisine katkı sunmaktadır (40).

2.2.3.2.6. Kemokinler

Kemokinler önceleri sadece kemotaktik özellikleriyle ön plana çıkarken artık günümüzde hücre aktivasyonlarında da etkili olduğu kabul edilmektedir. Çok sayıda kemokin mevcuttur. Kollajen üretimi ve fibrozisle alakalı olan kemokinlerin başında ise MCP-1 gelmektedir (26). MCP-1 endojen TGF- β 'yı artırarak direk kollajen üretimini etkilemektedir. Sklerodermalı hastaların serumlarında MCP-1, CXCL8, CCL18 kemokinlerinin arttığı saptanmıştır (26). Mononükleer hücreler ve dermal fibroblastlar bu kemokinleri üreterek kollajen miktarında artışa neden olmaktadır (26).

2.2.3.2.7. Biyoaktif Lipitler

Biyoaktif lipitler fibroblast fonksiyonları üzerinde güçlü modülatördürler. Birçok prostanoidler fibroblastlar üzerinde etki yaparak kollajen üretimini azaltırken, prostoglandin F (PGF2) fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezini artırmaktadır (41). PGF2 reseptörlerinin hasarlandırıldığı fare modellerinde fibrozis oluşturulamayan çalışmalar mevcuttur (41). Aynı

şekilde lizofosfoditikasitin de (LPA) fibroblast kemotaksisinde rol oynadığı gösterilmiştir. LPA'nın olmadığı farelerde deneysel fibrozisten korunmuşlardır (42). TGF- β sinyaline katkıda bulunduğu düşünülmektedir (42).

2.2.3.2.8. Kollajen Üretiminde Doğal İmmunite etkisi

Kollajen üretiminde fibroblastları etkileyen faktörler sadece yukarıda bahsedilen madde ve moleküllerle sınırlı değildir. Doğal immun yanıt innate immunité olarak da adlandırılan bağışıklık sisteminde fibroblastları ekilemektedirler (43). Toll-like reseptör (TLR4) aşırı aktivasyonunun karaciğer fibrozisine sebep olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Aynı zamanda karaciğer satellit hücrelerinin TGF- β uyarımına hassaslaşması fibrozis yanıtının artmasına neden olmaktadır (43). Hasar ilişkili yapılar (DAMPs) olarak adlandırılan TLR ligandları; oksidatif stres, doku hasarı, otoimmünite sonucunda TLR reseptörlerini uyararak fibroblast aktivasyonu ve sonuçta kollajen üretimini artırmaktadır (44). Yine sklerodermalı hastaların akciğer ve deri biyopsilerinde TLR3 ve TLR4 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (44).

2.2.3.2.9 Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstraselüler matriks ve bazal membran bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip enzim ailesidir. Genellikle bağ dokusu elemanları tarafından salgılanmaktadır. Normal yara iyileşmesi, doku yapılanması gibi fizyolojik durumlarda görev alırlar ancak kanser, invazyon, anjiyogenez ve metastaz gibi patolojik durumlarda da fonksiyona sahiplerdir. MMP enzim ailesi, 4 gruba ayrılır.

- 1- Kollajenazlar (MMP-1, -8, -13, -18)
- 2- Stromelizinler (MMP-3, -7, -10, -11, -12)
- 3- Jelatinazlar (MMP-2, -9)
- 4- Membran tip MMP'lar (MT-MMP-14, -15, -16, -17).

Kollajenazlar, kollajen tip I, II, III, VII ve X gibi fibriler kollajenlerin yıkımından sorumludurlar. Jelatinazlar, denatüre kollajenin ve bazal membranın yıkımından sorumludurlar. Endotelial, epiteliyal, yağ, kas, periferel sinir hücrelerinin ekstrasellüler matriksinin yıkımından sorumludur. Stromelizinler, kartilaj proteoglikanları dahil bütün ekstrasellüler matriks komponentlerini yıkıma uğratabilmektedirler (45).

MMP'ların düzenlenmesinde çeşitli faktörler mevcuttur. Bu faktörler gen ekspresyonu, inaktif zimojenler veya endojen inhibitörler olarak sayılabilir. Gen ekspresyonu çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler (IL-1, TNF), tümör promotörleri, hormonlar, kimyasal

ajanlar veya çevresel diğer faktörler sonucunda MMP genleri farklı hücrelerde eksprese olabilirler. Diğer bir MMP aktifleşmesi ise dokudan salınan inaktif MMP'lerin otokataliz, doku veya plazma proteinazları, fırsatçı bakteriyal proteinazlar veya diğer MMP'lerin etkilemesi ile oluşmaktadır. MMP'lerin inhibisyonu yada negatif yönde kontrolü ise doku inhibitör proteinleri ile (TIMPS) yapılmaktadır. İnsan vücudunda genetik olarak farklı 4 adet TIMP tanımlanmıştır. TIMP-1, -2, -3, -4. TIMPS'lar, MMP'lar ile koordineli olarak eksprese edilmektedirler. TIMP'lar, aktif MMP enzimini inhibe etme özelliğine sahiptir. Otoaktivasyonu inhibe etmemektedir. Böylece enzimler inaktive olana kadar etki edebilirler. Bu özellik aslında ESM yıkımını da kontrol altında tutulmasını sağlar. TIMP'ların MMP inhibisyon görevine ek olarak mitojenik ve hücre büyümesini indükleme özelliği de vardır. TIMP-1 ve TIMP-2 bazı tümör hücreleri için büyüme faktörleridir. Bazı tümör çeşitlerinde yüksek oranda TIMP bildirilmiş hatta yüksek bulunması kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir. Ayrıca MMP/doku inhibitör proteini oranının değişmesi romatoid artrit, osteoartrit, aterosklerozis, kalp yetmezliği, pulmoner amfizem gibi hastalıklarda da gözlenmektedir (45).

2.3. HÜCRE İÇİ SİNYAL YOLAKLARI

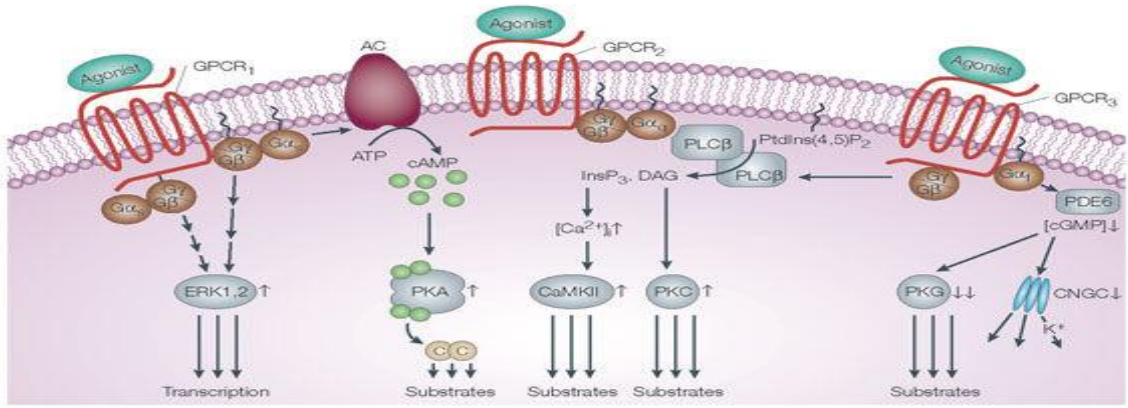
Yukarıdaki bölümde kollajen üretimde hücre dışı etkili faktörlerden bahsedilmiştir. Bu bölümde de fibroblast aktivasyonunu sağlayan o faktörlerin hücre içi hangi yolları kullandığından bahsedilecektir.

Hücreleri etkileyen faktörler, sinyaller ya da hormonlar hedef hücrede reseptör denilen yapılar aracılığıyla etkilerini göstermektedirler. Reseptörlerin hücredeki bulunma yerleri, lokalizasyonları etki mekanizmalarını da değiştirmektedir. Örneğin bazı steroid yapıdaki hormonlar direk hücre içinde ki reseptörleri aracılığıyla hedefine ulaşmaktadırlar. Büyüme faktörleri ya da interlökinler ise daha çok hücre yüzey membranında bulunan reseptörlerle bağlanarak hücre içindeki bir takım sinyal yollarını aktive ederek proliferasyon, transkripsiyon gibi sonuçlara sebep olurlar. Hücre yüzey reseptörleri temelde 3 farklı türdedir(46).

1. İyon kanalı eşlikli reseptörler (örnek: asetilkolin reseptörleri)
2. G-proteinleri ile ilişkili reseptörler
3. Enzimatik etkili veya sitoplazma enzim aktivitesine neden olan reseptörler

2.2.3.1. G-proteinler ile ilişkili Reseptörler

Yapısal olarak en büyük reseptör ailesidir. Yedi geçişli transmembran proteini olarak da isimlendirilmektedir. 1000'den fazla çeşidi tanımlanmıştır. Nörotransmitter, nöropeptidler, peptid hormon reseptörleri örnek verilebilir. α , β ve γ olarak 3 alt birimden oluşmaktadır. İstirahat halinde α alt birimi GDP bağlıdır ve aynı zamanda β ile γ birleşik durumdadır. Aktive olması halinde α alt birimine GTP bağlanır ve β ile γ birbirinden ayrılarak hedef protein ile etkileşir. Bu reseptörler ikincil haberci olarak cAMP, Protein Kinaz A, Kalmodulin, Fosfolipaz C, Ca^{++} ve diaçilgliserol gibi yapıları kullanır (Şekil 2.4). Bu ikincil haberciler iyon kanallarının, hücre içindeki metabolik yollarda görev alan enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesinde ayrıca nükleusta DNA'ya bağlanarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alırlar (46).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

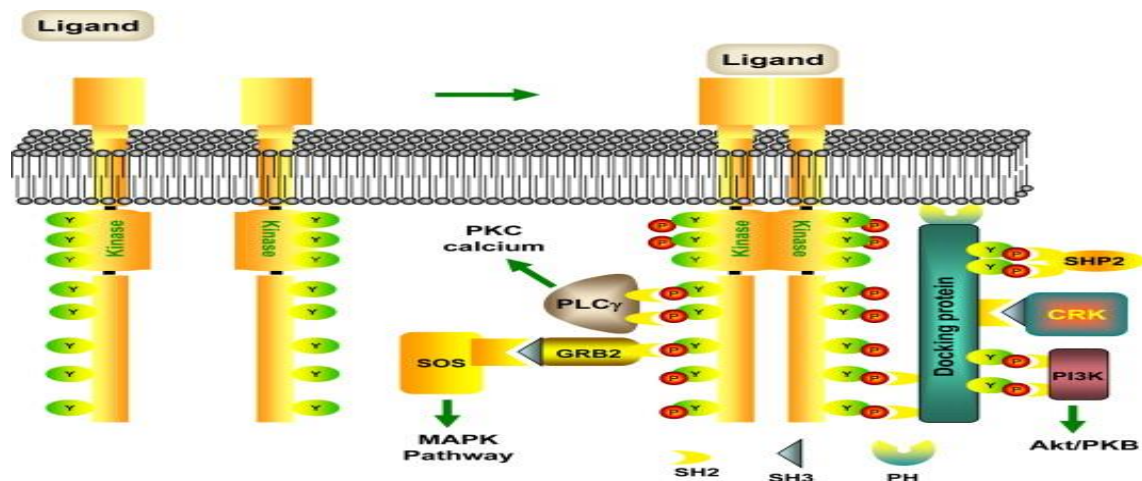
Şekil 2.4: G Protein Yapısındaki Reseptörler Ve İkincil Yolakları (47)

2.3.2. Enzimatik Etkisi Olan reseptörler (Reseptör Tirozin Kinazlar)

Büyüme faktörleri reseptörleri olarak da adlandırılan bu reseptörler isimlerini kendisine bağlanan ligandların yapısından alırlar. Bunlara Epidermal Growth faktör (EGF), PDGF ve insülin reseptörleri örnek verilebilir. Genellikle tek geçişli alfa-heliks yapıda, integral zar proteinleri olup -N uçları zarın ekstraselüler yüzeyinde, -C uçları zarın sitoplazmik yüzeyinde yer alır. Reseptör tirozin kinazların (RTK) sitoplazmik bölgesi tirozin kinaz aktivitesi gösterir (48). Ligand reseptöre bağlandıktan sonra iki reseptör dimerleşir ve substratlarındaki tirozin kalıntıları fosforillenir. Sitoplazmik kısımların birbirini fosforlamasına otofosforilasyon denir. Otofosforilasyon ile hem protein kinaz aktivitesi artarken hem de diğer sitoplazmik proteinlerin bağlanması için uygun bölgeler oluşturulur. Aktifleşmiş RTK ile ilişkiye giren 3 tip hücre içi protein tanımlanmıştır.

1. Reseptörle aktifleşmesi sonucu aktifleşen proteinler: Bu proteinler otofosforilasyon yapamazlar. Hedef protein ya adaptör proteindir (Örnek: Grb2) ya da reseptörle birleşince aktifleşen bir enzimdir (örnek: PI3 kinaz, fosfolipaz C). RTK aracılığıyla aktifleşen fosfolipaz C hücre membranındaki fosfolipitleri etkileyerek inositol 1,4,5 trifosfat'ın (IP3) ve diaçil gliserol'un (DAG) meydana gelmesini sağlar. IP3 hücre içi kalsiyum depolarından Ca^{++} salınımını sağlar. Ca^{++} ve DAG, protein kinaz C'yi aktive eder. Protein Kinaz C hücrel yanıtla aracılık eden proteinlerin fosforilasyonunu katalizler. Bu fosforilasyonlar sonucu aktifleşen proteinler (MAPK) nihayetinde gen transkripsiyonunu regüle etmektedir.
2. Hedef protein bir enzim substratı olabilir. Bu substratın kendisi bizzat bir enzim olabilir. Bazı durumlarda ise substrat bir kinazdır. Bu durumda RTK'nın hücre içi faaliyet yolu, etkilenen kinazların birbirini aktifleştirmesi sayesinde devam eder.
3. Bazı hedef proteinler faaliyet yolundaki son noktada görev alırlar. Örnek: hücre iskelet proteinleri. Bu proteinlerin fosforlanması, onların özelliğini değiştirir ve hücre içinde yeni yapıların ortaya çıkmasını sağlar (49) .

Bütün bu yollarda görev alan proteinlerin birbiriyle ilişki kurmalarında görev yapan 2 bölgeleri vardır. SH2 (Src homoloji-2) ve SH3 olarak adlandırılırlar. Her reseptörün SH2 bölgesi kendisine özgüdür (Şekil 2.5). Hedef bölge SH2 bölgesinin fosforlanması tirozin kinazın otofosforilasyonu ile meydana gelir. SH2 bölgesi taşıyan bir protein, ancak SH2-bağlanma bölgesi fosforlanmış olan reseptör proteine bağlanabilir. Bazı proteinler çok sayıda SH2 bölgesi taşıyabilir. Bu durum, bu proteinlerin fosfoproteinlere bağlanma afinitesini veya farklı fosfoproteinlere bağlanabilme yeteneğini artırır. SH3 bölgesi ise SH2 bölgesi bulunan proteinlerde efektör fonksiyon yapar. RTK'lar hücre içersinde değişik faaliyet yolları kullanarak uyarımın etkisinin güçlenmesini ve cevabın oluşmasını sağlarlar. Bu yollara cAMP, Ras/raf/MEK/ERK, Map Kinaz (MAPK), yolları örnek verilebilir.

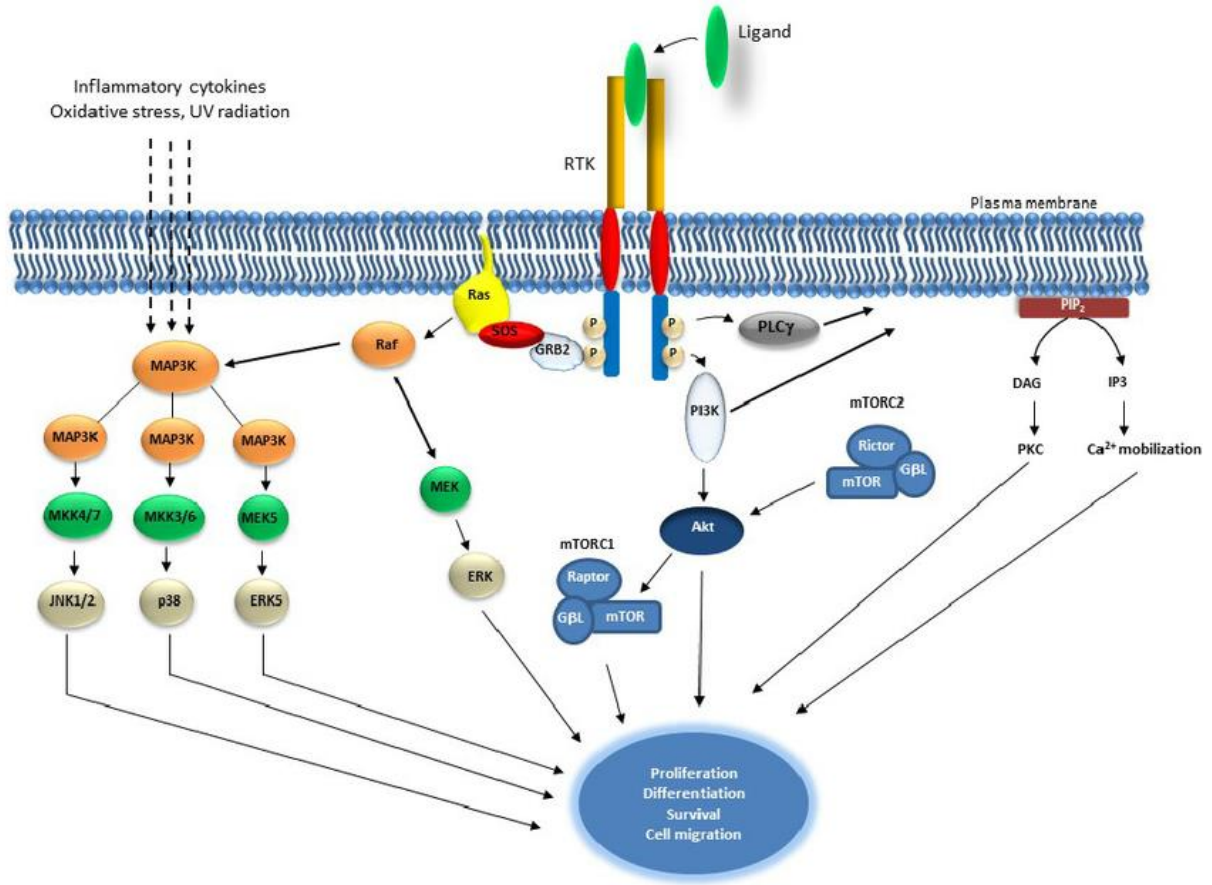


Şekil 2.5 : RTK'ların Aktifleşmesi Şematik Olarak (50).

Ras yolağının aktivasyonundaki sorunlar bazı kanserlere yol açtığı bilinmektedir. Reseptör Tirozin kinazların kullandıkları diğer bir yolak ta MAP-kinaz yolağıdır (Şekil 2.6). MAP kinazlar Serin/treonin kalıntılarını fosforilleyerek etkilerini gösterirler. MAP-kinazlar etkinleşmesi sonrasında nükleusa giderek transkripsiyon faktörlerinin sentezini sağlarlar. MAP kinaz (mitojenle aktiflenen protein kinaz) ailesi en az 3 alt grubu vardır.

1. ERK (ekstraselüler sinyal ile düzenlenen protein kinaz)
2. P38 (alt tipleri α , β , γ , δ)
3. Jnk (alt tipleri 1, 2, 3) (c-Jun NH₂-terminal kinaz).

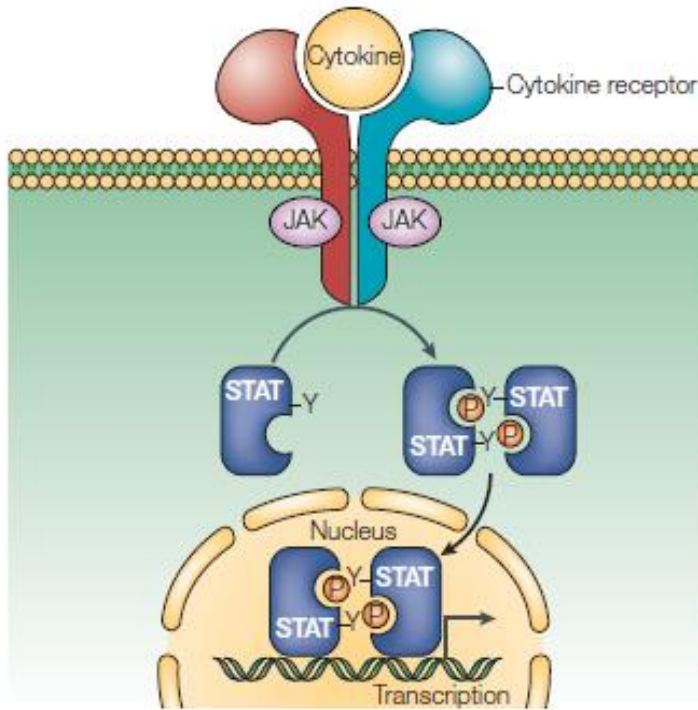
ERK’i aktif hale getiren aslında iki protein kinazdır. Bunlar Ras ve MEK’tir. Ras normalde GDP ile bağlı inaktif formda bulunmaktadır. Uyarı ile GTP ile bağlanarak aktifleşir ve Raf proteini ile bağlanır. Raf MEK’i fosforilleyerek aktif hale getirir. MEK ise serin/treonin kalıntılarını fosforilleyerek ERK’i aktifleştirir. ERK ise sitoplazma ve nükleustaki hedef proteinleri fosforiller. Kanserlerde ve nörodejeneratif bazı hastalıklarda ras/raf/MEK/ERK kinaz yolakların mutasyonları tanımlanmıştır (48).



Şekil 2.6 :Reseptör Tirozin Kinaz (RTK) Ve İkincil Haberci Yolakları (51)

2.3.3. JAK-STAT Yolağı

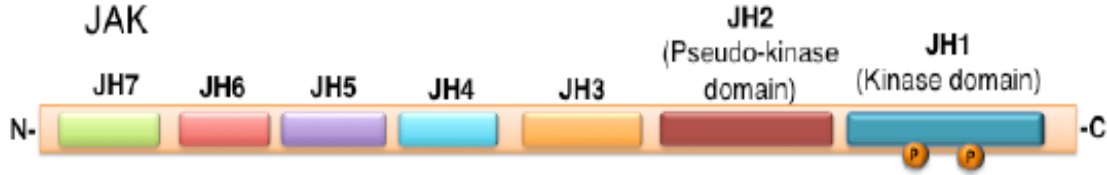
Janus-Kinaz (JAK)-STAT (sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörleri) sitokin ve faktör aracılı sinyallerin iletimini ve aktifleşmesini sağlayan reseptör yapıda olmayan ancak hücre içinde bulunan protein-kinazlardır. JAK aktivasyonu hücrelerde proliferasyon, migrasyon, diferansiyasyon ve apoptozis ile sonuçlanabilir. Bu yolların mutasyonlarının eritrositosis, gigantizm, inflamatuvar hastalıklar ve lösemi gibi hastalıklara yol açtığı gösterilmiştir. Ligand bağlanması sonucunda reseptör subnitelerinin multimerizasyonu gerçekleşir ve intraselüler JAK-STAT yolağı aktifleşir. JAK-Kinaz ailesinin memelilerde 4 alt tipi tanımlanmıştır. JAK1, JAK2, JAK 3 ve Tyk2 (Tirozinkinaz 2). Sistem aktivasyonu reseptörden uyarı gelmesi durumunda JAK'larda meydana gelen yapısal değişiklik, otofosforilasyon ve STAT fosforilasyonu ile devam etmektedir. STAT proteinleri sitoplazmada inaktif şekilde bulunan transkripsiyon faktörleridir. JAK'ların STAT'ları C terminal bölgesinden fosforillenmesi sonucunda aktif hale geçerler. Bugüne kadar 7 adet farklı STAT proteini tanımlanmıştır (52). Aktifleşen STAT proteinleri nükleusa geçerek uygun genlere bağlanıp genin transkripsiyonunu sağlarlar (Şekil 2.7). Yani hücre dışı uyarı direk JAK-STAT yolağı ile transkripsiyonu sağlayabilmektedir.



Şekil 2.7: JAK-STAT Yolağı (53)

2.3.3.1 JAK ve STAT Protein Yapısı

Tipik bir JAK yedi bölgeden oluşmaktadır. JH1, JH2, JH3, JH4, JH5, JH6, JH7. C terminal bölgesindeki JH1 tirozin kinaz aktivitesine sahip bölgedir. JH2 bu aktivite de JH1 için katalizör olarak görev almaktadır (Şekil 2.8). JH3-JH7 ise N-terminal bölgesidir ve diğer tirozinkinazlar ve JAK' lar ile ilişkisini regüle etmektedir (53).



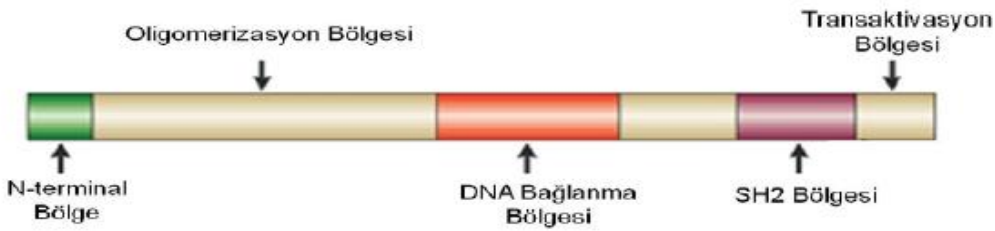
Şekil 2.8: JAK Protein Yapısı (53)

STAT proteinleri de N ve C terminal uçları olan çeşitli yapısal domainleri içeren yedi adet tanımlanmış bir ailedir. STAT1-4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak tiplendirilmişlerdir. Tablo 2.3'de STAT protein tipleri, aktivatörleri ve hedef genleri özetlenmiştir.

Tablo 2.3: STAT Protein Ailesi, Aktivatörleri ve Hedef Genleri (53)

STAT Protein	Aktivatör	Hedef Gen
STAT 1	IFN γ , IFN α ve IFN β	Th1 tip immunsitümlatör, pro-apoptozis
STAT 2	IFN α ve IFN β	Th1 tip immunsitümlatör, pro-apoptozis
STAT 3	IL-6, IL-10, IL-23, IL-21, IL-11	Th17, anti-apoptozis, proliferasyon, anjiogenez
STAT 4	IL-12	Th1, IFN γ
STAT 5A	IL-2, GM-CSF, IL-15,	Anti-apoptozis, pro-
STAT 5B	IL-7, IL-3, IL-5, büyüme hormonu	proliferasyon, diferansiyasyon
STAT 6	IL-4 ve IL-13	Th2, anti-apoptozis

Transaktivasyon bölgesi karboksil ucundadır, SH2 bölgesi, DNA bağlanma bölgesi ve oligomerizasyon bölgeleri mevcuttur. Oligomerizasyon bölgesi, diğer proteinler ile etkileşen bölgedir. DNA'ya özgün bağlanmadan sorumlu olan yer DNA bağlanma bölgesidir ve ligand uyarımı sonrasındaki JAK uyarısıyla birlikte spesifik sinyal oluşumunu sağlar (Şekil 2.9). SH2 bölgesi; STAT-reseptör, STAT-JAK ve STAT-STAT etkileşimlerinden sorumlu bölgedir. SH2 bölgesi tirozin fosforilasyona uğrayan kısımdır. STAT aktivasyonundan sorumlu ana bölgedir (53).



Şekil 2.9: STAT Protein Yapısı(53)

2.3.3.2. JAK-STAT Sinyalizasyonu

Yukarıda da bahsedildiği gibi JAK aktivasyonu ligand bağlanması sonucunda iki JAK domeyninin fosforillenerek yapısal değişikliğe uğraması ile başlar. Aktif JAK'lar reseptörlerin sitoplazmik bölgelerindeki tirozin kalıntılarını fosforiller. Bu işlem reseptörün SH2 bölgesi bulunduran diğer moleküllerle etkileşebilmesini sağlayan bölgelerin oluşmasını sağlar. STAT proteinleri reseptörde birikerek adeta JAK bağımlı tirozin fosforilasyonu ile aktif hale gelirler. Aktif STAT proteinin SH2 ucu diğer bir STAT proteinini bağlama yeteneğine sahiptir. Bunun sonucunda homodimer ya da heterodimer halini alırlar. Aktifleşen bu STAT'ların asıl hedefi nükleustur. Nükleusa geçen aktif STAT'lar DNA'ya DNA bağlanma bölgesi ile bağlanarak gen transkripsiyonunu başlatır.

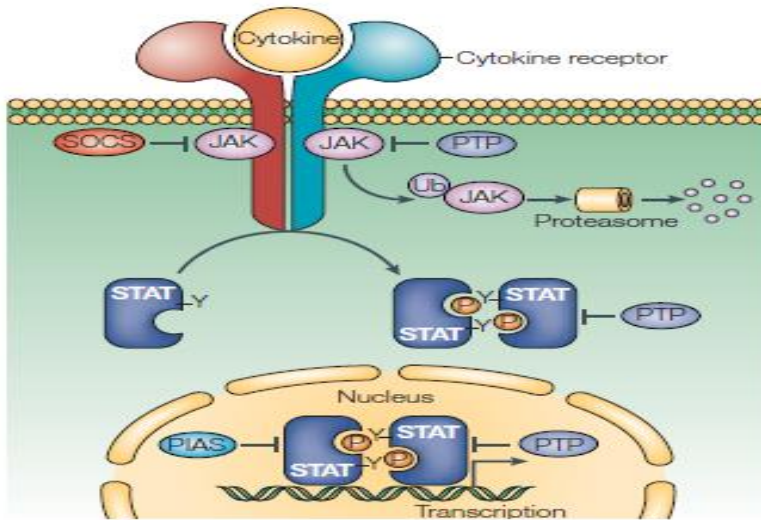
STAT'ların DNA'da farklı etkileri mevcuttur. Yani bazı STAT'lar anti-apoptotik genleri, hücre döngüsünü artıran genleri artırırken bazıları ise tam tersi etki gösterebilmektedirler. Azalan sinyal sonrasında ise STAT'lar dimer yapısını kaybederek sitoplazmaya geri dönerek inaktif hale geçerler (53).

JAK-STAT yolağında ana bileşenlerin dışında başka efektör yapılar da tanımlanmıştır. STAMs örnek olarak verilebilir. Sinyal iletici ve adaptör moleküller denilen bu yapılar SH3 ve VHS domeynleri içermektedir. Diğer bir adaptör molekül StIP (STAT ilişkili protein)-WD40 molekülüdür. StIP'ler JAK'ların STAT fosforilasyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Üçüncü adaptör molekül ailesi de SH2B/Lnk/APS'dir (54). Bu aile de net olarak yolaktaki görevi bilinmese de adaptör rolü ön plandadır.

2.3.3.3. JAK-STAT İnhibisyonu

JAK-STAT yolağını negatif yönde düzenleyen temelde üç sınıf protein ailesi mevcuttur. SOCS (sitokin sinyal supresörleri), PIAS (Aktive STAT inhibitör proteinleri) ve PTPs (protein tirozin fosfataz). En basitleri tirozin fosfatazlar olarak görülebilir. Bu grupta en iyi karakterize edilmiş olan SHP-1'dir. 2 adet SH2 domeynine sahiptir (52). Hem fosforile olan JAK hem de fosforile edilmiş reseptörlere bağlanarak defosforile hale getirir.

SCOS ailesi de SH2 içeren en az 8 ögeden oluşan bir ailedir. SH2 normalde C terminal bölgesindedir. SOCS 1 ve SOCS 3 de N terminal bölgesinde SH2 tespit edilmiştir. SOCS'lar aslında basit bir inhibitör mekanizmaya sahiptir. Aktif STAT'lar aynı zamanda SOCS transkripsiyonunu da sağlar. SOCS'lar da fosforillenme bölgelerini kapatır. SOCS'ların diğer bir etki şekli ise STAT'lar ile fosforillenme bölgeleri için yarışmasıdır. Böylece STAT'ların aktifleşmesini engellemiş olurlar (52). Diğer bir STAT inhibitörü ise PIAS'lardır (Şekil 2.10). PIAS1, PIAS3, PIASx ve PIAS olarak çeşitleri mevcuttur. Bu proteinler 'Ring finger' denilen domeynlere sahiplerdir (53). Bu bölgeler ile nükleusda STAT'ların DNA'ya bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonu durdururlar. Yine de PIAS'ların negatif feed-back üzerindeki etkileri tam olarak açıklanabilmiş değildir.



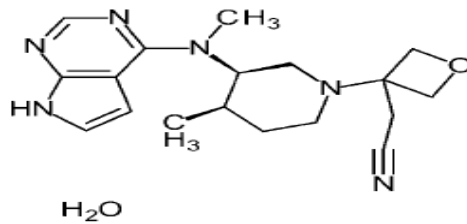
Şekil 2.10: Şematik Olarak JAK-STAT Yolağının İnhibisyonu (53).

2.3.3.4. JAK-STAT ve Diğer Yolaklar

JAK-STAT yolağı her ne kadar basit gibi görölse de diğer yolaklarla ilişkisi oldukça karmaşıktır (55). En iyi etkileşimi Ras/MAP kinaz yolağı ile gösterilmiştir (56). Aktive JAK'lar başka reseptörleri fosforilleyebilir. Bu fosforillenme SH2 içeren diğer adaptör proteinler için uygun bölgeler açar. SHP-2, GRB2 içeren adaptör proteinler ile Ras yolağını bu şekilde aktive edebilir (56). Ayrıca MAPKinaz inhibitörü RasGAP'i bağlayan SOCS'lar üzerinden JAK'lar indirek olarak da MAPK aktivasyonu yapmış olurlar. Tam tersi Reseptör Tirozin Kinazlar'da (RTK) JAK-STAT yolağını en az 2 mekanizma ile aktive ederler (56). Birinci mekanizma src kinaz gibi bazı kinazları kullanarak JAK bağımsız STAT aktivasyonu yapabilmektedirler. Buna rnek EGFR ve PDGFR verilebilir. İkinici mekanizma ise MAPK direk STAT'ın C terminal ucunda serin fosforilasyonu yaparak STAT aktivasyonu ile transkripsiyona sebep olur. TGF-β yolağının da JAK/STAT yolağı ile çeşitli seviyelerde çakıştığı bilinmektedir. PIAS yolunu etkileyen faktörlerden bir tanesi de TGF-β'dır. Yine IFN-γ ile aktive olan STAT yolağı TGF-β yolağını inhibe edebilmektedir. Bunu inhibitör etkili SMAD7'yi aktive ederek yapmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi SMAD yolakları TGF-β'nın kullandığı yolaklardır. Lösemi inhibitör faktör (LIF) ve kemik morfogenetik protein (BMG2) STAT ve SMAD yolaklarını aktive ederek hatta STAT-SMAD kprleşmesini sağladıklarını gösteren çalışmalar mevcuttur (57).

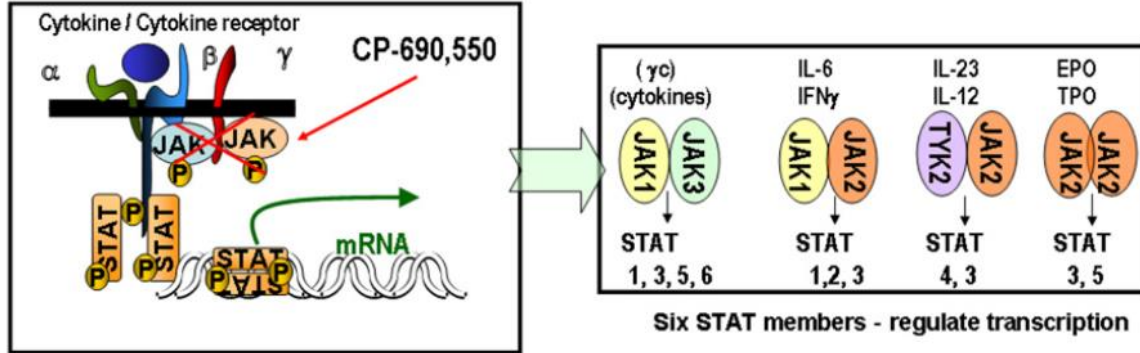
2.4. TOFASİTİNİB

Tofasitinib oral seçici JAK-kinaz inhibitörüdür. Molekül adı: CP-690,550 dir. Uzun açılımlı ise ((3R,4R)-4-metil-3-(metil-1H-pirilo [2,3-d]pirimidin-4-yl amino)-β-oxo-1-piper-piperidinepropanenitril, 2-hydrosi-1,2,3-propanetrikarboksilat) dır (58) (şekil 2.11). Enzim izolasyonları ile yapılmış çalışmalarda CP-690,550, dört JAK tipini de (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak hücre çalışmalarında tofasitinibin JAK türlerini inhibe etmesinde farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır (59).



şekil 2.11: CP-690,550 (Tofasitinib)'in Moleküler Yapısı (58)

Özellikle JAK1/3 kompleksine karşı afinitesi JAK2 ve bileşik JAK'lara göre daha kuvvetlidir (Şekil 2.12) (59)



Şekil 2.12: Tofasitinib'in JAK-STAT Üzerine Etkisi (59)

JAK inhibisyonu ile sitokinlerin yollarını inhibe etmektedir. Hayvan çalışmalarında ratlarda artrit üzerinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Hem klinik skorlarda iyileşme hem de serum IL-6 seviyelerinde anlamlı düşüş saptanmıştır. Yine immunomodulator, immun supresif etkisi hayvan çalışmalarında transplant yapılarak çalışılmıştır. Böbrek, kalp gibi nakillerde nakil dokuda oluşan immun yanıtı azalttığı ve sonuçta nakil sonrası sağ kalımı artırdığı gösterilmiştir. Günümüzde Romatoid Artrit tedavisinde endikasyonu mevcut olup diğer immun hastalıklarda da kullanımı açısından çalışmaları devam eden bir moleküldür (59).

2.5. Hücre Kültürü

Bir organ veya dokudan belli bir hücrenin izole edilerek ayrıştırılması ve izolasyondan sonra İn vitro ortamda uygun şartlar altında yaşamasının sağlanması hücre kültürü olarak adlandırılır. Hücre kültürü çalışmalarındaki amaç izole edilen hücrelerin canlılığının devamı ve sonrasında çoğaltılması ile çeşitli araştırmalarda kullanılmasıdır. Hücreler invitro ortamda genellikle diğer hücreler ile olan iletişim özelliğini doku özelliği göstermedikleri için kaybedebilirler. Bu nedenle canlılıkları ancak çok özel şartlar altında devam edebilir. Aynı zamanda çoğaltılması sağlanarak çok miktarda hücrede çalışma yapılması olanağı da vardır. Genetik olarak klonlama gibi tekniklerle çeşitli fenotip ve genotiplerde hücreler elde edilebilir. Ayrıca uygun şartlarda dondurulma işlemi ile uzun süre saklanabilme özelliğine de sahiplerdir (60).

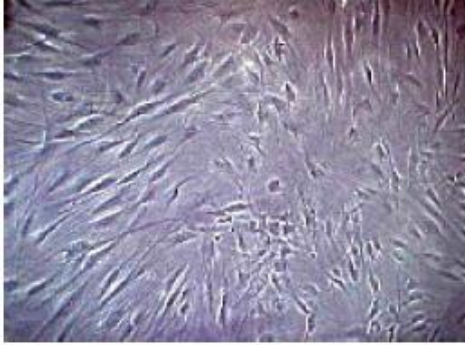
2.5.1. Kaynaklarına Göre Hücre Kültürleri

2.5.1.1 Primer Hücre Kültürü

Doku ya da organdan ilk izole edilen hücre kültürüdür. Enzimatik ya da mekanik yollarla yapılabilir. Besiyerine sahip şişelere hücreler inoküle edilir. Genellikle şişe yüzeyine yapışarak hücreler çoğalmaya başlarlar. Birbirine değen hücrelerde çoğalma durabilir. Metabolik aktivite yavaştır. Bu tür hücre kültürlerinde 8-9 pasaj hücre üretimi olabilir. Bu hücreler genellikle kaynak hücrede ki gibi diploid kromozoma sahiplerdir. Miks hücre fibroblast, epitelyal hücre gibi görülebilir. Taze dokudan alındığı için kontaminasyon riski de mevcuttur (60).

2.5.1.2 Diploid Hücre Kültürü

Primer hücre kültüründen elde edilen tek tip sonlu üreme gösteren hücre kültürüdür. Genellikle 50-100 pasaj hücre çoğalabilir. Ancak belli bir zaman sonra üreme yeteneğini kaybederler. Diploid hücre kültürleri çoğunlukla fibroblastoid hücre tipinden oluşur (Resim 2.3) (61) . İlk pasajdaki hücreler sıvı nitrojende saklanabilir.



Resim 2.3: fibroblast hücre kültürü mikroskopik görüntüsü (61)

2.5.1.3 Devamlı Hücre Kültürleri

Bölünme yeteneğini kaybetmeyen sonsuz bölünebilme özelliğine sahip hücrelerin oluşturduğu kültüre denir. İn vitro ortamdan tümör dokusundan alınan hücreler veya kimyasal olarak transformasyona uğramış hücrelerden kaynağını almaktadır. Normal hücre kültürünün en az 50 subkültürü yapıldıktan sonra devamlı hücre kültürü oluşturulabilir (60). Genellikle mutasyona uğradıkları için normal hücre genotip ve fenotip özelliklerini göstermezler.

2.5.2 Besiyerleri

Besiyerleri, temelde iyon dengesi açısından, dengeli tuz çözeltileri olarak değerlendirilebilir. 1950'li yıllarda yayımlanmış olan Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ve bunların zenginleştirilmiş formları; EMEM'e Dulbecco modifikasyonu (DMEM), Ham's F12, DMEM ve F12'nin 1:1 karışımı olan DMEM/F12, RPM1 1640, M199 en sık kullanılan çözeltilerdir. Bunlara eklenen diğer moleküller, esansiyel aminoasitler, vitaminler (özellikle B vitaminleri), hormonlar (insulin, hidrokortizon) ve glikozdur (60).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

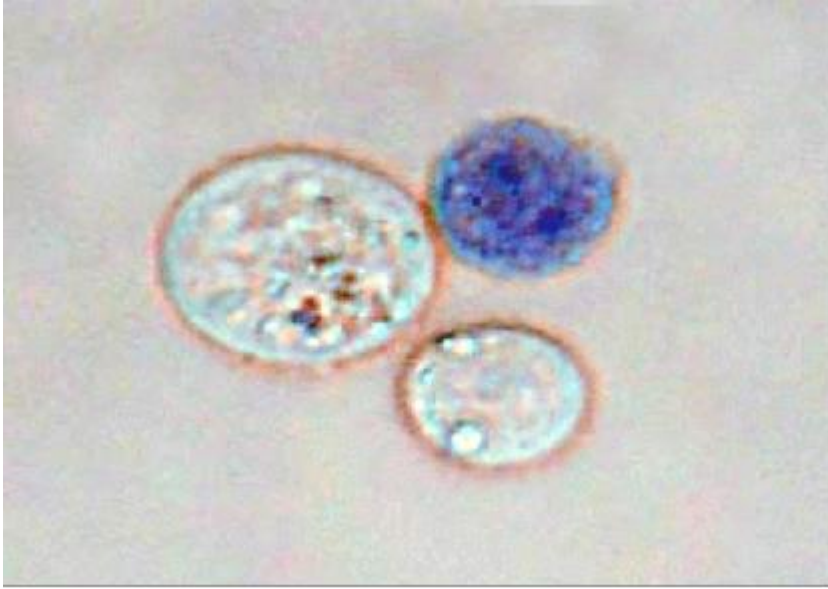
3.1.1 Kullanılan Gereçler

- Fetal Bovine Serum-100 ml
- L-Glutamine–Penicilin–Streptomycin solüsyon (5 ml’lik 10 adet vialler içeren kutuda)
- Fosfat buffered saline (PBS), Dulbecco (1x)-pH:7.4-1 L– steril (Hücre kültürü uyumlu)
- Tripsin – EDTA Solüsyonu –100 ml
- RPMI – 1640 Medium, L-glutamine ,sodyum bikarbonat ile birlikte – 1L
- Dulbecco’s Minimal Essential Medium (DMEM) 1,0 g/l D-Glucose – 1L- Glutamine (sodium bicarbonate ile birlikte)- 1 L
- 5 mL’lik disposable pipet (Piped aid ile uyumlu)
- 10 mL’lik disposable pipet (Piped aid ile uyumlu)
- Steril santrifüj tüpleri (Falkon) – 15 Ml
- Steril santrifüj tüpleri (Falkon)– 50 mL
- 0.2 mikron porlu disk filtre (şırınga filtresi)- Steril,
- Plastik kültür kabı –35x 10 mm — sterile
- Doku kültür şişesi – pirojenik olmayan – 250 mL, 75 cm²
- Doku kültür şişesi – pirojenik olmayan – 125 ml, 25 cm²
- Nötral Red-Sıvı formda-100 ml
- Ficoll – 100 ml
- Steril Olmayan Eldiven
- XTT hücre proliferasyon ölçüm kiti, 96 test
- Piped aid
- 96 kuyucuklu düz tabanlı steril elisa plağı 100’lük paketlerde
- Hücre Kültürü, BRL3A®-hepatik fibroblast, ATCC® CRL-1442™
- Hücre Kültürü, BJ-CRL1474®-skin fibroblast, ATCC® CRL-2522™
- Human/ Mouse TGF-1β ELISA kiti
- Human MMP3 ELISA kiti
- Human TIMP-1 Platinum ELISA kiti
- OH-prolin ELISA

3.2 Yöntem

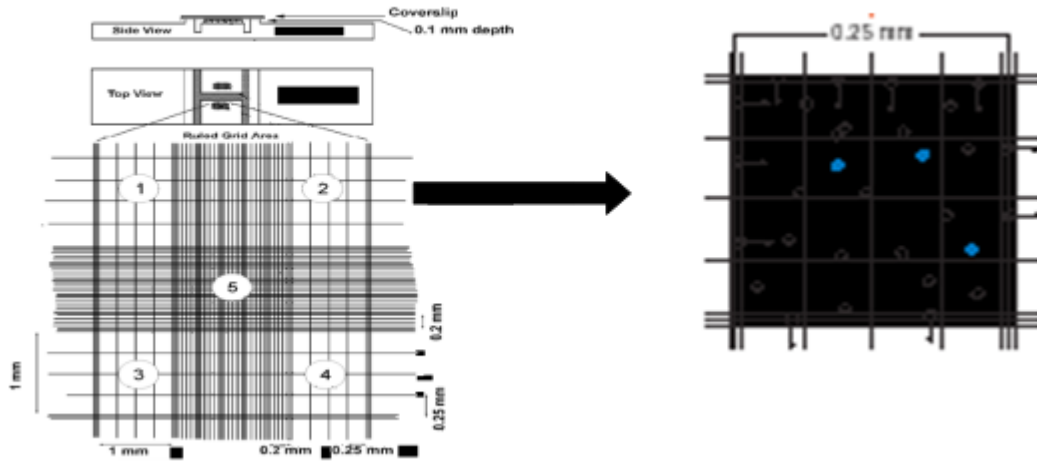
3.2.1 Tripan Mavisi Boyası Canlılık Testi

Tripan Mavisi Boyası sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Her bir muamele edilen grubun yaşama yüzdesi ölü hücrelerin (mavi) ve canlı hücrelerin (boya almamış) sayılmasıyla belirlenir. Analiz edilen parametre; hasarlı, sızıntı yapan plazma membranıdır. Bu testin avantajları arasında ışık mikroskobu ile canlı hücrelerin ölülerden ayırt edilmesinde kullanılan standart bir metot olması, hızlı ve ucuz olması, total hücre popülasyonundan çok küçük bir hacmin test analizi için gerekli olması sayılabilir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tripan Mavisi Boyası Canlı Ve Ölü Hücrelerin Boyanması

Sayım için en sık kullanılan Neubauer hemositometresidir ve iki eşdeğer bölmeye sahiptir (Şekil 3.2). Sayma odacığının derinliği 0.1mm' dir. Hücre süspansiyonu, odacığa mikro pipetler yardımıyla aktarılır. Mevcut hücre sayısına göre, hücreler, karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölmelerde sayılır. Sol ve üst üçlü çizgilerdeki hücreler sayıma dahil edilir. Bu bölmelerin alanı 1 mm^2 ' dir. Böylece hacmi $0,1 \text{ mm}^3$ olur. Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa (N): $N=0.1\text{mm}^3$ 'te mevcut hücre sayısı 1 ml yani 1cm^3 ' teki hücre sayısı = $N \times DF \times 10^4$ olur. DF=Dilüsyon Faktörü



Şekil 3.2. Neubauer hemositometresi

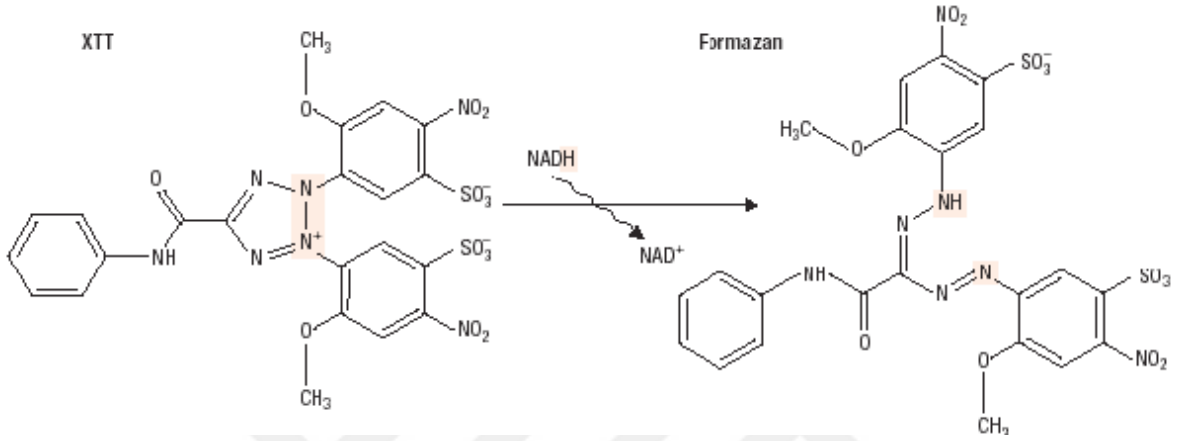
3.2.2 XTT Testi

Tetrazolyum tuzları prensibine dayanan bir diğer kolorimetrik metot olan XTT, 1988 yılında P.A. Scudiero tarafından ilk kez tanımlanmıştır. XTT metotunun kullanımı, proliferasyon ölçümü prosedürünü geniş ölçüde kolaylaştırmıştır. Bununla birlikte, hücrelerin kantifikasyonu için ve radyoaktif izotoplar kullanmadan canlılıklarının tespitinde kusursuz bir çözümdür. Bu kit, hücre proliferasyonunun çeşitli büyüme faktörleri ve besin bileşenleri ile ilişkili olarak ölçümü prensibine dayanmaktadır. XTT, hücrelerden ^{51}Cr salınımı temeline dayanan sitotoksik testlerin yerini almaktadır. Bu kiti kullanmanın avantajları şöyle sıralanabilir;

- a) **Kolay uygulanabilir olması:** Ek ajanlara veya hücre yıkama prosedürlerine ihtiyaç yoktur.
- b) **Hız:** Çok kuyucuklu plate'ler ve okuma için bir ELISA okuyucuya ihtiyaç vardır.
- c) **Duyarlılık:** Düşük hücre konsantrasyonlarında bile ölçüm yapılabilmektedir.
- d) **Doğruluk:** Her kuyucuktaki boya absorbansı, hücre sayısı ile orantılıdır.
- e) **Güvenilirlik:** Radyoaktif izotoplara ihtiyaç duyulmamaktadır. Normal olarak aktive edilmiş hücrelerin ve çeşitli sitokinlere bağımlı hücre hatlarının hücre canlılığı veya proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan yeni bir kromojenik bir yöntem olması açısından da ayrı bir önem taşımaktadır.

3.3 Yöntem Prensipleri

Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT' yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3.3. XTT' nin formazana dönüşümü

Oluşan boya suda çözünebilir özellikte olmakla birlikte boya yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla verilen dalga boylarında okutulabilmektedir. Boya duyarlılığı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Çok kuyucuklu plate'lerin ve bir ELISA okuyucusunun kullanılması, çok sayıda örneğin çalışılıp hızlı ve kolay sonuçlar alınabilmesini sağlamaktadır. Test prosedürü hücrelerin 96'lı well plate'lerde kültüre edilip, XTT ajanının eklenip, 2-24 saat inkübasyonda bekletilmesi prensibine dayanmaktadır. Inkübasyon süresi boyunca, duyarlılığı bir spektrofotometre (ELISA okuyucu) ile ölçülebilen turuncu renk oluşmaktadır (Şekil 3.4). Kuyucuklardaki aktif hücrelerin sayılarının çokluğu, mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin çokluğu ile orantılıdır.

Çalışmamızda başlangıçta tofasitinib tek başına 0.1, 0.5, 1, ve 2 μ M konsantrasyonda uygulandı ve inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerleri hesaplandı.

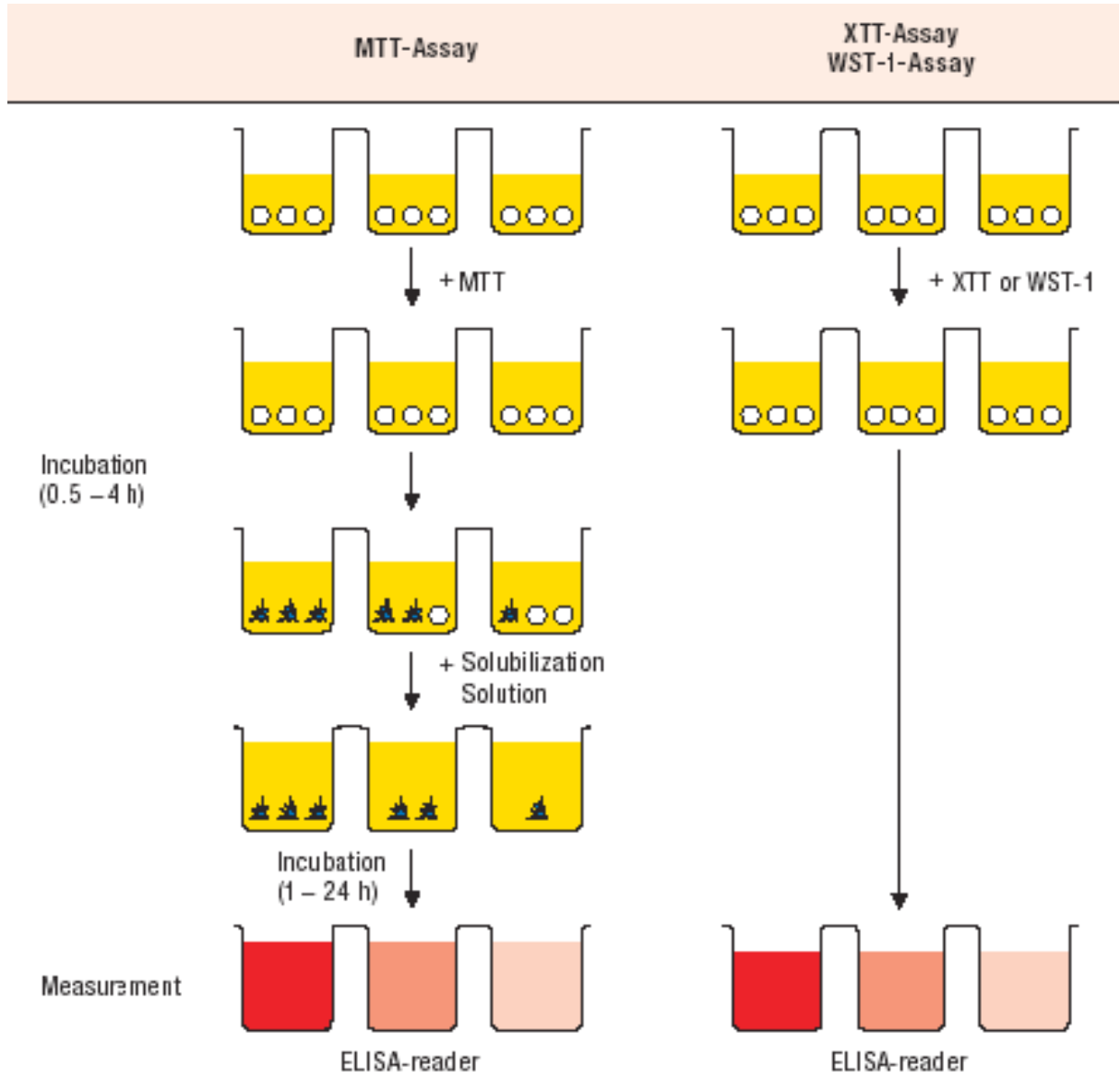
3.3.1 Hücre Kültürü Teknikleri

1. Dondurulmuş hücreler pasajlanmak için çözüldü.
2. Kriyo tüp içerisindeki hücrenin tamamı 5 ml'lik steril propilen tüpe alınıp, üzerine 8mL Medium eklendi.
3. 300 rpmde 5 dakika santrüfuj edildi.
4. Süpernatent kısım alındıktan sonra presipitatın üzerine tekrar 3 ml medium eklendi.
5. Tamamı 25'lik flask içerisine alındı ve üzerine tekrar 5 ml medium eklendi. 37°C'de CO₂ etüvüne kaldırıldı.
6. Ekilen hücreler 24 saat sonra, hücre görüntüleme cihazında kontrol edilerek pasajlandı.
7. Belli bir büyüklüğe ulaşan hücreleri pasajlamak için öncelikle besiyeri aspire edildi ve 25 mL'lik flaska alındı ve üzerine 1,5 mL tripsin eklendi daha sonra belli aralıklarla kontrol edildi. Hücreler flask içerisinde tutmadığı yüzeylerden tamamen kalktığında üzerine nötralize etmek amacıyla 1,5 mL medium eklendi.
8. 25'lik flastaki 3mL hücrenin tamamı 75 mL'lik flaska alındı ve üzerine 10mL medium eklendi.
9. Hücreler büyümek üzere 37°C'de CO₂ etüvüne kaldırıldı. Bu adımlar hücre pasajlamak için birkaç kez yapıldı.
10. Çalışmamızda 96'lık plate kullanıldı. Herbir kuyuda 10⁵ hücre olacak şekilde hesaplama yapıldı.

3.3.2. 96'lik Plate Ekimi

1. Belli sayıda büyüklüğe ulaşımı 75mL'lik flastan hücrelerin ilk önce besiyeri aspire edildi.
2. Sonra üzerine 3 mL tripsin eklendi. Birkaç dakika etüvde bekletildi. Hücrelerin tamamı flask yüzeyinden kalktıktan sonra 10µL hücre+10µL boya eklendi. Toplam 20µL içerisinden tekrar 10µL alındı ve hücre sayım slaytına pipetlendi.
3. Hücre görüntüleme cihazında hücre sayımı yapıldı. 96'lık plate'in her bir kuyucuğunda 10⁵ hücre olacak şekilde hesaplama yapıldı ve yüksek konsantasyondakiler medium ile seyreltildi.
4. Seyreltme işlemi yapıldıktan sonra 96'lık plate'in herbirine 100µL hücre ekimi yapıldı.
5. Ekim işlemi tamamlandıktan 24 saat sonra ilaç dozlama işlemi yapıldı.
6. Dozlama işlemi yapıldıktan sonra 37°C'de CO₂ etüvüne kaldırıldı. Daha sonra 24., 48. ve 72. Saat için herbir plate '*mikroplate reader*' cihazında okundu ve veriler kaydedildi.

7. Son olarak absorbans ve derişim aralığından yararlanarak 50 (IC₅₀) (%50 inhibisyon) değeri belirlendi.



Şekil 3. 4. MTT ve XTT metotları

Tofasitinib uygulaması sonrası kollajen sentezi ve fibrin oluşumu ile yollar üzerindeki etkiyi değerlendirmek üzere doku metalloproteinaz inhibitörü 1 (TIMP1), matriks metalloproteinaz 3, dönüştürücü büyüme faktörü beta-1 (TGF- β 1) ve hidroksi-prolin seviyeleri enzim aracılı immünoassay (ELISA) metodu ile değerlendirildi. Yöntem herbir parametre için temin edilen kitin üreticisi tarafından temin edilen protokole göre gerçekleştirildi. Örnek olarak TGF- β 1 ELISA protokolü verilecek olursa;

3.3.3. Elisa Testi Aşamaları

Örneklerin asit aktivasyonu: Latent TGF- β 1'in immünoreaktif formuna aktive edilmesi için sadece örneklerin (standartların değil) asidifiye edilmesi daha sonra da nötralize edilmesi gerekmektedir.

1. Hücre kültürü süpernatantları için; her bir 100 μ L örnek için, 20 μ L 1N HCl eklendi ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra bu karışım 20 μ L 1N NaOH ile nötralize edildi.

Çalışma seyrelticisinin (assay diluent) kullanılması

2. Standart eğrisinin elde edilebilmesi için en yüksek konsantrasyonlu standart çözelti 1/2 olacak şekilde seri sulandırma yapıldı.
3. Uygun kuyucuklara 100'er μ L standart solüsyonu, diğer kuyucuklara da 100'er μ L asit ile aktive edilmiş test örnekleri konuldu.
4. Plate'in üzeri kapatılıp ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
5. Kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi ve 250 μ L yıkama sıvısı ilave edildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
6. Kuyucuklara 100'er μ L deteksiyon antikorunu konuldu. Plate'in üzeri kapatıldıktan sonra oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
7. Kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi ve 250 μ L yıkama sıvısı ilave edildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
8. Kuyucuklara 100'er μ L Avidin-HRP konuldu. Plate'in üzeri kapatıldıktan sonra oda ısısında 30 dakika boyunca inkübe edildi.
9. Kuyucuklardaki sıvılar aspire edildi ve 250 μ L yıkama sıvısı ilave edildi. Bu işlem 7 kez tekrarlandı.
10. Kuyucuklara 100'er μ L Substrat solüsyonu konuldu ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.
11. Kuyucuklara 100'er μ L STOP solüsyonu koyup ,450 nm dalga boyunda okuma yapıldı.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada yapılan bütün ölçümler üç kez tekrar edildi. Absorbans olarak elde edilen veriler ortalama ve standart hata ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 22 (Statistics Program for Social and Science) programı ile gerçekleştirildi. Ortalamalar arasındaki farkın önemliliği değerlendirilirken ANOVA testi, testi kullanıldı. Parametrik test varsayımlarının yerine getirilemediği durumlarda ise Kruskal-Wallis testi uygulandı. P değerinin 0.05'den küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.



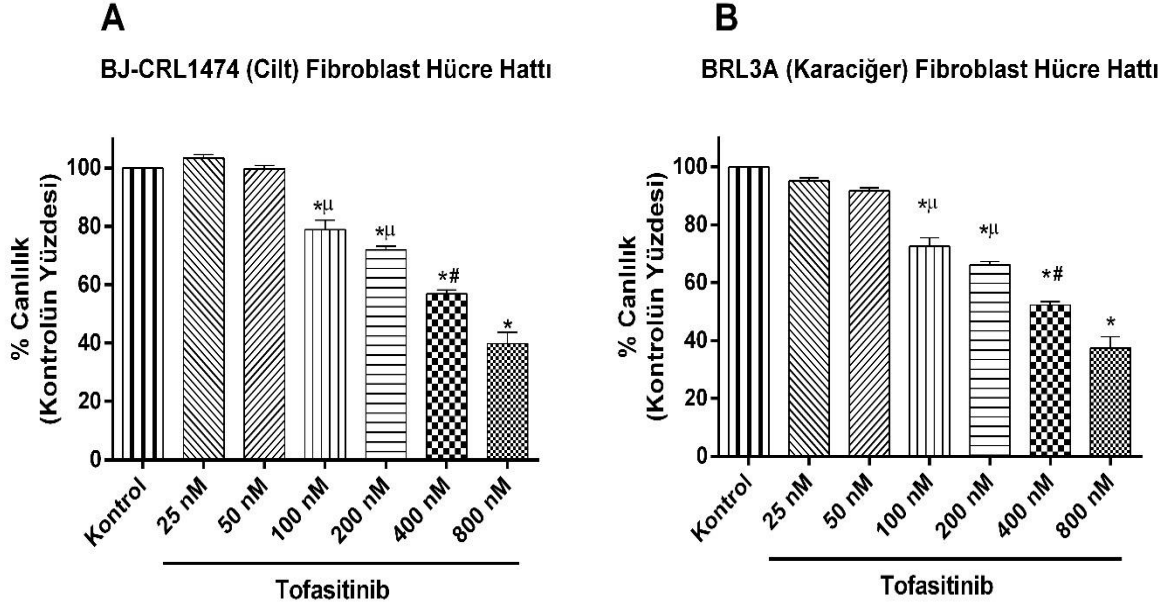
5. ARAŞTIRMANIN ETİK YÖNÜ

Araştırmanın her aŐaması etik ilkelere uygun olarak yürütölmüŐtür. Uygulamaya geçmeden önce etik kuruldan (25/11/2016 tarihli, 2016-11/21sayılı) (EK.1) izin alınmıŐtır.



6. BULGULAR

6.1. Tofasitinib'in Fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı değerlendirilmesi

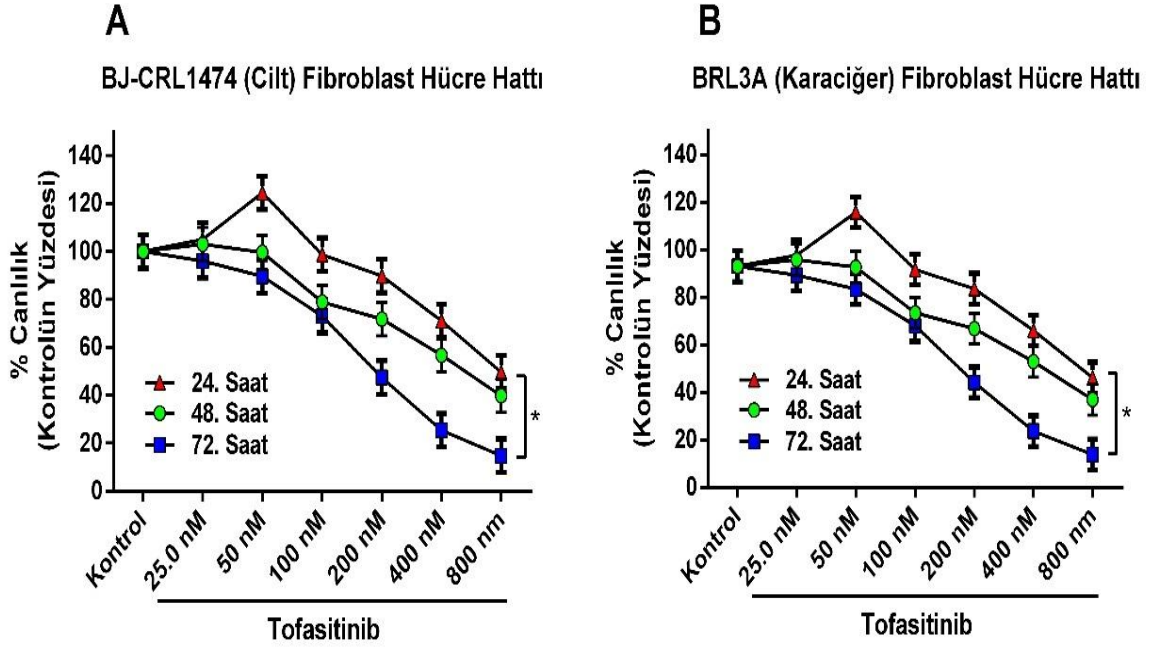


Grafik 6.1. Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi.

A) BJ-CRL 1474® Cilt Fibroblast Hücre Hattı, **B)** BRL3A® Karaciğer Fibroblast Hücre Hattı.

Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatları üzerindeki etkileri zamana bağımlı olarak değerlendirildi. Tofasitinib'in konsantrasyona bağımlı bir sitotoksik etkinlik gösterdiği gözlemlendi. Bu etki 100 nM konsantrasyonda başlarken ($p < 0,05$), en yüksek antiproliferatif etki 800 nM konsantrasyonda görüldü. 100nM ve 200nM arasındaki etkinlik istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$) ancak 400nM ve 800nM konsantrasyonlarda ki etkinlik 100nM ve 200nM konsantrasyonlara göre daha fazla saptandı. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$). Bahsedilen etki hem karaciğer hem de cilt fibroblast hücrelerinde benzer şekilde görüldü. Aradaki fark %5 düzeyinde olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).

6.2. Tofasitinib'in Fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin zamana bağlı değerlendirilmesi



Grafik 6.2. Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi.

A) BJ-CRL 1474® Cilt Fibroblast Hücre Hattı, **B)** BRL3A® Karaciğer Fibroblast Hücre Hattı.

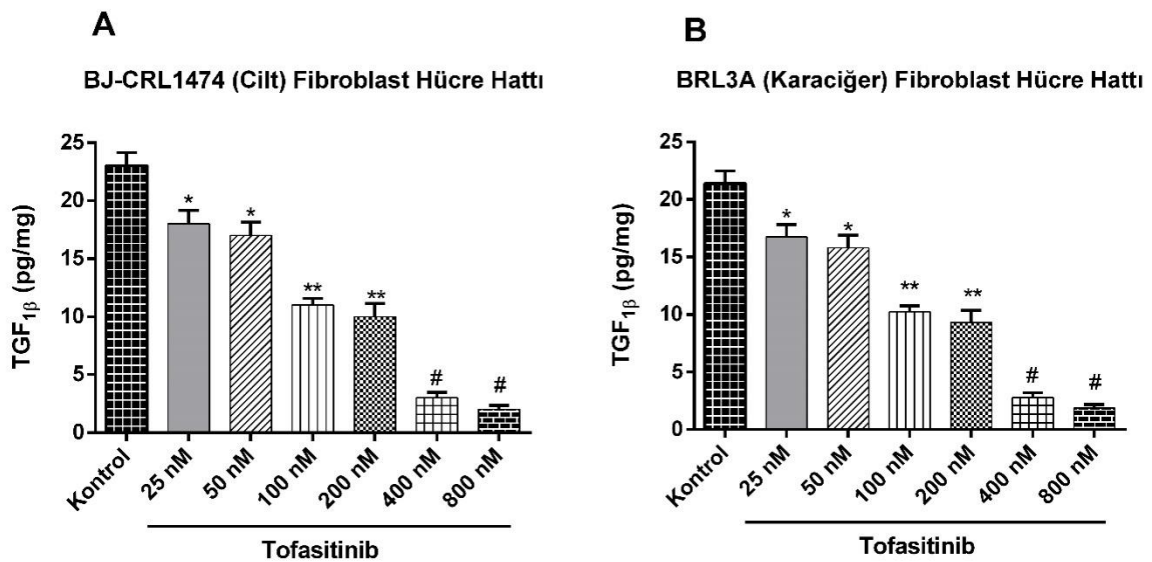
Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatları üzerindeki etkileri zamana bağımlı olarak değerlendirildi. Tofasitinib'in sitotoksik etkinliğinde zamana bağımlı olarak artış gözlemlendi. Sitotoksik etki tofasitinib'in 50nM ve 100nM konsantrasyonlarında 48. ve 72. Saatte, 24. saate göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). 200nM, 400nM ve 800nM konsantrasyonlarında ise 72. saatteki sitotoksik etki etki, 24. ve 48. saatteki etkinliğe göre belirgin olarak daha fazlaydı ($p < 0,05$). Bahsedilen etki hem karaciğer hem de cilt fibroblast hücrelerinde benzer şekilde görüldü. Aradaki fark %5 düzeyinde olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0,05$).

Tablo 6.1: Tofasitinib'in Fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin zamana ve konsantrasyona bağlı değerlendirilmesi

Tofasitinib	% Canlılık (Kontrolün Yüzdesi)			
	24 saat	48 saat	72 saat	P değeri
Kontrol	100	100	100	-
25 nM	103,0±7,6	96,0±4,5	105,0±3,2	-
50 nM	99,6±6,8*	89,7±6,1**	124,5±5,6**	<0,05
100 nM	78,9±8,2*	73,1±5,6**	98,6±7,6**	<0,05
200 nM	71,8±5,9*	47,4±4,8*	89,8±5,3**	<0,05
400 nM	56,8±6,4*	25,4±4,2*	71,0±4,1**	<0,05
800 nM	39,7±7,6*	14,8±4,1*	49,6±48**	<0,05

Tofasitinib'in Fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin zamana ve konsantrasyona bağlı değerlendirilmesi sonuçları Tablo 6.1 de özetlenmiştir. 50 nM ve üzeri konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak etkinin arttığı gözlemlendi. 50nM ve 100nM konsantrasyonlarında 48. ve 72. Saat etkinliği arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken ($p>0,05$), 200nM, 400nM ve 800nM konsantrasyonlarında tofasitinib'in sitotoksik etkinliği 72. saatte belirgin olarak yüksek bulundu ($p<0,05$).

6.3. Tofasitinib uygulamasının TGF-1 β seviyeleri üzerindeki etkisi

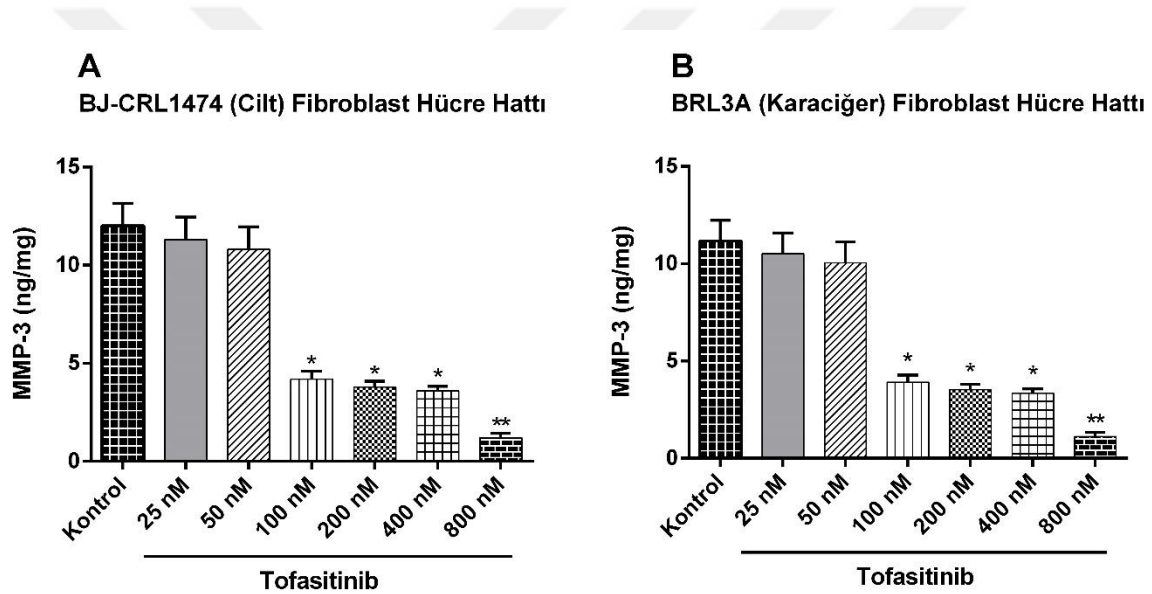


Grafik 6.3. Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi.

A. BJ-CRL 1474[®] Cilt Fibroblast Hücre Hattı, **B.** BRL3A[®] Karaciğer Fibroblast Hücre Hattı.

Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarında TGF-1 β seviyeleri üzerindeki etkileri incelendiği zaman konsantrasyona bağımlı azaltıcı bir etkisi olduğu gözlemlendi. Tofasitinib 25 nM gibi düşük konsantrasyonlardan itibaren TGF-1 β seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdü ($p < 0,05$). 100 nM ve 200 nM konsantrasyonlarında ki düşüş 25 nM ve 50 nM konsantrasyonlarına göre daha fazla gerçekleşti ($p < 0,05$). 400 nM ve 800 nM konsantrasyonlarında ki TGF-1 β seviyesindeki düşüşün ise 100 nM ve 200 nM konsantrasyondaki düşüşe göre daha anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). 100nM ve 200nM konsantrasyonlarda ki düşüş her iki doz için istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). 400nM ve 800nM konsantrasyonlardaki TGF-1 β düşüşü miktarı kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı ($p > 0,05$).

6.4. Tofasitinib uygulamasının MMP-3 seviyeleri üzerindeki etkisi

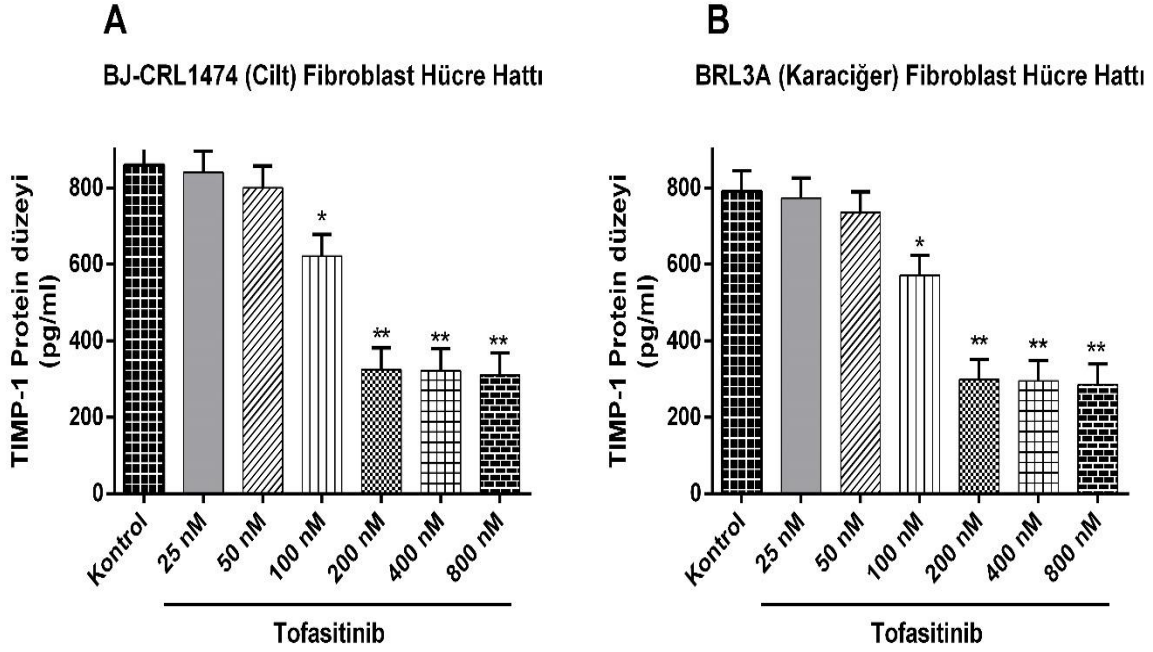


Grafik 6.4: Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi.

A. BJ-CRL 1474[®] Cilt Fibroblast Hücre Hattı, **B.** BRL3A[®] Karaciğer Fibroblast Hücre Hattı.

Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarında MMP-3 seviyeleri üzerindeki etkileri incelendiği zaman konsantrasyona bağımlı azaltıcı bir etkisi olduğu gözlemlendi. Tofasitinib 100 nM konsantrasyondan itibaren MMP-3 seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdü ($p < 0,05$). 100 nM, 200 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında ki düşüş kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). 800 nM konsantrasyonlarındaki MMP-3 seviyesindeki düşüşün ise 100 nM ve 200 nM konsantrasyonlarındaki düşüşe göre istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu bulundu ($p < 0,05$).

6.5.Tofasitinib uygulamasının TIMP-1 düzeyi üzerindeki etkisi

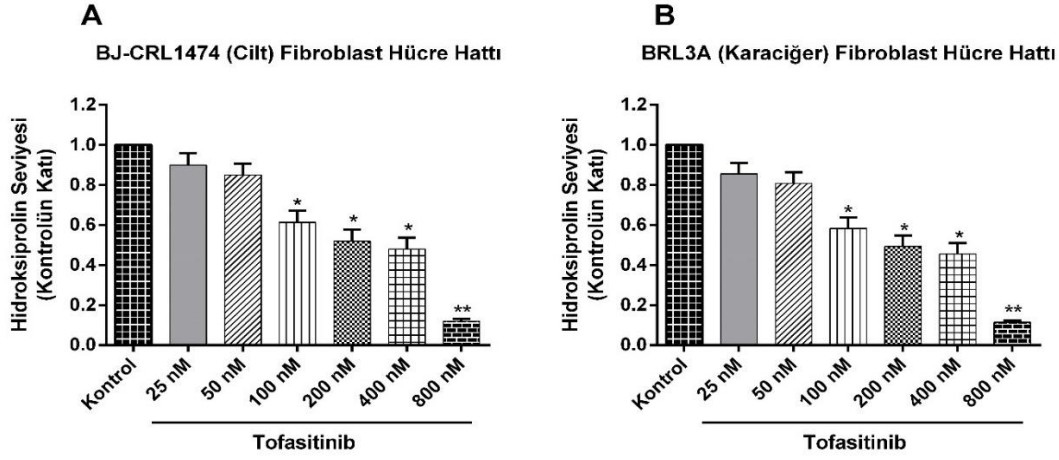


Grafik 6.5: Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi.

A. BJ-CRL 1474[®] Cilt Fibroblast Hücre Hattı, **B.** BRL3A[®] Karaciğer Fibroblast Hücre Hattı.

Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarında TIMP-1 seviyeleri üzerindeki etkileri incelendiği zaman konsantrasyona bağımlı azaltıcı bir etkisi olduğu gözlemlendi. Tofasitinib 100 nM konsantrasyondan itibaren TIMP-1 seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdü ($p < 0,05$). 200 nM, 400 nM ve 800 nM konsantrasyonlarında ki düşüş kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$) ancak her üç konsantrasyondaki TIMP-1 seviyesindeki düşme miktarı, 100 nM konsantrasyonlarındaki TIMP-1 seviyesindeki düşüşe göre daha fazlaydı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

6.6. Tofasitinib Uygulamasının Hidroksiprolin Seviyesi Üzerindeki Etkisi



Grafik 6.6: Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi.

A. BJ-CRL 1474[®] Cilt Fibroblast Hücre Hattı, **B.** BRL3A[®] Karaciğer Fibroblast Hücre Hattı.

Tofasitinib'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 nM konsantrasyonlarının fibroblast hücre hatlarında hidroksiprolin seviyeleri üzerindeki etkileri incelendiği zaman konsantrasyona bağımlı azaltıcı bir etkisi olduğu gözlemlendi. Tofasitinib 100 nM konsantrasyondan itibaren hidroksiprolin seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdü ($p < 0,05$). 100 nM, 200 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında ki düşüş kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). 800 nM konsantrasyonlarındaki hidroksiprolin seviyesindeki düşüş ise diğer tüm konsantrasyonlardaki düşüşe göre istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$).

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Skleroderma, karaciğer fibrozisi gibi kollajen üretiminin fazla olduğu hastalıklarda günümüzde tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır. Aşırı kollajen sentezini dolayısıyla fibrozisi engelleyen ilaçlar için çalışmalar devam etmektedir. Kollajen sentezinin ana uyarıcısı TGF-1 β 'dir. Ancak hücre dışı hipoksi, travma gibi etkenler ve içi birçok sitokin ve interlökinler de kontrolsüz kollajen sentezini artırıp fibrozise yol açmaktadır. Günümüzde artık hedeflenmiş tedaviler mevcuttur. Antikor bağlayıcı, reseptör bloke edici ve interlökin ya da diğer büyüme faktörlerinin hücreyi uyardıktan sonra aktif hale gelen ikincil yolakları hedef alan tedaviler her geçen gün artmaktadır.

Tofasitinib seçici JAK-kinaz 3 inhibitörü olarak günümüzde Romatoid Artrit tedavisinde kullanılmaktadır. Fibroblast aktivasyonu sonrasında JAK-STAT yolağı inhibisyonunun kollajen sentezi üzerindeki net etkisi bilinmemektedir. Hastalıklarda daha çok mortalite sebebi pulmoner fibrozis, karaciğer fibrozis, pankreas fibrozis ve renal olduğundan dolayı literatürdeki çalışmaların büyük kısmı bu organlarla ve hücreleriyle alakalı çalışmalardan oluşmaktadır. Pulmoner fibroziste JAK/STAT yolağının rolü olduğunu gösteren sınırlı sayıda çalışmalar mevcuttur. Pedroza ve ark. STAT3'ün epitel hasarı ve fibroblast-miyofibroblast farklılaşması yoluyla akciğer fibrozisinin gelişimine katkıda bulunduğunu göstermiştir (62). JAK/STAT ve TGF-1 β /Smad inhibisyonu yapan IL-27 ile yapılmış bir çalışmada Dong Z ve ark. pulmoner fibroziste IL-27 ile fibroblast aktivasyonunun azaldığı sonucunda da kollajen sentezinin azaldığını göstermişlerdir (63). Masamune A ve ark. fare pankreas hücrelerinden elde ettikleri pankreatik satellit hücrelerinin PDGF ile uyarılması sonucunda sadece Raf/MEK/ERK yolağı değil aynı zamanda JAK/STAT yolağının da aktive olduğunu ve bu yolağın pankreatik fibrozis gelişiminde rol oynadığını göstermişlerdir (64).

Biz de bu çalışmamızda seçici JAK-Kinaz inhibitörü olan tofasitinib'in fibroblast hücre kültüründe hücre çoğalmasına, canlılığına etkisini göstermeyi amaçladık. Tofasitinib'in 6 farklı konsantrasyonda hem karaciğer hem deri fibroblast hücrelerine uyguladık. Grafik 6.1'de gösterildiği gibi tofasitinib'in doza bağlı etkisi 100 nM konsantrasyonda başladı. En yüksek etkiyi ise 800 nM değerinde olduğunu saptadık. Bu sonuç yukarıda bahsedilen literatürde ki çalışmalarla benzer olarak yani JAK/STAT yolağının inhibisyonu ile fibroblast canlılığının azaldığını göstermektedir. Yine literatüre bakıldığı zaman hepatik hücrelerde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Gu YJ ve ark. hepatik satellit hücrelerinde JAK inhibitörü olan SHR0302 ile hepatik fibroziste azalma olduğunu göstermiştir (65). Renal hücrelerde renal fibroziste

tofositinib'in etkisini araştıran bir çalışmada Yan J. ve ark. tofasitinib'in miyofibroblast transformasyonunda, ekstraselüler matriks bileşenlerinin sentezinde azalma ve fibroblast gelişiminde azalmaya sebep olduklarını saptamışlardır (64).

Burada önemli noktalardan bir tanesi doza bağımlı olarak etkinin artmasıdır. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz ikinci nokta ise tofasitinib'in zamana bağlı olarak etkisini ortaya koymaktı. Grafik 6.2'de de gsterildiği gibi sitotoksik etki zamanla birlikte artmaktaydı. En etkili olduğu saat 72. saat olarak tespit edildi. Literatürdeki çalışmalarda da benzer şekilde diğer JAK inhibitörlerinin de etkisi zamanla artmaktadır. Buradan da anlaşılacağı üzere tofasitinib'in etkisi hem yüksek dozlarda hem de zamanla artmaktadır.

TGF-1 β fibroblastların temel uyarıcısıdır. Aynı zamanda fibroblastlardan da salınmaktadır. TGF-1 β 'in bu etkisi birçok çalışmada gsterilmiştir. Fare ve insan karaciğer hücre kültüründe yapılan bir çalışmada Breikopf-Heinlein ve ark. TGF-1 β ve TGF-2 β 'nın hem karaciğer fibrozisinde, hem de karaciğer kanser hücrelerinde normalden fazla olduğunu saptamışlardır. Hatta TGF-2 β uyarımının TGF-1 β reseptörlerinde artışa neden olduğunu gstermişlerdir (66). Diğer bir çalışmada koklear implantasyon sonucunda gelişen fibrozisin engellenmesi için fare koklear hücreleri üzerinde hem invitro hem in vivo antiinflamatuvar ve antimitotik ilaç uygulaması yapılmıştır. Jia H ve ark. yaptığı bu çalışmada özellikle TGF-1 β ve IL-1 β düzeyleri ölçülmüştür. Tedavi öncesi yüksek olan değerlerin ilaç uygulaması sonrasında düştüğü saptanmıştır (67). Bleomisinle oluşturulan pulmoner fibrozisli bir çalışmada ise yine anti fibrotik etkisinin araştırıldığı fluorofenidone uygulaması yapılmıştır. Hayvan modelinde yapılmış bu çalışmada Yue-Han Wu ve ark. fluorofenidone uygulaması sonrasında kollajen üretiminin ve TGF-1 β düzeylerinin azaldığını gstermişlerdir (68). Literatürde de birçok çalışmada gsterildiği gibi fibrotik yanıtta TGF-1 β 'nin rolü büyüktür. Ancak TGF-1 β daha önce de bahsedildiği gibi hücre içi SMAD yolaklarını kullanmaktadır. Biz de çalışmamızda diğer çalışmalara benzer fibroblast aktivitesini azaltıcı etkisi ve sonucunda TGF-1 β 'nin seviyesinde düşmeyi gsterdik (grafik 6.3). Ancak bu etkinin yani TGF-1 β 'nin inhibe edilmesi tofasitinib'in JAK-kinaz inhibisyonu ile direk olduğunu söylemek zordur. Çünkü Yan J ve ark. yaptığı çalışmada renal fibroziste, renal hücre kültüründe tofasitinib uygulamasının fibrozisi, kollajen sentezini TGF-1 β yolağını etkilemeden azalttığını gstermiştir (64). TGF-1 β kollajenn sentezinde hem sebep hem sonuçtur. Tofasitinib bizim çalışmamızda gsterdiğimiz gibi TGF-1 β seviyesini azaltmıştır. Fibroblast proliferasyonunu azaltarak TGF-1 β seviyesini azalttığını düşünmekteyiz.

Matriks Metalloproteinaz'lar (MMP) kollajen yıkımında görevli kalabalık bir enzim

ailesidir. Bazı MMP'ler hücre proliferasyonunu uyarabilirler. Literatüre bakıldığı zaman MMP'ler ile ilgili birçok çalışmanın yapıldığı görülmektedir. W Gao ve ark. psöriatik artritli hastalarda elde edilen sinovyal hücrelerde tofasitinib uyguladığı bir çalışmada tofasitinib'in anlamlı derece STAT3 ve STAT1 inhibisyonu yaptığı ayrıca SOCS3 ve PIAS3 (STAT inhibitörleri) uyarımı yaptığını göstermişlerdir. O çalışmada ayrıca IL-6, IL-8, MCP-1, MMP9/MMP2, MMP3 düzeylerinde ve MMP3/TIMP3 oranında azalma saptamışlardır (69). Edyta K ve ark. tarafından 49 psöriyazis'li hastanın serumunda ELİSA ile MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, TIMP-2 ve TIMP-3 düzeylerini ölçerek Roc analizi yapılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-3 düzeyini anlamlı olarak yüksek, MMP-12 i ise düşük saptamışlardır (70). Flisiak I ve ark. ise psöriyazisli hastalarda yaptığı bir çalışmada serum MMP-1 ve TIMP-1 seviyesini kontrol gruba göre daha yüksek bulmuştur (71). Biz de çalışmamızda literatürdeki çalışmamalarla benzer MMP-3 ve TIMP-1 seviyesini tofasitinib uygulaması sonrasında kontrole göre düşük saptadık (Grafik 6.4, 6.5). Ancak bazı çalışmalarda da MMP-3 düzeyi düşük saptanmıştır. Ming-Wei Zhou ve ark. yaptığı bir çalışmada normal ve keloid dokudan alınan fibroblastlar üzerine WNT/ β -katenin yolağı inhibitörü olan IWR-1 uygulanmıştır. Sonrasında MMP-1, MMP-3 ve MMP-13 ün seviyesinde yükselme olduğunu göstermişlerdir. Yani kollajen yıkımı yapan enzimlerde ilaçla birlikte artı olmuştur (72). Daha önce belirtildiği gibi MMP ailesi çok sayıda enzimden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar da aslında hepsinin farklı özelliklerinin olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedendir ki aynı hastalıkta bazı MMP türleri artarken bazıları ise düzeyleri düşük saptanabilmektedir. Çelişkili sonuçlar nedeniyle bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

Hidroksiprolin de kollajen sentezinde yer alan ve kollajen yapısında yer alan bir moleküldür. Kollajen sentezinin artmasıyla paralel olarak miktarı da artış göstermektedir. Akimoto K ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada hepatik hücre kültründe heparin uygulamasının hidroksiprolin düzeyinde düşmeye neden olduğunu göstermişlerdir (73). Diğer bir çalışma da göz keratinositleri üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada Stochon T. Ve ark. keratokonuslu hastaların kornealarından ve normal insan kornealarından hücreler alınarak hücre kültüründe çeşitli parametreler ve hidroksiprolin seviyelerini ölçmüşler. Keratokonuslu hücrelerde yani kollajen sentezinin bozulduğu bu grupta hidroksiprolin seviyesinin de normal gruba göre daha düşük olduğunu saptamışlardır (74). Grafik 6.6'da gösterildiği gibi biz de çalışmamızda hidrosiprolinin seviyesini kontrole göre düşük bulduk. Yani tofasitinib uyguladıktan sonra kontrol hücre grubuna göre düşük olması aslında tofasitinib'in kollajen sentezini azalttığını desteklemektedir.

Sonuç olarak tofasitinib'in fibroblast hücre kültüründe (hem karaciğer hem deri) fibroblastların proliferasyonunu, canlılığını doza ve zamana bağlı olarak artan etki ile azalttığını göstermiş olduk. Aynı şekilde fibroblast aktivasyonunu gösteren markerlerden TGF-1 β , MMP-3, TIMP-1 ve hidroksiprolin seviyeleri de tofasitinib uygulaması sonrasında kontrollere göre düşük saptadık. Ancak çalışmamızda gösterdiğimiz tofasitinib'in bu etkisi hücre kültürü seviyesinde olduğundan dolayı hastalıklarda klinik etkisini ortaya koyabilmek için hayvan model çalışmaları ve klinik çalışmaları içeren daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.



8. KAYNAKLAR

1. Turanlıgil C UY. Hücre İçi Sinyal Yolakları ve Klinik Yansımaları. Arşiv. 2010;19-180
2. Çoban ZD GŞ. Hücre içi sinyal iletimi mekanizmalarının kanser tanı ve tedavisindeki rolü. Cumhuriyet Tıp Derg. 2013;35:302–10.
3. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. Eur J Cancer. 2002 Sep;38 Suppl 5:S3-10.
4. Kuralay F ÇZ. İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış. Genel Tıp Derg. 2006;16(3):143–52.
5. Leask A AD. TGF- β signaling and the fibrotic response. FASEB J. 2004;May(18(7)):816–27.
6. Ghoreschi K, Jesson M, Li X et al. Modulation of Innate and Adaptive Immune Responses by Tofacitinib (CP-690,550). J Immunol. 2011 Apr;186(7):4234–43.
7. Piscianz E, Valencic E, Cuzzoni E et al. Fate of lymphocytes after withdrawal of tofacitinib treatment. PLoS One. 2014;9(1):e85463.
8. Boyle D L, Soma K HJ. The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2015 Jun;74(6):1311–6.
9. Gao W, McGarry T OCE al. Tofacitinib regulates synovial inflammation in psoriatic arthritis, inhibiting STAT activation and induction of negative feedback inhibitors. Ann Rheum Dis. 2016 Jan;75(1):311–5.
10. Brown B.N. BS. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. Transl Res. 2014;163:268–85.
11. Hanein D HA. The structure of cell-matrix adhesions: the new frontier. Curr Opin Cell Biol. 2012;24:134–40.
12. Güzel E. E., Atilla P. DA. Fibroblast ve Fibroblast Benzeri Hücreler. Türkiye Klin J Med Sci. 2006;26:421–9.
13. Saalbach A, Aneregg U BM etc. Novel fibroblast specific onoclonal antibodies: Properties and specificities. J Invest Dermatol. 1996;106:1314–9.
14. Atilla P, Vermot-Desroches C DA etc. Fibroblastic reticular cells and fibroblast-like cells determined by monoclonal antibodies B-F45 and B-D46 in humans. Saudi Med J. 2004;25:602–8.
15. Gartner LP HJ. Connective tissue. In: Color Textbook of Histology. second. 2001. p. 109–28.
16. Evans CE TI. Fibroblast-like cells from tendons differ from skin fibroblasts in their

- ability to form three-dimensional structures in vitro. *J Hand Surg.* 1998;23:633–41.
17. Bancroft J. D. LC. Connective and other mesenchymal tissues with their stains. In: *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*,. p. 153–75.
 18. B. E. An assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. *Ultrastruct Pathol.* 2001;25:39–50.
 19. Desaki J SM. A re-examination of the cellular reticulum of fibroblast-like cells in the rat small intestine by scanning electron microscopy. *Electron Microsc.* 2000;49:203–8.
 20. D.J.S. Hulmes. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In: *Collagen Structure and Mechanics.* 2008. p. 15–41.
 21. Gur P. Kaushal, Alan D. Elbein WEC. The Extracellular Matrix. In: *Medical biochemistry.* Fourth. 2014. p. 380–92.
 22. Ovalle K. W. NPC. Connective Tissue. In: *Netter's Essential Histology*,. 2013. p. 51–70.
 23. PhD LPG. Connective Tissue. In: *Textbook of Histology.* 2017. p. 127–48.
 24. Gerhard Meisenberg PhD WHSP. The Extracellular Matrix. In: *Principles of Medical Biochemistry.* 2017. p. 218–34.
 25. Yamauchi M SM. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem.* 2012;52:113–33.
 26. Varga J. Mechanism of Fibrosis. In: *Scleroderma.* 2012. p. 255–65.
 27. Jimenez SA DC. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med.* 2004;140(1):37–50.
 28. Feng XH DR. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:659–93.
 29. Briones-Orta MA, Tecalco-Cruz AC etc. Inhibitory Smad7: emerging roles in health and disease. *Curr Mol Pharmacol.* 2011;4:141–53.
 30. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P etc. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(5):1523–32.
 31. Svegliati S, Canello R SP etc. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblastse. *J Biol Chem.* 2005;280(43):36474–82.
 32. Olson LE SP. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell.* 2009;16(2):303–13.
 33. Baroni SS, Santillo M BF etc. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in

- systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2005;354(25):2667–76.
34. Rao TP KM. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res.* 2010;106(12):1789–806.
 35. Wei J, Melichian D, Komura K etc. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum.* 2011;63:1707–17.
 36. Lam AP, Flozak AS, Russell S etc. Nuclear {beta}-catenin is increased in scleroderma pulmonary fibrosis and promotes lung fibroblast migration and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;(april).
 37. Kavian N, Servettaz A, Mongaret C E. Targeting ADAM-17/notch signaling abrogates the development of systemic sclerosis in a murine model. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3477–87.
 38. Aden N, Nuttall A, Shiwen X E. Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2010;130(9):2191–200.
 39. TA. W. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):583–94.
 40. Fuschiotti P MJT. Effector CD8+ T cells in systemic sclerosis patients produce abnormally high levels of interleukin-13 associated with increased skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1119–28.
 41. . Oga T, Matsuoka T YC etc. Prostaglandin F(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factorbeta. *Nat Med.* 2009;15(12):1426–30.
 42. Tager AM, LaCamera P SB etc. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med.* 2008;14(1):45–54.
 43. . Seki E, De Minicis S OC etc. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(11):1324–32.
 44. Farina GA, York MR, Di Marzio M etc. Poly(I:C) drives type I IFN- and TGF b - mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2010;130(11):2583–93.
 45. Ö.G. Ö. Matriks Metalloproteinaz Enzim Ailesi. *Arch Med Rev J.* 2013;22(2):209–20.
 46. Ian P. Salt MMH and HSG. Membrane Receptors and Signal Transduction. In: *Medical Biochemistry.* 2014. p. 536–50.
 47. Craig C. Malbon. Developmental cell biology: G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:689–701.

48. PhD GMP and WHS. Intracellular Messengers. In: Principles of Medical Biochemistry. 2017. p. 256–74.
49. Prf.Dr. Hasan Veysi Güneş. Hücre Uyarı Sistemleri. In: Moleküler Hücre Biyolojisi. 2006. p. 303–33.
50. Cantley L. Principles of Cell Signaling. In: Seldin and Giebisch's The Kidney. 2013. p. 369–413.
51. T R. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1758–84.
52. Rawlings J. S., Rosler K.M. HAD. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004;117:1281–3.
53. Shuai K LB. Regulation of JAK-STAT Signalling in the Immune System. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:903–11.
54. Clifford Liongue ACW. Evolution of the JAK-STAT pathway. *JAKSTAT*. 2013;2(1).
55. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan S. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374:1–20.
56. Foster, F. M., Traer, C. J., Abraham S. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci*. 2003;116:3037–40.
57. Moustakas A. Smad signalling network. *J Cell Sci*. 2002;115:3355–6.
58. Gehringer M. Pfaffenrot E. E. 2-(3-((3R,4R)-4-Methyl-3-[methyl(7Hpyrrolo[2,3d]pyrimidin-4-yl)amino] piperidin-1-yl)oxetan-3-yl) acetonitrile monohydrate. *Acta Crystallogr Sect E*. 2014;70:382–3.
59. Riese J. C. Krishnaswami S. etc. Inhibition of JAK kinases in patients with rheumatoid arthritis: scientific rationale and clinical outcomes. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24:513–26.
60. Helmrich A BD. Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol*. 1998;57:3–17.
61. Etc A-NMBAM. Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. *Egypt Dermatology Online J*. 1(2):2005.
62. Mesias Pedroza, Thuy T. Le KL et al. STAT-3 contributes to pulmonary fibrosis through epithelial injury and fibroblast-myofibroblast differentiation. *FASEB J*. 2016;30(1):129–40.
63. A ZD, B XZ, Al T et. IL-27 attenuates the TGF- β 1-induced proliferation, differentiation and collagen synthesis in lung fibroblasts. *Life Sci*. 2016;feb 1(146):24–33.
64. Yan J, Zhang Z, Yang J et al. JAK3/STAT6 Stimulates Bone Marrow-Derived Fibroblast Activation in Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2015;12(26):3060–71.

65. Gu YJ, Sun WY ZS et al. Targeted blockade of JAK/STAT3 signaling inhibits proliferation, migration and collagen production as well as inducing the apoptosis of hepatic stellate cells. *Int J Mol Med*. 2016;sep 38(3):903–11.
66. Dropmann A, Dediulia T B-HK et al. TGF- β 1 and TGF- β 2 abundance in liver diseases of mice and men. *Oncotarget*. 2015;july,7(15):19499–518.
67. H. Jia, F. François JBourie et al. Prevention of Trauma-Induced Cochlear Fibrosis Using Intracochlear Application Of Anti-Inflammatory And Antiproliferative Drugs. *Neuroscience*. 2016;316:261–78.
68. Yue-Han Wu X-WL et al. Fluorofenidoneattenuatesbleomycin-inducedpulmonary fibrosisby inhibiting eukaryotictranslationinitiationfactor3a(eIF3a)inrats. *EuropeanJournalofPharmacology*. 2016;773:42–50.
69. Gao W, McGarry T OCE al. Tofacitinib regulates synovial inflammation in psoriatic arthritis, inhibiting STAT activation and induction of negative feedback inhibitors. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:311–5.
70. Glazewska E.K. Niczyporuk M. Lawicki S. et al. ROC analysis of selected matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in psoriatic patients. *Adv Dermatology Allergol*. 2018;XXXV(2):167–73.
71. Flisiak I, Porebski P CB. Effect of psoriasis activity on metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 in plasma and lesional scales. *Acta Derm Venereol*. 2006;86:16–21.
72. Ming-Wei Zhou, Wei-Tian Yin, Ri-Hua Jiang et al. Inhibition of collagen synthesis by IWR-1 in normal and keloidderived skin fibroblasts. *Life Sci*. 2016;
73. Akimoto K, Ikeda M SK. Inhibitory effect of heparin on collagen fiber formation in hepatic cells in culture. *Cell Struct Funct*. 1997;22(5):533–8.
74. Stachon T, Kolev K, Flaskó Z et al. Arginase activity, urea, and hydroxyproline concentration are reduced in keratoconus keratocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017;255(1):91–7.

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Mehtap ŞAHİN
Doğum Yeri ve Tarihi: Kırşehir, 06.10.1979
Medeni Hali: Evli
Yabancı Dil: İngilizce
e-posta: dralsahin@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Lise: Fatsa Lisesi,Fatsa,1996
Önlisans: Anadolu Üniversitesi,AÖF, Sağlık Kurumları İşletmeciliği,2015
Önlisans: Anadolu Üniversitesi,AÖF, İşletme ,2015-
Lisans: Dokuz Eylül Üniversitesi, Hemşirelik Bölümü,İzmir,2000
Yüksek Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD,2015-

İş Tecrübesi

Görev Yeri	Ünvanı	Tarih
İzmir Özel Kaskaşoğlu Göz Merkezi	Hemşire	Haziran-Eylül 2000
9 Eylül Üni. Tıp Fak. Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)	Hemşire	Eylül 2000- Kasım 2002
Erciyes Üni. Tıp Fak. Dahiliye YBÜ, Genel Cerrahi YBÜ, Yenidoğan YBÜ, Çocuk Cerrahisi AD	Hemşire	Aralık2002-Temmuz 2009
T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji EAH, G Cerrahi, Ortopedi, Beyin Cerrahi Bölümü	Hemşire	Temmuz 2009-Şubat 2011
T.C. Sağlık Bakanlığı Şanlıurfa Mehmet Akif İnan EAH, Fizik Tedavi Ünitesi Birim Sorumlusu	Hemşire	Şubat 2011-Aralık 2013
T.C. Sağlık Bakanlığı Sivas Numune Hastanesi Göz Polk	Hemşire	Aralık 2013-

SERTİFİKALAR

1. Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hemşireliği
2. Adli Tıp Hemşireliği



EK:1 Etik Kurul Kararı

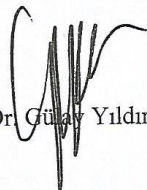
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Fibroblast Hücre Kültüründe JAK-STAT Sinyal Yolu İnhibisyonunun Kollajen Biyosentezi Üzerine Etkilerinin Araştırılması
-----------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başhekimlik Girişi Kampüsü, TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 258 00 25
	FAKS	0 346 258 00 24
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Hüseyin Aydın			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yüksek lisans tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Gülay Yıldırım
İmza:



GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Fibroblast Hücre Kültüründe JAK-STAT Sinyal Yolu İnhibisyonunun Kollajen Biyosentezi Üzerine Etkilerinin Araştırılması
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2016-11/21	Tarih: 25.11.2016		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmann/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Gülay Yıldırım

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Şahande Elagöz	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Serpil Değerli	Parazitoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Naim Nur	Halk Sağlığı	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Diğdem Eren	Diş Hastalıkları ve Tedavisi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sulhattin Arslan	Göğüs Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Zehra Gölbaşı	Doğum-Kadın Hastalıkları Hemşireliği	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimler Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceylan Hepokur	Eczacılık Biyokimya	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczalık Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Gülay Yıldırım
İmza: