



T.C.

**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ ATATÜRK
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ**

İÇ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

**SJÖGREN SENDROMU VE SİSTEMİK
SKLEROZ HASTALARININ MİNÖR TÜKÜRÜK
BEZİ PATOLOJİLERİNDEN MTOR YOLAĞININ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Zeynep Zehra Gümüş

Danışman

Prof. Dr. Servet AKAR

İZMİR-2016



T.C.

**İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ ATATÜRK
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ**

İÇ HASTALIKLARI KLİNİĞİ

**SJÖGREN SENDROMU VE SİSTEMİK
SKLEROZ**

**HASTALARININ MİNÖR TÜKÜRÜK BEZİ
PATOLOJİLERİNDE mTOR**

YOLAĞININ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Zeynep Zehra Gümüş

Danışman

Prof. Dr. Servet AKAR

İZMİR-2016

TEŞEKKÜR

Tezimin yazılması sırasında hem zamanını hem de değerli görüş ve önerilerini benden esirgemeyen danışmanım, hocam ve mentorum Prof. Dr. Servet Akar'a, tez sürecinde yardımlarını eksik etmeyen, bir gün bile hayır demeyen Prof. Dr. Fulya Çakalağaoğlu'na, tezimin yazım aşamasında her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan Burak Demirel'e,

Bütün hayatım boyunca bana her zaman, her konuda maddi ve manevi destek veren sevgili annem Emel Gümüş, babam Mehmet Gümüş ve kardeşim Seda Gümüş'e,

Daha önce yaptığım yayınlar sayesinde tezimin oldukça kolay yazılmasına vesile olan ve bana ilk yayınlamı yaptıran Füsun Gediz'e; sonrasında beni bilimsel çalışmalar için destekleyip yönlendiren Cem Çekiç, Elif Sarıtaş Yüksel, Firdevs Topal, Zehra Ecesoy Akpınar, Belkıs Ünsal, Murat Akyol, Ahmet Alacacıoğlu, M. Oktay Tarhan, Dilek Solmaz, Mustafa Özmen'e,

Tüm asistanlık hayatım boyunca kyifle ve huzurla çalışmamı sağlayan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Gerek tezimin yazımı sırasında gerekse günlük hayatımda varlıklarıyla beni her zaman destekleyen, mutlu eden ve geliştiren tüm sevdiklerime teşekkür ederim.

Dr. Zeynep Zehra Gümüş

Ağustos 2016

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ	II
KISALTMALAR DİZİNİ	III
TABLOLAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
4. SONUÇLAR	44
5. TARTIŞMA	50
6. ÖZET	53
7. SUMMARY	56
8. KAYNAKLAR:.....	59

KISALTMALAR DİZİNİ

4EBP1: *eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) binding protein-1*

α -SMA: alfa-düz kas aktin

ACR: Amerikan Romatoloji Derneği, *American College of Rheumatology*

ADP: Adenozin difosfat

AECG: *American-European Consensus Group*

Akt: Protein kinaz B

AMP: Adenozin monofosfat

AMPK: AMP aktive edici protein kinaz

ANA: Antinükleer antikor

ANCA: Antinötrofil sitoplazmik antikor

Anti-La: Sjögren Sendromu ilişkili antijen-B, SSB

Anti PM-Scl: Polimiyozit-skleroderma antikor

Anti-RNP: Anti ribonükleoprotein

Anti-Ro: Sjögren Sendromu ilişkili antijen-A, SSA

Anti-Sm: *Smith* antikor

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

ATP: Adenozin trifosfat

BAFF: B hücre aktive edici faktör

Bcl-2: B hücreli lenfoma 2 (*B cell lymphoma 2*)

BCR: B hücre reseptörü

BLK: B lenfosit kinaz

BNIP3: *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*

BUT: *Break-up time*

CCN ailesi: CYR61-CTGF-NOV ailesi (*cysteine-rich protein 61, connective tissue growth factor ve nephroblastoma overexpressed protein*)

CD: *Cluster of differentiation*

CMV: sitomegalovirüs

CREST: Kalsinozis kutis, Raynaud fenomeni, özofageal dismotilite, sklerodaktili, telenjektazi

CTGF: konnektif doku büyüme faktörü (*connective tissue growth factor*)

CXCL: kemokin C-X-C motif ligand

CXCR5: *C-X-C chemokine receptor type 5*

CYR61: *cysteine-rich protein 61*

Deptor: *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*

DNA: Deoksiribonükleotid asit

EBV: Epstein-Barr virüs

EBF1: *Early B-Cell Factor 1*

ECM: Ekstrasellüler matriks

eIF4E: *eukaryotic initiation factor 4E*

ERK: *Extracellular-signal-regulated kinase*

EU1: *European-1*

EULAR: *European League Against Rheumatism*

FAT: PIKK aile üyesi olan FRAP, ATM, TRAPP proteinlerinin kısaltması

FATC: *FAT C- terminus*

Fc: Kristalize olabilen fragman, (antikor yapısında bir bölüm)

FCGR2B: *Fc Fragment Of IgG Receptor IIb*

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FKBP12: *FK506 binding protein 12 kDa*

FOXP3: *Forkhead box P3*

FRAP1: FK506 bağlayan protein 12- rapamisin ilişkili protein
(*FK506-binding protein 12-rapamycin-associated protein 1*)

FRB: *FKBP12/rapamisin binding*

G1: Mitoz bölünmenin *Gap-1* fazı

GbL: (veya diğer adıyla mLST8) *mammalian lethal with Sec13 protein 8*

GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör

GVHD: Graft-versus-host hastalığı

H&E: Hematoksilen Eosin

HCV: Hepatit C virüsü

HEAT: *Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), protein phosphatase 2A (PP2A), and the yeast kinase TOR1*

HHV6: İnsan herpes virüs-6

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü

HLA: İnsan lökosit antijeni

HLA-DR: *Human Leukocyte Antigen - antigen D Related*

HTLV1: İnsan T lenfotropik virüs 1

hyRNA: *Human yeast ribonükleotid asit*

ICA69: Adacık hücre otoantijeni (*Islet-cell autoantigen 69*)

IFN: İnterferon

IgG4: İmmunglobulin G4

IKK β : aktive I κ B (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha*) kinaz beta

IL: İnterlökin

IRF5: interferon regülatuar faktör 5 geni

IRS1: İnsülin reseptör substrat 1

İHK: İmmunohistokimyasal

JAK-STAT: Janus Kinaz- transkripsiyonun sinyal güç çeviricileri ve aktive edicileri (*Janus kinase- signal transducers and activators of transcription*)

kDa: Kilo Dalton

KKS: Keratokonjunktivitis sikka

LTA: *Lymphotoxin Alpha*

MALToma: Mukoza ilişkili lenfoid doku lenfoması, MALT lenfoma

MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz

MBL2: *Mannose Binding Lectin 2*

MHC: Büyük doku uygunluk kompleksi (*Major histocompatibility complex*)

mLST8: *mammalian lethal with Sec13 protein 8*

mRNA: Mesajcı RNA

mSIN1: *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein*

MTB: Minör tükürük bezi

mTOR: Memeli rapamisin hedefi (*Mammalian target of rapamycin*)

mTORC1: mTOR kompleks 1

mTORC2: mTOR kompleks 2

NCR3: *Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3*

NF-κB: Nükleer faktör kapa B

NFKBIA: *NFKB Inhibitor Alpha*

NK: Doğal öldürücü hücre (*natural killer*)

NKp30: Doğal sitotoksik reseptör p30, CD337

NOD: Obez olmayan diyabetes mellitus (*NonObese Diabetes*)

NOV: *nephroblastoma overexpressed protein*

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PDGFR: PDGF reseptörü

PI3K: Fosfoinositid-3-kinaz

PIKK: Fosfatidil inozitol 3-kinaz ilişkili kinazlar

(Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases)

PKB: Protein kinaz B, diğer adı ile Akt

PKC-α: Protein kinaz C alfa

PPARγ: *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*

PRAS40: *Prolinerich AKT substrate 40 kDa*

Protor-1: *protein observed with Rictor-1*

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

PTPN22: *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22*

RAG proteini: Rekombinasyon aktive edici protein

Raptor: *Regulatory-associated protein of mTOR*

RAS ailesi: Rat sarkoma virüs geni protein ailesi

REDD1: *DNA damage response 1*

RF: Romatoid faktör

Rictor: *rapamycin-insensitive companion of mTOR*

RNA: Ribonükleotid asit

S: Mitoz bölünmenin sentez fazı

S6K1: Ribosomal subunit 6 kinaz 1

Scl-70: Anti topoizomeraz I

SD: Standart sapma

Ser473: Akt molekülünün fosforile edilebildiği bir bölgesi

SjS: Sjögren Sendromu

SLE: Sistemik lupus eritematosus

SMAD: *Suppressor of mothers against decapentaplegic*

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphism*, tek nükleotid polimorfizmi

SP1: Sıçan parotid antijeni

SPSS V.16: Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi Versiyon 16 (*Statistical Package for the Social Sciences version 16th*)

SREBP1: *Sterol regulatory element binding protein 1*

SSA: Sjögren Sendromu ilişkili antijen-A (veya anti-Ro)

SSB: Sjögren Sendromu ilişkili antijen-B (veya anti-La)

SSc: Sistemik skleroz

STAT4: *Signal transducer and activator of transcription 4*

TAP2: *Antigen peptide transporter 2*

TGF- β 1: *Transforming growth factor- β 1*

Th: Yardımcı T hücre (*T helper*)

TLR: Toll-benzeri reseptör

TNF: Tümör nekroz faktör

TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa

TNFRSF4: *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member*

4

TNIP1: *TNFAIP3 Interacting Protein 1*

TOR: *target of rapamycin*

TRAPP: *Transformation/transcription domain-associated protein*

Treg: Regülatuar T hücre

TSC: Tuberoskleroz kompleks

tsk1 fare modeli: *Tight skin* fare modeli

ULK1: *Unc51-like kinase 1*

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WNT: *Wingless-Type Integration Site*

TABLolar DİZİNİ

- Tablo 1: Her 3 hasta grubunda hasta yaşı, hastalık süreleri, sikka semptom varlığı, BUT ve Schirmer test sonuçlarının istatistiksel verileri
- Tablo 2: Hasta gruplarına göre minör tükürük bezinin mTOR sinyal skorları.
- Tablo 3: Hasta gruplarına göre minör tükürük bezinin PTEN sinyal skorları.
- Tablo 4: Hasta gruplarına göre minör tükürük bezi duktuslarında TGF- β 1 sinyal skorları.
- Tablo 5: Hasta gruplarına göre minör tükürük bezi asinuslarında TGF-sinyal skorları.
- Tablo 6: Tüm hasta gruplarındaki fibrosis derecesi verileri
- Tablo 7: Sjögren Sendromu hasta grubunda mTOR, PTEN, TGF- β 1, fibrosis ve yaş değişkenlerinin birbirleriyle Spearman analizine göre korelasyon verileri

ŞEKİLLER DİZİNİ

- **Şekil 1:** mTOR kompleks 1 ve 2'yi oluşturan yapısal proteinler ve mTOR komplekslerinin etkileşime girdiği yollar.
- **Şekil 2:** mTOR komplekslerinin hücre zarı ve etkileşimde oldukları yollarla ilişkisi
- **Şekil 3:** mTOR işlevleri ve işlevlerine aracılık eden proteinler.
- **Şekil 4:** mTOR'un T hücre farklılaşması üzerindeki işlevi
- **Şekil 5:** T hücreleri ve enerji gereksinimleri için gerekli yüksek mTOR aktivitesi
- **Şekil 6:** Çeşitli büyüme faktörleri ve mTOR arasındaki etkileşim
- **Şekil 7:** PTEN ve PI3K/Akt/mTOR yolu arasındaki ilişki
- **Şekil 8:** TGF- β reseptörünün uyarılması ile mTOR arasındaki etkileşim
- **Şekil 9:** TGF- β 'nin Ras/ERK yolu üzerinden PTEN düzeylerine hem pozitif hem de negatif yöndeki etkisi
- **Şekil 10:** Hematoksin Eosin ile boyanmış minör tükürük bezinin 4x büyütmede görüntüsü
- **Şekil 11:** Minör tükürük bezinde fokus skoru ≥ 1 alan görüntüsünün büyük (a) ve küçük (b) büyütmede görüntüsü
- **Şekil 12:** Minör tükürük bezinde 10x büyütmede 1 pozitif (a) ve 3 pozitif (b) mTOR boyanması
- **Şekil 13:** Minör tükürük bezinde 10x büyütmede PTEN için negatif (a) ve 2 pozitif (b) boyanma
- **Şekil 14:** Minör tükürük bezinde 10x büyütmede TGF- $\beta 1$ ile 1 pozitif (a) ve 4x büyütmede 3 pozitif (b) boyanma



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sjögren Sendromu (SjS) kronik, sistemik, inflamatuvar bir hastalıktır¹. Patogenezinde tükürük ve gözyaşı bezi gibi dış salgı bezlerine T hücre infiltrasyonu ile eş zamanlı otoantikör üretimi ve glandüler dokunun harabiyeti yer alır^{1,2}. Buna bağlı olarak hastaların başlangıç yakınması çoğunlukla ağız ve göz kuruluğudur². SjS ya tek başına (primer SjS) ya da altta yatan bir başka bağ doku hastalığı ile ilişkili olarak (sekonder SjS) görülür. SjS'nun erken dönemlerinde, patogenezden *cluster of differentiation* (CD) 4 pozitif T *helper* hücreler sorumluyken ilerleyen dönemlerde B hücreler ağırlıklı rol oynadığı düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda epitel hücrelerinin insan lökosit antijenlerini (HLA), adezyon ve kostimülatör molekülleri, sitokinleri ve kemokinleri sentezleyerek otoimmunitede merkezi bir göreve sahip olduğu da görülmüştür². Bu nedenle SjS etiyolojisi için “otoimmün epitelit” terimi önerilmiştir.

Sistemik skleroz (SSc), bir kronik otoimmün hastalık olup patogenezini henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da artmış fibrosis ile karakterizedir³. SSc'da en sık rastlanan cilt bulgusu artmış tip 1 kollajen birikimi ve alfa-düz kas aktin (α -SMA) sentezleyen miyofibroblastların dermal infiltrasyonudur⁴. Bu durumun nedeni, birçok farklı uyaran etkisi ile fibroblastların miyofibroblastlara dönüşmesi ve ekstrasellüler matriks sentezlemesidir⁵. SSc hayvan modellerinde yapılan birçok araştırmada, tümör büyüme faktörü beta (*Transforming growth factor- β* , TGF- β) gibi profibrotik mediatörlerin ve mTOR aktivitesinin artmış olduğu kanıtlanmıştır⁴.

Memeli rapamisin hedefi (*mammalian target of rapamycin*; mTOR), bir serin treonin kinaz olup hücre büyüme ve çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynar. mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) olmak üzere 2 farklı multiprotein kompleksinden oluşur⁴. mTORC1, mesajcı ribonükleotid asit (mRNA) translasyonunda görevli olan Ribosomal subunit 6 kinaz 1 (S6K1) ve *eukaryotic initiation factor 4E*

(*eIF4E*) *binding protein-1* (4EBP1) proteinlerini aktive eder⁶. Büyüme faktörleri, besinler, enerji, stres sinyalleri, fosfatidil inozitol 3 kinaz (PI3K), mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK), adenosin monofosfat (AMP) aktive edici protein kinaz (AMPK) gibi en yaygın sinyal yolları ile stimüle olarak hücre büyümesini, proliferasyonunu ve sağ kalımını kontrol eder. mTORC2, protein kinaz C alfa (PKC- α) ve Akt'yi aktive eder ve aktin hücre iskeletini düzenler⁶. mTOR multiprotein komplekslerinin fibrotik interlökinler (IL) üzerine pozitif etkisi mevcut olup Liang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mTOR'un rapamisin ile inhibisyonu sonucu IL4, IL6, IL17 ve TGF- β 'nin azaldığı gösterilmiştir⁵. PTEN molekülü ise Akt'yi (diğer adı ile PKB'yi) inhibe ederek mTOR yolağını etkiler⁷.

Günümüzde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı mTOR inhibitörleri mTORC1 proteini üzerinden etki göstermektedirler. mTORC1 inhibisyonu, mTOR-S6- insülin reseptör substrat 1 (IRS1)-negatif feedback luyunun deaktivasyonu yoluyla Akt yolağının aktive olmasına yol açar⁵. mTORC2, Akt'yi Ser473 kısmı üzerinden fosforile ederek Akt enzim aktivitesini 10 kata kadar artırır. Akt hiperaktivasyonu apoptoza direnç, artmış hücre büyümesi, hücre proliferasyonu ve hücre metabolizması ile ilişkili bulunmuştur. Bu durum, mTOR inhibitörlerinin SSc modellerindeki kısıtlı başarısını açıklayabilir. Bu nedenle SSc tedavisinde hem mTOR hem de PI3K/Akt yolağını eş zamanlı inhibe edebilen BEZ235 gibi yeni tedavi ajanları geliştirilmektedir⁵.

Sistemik otoimmün hastalıklarda MAPK, Akt, nükleer faktör kappa B (NF- κ B), B hücreli lenfoma 2 ailesi (*B cell lymphoma 2*, Bcl-2) ve Janus Kinaz- transkripsiyonun sinyal güç çeviricileri ve aktive edicileri (*Janus kinase- signal transducers and activators of transcription*, JAK/STAT) molekülleri gibi birçok moleküler sinyalizasyon yollarının aktive olduğu görülmüştür. Ancak tüm bu moleküler yollar içerisinde, terapötik hedef olma özelliği nedeni ile PI3K/Akt/mTOR yolağı öne çıkabilir⁸. SSc'da artmış fibrosisin mTOR ile ilişkisi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda daha önce araştırılmıştır. Sjs için "obez olmayan diyabetes mellitus" (*NonObese*

Diabetes: NOD) fare modelinde rapamisin ve *FK506 binding protein 12 kDa* (FKBP12) kompleksinin mTOR yolağı inhibisyonunu arttıran bir molekülle ilgili bir çalışma mevcut olup ⁹ *in vivo* veya *in vitro* olarak SjS patogenezi ve mTOR yolağı arasındaki ilişki açısından yapılmış insan veya hayvan deneyi bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada SjS ve SSc için potansiyel tedavi hedefi olan mTOR sinyal yolağının sistemik skleroz, Sjögren sendromu ve SSc-SjS akışma sendromlu hastaların minör tükürük bezi biyopsilerinde rolünün araştırılması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. SJÖGREN SENDROMU

2.1.1. Epidemiyoloji

SjS prevalans ve insidansı ile ilgili tahminler kullanılan tanı ölçütleri, çalışma tasarımı ve incelenen popülasyona göre değişiklik gösterir. Göz kuruluğu yakınması olan hastaların yalnızca %10 gibi küçük bir kısmında SjS bulunmaktadır. Minnesota'daki Olmsted County' de 1993 SjS tanı ölçütleri kullanılarak yapılan bir toplum temelli çalışmada, SjS yıllık insidansı yaklaşık olarak 4/100.000 olarak bulunmuştur¹⁰. Bu hastaların %70'i primer SjS, geri kalanında sekonder SjS bulunmaktaydı¹⁰. Diğer toplumlardaki prevalans bildirimleri %0,001-0,009 arasında değişmektedir¹¹⁻¹³. Toplum temelli çalışmalardan oluşan ve 2014 yılında yayınlanan bir meta-analizde toplam SjS insidansı yaklaşık olarak 7/100.000 olarak verilmiştir¹⁴. En yüksek insidanslar Asya ve Avrupa'dan bildirilmiştir. Bu meta-analizdeki prevalans ise %0,043 olarak tahmin edilmiştir. Ülkemizde Ege bölgesinden 2.835 kişinin dahil edildiği bir çalışmada ise primer SjS prevalansı Amerika-Avrupa Konsensus Grubu (*American-European Consensus Group, AECG*) kriterlerine göre %0,210 ve European-1 (EU-1) kriterlerine göre %0,350 olarak bulunmuştur¹⁵.

2.1.2. Genetik

Büyük doku uygunluk kompleksi (*Major histocompatibility complex-MHC*) sınıfı içerisindeki ve dışındaki birçok genom bölgesi SjS ile ilişkili bulunmuştur^{16,17}.

HLA genleri: En kuvvetli ilişki MHC genlerinde bulunsa da etnik gruplar arasında ciddi heterojenite mevcuttur. Beyaz ırkta SjS hastası olanlar arasında *Human Leukocyte Antigen - antigen D Related-3* (HLA-DR3), HLA-B8, HLA-DQ2 ve HLA-C4 yaklaşık %50 oranında bulunmaktayken, genel popülasyonda bu oran %20-50 arasındadır¹⁸.

HLA dışı genler: HLA dışı genlerle de artmış SjS riski bildirilmiştir¹⁹. Doğal bağışıklık sistemi ile ilgili interferon regülatuar faktör 5 geni

(*IRF5*) ve *TNFAIP3 Interacting Protein 1 (TNIP1)*, edinilmiş bağışıklık sistemi ile ilgili B lenfosit kinaz (*BLK*), *signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)*, *IL12A* ve *C-X-C chemokine receptor type 5 (CXCR5)* genleri, bunların en iyi bilinenlerindedir¹⁹. Doğal bağışıklıkla ilgili *Mannose Binding Lectin 2 (MBL2)*, *Fc Fragment Of IgG Receptor Iib (FCGR2B)*, *Lymphotoxin Alpha (LTA)*, tümör nekrozis faktör geni (*TNF*), *Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3 (NCR3)* ve *NFKB Inhibitor Alpha (NFKBIA)* ile edinsel bağışıklıkla ilgili *Antigen peptide transporter 2 (TAP2)*, *Early B-Cell Factor 1 (EBF1)*, *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22 (PTPN22)*, *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 4 (TNFRSF4)* ve *IL10* genlerinin bazı çalışmalarda ilişkili bulunduğu ve patogeneizde önemli olabileceği düşünülmüştür²⁰.

2.1.3. Çevresel Etkenler

SjS patogenezinden virüslerin sorumlu olabileceği düşünülse de, şu ana kadar herhangi bir virüsün yol açtığı SjS kanıtlanamamıştır. Hastalarda devam eden veya yeni geçirilmiş viral infeksiyon olduğu gösterilse bile yüksek seviyede virüs varlığı hedef dokuda gösterilememiştir²¹. Ancak yine de düşük düzeyde virüsle enfekte hücreler, otoantijenlere karşı toleransı kırıyor olabilir. SjS patogenezinden sorumlu tutulan virüslerden bazıları Epstein-Barr virüs (*EBV*), sitomegalovirüs (*CMV*), insan herpes virüs-6 (*HHV6*), adenovirus, coxsackie virus, insan T lenfotropik virüs 1 (*HTLV1*), insan immun yetmezlik virüsü (*HIV*) ve Hepatit C virüsü (*HCV*) olup elimizde kesin kanıt oluşturacak bir veri yoktur²²⁻²⁹.

2.1.4. T hücre İnfiltrasyonu ve Patogenez

Bez dokusu harabiyetinde hem doğal hem de edinsel bağışıklık sisteminin rolü vardır³⁰. Doku hasarı büyük ölçüde, bu bağışıklık sistemi yolaklarının aktivasyonunu ile meydana gelir. Bu aktivasyonda glandüler veya ekstraplanduler doku içerisinde bulunan lenfositler tarafından interferon (*IFN*) gama, *IL17*, B hücre aktive edici faktör (*BAFF*) gibi sitokinlerin salınımı ve karakteristik otoantikorların üretimi rol oynuyor olabilir. Glandüler dokudaki hücrelerin apoptozu ve disfonksiyonu,

tükürük bezi dokusu ile etkileşime geçen sitokinler ve metalloproteinazlar nedeni ile meydana gelir.

Sekretuar bez hücrelerinin virüs veya genetik nedenlerle hasarının, apopitoza ve Sjögren Sendromu ilişkili antijen-A (SSA veya anti-Ro) antijeninin insan Y-RNA'sı (*human yeast ribonucleotide acid, hyRNA*) ile kompleks oluşturarak nukleustan hücre yüzeyine doğru migrasyonuna neden olduğu düşünülmektedir ³¹. SSA molekülü, normal apopitoz yıkımından bu şekilde kaçmış olur. SSA-hYRNA kompleksine karşı oluşmuş bir otoantikör varlığında, bu immün kompleks, dendritik hücreler ve B hücrelerince sitoplazmik Toll-benzeri reseptörlerce (TLR) tanınır ^{32,33,30}. Doğal bağışıklığın bu aktivasyonu, tip 1 IFN ve diğer faktörleri aktive ederek ileriki dönemde T ve B hücre aktivasyonunu sağlar. Yeni bir doğal öldürücü hücre (NK), bu aktivasyon ile edinsel bağışıklık sistemine geçişte bir köprü sağlıyor olabilir.

SjS'nin esas patolojik lezyonu lenfosit infiltrasyonudur ve hastalıktan etkilenen tüm dokularda infiltrasyon görülebilir ³⁴. İnfiltratlarda tipik olarak duktuslar çevresinden başlayıp tüm lobüle yayılan, 50 veya daha fazla hücreden oluşan fokal lenfosit toplulukları vardır. Bazı lobüller, bu süreç nedeni ile tamamen harap olmuş olsa da diğer lobüllerin sağlam kalması ile genel olarak mimari korunmuştur. Lenfositik infiltrasyon ile birlikte tükürük bezi duktal epitelinde hiperplazi mevcut olup bu durum klinik olarak bez boyutlarında artışa neden olur.

SjS hayvan modeli ile yapılan bir deneyde (NOD –ciddi kombine immün yetersizliği [SCID] kombinasyonu olan fare modellerinde), epitel ve lokal venül endotelinde metalloproteinazlarla olan değişiklikler sonucu hem dişi hem de erkek farelerde fonksiyonel lenfosit eksikliği gelişmiştir. Ancak kuruluk semptomlarının T lenfositler bezde bulunmadığı sürece gelişmediği gösterilmiştir ^{35,36}.

Epitel hücrelerinin patogenezdaki rolünün anlaşılmasından dolayı hastalık “otoimmün epitelit” olarak adlandırılmıştır ^{37,38}. Epitel hücrelerinin ürettikleri CD86, T hücre yüzeyindeki bulunan CD28 ile

etkileşime girer³⁹. Tip 1 IFN uyarısı veya viral infeksiyon sonrası tükürük bezi epitel hücrelerinden BAFF ve foliküler yapılanmayı sağlayan IL21 gibi sitokinler salınır^{40,41}. Epitel hücreleri ayrıca kemokin C-X-C motif ligand 12 (CXCL12)'nin upregülasyonu ile lenfositik infiltrasyonu artırır⁴².

Tükürük bezi biyopsilerinde sitokin üretimi üzerine yapılan çalışmalarda tip 1 ve tip 2 IFN'un immün yanıtlarda önemli görevi olduğu gösterilmiştir^{43,44}. T ve B hücrelerinde devam eden uyarılar, B hücrelerinde genetik mutasyonlara ve psödolenfoma veya gerçek lenfomaya neden olabilir. B hücre aktivasyonu, artmış BAFF aktivitesi ile ilişkilidir⁴⁵. Özellikle ilginç olan, SjS ile SSA/anti-Ro arasında olan ilişkiden bahsedilmesidir^{46,47}. Bilindiği üzere Ro/SSA, hYRNA'ya ve Ro/SSA apoptotik glandüler hücrenin yüzeyine göçer. Ro/SSA-hYRNA kompleksi ve antikoru bir immün kompleks oluşturarak TLR ve dendritik hücrenin kristalize olabilen fragman (Fc) reseptörüne bağlanır. Dendritik hücrelerin bu uyarımı, SjS'de bildirilen tip 1 IFN gen sinyalizasyonunu sağlar⁴⁸.

Dış salgı bezlerinde ve lenfoid dokularda, T ve B lenfosit aktivasyonu, ko-stimülatör molekül varlığında HLA-DR-kısıtlı antijen sunan hücrelerce meydana getirilmektedir. Bu bulgular hafıza hücreleri ve otoantikorlarla edinsel bağışıklığın karakteristik özellikleridir⁴⁹. SjS'nin ekstraglanduler bulguları, lenfositlerin diğer dokulara infiltrasyonu ve patogenetik otoantikorların üretimi ile olur.

2.1.5. Sitokinler ve Patogenez

Yardımcı T hücre (*T helper*, Th) 1 hücrelerine ek olarak, doğal öldürücü hücreler ve IFN gama üreten Th17 hücrelerinin de rolü olduğu düşünülmektedir. Tükürük bezi dokusunda birçok sitokin tanımlanmış olup tedavide olası hedefleri oluştururlar. Bu sitokinler aşağıdaki gibidir:

- IL7 hematopoetik büyüme faktörüdür ve olgun, naif ve hafıza T hücrelerinin sağ kalımı, çoğalması ve farklılaşmasında görev alır. IL7

ekspresyonunun SjS'lu hasta tükürük bezlerinde arttığı gösterilmiştir⁵⁰. IL7 ayrıca SjS bezlerinde Th1 ve Th17 hücrelerinden sitokin üretimini de yönetir^{51,52}.

- IL12, T hücrelerindeki (özellikle de tip II IFN gama üreten Th1, Th17 ve NK hücreler) STAT4 aktivasyonu sırasında görev alır⁵³.

- IL18 üretimi SjS asiner hücrelerinde gösterilmiştir. IL17 ile sinerjistik etki yaratarak bez harabiyetine yol açabileceği düşünülmektedir. IL18 bir prekürsör olarak salınır ve aktivasyonu ile kaspaz aktivasyonu ve apoptoz gerçekleşir⁵⁴.

- IL21'in BAFF-2'yi indüklediği bildirilmiştir. Bu sitokin, SjS'de doğal immunité ve otoimmün B hücre aktivasyonu arasında köprü rolü oynuyor olabilir⁵⁵. IL21'in tükürük bezinin viral infeksiyonu ile artıyor olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır⁴¹.

- *Forkhead box P3* (FoxP3) belirtecine sahip regülatuvar T hücreler (Treg) homeostatik role sahiptir ve SjS tükürük bezi hücrelerinde gösterilmiştir⁵⁶. Bu hücreler, geri bildirim sinyali sunuyor olabilir⁵⁷.

- Bir doğal öldürücü hücre aktive edici reseptör olan “doğal sitotoksik reseptör p30” (NKp30, CD337) SjS dokularında gösterilmiştir ve IL7, IL17 ve IFN gama varlığında NKp30 miktarı belirgin olarak artar³⁰.

2.1.6. Serolojik özellikler

Serolojik bulgular, SjS hastalarında oldukça belirgindir. SjS açısından karakteristik otoantikörler anti-Ro/SSA ve Sjögren Sendromu ilişkili antijen-B (SSB, anti-La) olup bu otoantikörler aynı zamanda tanı için de gereklidir^{22,58}. Antinükleer antikörler (ANA) hastaların %90'ında bulunmaktadır. Yüksek titrede romatoid faktör (RF) pozitifliği de ayrıca sık olarak görülür.

Bazı belirli serolojik bulgular, spesifik klinik özelliklerle yüksek oranda korele olup bu durumlardan bazıları aşağıda belirtilmiştir:

Antinükleer antikolar: ANA pozitif olan SjS hastaları, ANA negatif olanlara göre daha yüksek prevalansta adenopati, Raynaud fenomeni ve kutanöz vaskülitte sahiptir⁵⁹.

Anti-Ro/SSA ve anti-La/SSB antikoları: Bu otoantikörlara sahip olan hastalarda adenopati, periferik nöropati, kutanöz vaskülit, Raynaud fenomeni ve annular eritema daha fazla gözlenmektedir⁵⁹. Ancak, fotosensivite sistemik lupus eritematosus (SLE) hastalarının tersine SjS hastalarında oldukça nadirdir.

Anti- sentromer antikolar: Bu antikörlar sistemik sklerozis olmaksızın bazı SjS hastalarında görülebilmektedir. Bu antikörlara sahip hastalarda Raynaud fenomeni ve telenjiektazi sıklığında artış bulunmaktadır.

Anti-asetilkolin reseptör: Bazı hastalarda bu antikörlar nöroglandüler iletimi engelleyerek sıkka semptomlarına yol açabilmektedir. Ancak bu antikörların primer veya sekonder hastalığa ait olup olmadığı net değildir^{60,61}.

Anti-alfa-fodrin: Aktin bağlayan bir protein olan alfa fodrine karşı gelişen antikörların SjS patogenezinde rolü henüz bulunamamıştır. Ancak bu antikörların bulunuşu, SSA ve SSB'ye göre SjS için daha yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahiptir^{62,63}.

Adacık hücre otoantijeni: Adacık hücre otoantijeni [Islet-cell autoantigen 69 (ICA69)] tükürük bezi ve gözyaşı bezi ile pankreatik beta hücreler ve sinir sistemi dokusunda bulunmaktadır. ICA69'a karşı oluşturulmuş otoantikörlar SjS'de tanımlanmış olsa da patogenezdaki rolü henüz tanımlanamamıştır^{64,65}.

Anti-Sıçan parotid antijen: Bir grup SjS hastasının serumunda Sıçan parotid antijeni (SP-1) gibi sıçan parotid bezine karşı reaksiyon veren proteinler saptanmıştır⁶⁶.

2.1.7. Klinik özellikler

SjS klinik manifestasyonları ekzokrin bez ve bez dışı (ekstraglanduler) hastalık özellikleri olmak üzere ikiye ayrılır ⁶⁷.

2.1.7.1. Dış Salgı Bezi Tutulumu:

Dış salgı bezi tutulumunun en temel bulguları kuru göz (keratokonjunktivitis sikka) ve kuru ağızdır (kserostomi). Ancak aşağıdaki diğer bulgular da gözlenebilir:

- Keratokonjunktivitis sikka (KKS) SjS ilişkili göz kuruluşunda (kseroftalminin yerine) daha çok tercih edilen terimdir. Kuru göz semptomları irritasyon, göze kum batması ve gözde yabancı cisim hissidir.

- Kserostomi, kuru gıdalarla, özellikle krakerlerle, sıvı olmadan yutma gücünü yaşanmasına yol açar. Ağız kuruluşu artmış oranda diş çürükleri ve periodontal hastalıklarla ilişkilidir. Ayrıca azalmış tat duyusu ve ağız florasında değişiklikler (özellikle oral kandidada artış) gözlenebilir ⁶⁸.

- Tükürük bezi genişlemesi: Parotis, submandibular ve diğer tükürük bezleri SjS'nda hipertrofiye gidebilir.

- Diğerleri: Cilt ve üst solunum yollarının tutulumu cilt kuruluşu, nonspesifik öksürük ve başka bulgulara yol açabilir ⁶⁹. Vajinal kuruluk dispareni ile ilişkili olabilir⁷⁰.

- Lenfoma: SjS'unun en ciddi komplikasyonlarından biri olup hastaların %5-10'unda gelişir⁷¹. Aynı yaştaki sağlıklı popülasyonla karşılaştırıldığında lenfoma riskinde 16 ile 44 kat arasında artış olduğu gösterilmiştir^{72,73}. Tümörler ekzokrin bezlerden, lenf nodlarından veya mukoza ilişkili lenfoid dokulardan kaynaklanabilir. Lenfoma ile ilişkili olabileceği düşünülen faktörler aşağıda belirtilmiştir:

- 1) Tek taraflı olan ısrarcı glandüler şişlik (özellikle de bir önceki şişlik geçici veya aralıklı ise)

- 2) Sert ve nodüler yapıdaki bez

- 3) Kutanöz vaskülit veya palpable purpura varlığı
- 4) Hipokomplementemi
- 5) Konstitüsyonel semptomlar (halsizlik, kilo kaybı, ateş)

2.1.7.2. Ekstraglanduler Organ Tutulumu

Dış salgı bezlerine ilaveten, birçok organ SjS hastalarında tutulabilir⁶⁷. Tipik olan fakat çok sık olmayan tanısal hastalık manifestasyonları, aşağıda sıralanan organlarda bulunabilir⁵⁹.

1) Cilt: Kuruluk, Raynaud fenomeni, kutanöz vaskülit, annular eritem, eritema nodosum, livedo retikularis, vitiligo, kutanöz amiloidoz, granuloma annulare, angular keilitis, liken planus^{67,74}.

2) Eklem ve kaslar: Artrit, artralji, proksimal kas güçsüzlüğü⁷⁵.

3) Tiroid bezi: Otoimmün tiroidit, tiroid otoantikör pozitifliği^{76,77}.

4) Akciğerler: İnterstisyel akciğer hastalığı, bronşiolit^{78,79}.

5) Kalp: Akut perikardit, sol ventrikül hipokinezi⁸⁰.

6) Gastrointestinal sistem: Disfaji, özofageal dismotilite, bulantı, epigastrik ağrı, dispepsi, atrofik gastrit, aklorhidri, pernisiyöz anemi, çölyak hastalığı⁸¹⁻⁸³.

7) Karaciğer: Yükselmiş karaciğer enzimleri, primer biliyer siroz, kronik aktif hepatit, idiyopatik nonsirotik portal hipertansiyon^{70,84}.

8) Böbrekler: İnterstisyel nefrit, renal tübüler disfonksiyon, renal tübüler asidoz, glomerüler hastalıklar⁸⁵.

9) Mesane: Dizüri, sık işeme, noktüri, acil tuvalet ihtiyacı, interstisyel sistit⁸⁵.

10) Pankreas: Otoimmün sklerozan pankreatit⁸⁶.

11) Periferik sinir sistemi: Periferik nöropati, duysal ataksi, yaygın arefleksi, ağrılı duysal nöropati, saf duysal trigeminal nöropati,

mononöritis multipleks, multiple kranyal nöropati, radikülönöropati, otonom nöropati ^{87,88}.

12) Santral sinir sistemi: Motor veya duysal kayba, nöbete veya serebral sendromlara yol açabilen fokal santral lezyonlar, ensefalopati veya psikiyatrik anormalliklere yol açabilen diffüz beyin lezyonları, demans, multiple skleroz benzeri durumlar, serebral beyaz cevher lezyonları, akut transvers miyelopati, progresif miyelopati, nöromiyelitis optika, subakut aseptik menenjit, korea, optik nörit ⁸⁹⁻⁹³.

13) Psikiyatrik: Halsizlik, fibromiyalji, depresyon, kişilik bozuklukları ^{94,95}.

14) Lenf nodu ve kemik iliği: Lenfoma (diffüz büyük B hücreli lenfoma, foliküler hücreli lenfoma, MALToma), psödolenfoma ⁹⁶.

2.2. PROGRESİF SİSTEMİK SKLEROZ

Sistemik skleroz (SSc); başlıca bulguları yaygın fibrosis, vasküler değişiklikler ve çeşitli hücresele antijenlere karşı otoantikör gelişimi olan kompleks bir hastalıktır. Hastalığın en yaygın kabul görülen sınıflandırmalarında üç alt grup yer alır: sınırlı SSc, diffüz SSc ve sine skleroderma ⁹⁷.

Sınırlı SSc'da fibrosis büyük ölçüde el, kol ve yüze sınırlıdır. Raynaud fenomeni fibrozun ortaya çıkışından birkaç yıl önce ortaya çıkar. Pulmoner hipertansiyon sıktır. Antisentromer antikorlar hastaların %50-90'ında bulunur ⁹⁷.

Diffüz SSc, hızla ilerleyerek ciltte geniş alanları ilgilendirir ve bir veya daha fazla iç organda tutulum tipiktir ⁹⁷.

Nadir olarak bazı hastalarda belirgin bir cilt tutulumu görülmez ve bunlar sine SSc olarak sınıflandırılırlar ⁹⁷.

2.2.1. Epidemiyoloji

SSc genellikle 35-55 yaşları arasında görülür, çocuklar ve 35 yaş altı erkeklerde oldukça seyrek. SSc prevalansı %0,007-%0,489, insidansı 0,6-122/milyon olarak bildirilmiştir. SSc Afro-Amerikalılarda beyazlara göre hafifçe daha yüksek sıklıkta bildirilmiştir⁹⁸ ve kadınlarda daha fazla görülmektedir. Kadın/erkek oranı 3/1 ile 8/1 arasında bulunmuştur⁹⁹.

Sınırlı SSc sıklıkla 20-40 yaş arasında görülür. Ancak lineer alt tip çocuklarda daha sıktır. Yine bu alt tipte kadın/erkek oranı benzerdir. Sınırlı SSc insidansı bir tek çalışmada Minnesota-Olmsted County'de 27/1 milyon saptanmış ve kadın/erkek oranı 2.6/1 olarak bulunmuştur¹⁰⁰.

2.2.2. Genetik

İmmün sistem ve inflamatuvar yanıtı düzenleyen birkaç gende tek nükleotid polimorfizmi (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs) varlığı ile SSc arasında ilişki gösterilmiştir. Bunlar içerisinde en dikkat çekici olanı tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) promotör bölgesindeki bir polimorfizmin SSc'de daha sık bulunmuş olmasıdır¹⁰¹. Ayrıca aynı SNP'nin anti-sentromer antikoru pozitifliği ile daha sıkı ilişkisi saptanmıştır.

Mikrokimerizmin SSc gelişiminde olası bir faktör olabileceği yönünde bulgular elde olunmuştur. Bir çalışmada en az bir erkek çocuğu doğurmuş olan kadın SSc hastalarında, kontrollere göre yüksek konsantrasyonda erkek deoksiribonükleotid asiti (DNA) tespit edilmiştir¹⁰². Diğer çalışmalarda daha yüksek oranda DNA varlığının, fetal hücrelerin reddini engelleyecek şekilde, HLA uyumu ile korelasyonu gösterilmiştir. Fetal hücrelerin, hastalığın başlamasındaki rolü hala bilinmemektedir.

Serolojik tetkikler ile yapılan HLA çalışmalarında, HLA-A1, HLA-B8 ve HLA-DR3 veya HLA-DR3/DR52 haplotipleri ile hastalığın bağlantılı olabileceği düşünülmüştür¹⁰³. DNA düzeyinde MHC analizi yapıldığında, C4AQ0 ve DQA2 ile güçlü ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sınıf II MHC alleleri ile serolojik ve klinik olarak tanımlanmış hastalık

arasında güçlü ilişki vardır¹⁰⁴. Murin *tight skin* fare modeli (*tskl* fare modeli) bölgesindeki 15q homolog kromozomu üzerinde yer alan multilokal 2-cM haplotipi Choctaw'da SSc ile ilişkili bulunmuştur¹⁰⁵.

2.2.3. Çevresel faktörler

Bazı enfeksiyöz ve çevresel ajanların SSc'un gelişiminin tetikleyebileceği ileri sürülmüştür. *Parvovirus B19*¹⁰⁶, *CMV*, *Borrelia burgdorferi*¹⁰⁷ enfeksiyonlarının hastalıkta rolü olabileceği iddia edilmişse de etkileri henüz kesinlik kazanmamıştır. Birkaç vaka-kontrol çalışması ve olgu sunumlarında çeşitli organik solventler, vinil klorid ve silika tozunun, bazı kişilerde SSc benzeri hastalığı tetikleyebilecek potansiyel ajanlar oldukları saptanmıştır¹⁰⁸. Ancak bu maddelerin hastalık yatkınlığındaki kesin rolünün ortaya konulabilmesi için daha büyük ve özenli epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.2.4. Fibrosis

Doku tamir sürecinde ekstrasellüler sinyalin etkisiyle fibroblast veya diğer projenitör hücreler, myofibroblastlara farklılaşarak; kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin sentezi, bağ dokunun yapışma ve kontraksiyonu, büyüme faktörlerinin sekresyonu ile tüm bu ligandlar için reseptörlerin hücre yüzey ekspresyonu indüklenir. Fizyolojik koşullarda tamir programı sıkı kontrol altındadır ve kendini sınırlar. Patolojik fibrosis ise sürekli ve artmış fibroblast aktivasyonu ile karakterizedir ve bu da ECM'in aşırı birikimi ve yeniden şekillendirilmesi (*remodeling*) ile sonuçlanır.

Fibrosis, normal doku mimarisinin yoğun bağ dokuya dönüşümü ile karakterizedir. ECM hücresel kompartman (sirkülasyondan kaynaklanan infiltratif hücreler, dokuya yerleşik hücreler), büyük veya küçük yapısal moleküllerden (kollajen, proteoglikan, elastin, fibrillin ve adezyon molekülleri) oluşmaktadır¹⁰⁹.

2.2.4.1. Erken vasküler ve inflamatuvar değişiklikler

Sistemik skleroz erken dönemde dokuda görülen değişiklikler; erken mikrovasküler hasarlanma, mononükleer hücre infiltrasyonu ve yavaş gelişen fibrosistir. Geç dönemde ise ana bulgu dermiste yoğun bir şekilde paketlenmiş kollajen ile birlikte hücrelerin ortadan kaybı ve atrofidir¹¹⁰.

Sistemik sklerozda vasküler hasarlanma erken dönem lezyonudur. Özellikle arteriyol olmak üzere küçük damarları ilgilendirir ve hemen tüm organlarda görülür¹¹⁰. Bu dönemde endotel dōşeyici tabaka değişiklikleri, perivasküler infiltratlar ve tıkayıcı mikrovasküler lezyonlar görülebilir. Geç dönemlerde kan damarlarının belirgin şekilde seyrelmesi tipiktir^{111,112}. Kan damarlarının ilerleyici azalması ve hipoksiye yanıt olarak plazma vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) düzeyleri yüksek olmasına rağmen damar oluşumu defektiftir¹¹³ ve bu paradoksun mekanizması bilinmemektedir.

Zaman içerisinde SSc vasküler inflamasyon, fibrosisle yavaşça yer değiştirir ve etkilenen organların mimarisi bozulur. Bu durum hastalığın ana belirti ve bulgularına yol açar. Ciltte fibrosis alt dermis ve üst subkutan tabakada başlar, bağ doku kaybı ile birlikte deri ekleri, retiküler yapılar, çizgilenmeler azalır. Erken dönemde değişik kollajen tipleri, proteoglikanlar ve fibrillin dahil elastik lifler tipik iken geç dönemde temel birikim tip I kollajendir.

2.2.4.2. Sistemik Skleroz ve TGF-β

TGF-β güçlü bir profibrotik sitokindir¹¹⁴. SSc'lu hastaların cilt lezyonlarından elde edilen biyopsi örneklerinde, DNA mikrodizin (*microarray*) analizleri ile TGF-β bağımlı bir grup genin aşırı ekspresyonu saptanmıştır. TGF-β aynı zamanda myofibroblastların en güçlü uyarandır ve TGF-β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF) reseptörleri dahil çeşitli sitokin reseptörlerinin ekspresyonunu düzenler^{115,116}.

Ayrıca SSc fibroblastlarında TGF- β , CYR61-CTGF-NOV ailesi (*cysteine-rich protein 61, connective tissue growth factor ve nephroblastoma overexpressed protein* ailesi [CCN ailesi]) büyüme faktörlerinden birisi olan ve sisteinden zengin bir modüler protein olan konnektif doku büyüme faktörünü (CTGF) de upregüle eder. Bu madde TGF- β 'ya benzer biyolojik aktiviteye sahiptir¹¹⁷. SSc lezyonlarında artmış TGF- β ve CTGF ekspresyonu tespit edilmiştir ve fare modellerinde, fibroblastlardaki artmış TGF- β sinyalizasyonunun, cilt fibrosisine neden olduğu gösterilmiştir¹¹⁸.

Skleroderma hücrelerinde TGF- β sinyalizasyon yolağının daha alt kesimlerinde *Suppressor of mothers against decapentaplegic* (SMAD) bağımlı ve bağımsız iletiler yoğun şekilde araştırılmıştır. PKC delta, geranil transferaz 1 ve stres ile aktive olan protein kinaz p38 inhibisyonu SSc hücrelerinde kollajen I ve III ekspresyonunu elimine etmektedir. İnaktif prekürsör olarak üretilen TGF- β , $\alpha_v \beta_3$ integrin ve trombospondin tarafından aktive edilir ve bu durum sitokinler, ECM ve integrinler arasındaki etkileşimin iyi bir örneğidir ve tüm bu moleküllerin SSc'da ekspresyonu indüklenmiştir¹¹⁰.

2.2.4.3. Otoantikörler

SSc hastalarında çeşitli otoantikörlerin varlığı bildirilmiştir. Bazı otoantikörler, SSc'da hastalık şiddeti ve belli organ tutulumları ile korele bulunmuş olmasına karşın patojenik bağlantıları açık değildir. Yakın dönemde, hücre yüzey antijenleri dahil, çekirdek dışı antijenlere karşı da otoantikörler tanımlanmıştır. *Platelet-derived growth factor* reseptörüne (PDGFR) karşı olan antikörler spesifik sinyal kaskatını stimüle ettiklerinden agonistik gibi görünmektedir¹¹⁹. PDGFR agonistik aktivitesi ile aynı tipte otoantikörler, sklerodermatöz graft-versus-host hastalıklı (GVHD) hastaların serumlarında kaba immünglobulin şeklinde saptanmıştır ve dirençli sklerodermatöz GVHD'da PDGFR sinyalizasyon inhibitörlerinin yararlı etki gösterdikleri bildirilmiştir¹²⁰.

SSc'un patogenezi henüz net olarak açıklanabilmiş değildir. Birçok gen Rat sarkoma virüs geni proteini (RAS), TGF- β ve reaktif oksijen türleri tarafından uyarılır. Bunun yanında tirozin kinaz reseptörleri ile TGF- β , CTGF reseptörleri arasında amplifikasyon halkası oluşumu gösterilmiştir. Bütün bu olaylar fibroblastları aktive edebilir¹¹⁰.

2.2.5. Klinik özellikler

2.2.5.1. Kutanöz bulgular

Cilt tutulumu SSc'un evrensel bir bulgusu olup değişken boyut ve ciddiyette cilt kalınlaşması ve sertleşmesi şeklindedir. Parmaklar, eller ve yüz genellikle ilk etkilenen yerlerdir. Ödematöz şişlik ve eritem cilt sertleşmesine eşlik edebilir. Diğer cilt bulguları:

- Erken dönemde kaşıntı ve ödem
- Cilt hiperpigmentasyonu veya depigmentasyonu (tuz-biber)
- Ekstremitelerde kıl kaybı
- Sklerodaktili
- Dijital ülserler
- Parmak uçlarında *pitting* skarlar
- Telenjektaziler
- Kalsinozis kutis

Sınırlı kutanöz SSc'u olan hastalarda cilt tutulumu eller, ön kol ve daha az olarak yüz ve boyna sınırlıdır. Bu hastalarda genellikle Raynaud fenomeni ve kutanöz telenjektazi gibi vasküler bulgular ön plandadır. Bu hastalarda CREST sendromu (kalsinozis kutis, Raynaud fenomeni, özofageal dismotilite, sklerodaktili, telenjektazi) daha sık görülür.

Diffüz kutanöz SSc olan hastalarda göğüs, abdomen, kol ve omuzlarda da cilt tutulumu görülür. Bu hastalar iskemik hasar veya

fibrosise bağlı belirgin iç organ tutulumuna sınırlı tip SSc hastalarına göre daha yatkındır.

2.2.5.2. Ekstrakutanz bulgular

1) Eklem ve kaslar: Yaygın artralji ve sabah katılığı, tendinit, kullanılmamaya bağlı kas güçsüz lüğü, kronik dijital iskemi, dijital *tuft* erozyonu, akro-osteoliz, eroziv artropati^{121,122}.

2) Ağız ve dişler: Kserostomi, dudak çevresinde vertikal izgilenmede artma, ağız açıklığında azalma, dudaklarda incelme ve retraksiyon, , diş çürükleri, periodontal hastalıklar, periodontal ligaman yüzeyinde genişleme, kemik rezorbsiyonu, diş kökü rezorbsiyonu, mandibular kemikte erozyon¹²³⁻¹²⁶.

3) Gastrointestinal sistem: Altzofagus sfinkter bozukluğu, dispepsi, fonksiyonel gastrik çıkış obstrkiyonu, akut gastrik dilatasyon, gastrik antral venöz ektazi ve buna bağlı GİS kanaması,özofagus motilite bozukluğu, ince barsak tutulumu ile kronik diyare, intestinal obstrüksiyon ve malabsorbsiyon, kolon tutulumlarında konstipasyon, psödoobstrüksiyon ve geniş ağızlı divertikül.

4) Akciğerler:yk ve fizik muayenede efor kapasitesinde kısıtlanma, nonproduktifksrk, inspiratuar ince raller, S2 pulmoner komponentinin duyulması, sağ ventrikül gallop ritmi, pulmoner ve triküspit yetmezlikfrmleri, juguler venöz dolgunluk, hepatojuguler reflü, hepatopedaldem saptanabilir. Ekokardiyografi ile pulmoner hipertansiyon, pulmoner ve triküspit yetmezliği gösterilebilir. Radyolojik incelemeler ile interstisyel akciğer hastalığı gösterilirken solunum fonksiyon testlerinde vital kapasitede azalma, azalmış kompliyan ve zorlu ekspiratuvar hacmin vital kapasiteye oranının artması, difüzyon kapasitesinde azalma saptanabilir.

5) Kalp: Atrial veya ventriküler aritmiler, iletim bozuklukları.

6) Böbrekler: Ani başlangıçlı hızlı seyirli malin hipertansiyon (skleroderma renal kriz” sendromu), hızlı ilerleyen böbrek yetmezliği, hiperreninemi, mikroanjiopatik hemoliz bulguları.

7) Periferik sinir sistemi: Karpal tünel sendromu, meraljiya parestetika, trigeminal nevralji, fasyal sinir paralizisi, subklinik otonomik disfonksiyon görülebilecek bulgular arasındadır.

2.2.6. Serolojik özellikler

SSc hastalarının yaklaşık %95’inde en az 1 antijene karşı oluşmuş otoantikör bulunur. Bunlar:

- Anti topoizomeraz I (Scl-70): Topoizomeraz I’e karşı oluşmuştur ve %20-45 sıklıkta görülür¹¹⁴. Duyarlılığı düşüktür ancak SSc için özgüllüğü %98-100 kadardır ve interstisyel akciğer hastalığı ile belirgin korelasyon gösterir¹²⁷.

- Anti sentromer antikörleri: Sınırlı tip SSc ile ilişkilidir ve %12-44 sıklıkta görülürler¹¹⁴. Diffüz tip SSc hastalarının yalnızca %5’inde bulunur.

- Anti RNA polimeraz III: genellikle diffüz SSc hastalarında bulunur. Skleroderma renal krizi ve hızlı ilerleyici cilt tutulumu ile ilişkilidir. Ayrıca bu antikora sahip hastalar malignite açısından artmış risk altındadır.

- Anti-fibrillarin,
- Polimiyozit-skleroderma antikoru (Anti PM-Scl) (genellikle polimiyozit ile çakışma durumunda görülür),

- Anti fibrillin-1¹¹⁵,

- Antinukleolar antikör,

- Anti-Th/To,

- Anti-Ku,

- Antifosfolipid antikorlar,
- Smith antikoru (Anti-Sm),
- Anti ribonükleoprotein (Anti-RNP),
- Anti-Ro,
- Antinötrofil sitoplazmik antikor (ANCA),
- Anti-U1 RNA,
- Antinukleozom,
- Anti-matriks metalloproteinaz 1 ve 3,
- Anti-endotelyal hücre^{56,105,124,128}.

2.3. mTOR yolağı

2.3.1. Tarihçe

Güney Pasifik Okyanusu'nda Paskalya Adası'nda bulunan ve üzerinde yaşayan yerlilerin dilinde “*Rapa Nui*” olarak adlandırılan *Streptomyces hygroscopicus* isimli bakteri zinciri ilk defa 1970’lerde izole edilmiştir. Bakteri üzerindeki araştırmalarda, bu bakterinin potansiyel yeni bir makrolid grubu antifungal sentezlediği görülmüştür. Bu antifungale, adanın adına ithafen rapamisin adı verilmiştir. Rapamisin üzerinde yapılan araştırmalar, bu ajanın immünsupresif ve antiproliferatif etkilerini göstermiştir. Bugün rapamisin FDA onaylı bir ilaç olarak kemoterapi, organ reddi ve anjioplasti sonrası yeniden tıkanmayı önlemek amaçlı kullanılmaktadır¹²⁹.

Mayaların genetik izleminde iki adet rapamisin hedef geni tespit edilmiş olup “target of rapamycin (TOR)” 1 ve 2 olarak isimlendirilmiştir. Maya genlerindeki bu keşfin ardından ökaryot hücrelerde de inceleme yapılmış ve “mammalian” (memeli) TOR (mTOR) bulunmuştur¹²⁹.

Rapamisinin 1970'lerdeki keşfi ile biyolojik yollar içerisinde çok önemli bir role sahip olan mTOR yolu bulunmuş oldu. Rapamisin keşfinin üzerinden geçen zamana rağmen mTOR yolu halen tam olarak anlaşılabilmiş olmamakla birlikte mTOR'un mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) olmak üzere 2 farklı multiprotein kompleksinden oluştuğu görülmüştür. Kısaca özetleyecek olursak, mTOR ve *mammalian lethal with Sec13 protein 8* (mLST8 veya diğer adıyla GβL) her iki multiprotein kompleksi içerisinde yer alan ortak moleküller olup mTORC1 içerisinde ek olarak *Regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor) proteini, mTORC2 içerisinde ise *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor) proteini bulunmaktadır.

2.3.2. mTOR multiprotein kompleksleri ve yapısal özellikleri

mTOR, 290 kilo Dalton (kDa) ağırlığında bir atipik serin/treonin protein kinaz olup fosfatidil inozitol kinaz ilişkili kinaz (PIKK) ailesine mensuptur¹²⁹. Yapısal olarak 20 ardışık *Huntingtin*, *elongation factor 3* (*EF3*), *protein phosphatase 2A* (*PP2A*) ve *the yeast kinase TOR1* (*HEAT*) proteininden oluşur¹³⁰. Amino uç bölgesini *FAT* (tümü PIKK aile üyesi olan FK506 bağlayan protein 12- rapamisin ilişkili protein [*FRAP*], *Ataxia telangiectasia mutated* [*ATM*], *Transformation/transcription domain-associated protein* [*TRAPP*]) takip eder. Kinaz alanı, FKBP12/rapamisin binding (*FRB*) ile *FAT* C- terminus (*FATC*) arasında olup proteinin C-terminal kısmındadır. *FRB*, *FAT* ve *FATC* alanları, mTOR kinaz aktivitesinden sorumludur.

mTORC1

mTORC1 5 kısımdan oluşur¹³¹:

- 1) mTOR (kompleksinin katalitik alt birimidir)
- 2) Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*)
- 3) GβL (veya diğer adıyla *mLST8 -mammalian lethal with Sec13 protein 8*)

4) PRAS40 (*prolinerich AKT substrate 40 kDa*)

5) Deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*)

mTOR ile ilişkili pek çok molekülün kesin işlevi hala net değildir. Raptorun mTOR substratlarını toplayıp kompleksi düzenleyerek mTORC1 aktivitesini etkilediği öne sürülmektedir^{132,133}. mLST8 proteininin *in vivo* delesyonu ile mTORC1 işlevi etkilenmediği için mLST8 işlevi henüz belli değildir¹³⁴. PRAS40 ve Deptor mTORC1 için belirgin negatif düzenleyicilerdir^{131,135,136}.

mTORC2

mTORC2, bazıları mTORC1 kompleksinde de yer alan 6 farklı proteinden oluşur¹³¹:

1) mTOR (kompleksin katalitik alt birimidir)

2) Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*)

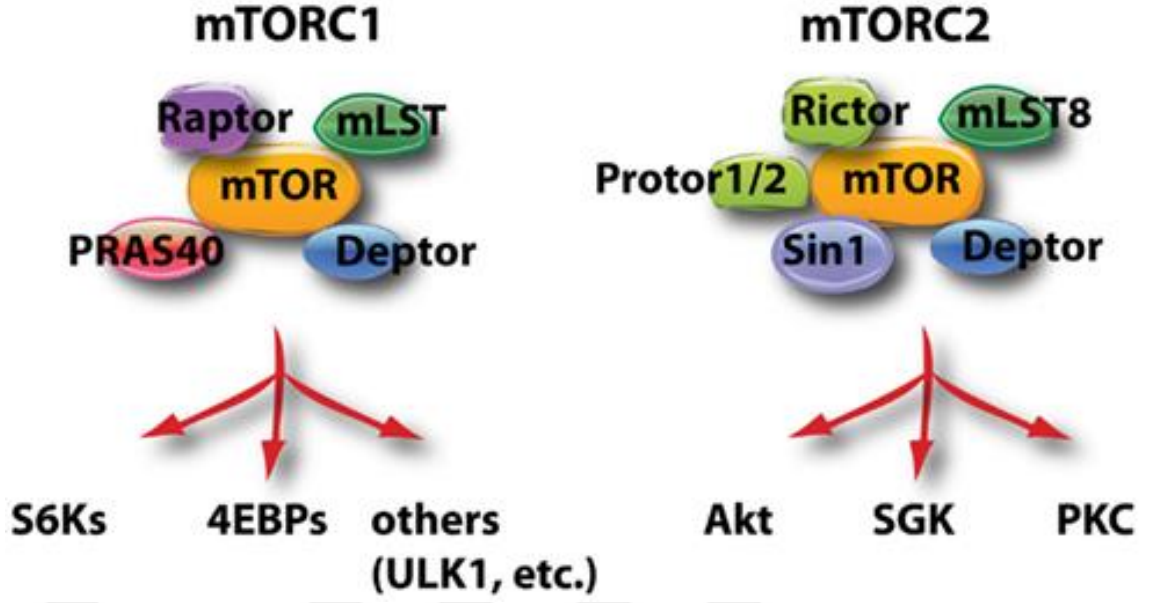
3) GbL (veya diğer adıyla *mLST8 -mammalian lethal with Sec13 protein 8*)

4) mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein*)

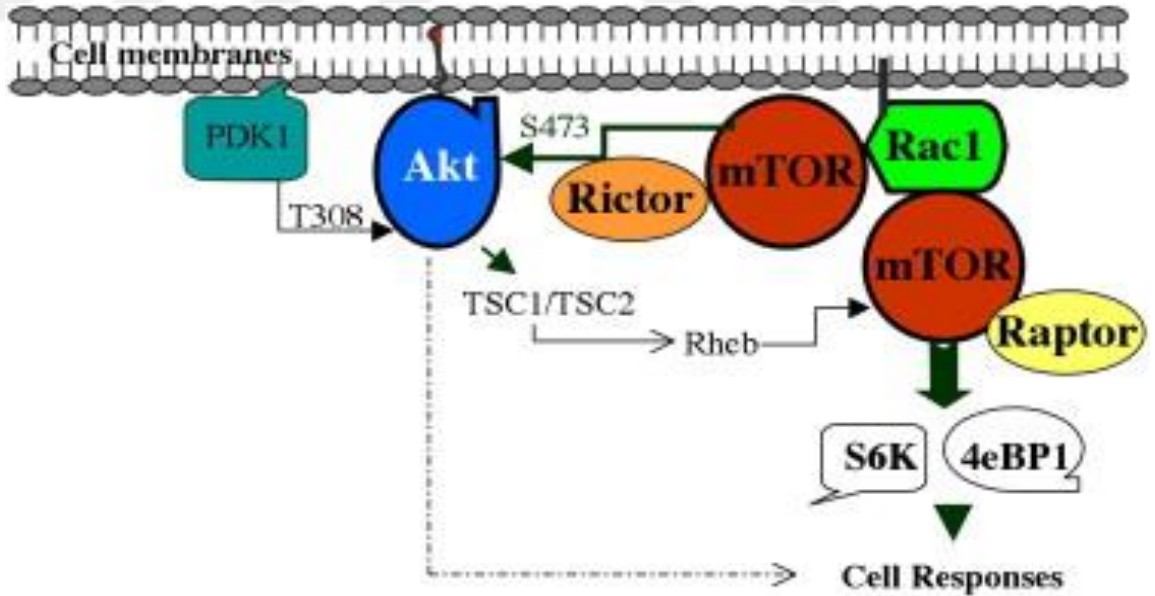
5) Protor-1 (*protein observed with Rictor-1*)

6) Deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*)

Rictor ve mSIN1 moleküllerinin birbirlerini stabilize ederek mTORC2 yapısını kurduğuna dair kanıtlar mevcuttur^{137,138}. mTORC1 içindeki görevine benzer olarak Deptor mTORC2 aktivitesini inhibe eder¹³¹. Son olarak, mLST8 (GbL) mTORC2 işlevi için çok önemlidir. Bu proteinin eksikliğinde kompleks stabilizasyonu bozulur ve kompleksin aktivitesi kaybedilir¹³⁴. Akt hem mTORC1 hem de mTORC2'yi fosforilleyerek aktive ederken, mTORC2 daha sonra Akt'yi fosforilleyerek Akt'nin tam aktivasyon ile çalışmasını katalizler¹³⁹.



Şekil 1: mTOR kompleks 1 ve 2'yi oluşturan yapısal proteinler ve aktive olan mTOR komplekslerinin etkileşime girdiği yollar¹⁴⁰.



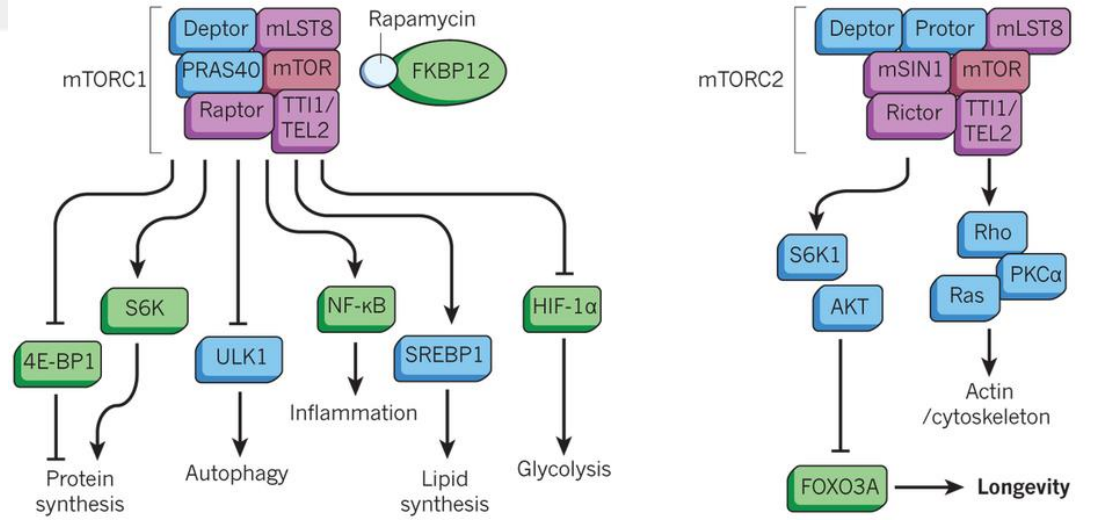
Şekil 2: mTOR komplekslerinin hücre zarı ve etkileşimde oldukları yollarla ilişkisi¹⁴¹.

2.3.3. mTOR kompleksinin fizyolojik işlevleri

mTOR kompleks aktivasyonu ile hücre büyümesi, hücre çoğalması ve hücrenin boyutsal olarak genişlemesi pozitif yönde etkilenir. mTOR bu etkilerini mRNA translasyonu, ribozom biyogenezi, besin metabolizması ve otofaji gibi birkaç yolla yapabilmektedir.

Protein sentezi

mTORC1 hücre büyümesi için gerekli olan protein sentezini çeşitli efektörleri etkileyerek artırır. mTORC1 eIF4E ve bunu bağlayan protein olan *eIF4E binding protein-1* (4E-BP1) ile S6K1 proteinlerini fosforile ederek protein sentezini artırır. 4E-BP1 molekülünün fosforillenmesi bu molekülün eIF4E'ye bağlanmasını önler. Böylece eIF4E şapka bağımlı translasyonu başlatır¹⁴². S6K1 aktivitesinin mTORC1 ile uyarılması mRNA biyogenezinde, şapka bağımlı translasyon ve uzama ile ribozomal proteinlerin translasyonunda artışa yol açar. Bu durum Şekil 3'te şematize edilmiştir.



Şekil 3: mTOR işlevleri ve işlevlerine aracılık eden proteinler¹⁴³. mTORC1 uyarısı ile 4E-BP1, translasyonu başlatacak olan eIF4E'den ayrılır ve böylece şapka bağımlı translasyon başlar. Yine mTOR uyarısı ile S6K1 aktivitesi başlar. Translasyon ve elongasyon ile protein sentezi artmış olur.

Otofaji

Otofaji, hücre içi komponentlerin otofagozomlar içine alınarak lizozomlar aracılığı ile sindirilmesi demektir. Organellerin degradasyonu ve protein döngüsünde önemli bir katabolik süreçtir. Besin yetersizliğinde protein sentezi ve enerji sentezi gibi anabolik olaylar için biyolojik materyal otofaji ile sağlanır. Çalışmalar mTORC1 inhibisyonunun otofajiyi arttırdığını, diğer yandan mTORC1 aktivitesinin otofajiyi azalttığını göstermiştir¹⁴⁴. mTOR *Unc51-like kinase 1* (ULK1) molekülünü fosforile ederek otofajiyi önlemektedir¹⁴⁵ (Şekil 3).

Lipid sentezi

mTORC1 lipid sentezinde görevli olan *sterol regulatory element binding protein 1* (SREBP1) ve *peroxisome proliferator-activated receptor-γ* (PPAR-γ) moleküllerini pozitif yönde kontrol etmektedir^{146,147}. Bu iki molekül (SREBP1 ve PPAR-γ) lipid ve kolesterol homeostazında görevli proteinlerin kodlandığı genlerin transkripsiyon faktörleridir. mTOR kompleksinin rapamisin ile bloke edilmesi PPAR-γ ve SREBP1 ekspresyonunu ve aktivitesini azaltmaktadır^{146,148}.

Mitokondriyal Metabolizma ve Biyogenez

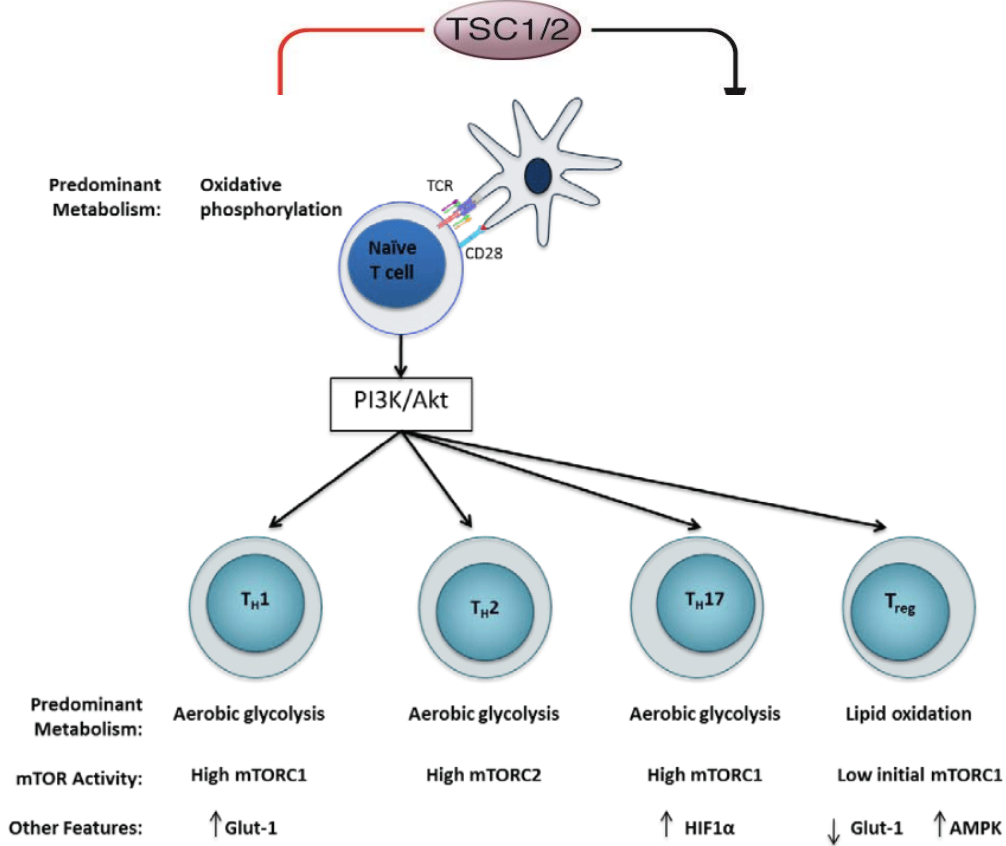
Mitokondriyal metabolizma ve biyogenezin her ikisi de mTORC1 ile kontrol edilmektedir. Rapamisin ile mTORC1 inhibisyonu mitokondriyal membran potansiyelini, oksijen tüketimini ve hücresele adenosin trifosfat (ATP) düzeylerini azaltır¹⁴⁹. Son yapılan çalışmalarda oksidatif metabolizmada yer alan proteinlerin yanında mitokondriyal DNA kopya sayısının rapamisin ile azaldığı ve mTORC1 aktivasyonuna yol açan mutasyonlarla arttığı gösterilmiştir¹⁵⁰. Bunlara ek olarak fare iskelet hücrelerinde Raptorun delesyonu ile mitokondriyal biyogenezi düzenleyen genlerin ekspresyonunda azalma saptanmıştır¹⁵¹.

T Hücre Farklılaşması

T hücrelerinin farklılaşması için başlıca 3 sinyale gerek vardır: T hücre reseptör (TCR) etkileşimi, kostimülatör sinyaller ve sitokinler. Bu

sinyallerin tamamı mTOR duyarlıdır. mTOR aktive olduğunda T hücre sinyal yolları ile etkileşime girerek hücre farklılaşması, çoğalması, sağ kalımı ve metabolizmasını düzenler. T hücrelerindeki mTOR'un fonksiyon kaybı Th1, Th2 ve Th17 hücrelerinin azalmasına ve Treg hücrelerinin artmasına neden olur (Şekil 4). Treg hücreleri organizmanın kendi antijenlerine karşı duyarlı hale gelmesini önleyerek otoimmün hastalıkları önlemektedir. Bu nedenle organ naklinde organ reddini önlemek amaçlı mTOR inhibitörleri kullanılmaktadır. mTOR inhibisyonu ile Treg hücre artışı sağlanırken yardımcı T hücreler baskılanmaktadır¹⁵². Ayrıca mTOR inhibitörü ile naif T hücresi yüzeyinde, Treg hücre yüzeyinde fazla miktarda bulunan FoxP3'ün *de novo* artışı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir ¹⁵². Yine benzer şekilde *in vitro* ortamda TGFβ ve IL2 varlığında, T hücre reseptörlerinin uyarıldığı ve T hücre yüzeyinde FoxP3 artışı olduğu tespit edilmiştir¹⁵³. Şekil 5'te T hücreleri ve başlıca enerji kaynakları gösterilmekte olup yardımcı T hücrelerin fazla enerji gereksinimleri için yüksek mTOR aktivitesine ihtiyaç vardır. Böylece mTOR yalnızca T hücre farklılaşması değil sağ kalımında da önemli rol oynamaktadır.

Şekil 4: mTOR'un T hücre farklılaşması üzerindeki işlevi¹⁵⁴



Şekil 5: T hücreleri ve T hücrelerinin enerji gereksinimleri için gerekli olan yüksek mTOR aktivitesi¹⁵²

B hücreler

PI3K ve mTOR B hücre çoğalması için gerekli olup erken ve geç B hücre reseptörlerini (BCR) mTOR inhibisyonu ile bloke olurlar. Fare B hücrelerinde mTOR inhibisyonu ile S6K1 aktivasyonu ve DNA sentezinin de bloke olduğu gösterilmiştir¹⁵³. B hücrelerinin lipopolisakaride olan duyarlılığı da yine mTOR aracılığıyla olur.

Doğal Öldürücü Hücreler

mTOR inhibisyonu ile sıçan NK hücrelerinde mitoz bölünmenin *Gap-1* (G1) fazından sentez (S) fazına geçişin durması ile hücre çoğalmasının engellendiği gösterilmiştir. Ancak bu durumdan IFN- γ salınımı etkilenmemektedir¹⁵³

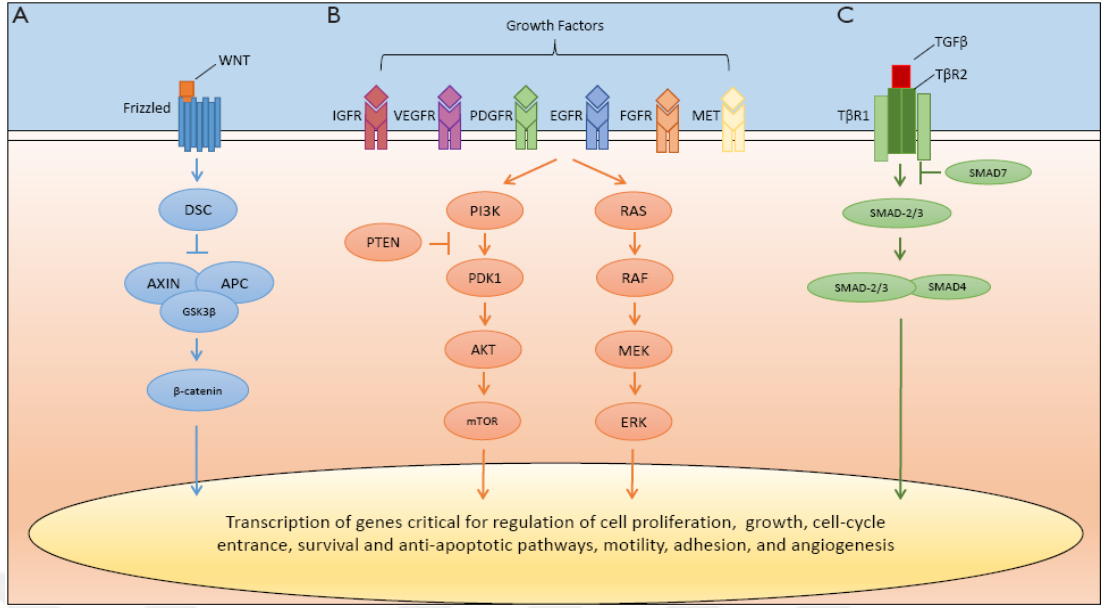
Nötrofiller

mTOR nötrofillerin kemotaksis ve granülosit makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF) ile ortaya çıkan kemokinesisinde görev alır. mTOR inhibisyonu ile kemotaksis, kemokinesis ve IL8'e verilen nötrofil yanıtı azalır. GM-CSF hücre için S6K1 düzeyini arttırarak lökosit migrasyonu için gerekli olan aktin liflerini arttırır¹⁵³. Hücre migrasyonunda görev alan PI3K/Akt/mTOR yolağının oral PI3K inhibitörü ile engellenmesi sonucunda fare romatoid artrit modellerinde eklem inflamasyonu ve hasarının engellendiği gösterilmiştir¹⁵⁵.

2.3.4. mTOR aktivitesini etkileyen mekanizmalar

Büyüme faktörleri:

Büyüme faktörleri, standart insülin ve Ras sinyalizasyon yolları üzerinden mTOR aktivitesini uyarırlar. Bu yolların uyarımı ile tuberokleroz kompleks (TSC)-2 fosforilasyonu artar. TSC2 kompleksinin fosforile olup inaktive olmasıyla mTORC1 aktive olur. Büyüme faktörleri ile Akt aktive olduğunda, direkt PRAS40 molekülünü fosforiller ve mTORC1 aktivasyonuna neden olur^{135,136,156}.



Şekil 6: Çeşitli büyüme faktörleri ve mTOR arasındaki etkileşim¹⁵⁷

Enerji Düzeyi

Hücre enerji düzeyi, AMPK aracılığıyla mTORC1 kompleksine yansıtılır¹⁵⁸. Enerji düzeyinin azalmasına yanıt olarak (düşük ATP:adenozin difosfat [ADP] oranı oluşunca), AMPK aktive olarak mTORC1'in aktivitesinin azalmasına yol açar¹⁵⁹.

Oksijen Düzeyi

Oksijen düzeyleri mTORC1 aktivitesini pek çok yoldan etkileyebilir ve net etki olarak mTOR düzeylerini azaltır¹⁶⁰. Orta düzeyde bir hipoksi oluşması halinde ATP azalarak yukarıda bahsedilen AMPK mekanizması üzerinden mTORC1 aktivitesi baskılanır^{161,162}. Hipoksi ayrıca *DNA damage response 1* (REDD1), promiyelositik lösemi tümör supresör ve *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3) molekülleri aracılığıyla mTORC1 sinyalizasyonunu azaltır¹⁶³⁻¹⁶⁵.

Aminoasitler

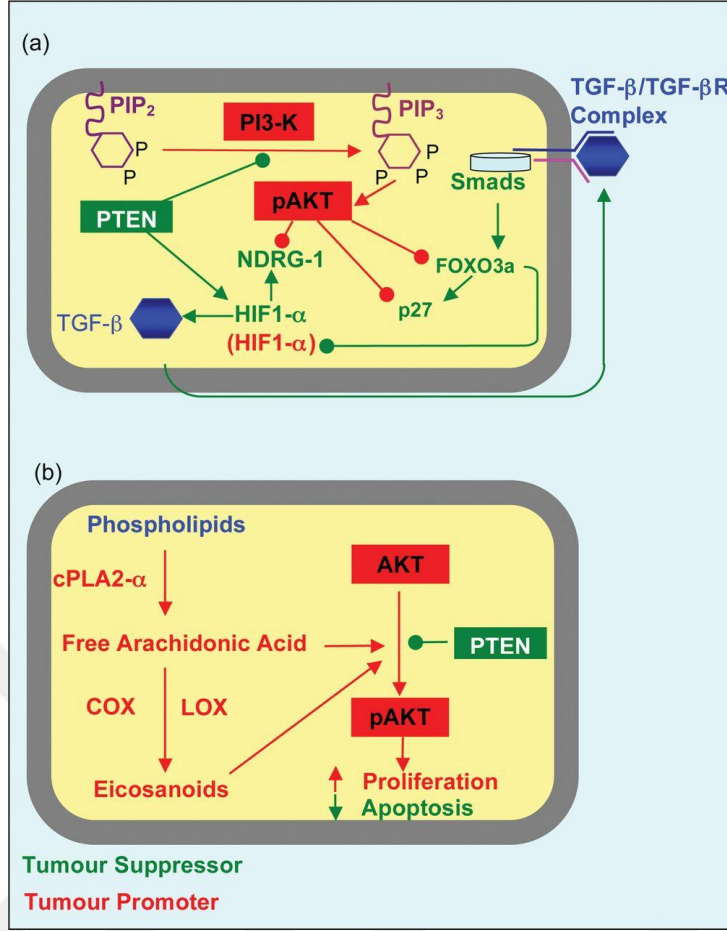
Aminoasitler mTORC1'i kuvvetli olarak uyaran sinyaller sunarlar¹⁶⁶. mTORC1 aktivasyonu için bir esansiyel aminoasit olan lösin gereklidir ve hücre içine glutamin aracılıklı bir yol ile alınır¹⁶⁷.

Aminoasit varlığında rekombinasyon aktive edici protein (RAG proteini) Raptor'a bağlanır ve mTORC1 aktivatörü olan Rheb proteinine bağlanmasını sağlar¹⁶⁸. Bu nedenle aminoasit yokluğunda büyüme faktörleri olsa bile mTORC1 yolağı aktive olamamaktadır¹⁶⁸.

PTEN

PTEN ise Akt/mTOR yolağının negatif düzenleyicisidir¹⁶⁹. PTEN Akt'nin fosforile olmasını engelleyerek mTOR kompleksinin aktive olmasını inhibe eder¹⁷⁰ (Şekil 7). PTEN'in bu etkisine karşılık araşidonik asit ise Akt fosforilasyonunu arttırarak mTOR'u aktive eder. PTEN düzeyinin hücre içinde düşüşü ile PI3K/Akt/mTOR yolağı aktive olarak hücre proliferasyonu, sağ kalımı, hücre adezyon ve migrasyonu ile angiogenesis artmaktadır¹⁷⁰.

PTEN'in mTOR üzerindeki bu negatif etkisinin yanında immün sistemde mTOR ile benzer etkileri bulunmaktadır. Nötrofil migrasyonu PI3K/Akt/mTOR ve PTEN'den oluşan 2 farklı yolak aracılığıyla olmaktadır¹⁷¹. PTEN delesyonu olan hücrelerin migrasyonu yeteneği kaybolmuş olup bakteriyel kemoatraktanlara yeterli yanıt verilemez¹⁷¹. Bu nedenle PTEN otoimmün artritlerde araştırılmış olup PTEN delesyonu olan antijen sunucu hücrelere sahip fare modellerinde kollajen ile indüklenmiş artrit neredeyse tamamen önlendiği, IL23 ve IL6 gibi sitokinlerin antijen sunan hücreler tarafından üretilme kapasitelerinin azaldığı gösterilmiştir¹⁷².



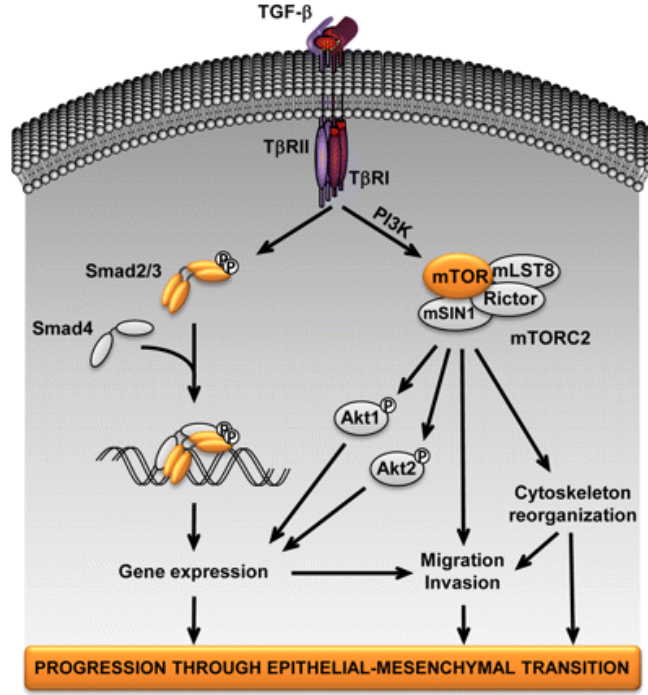
Şekil 7: PTEN ve PI3K/Akt/mTOR yoluğları arasındaki ilişki¹⁷⁰

TGF-β

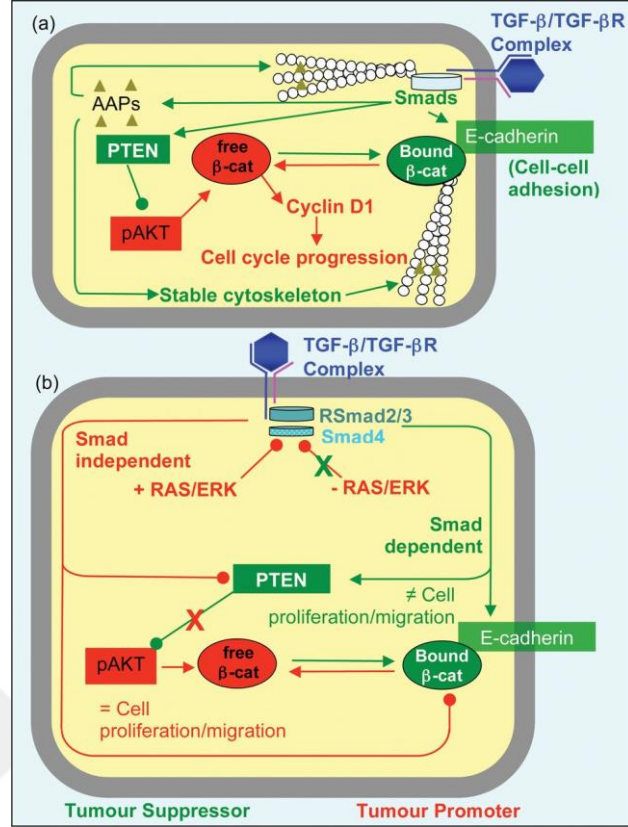
TGF-β reseptörünün uyarılması hem PI3K hem de SMAD üzerinden hücre içi yolları aktive eder^{173,174} (Şekil 8). PI3K molekülünün TGF-β reseptörü ile fosforile olması Akt, mTOR ve S6K1'i aktive eder^{173,174}. Bu durum S6 kinaz aktivasyonu ve translasyon artışı ile devam eder¹⁷³. Sonuçta protein sentezi artışı ve hücre migrasyonunda artış meydana gelir.

TGF-β'nin PTEN molekülünü hem arttırma hem de baskılama yönünde etkilediğı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu etkisi Ras/*Extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) yoluğının durumuna göre

değişiklik göstermektedir. Ras/ERK yolağı aktive olduğunda, SMAD4 bağımsız sinyal yolağı üzerinden TGF- β 'nın PTEN üzerine baskılayıcı etkisi görülmektedir. Ancak Ras/ERK yolağı inaktive edildiğinde TGF- β klasik SMAD bağımlı yolaktan PTEN molekülünün ekspresyonunu arttırmaktadır¹⁷⁰ (Şekil 9).



Şekil 8: TGF- β reseptörünün uyarılması ile mTOR arasındaki etkileşim¹⁷⁵



Şekil 9: TGF- β 'nin Ras/ERK yolağı üzerinden PTEN düzeylerine hem pozitif hem de negatif yöndeki etkisi¹⁷⁰

Diğer hücresel durumlar ve sinyaller

Yukarıda bahsedilenlerin dışında genotoksik stres faktörleri, inflamasyon, *Wingless-Type Integration Site* (WNT) ligandı ve p53 de mTORC1 aktivitesini düzenlemektedir. Örneğin DNA hasarı sonrası aktive olan p53, TSC2'yi aktifler ve böylece indirekt olarak mTORC1 aktivitesini inhibe eder¹⁷⁶.

TNF α , aktive I κ B kinaz β (IKK β) gibi proinflamatuvar sitokinler fiziksel olarak TSC1 ile temas ederek onu inhibe ederler. Bu da mTORC1 aktivasyonuna yol açar¹⁷⁷. İnflamasyon ve mTORC1 arasındaki bu pozitif ilişkinin tümör anjiyogenezinde ve insülin direnci gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir¹⁷⁷.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve veri seçimi

SSc veya SjS tanıları olan ve Ocak 2007- Aralık 2015 tarihleri arasında polikliniğimize başvuran hastaların verileri retrospektif olarak hastane bilgi sisteminden tarandı. Hastalar 3 gruba ayrıldı:

- 1) SSc hastaları,
- 2) SjS hastaları,
- 3) SSc ve SjS çakışma sendromu olan hastalar.

Hastaların aşağıda belirtilen demografik, klinik, patolojik ve laboratuvar özellikleri ile sikka semptomuna yol açabileceğinden diyabetes mellitus varlığı kaydedildi:

- Ad, soyad
- Protokol numarası
- Yaş
- Cinsiyet
- Hastalık tanısı ve tanı tarihi
- Hastalık süresi
- Sistemik skleroz alt tipi
- Serum antikor pozitiflikleri ve dilüsyonları
- Schirmer ve *break-up time* (BUT) testlerinin sonuçları
- Sikka semptomları
- Diyabetes mellitus varlığı

SjS hastalarının çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Amerikan Romatoloji Derneği (*American College of Rheumatology*, ACR) 2012 Sjögren Sendromu Sınıflandırma Kriterlerini karşılayan,
2. 18 yaş üstü,
3. Primer SjS ve hastanemizde yapılmış minör tükürük bezi biyopsisi olan,
4. Bilgisayar sistemimizde sağlık kayıtlarına ulaşılabilen hastalar çalışmaya dahil edildiler.

SjS hastalarını çalışma dışı bırakma kriterleri:

1. Hastanemizde yapılmış minör tükürük bezi biyopsisi olmayan,
2. 18 yaş altı,
3. Sistemik skleroz dışı romatolojik hastalıklara sekonder SjS olan,
4. Sağlık kayıtları eksik olan hastalar
5. Daha önce herhangi bir nedenle mTOR inhibitörü ile tedavi edilmiş hastalar çalışma dışı bırakıldılar.

SSc hastalarının çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. ACR/*European League Against Rheumatism* (EULAR) 2013 Sistemik Skleroz Sınıflandırma Kriterlerine uyan,
2. Sikka semptomlarından en az birine sahip,
3. 18 yaş üstü,
4. Hastanemizde minör tükürük bezi biyopsisi yapılmış olan,
5. Bilgisayar sistemimizde sağlık kayıtlarına ulaşılabilen hastalar çalışmaya dahiledildiler.

SSc hastalarının çalışma dışı bırakılma kriterleri:

1. 18 yaş altı olan,
2. Bilgisayar sistemimizde sağlık kayıtlarında eksik verisi olan,
3. Hastanemiz dışı bir kurumda patolojik incelemesi olan,
4. Sjögren sendromu dışında bir romatolojik hastalıkla overlap sendromu olan hastalar,
5. Daha önce herhangi bir nedenle mTOR inhibitörü ile tedavi edilmiş hastalar çalışma dışı bırakıldılar.

SjS-SSc çakışma sendromu olan hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Hem ACR/EULAR 2013 Sistemik Skleroz Sınıflandırma Kriterlerine hem de ACR 2012 Sjögren Sendromu Sınıflandırma Kriterlerine uyan ve bu şekilde SSc-SjS çakışma sendromu tanısı alan,
2. Sikka semptomlarından en az birine sahip,
3. 18 yaş üstü,
4. Hastanemizde minör tükürük bezi biyopsisi yapılmış olan,
5. Bilgisayar sistemimizde sağlık kayıtlarına ulaşılabilen hastalar çalışmaya dahil edildiler.

SjS-SSc çakışma sendromu olan hastaların çalışma dışı bırakılma kriterleri:

1. Yukarıda belirtilen tanı kriterlerine uymayan,
2. 18 yaş altı,
3. Sikka semptomu olmayan,
4. Hastanemizde yapılmış minör tükürük bezi biyopsisi olmayan
5. Sağlık kayıtlarında eksik verisi olan,

6. Sistemik skleroz ve sjögren sendromu dışında bir başka romatolojik hastalığı olan,

7. Daha önce herhangi bir nedenle mTOR inhibitörü ile tedavi edilmiş hastalar çalışma dışı bırakıldılar.

ACR Sjögren Sendromu Sınıflandırma Kriterleri 2012

Laboratuvar Bulguları: Anti- SSA/Ro ve/veya Anti- SSB/La veya RF pozitifliği ve ANA titresi > 1/320 (+) olması

Tükürük bezi biyopsisi: Dudaktan alınan tükürük bezi biyopsisinde her 4 milimetre karelik alanda 1 veya daha fazla fokal lenfositik siyaladenit varlığı

Oküler Boyanma Skoru: Kuru göz ile birlikte oküler boyanma skorunun 3 ve üzerinde olması (Hastanın glokom nedeni ile göz damlası kullanmaması, son 5 yıl içerisinde korneal cerrahi veya kozmetik göz kapağı cerrahisi geçirmemiş olması gerekmektedir.)

Tanı için bu kriterlerden 2 veya daha fazlasının varlığı ve aşağıdaki durumların olmaması gerekmektedir:

- Baş ve boyun bölgesine radyoterapi almış olmak
- Hepatit C infeksiyonu
- AIDS
- Sarkoidoz
- Amiloidoz
- Graft versus host hastalığı
- İmmunglobulin G4 (IgG4) ilişkili hastalık

ACR/EULAR Sistemik Skleroz Tanı Kriterleri 2013

Bu kriterler, SSc açısından şüphelenilen her hasta için uygulanabilir. Skorlar toplamı 9 veya üzeri ise hasta SSc kabul edilir. Aşağıda belirtilen özelliklere sahip hastalar için bu kriterler kullanılamaz:

SSc benzeri hastalıklarla semptomları daha iyi açıklanabilen hastalar. Örnek: nefrojenik sklerozan fibrosis, morfea, özinofilik fasiit, skleroderma diyabetikorum, sklerodermiksödema, eritromiyalji, porfiria, liken skleroz, graft versus host hastalığı, diyabetik keiropati.

Parmakları korunmuş cilt kalınlaşması olan hastalar

Puan	Madde
9	Her iki el parmaklarında ve metakarpofalangeal eklemlerin proksimalinde deri kalınlaşması (<i>tek başına yeterli</i>)
2 4	<i>Parmaklarda deri kalınlaşması (sadece en yüksek olan değer alınır)</i> Şiş (puffy) parmaklar Sklerodaktili
2 3	<i>Parmak ucu lezyonları (sadece yüksek olan değer alınır)</i> Parmak ucu ülserleri Pitting skar
2	Telenjektazi
2	Anormal tırnak yatağı kapilleri
2	Pulmoner arter hipertansiyonu ve/veya İnterstisyel akciğer hastalığı (<i>herhangi birinin varlığı</i>)
3	Raynaud fenomeni
3	<i>Sistemik skleroz ilişkili otoantikor varlığı (herhangi birinin varlığı)</i> Antisentromer antikor Anti Scl 70 Anti RNA polimeraz 3 antikor

3.2.Minör Tükürük Bezi Biyopsi Yöntemi

Çalışmamız için herhangi bir hastaya yeni minör tükürük bezi (MTB) biyopsisi yapılmamıştır. Kliniğimizde her hasta için tek bir MTB biyopsi metodu uygulanmakta olup şu şekilde yapılmaktadır: Alt dudak tükürük bezleri palpasyonla palpe edilerek tespit edilir. Biyopsi yapılacak alanın tespitinden sonra bu alan dezenfekte edilir. Lidokain ile lokal anestezi yapıldıktan sonra 22 numara bistüri ile 2-3 mm küçük insizyon oluşturularak biyopsi forsepsi ile glandüler doku çıkarılır. İnsizyon yeri, emilebilen suture materyali ile kapatılır.

3.3.Histolojik değerlendirme:

% 10 tamponlu formalin ile en az 6 saat fikse edilen biyopsiler kapalı sistem doku takip makinası ile bir gece rutin doku takibi yapılmış ve elde edilen minör tükürük bezi parafin bloklarından her hasta için 1 blok seçildi. Bu bloklardan elde edilen 4-5 mikron kalınlıkta seri kesitler *Hematoksilen Eosin* (H&E) boyası ile boyanarak ışık mikroskop ile tek bir uzman patolog tarafından incelendi (Şekil 10). H&E boyalı lamalar ışık mikroskopunda minör tükürük bezi yüzey alanı, lenfositik hücre infiltrasyon miktarı, lenfositik hücre sayısı >50 ise fokus kabul edildi. Preparatlar fokus sayısı, dev fokus varlığı, fibrosis varlığı ve derecesi, lobuler veya asiner atrofi, nonspesifik siyaladenit varlığı açısından değerlendirildi. *Chisholm* ve *Mason* skalasına ¹⁷⁸ göre fokus skorunun ≥ 1 olması SjS açısından tanısal kabul edildi (Şekil 11). Bu skorlama sistemine göre:

0: yangı yok

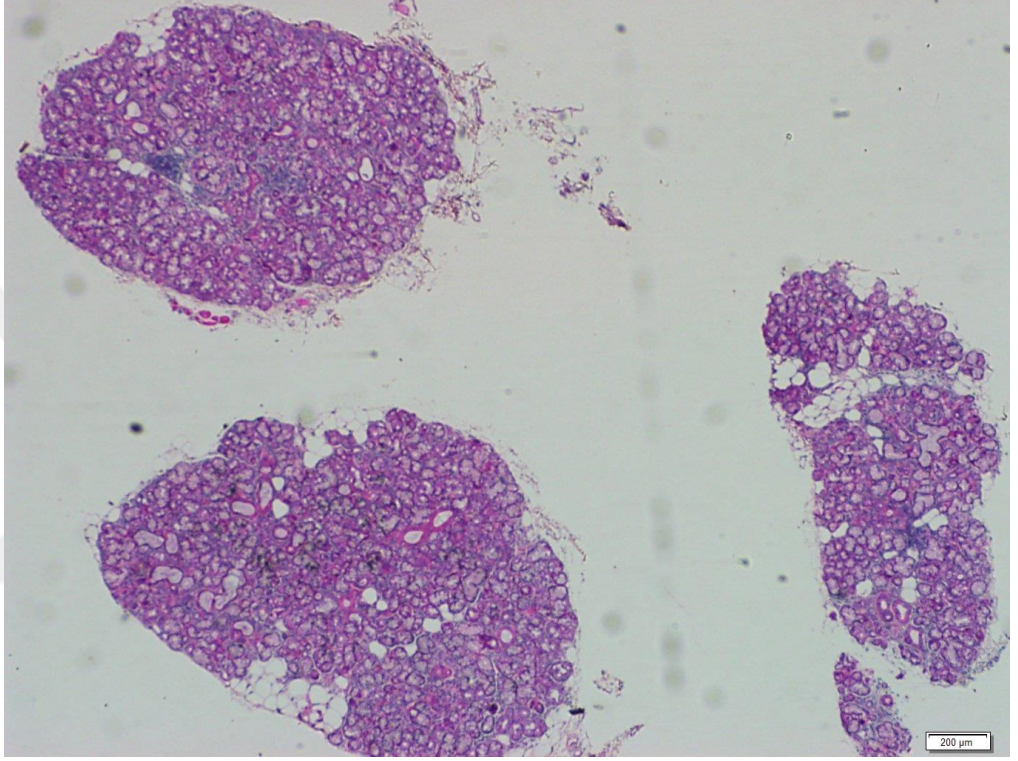
1: hafif yangı

2: 1 foküsten az yangı

3: 1 fokus yangı (4 milimetre kare başına 1 fokus yangı var ve buna fokus skor=1 denmektedir)

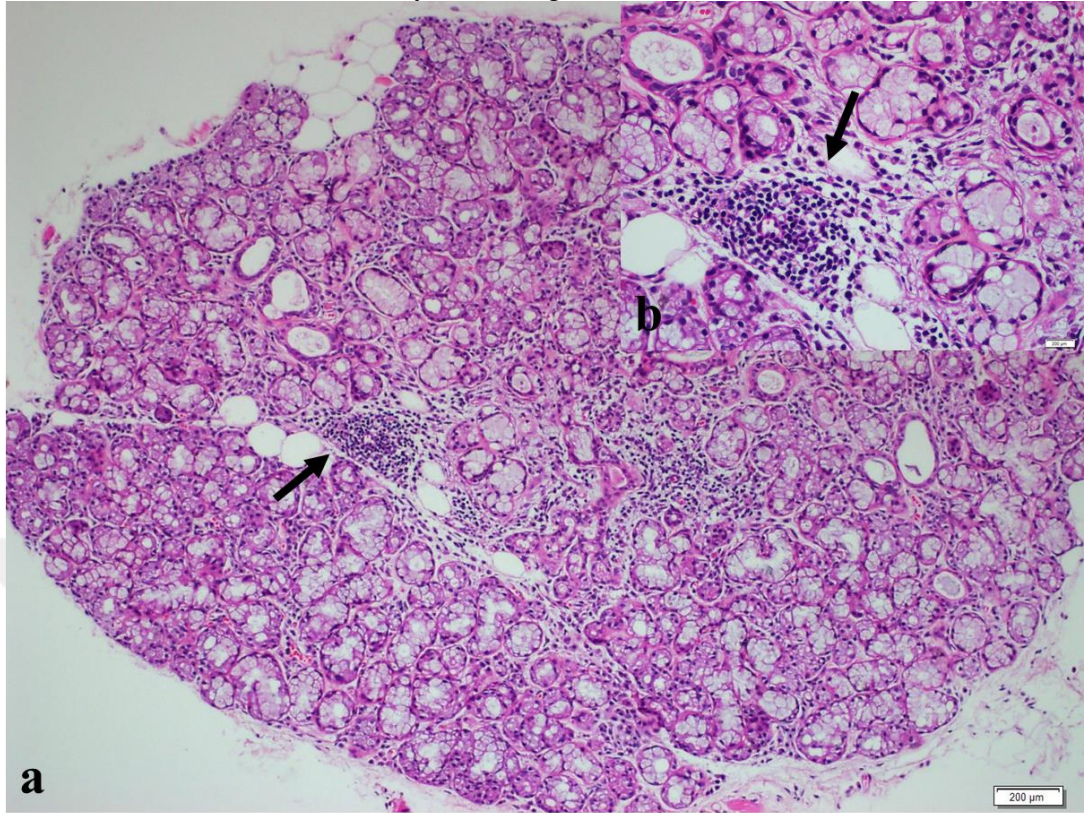
4: 1 foküsten fazla yangı (fokus skor >1)

Bu skorlama sisteminde 3 (foküs skor=1) ve 4'ün (foküs skor>1) tanısal olmasına karar verilmiştir ¹⁷⁹. MTB biyopsisinde saptanan fibrosis *Olympos BX52* mikroskop ile semi kantitatif olarak değerlendirildi. Fibrosis miktarı yüzey alanının %25'inden küçük ise hafif, %25-%50 arası ise orta, >%50 ise şiddetli fibrosis olarak derecelendirildi.



Şekil 10: Hematoksilen Eosin ile boyanmış minör tükürük bezinin 4x

büyütmede görüntüsü



Şekil 11: Minör tükürük bezinde fokus skoru ≥ 1 alan görüntüsünün büyük (10x) (a) ve küçük (40x) (b) büyütmede görüntüsü

3.4. İmmunohistokimyasal Boyama:

- MTB biyopsilerinde PTEN (*Spring Bioscience Rabbit Anti-Human PTEN Rabbit Monoclonal, Clone SP170*), mTOR (*Spring Bioscience Rabbit Anti-Human mTOR Polyclonal Antibody*) ve β - β (*Spring Bioscience Rabbit Anti-Human Transforming Growth Factor 1 β Polyclonal Antibody*) antikoru immunhistokimyasal (İHK) boyama yöntemi ile araştırıldı. Boyama protokolü şu aşamaları içerdi:

- Rutin doku takibi ile elde edilen parafin bloklardan hazırlanan 3-5 Mikron kalınlıkta kesitler Poli-L-lizin kaplı lam üzerine alındı.

- Lam üzerine alınan kesitler 1 saat 60°C'de etüvde deparafinize edildi.

- Ardından antijen açığa çıkarma (antijen retrieval) ve rehidrasyon işlemleri için mTOR ve TGF- β ile boyanacak preparatlar *Dako*

EnVision FLEX Target retrieval Solution (50x) Low pH ile; PTEN ile boyanacak preparatlar ise *EnVision FLEX Target retrieval Solution (50x) high pH* solusyonu ile *Dako PT Link* cihazı kullanılarak 97⁰C'ye kadar ısıtılıp 20 dakika inkübe edilip ardından 65⁰C'ye geri soğutuldu.

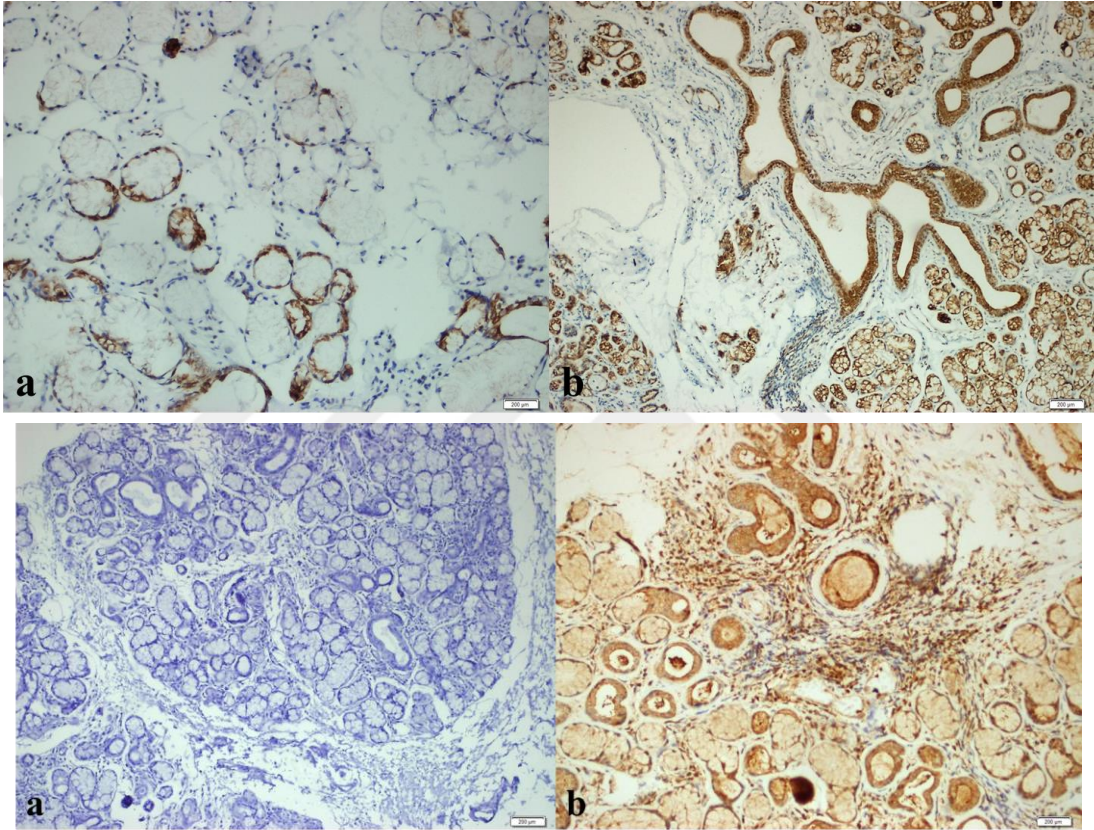
- Daha sonra preparatlar İHK otomatik boyama cihazına (*Dako Autostainer Link 48*) yerleştirildi.
- Primer PTEN antikoru 1:100 oranında dilüe edilerek 35 dakika primer antikor inkübasyonu ile *Dako Envision Flex + Rabbit Sekonder Antikor Kiti* kullanılarak görüntüleme elde edildi. Pozitif kontrol için prostat adenokarsinom dokusu kullanıldı.
- Primer TGF- β kullanıma hazır antikoru 15 dakika inkübe edildi ve *Dako Envision Flex Sekonder Antikor Kiti* kullanılarak görüntüleme elde edildi. Pozitif kontrol amaçlı plasenta dokusu kullanıldı.
- Primer mTOR antikoru 1:50 oranında dilüe edilerek, 15 dakika inkübe edildi ve *Dako Envision Flex Sekonder Antikor Kiti* kullanılarak görüntüleme elde edildi. Pozitif kontrol amaçlı meme kanseri dokusu kullanıldı.
- Zıt boyama için tüm kesitlere *Dako Envision Flex Hematoxylin* 5 dakika inkübasyon ile uygulandı.
- Boyanan kesitlere dehidrasyon işlemi için ikişer dakika 3 farklı alkol değişimi ve beşer dakika 2 farklı ksilen değişimi uygulanarak bunun ardından entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.
- Usulüne uygun şekilde İHK boyanan lamalar, tek bir uzman patolog tarafından ışık mikroskopunda değerlendirildi.

3.5. İmmunhistokimyasal Boyaların Değerlendirilmesi

mTOR MTB materyallerini değerlendirmeden önce ilk olarak pozitif kontrol olarak kullanılan dokuda kahverengi sitoplazmik ve membranöz immunekspresyon pozitif boyanma olarak kabul edildi. MTB biyopsilerinde mTOR İHK boyanın değerlendirilmesi için ışık

mikroskobunda semikantitatif bir yöntem kullanıldı ve zayıf boyanma 1 pozitif (Şekil 12), orta derecede boyanma 2 pozitif ve güçlü boyanma 3 pozitif (Şekil 12) olarak derecelendirildi. Boya ile immunreaksiyon olmaması durumunda ise 0 puan verildi ¹⁸⁰.

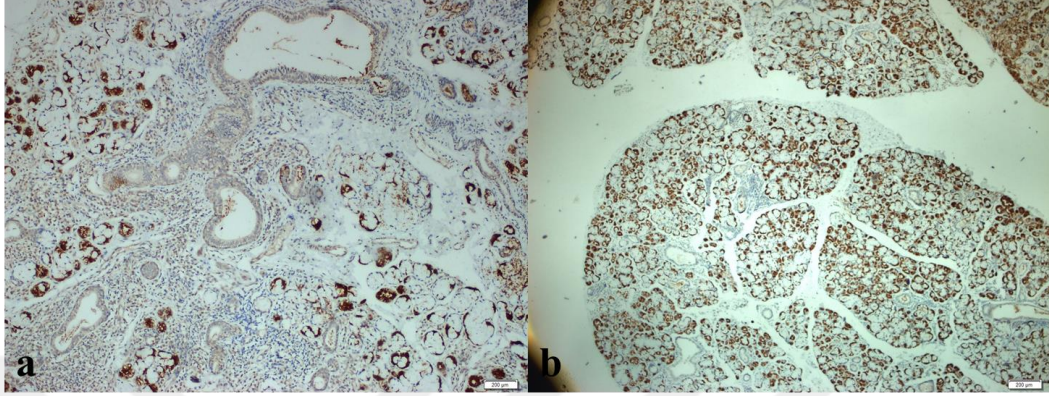
Şekil 12: Minör tükürük bezinde 10x büyütmede 1 pozitif (a) ve 3 pozitif (b) mTOR boyanması



PTEN için kullanılan pozitif kontrol dokuda sitoplazmik ve/veya nükleer immunekspressiyon pozitif olduğu görüldü. Ardından MTB dokuları semikantitatif olarak boyanma durumlarına göre ışık mikroskobunda derecelendirildi. Hücreler zayıf boyanma gösterdiyse 1 pozitif, güçlü boyanma gösterdilerse 2 pozitif olarak değerlendirilirken boyanma göstermedilerse skor 0 olarak not edildi (Şekil 13) ¹⁸¹.

Şekil 13: Minör tükürük bezinde 10x büyütmede PTEN için negatif (a) ve 2 pozitif (b) boyanma

TGF- β 1 için kontrol dokuda immunreaksiyon görüldükten sonra MTB preparatları boyanmış olup sonrasında 0 ve 4 arasında boyanma şiddetleri derecelendirildi (Şekil 14) ¹⁸².



Şekil 14: Minör tükürük bezinde 10x büyütmede TGF- β 1 ile 1 pozitif (a) ve 4x büyütmede 3 pozitif (b) boyanma

3.6. İstatiksel Analiz:

Sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma olarak, kategorik değişkenler yüzde (%) olarak ifade edildi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare (chi-square, χ^2) testi kullanıldı. Bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin tespitinde Spearman korelasyon analizi ile yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistik analizi için Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi Versiyon 16 (Statistical Package for the Social Sciences version 16th [SPSS V.16]) paket programı kullanıldı.

4. SONUÇLAR

Çalışmamıza toplamda 58 SjS, 16 SSc ve 23 çakışma sendromu hastası dahil edildi. SjS hasta grubunda 1 erkek ve 57 kadın hasta, SSc grubunda 1 erkek ve 15 kadın hasta ve çakışma sendromu hasta grubunda 23 kadın hasta vardı.

SSc grubundan 2 hasta boyama hazırlıkları sırasında gelişen teknik sorunlar nedeni ile çalışma dışı bırakıldı. Böylece SSc grubundan toplamda 14 hasta çalışmaya dahil edilmiş olup 3 biyopsi sonucu kronik siyaladenit ile uyumlu iken diğer 11 hastada lenfosit infiltrasyonu görülmedi. SSc-SjS çakışma sendromu hasta grubunda toplam 23 hastadan 1 hastanın biyopsi sonucu olağan olup klinik ve laboratuvar değerlerine göre SjS ve SSc tanısı aldı. Benzer şekilde SjS hastalarından 6'sının biyopsi sonucu normal olup klinik ve laboratuvar özellikleri ile SjS tanısı aldılar.

Çalışmaya dahil edilen hastaların bazı demografik ve klinik özellikleri ile ilgili veriler aşağıda Tablo 1'de verilmiştir. Ağız kuruluğu ve/veya göz kuruluğu ile ilgili sorulardan en az birine evet yanıtı veren hastalar "sikka semptomuna sahip" olarak değerlendirilmiştir. Her hastanın sikka semptom varlığı ile BUT ve Schirmer test sonuçları elde edilememiş olup toplamda 48 SjS, 20 çakışma sendromu ve 11 SSc hastasının sikka semptomları ile ilgili verilere ulaşıldı. Sikka semptomu varlığı SjS hastalarında (%89,6) SSc ve çakışma sendromu hastalarına göre daha yüksek oranda bulunmuştur (sırasıyla %72,7 ve %70). BUT ve Schirmer testleri anlamlı olarak azalmış ise (BUT <10 saniye ve Schirmer<5 mm/5 dakika) "kuruluk var", normal değerler arasında bulunmuşsa "kuruluk yok" şeklinde yorumlanmıştır. Retrospektif olarak hasta kayıtları incelendiğinde 25 SjS, 19 çakışma sendromu ve 11 SSc hastasının BUT sonucuna ulaşılabildi. Schirmer testi sonuçlarından 45 SjS, 19 çakışma sendromu ve 12 SSc hastasının verilerine ulaşıldı. Hastalık süresi hastaya tanı konduğu andan Mayıs 2016 tarihine kadar geçen süre olarak hesaplandı.

Tablo 1: Her 3 hasta grubunda hasta yaşı, hastalık süreleri, sikka semptom varlığı, BUT ve Schirmer test sonuçlarının istatistiksel verileri

	Sjögren sendromu (n=58)	Sistemik skleroz (n=14)	Çakışma sendromu (n=23)
Yaş, yıl (ortalama±SD)	52.64±13,08	53,85±14,24	48±9,315
Hastalık süresi, ay (ortalama±SD)	58,27±23,35	43±23,9	56,8±35,43
Sikka semptomu olan hasta sayısı, n, (%)	43, (89,6)	10, (72,7)	14, (70)
BUT ile sikka saptanan hasta sayısı, n, (%)	21, (60)	4, (36,3)	14, (73,7)
Schirmer ile sikka saptanan hasta sayısı, n, (%)	26, (57,8)	6, (50)	11, (57,9)

*BUT: *Break-up time*, SD: Standart sapma

Lam üzerindeki dokuların dökülmesi nedeni ile toplamda 11 SSc, 20 çakışma sendromu ve 54 SjS hastasının mTOR boyaması yapılabildi. Aynı teknik sorun nedeni ile 12 SSc, 19 çakışma sendromu ve 47 SjS hastasının PTEN ile doku incelemesi elde edilebilirken TGF-β1 boyanma durumu açısından asinus incelemesinde 11 SSc, 55 SjS ve 21 çakışma sendromu hastası ve duktusların incelemesinde 13 SSc, 54 SjS ve 21 çakışma sendromu hastasının verileri elde edilebildi. Bu nedenle tablolardaki hasta sayıları farklıdır.

Her hasta grubu için mTOR ve mTOR yolağının sekonder göstergeleri olan PTEN ve TGF-β1 ile belirlenen immunhistokimyasal boyanma verileri aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5). TGF-β1 pozitifliği minör tükürük bezi duktus ve asinusları için ayrı olarak yorumlanmış olup TGF-β1 duktuslarda yalnızca negatif veya zayıf pozitif şeklinde boyanmıştır (Tablo 4).

Minör tükürük bezinde immünohistokimyasal boyanma paternleri mTOR için gruplar arasında fark göstermezken ($P=0,604$), PTEN ve asinüslarda TGF-β1 boyanma paterni gruplar arasında anlamlı farklı bulundu (sırasıyla $P=0,023$ ve $P=0,004$). PTEN boyanma paterni SjS ve SSc hastalarında anlamlı farklılık göstermemesine karşın ($P=0.420$) çakışma sendromu ile karşılaştırıldığında hem SjS ($P=0.026$) hem de SSc

hastalarında ($P=0.027$) anlamlı farklılık göstermekte idi. Öte yandan asinüs TGF- β 1 boyanma paterni Sjs ile karşılaştırıldığında hem SSc hastalarında ($P=0.001$), hem de çakışma sendromu hastalarından ($P=0.038$) anlamlı şekilde farklı idi. Ancak SSc ve çakışma sendromu hastalarında anlamlı fark gözlenmedi ($P=0.207$).

Tablo 2: Hasta gruplarına göre minör tükürük bezinin mTOR sinyal skorları.

	mTOR			
	Negatif	Zayıf Pozitif	Orta Pozitif	Güçlü Pozitif
Sjs Grubu, n, (%)	3, (5,6)	25, (46,3)	20, (37)	6, (11,1)
SSc Grubu, n, (%)	1, (9,1)	4, (36,4)	5, (45,5)	1, (9,1)
Çakışma Sendromu Grubu, n, (%)	0	11, (55)	9, (45)	0

*Sjs: Sjögren Sendromu, SSc: Sistemik skleroz, mTOR: *mammalian target of rapamycin*

Tablo 3: Hasta gruplarına göre minör tükürük bezinin PTEN sinyal skorları.

	PTEN		
	Negatif	Zayıf Pozitif	Güçlü Pozitif
Sjs Grubu, n, (%)	6, (12,8)	23, (48,9)	18, (38,3)
SSc Grubu, n, (%)	0	7, (58,3)	5, (41,7)
Çakışma Sendromu Grubu, n, (%)	8, (42,1)	5, (26,3)	6, (31,6)

*Sjs: Sjögren Sendromu, SSc: Sistemik skleroz, PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

Tablo 4: Hasta gruplarına göre minör tükürük bezi duktuslarında TGF- β 1 sinyal skorları.

	TGF- β 1 Duktus	
	Negatif	Zayıf Pozitif
Sjs Grubu, n, (%)	26, (48,1)	28, (51,9)
SSc Grubu, n, (%)	6, (46,2)	7, (53,8)
Çakışma Sendromu Grubu, n, (%)	14, (66,7)	7, (33,3)

*Sjs: Sjögren Sendromu, SSc: Sistemik skleroz, TGF- β 1: Tumor büyüme faktörü beta 1

Tablo 5: Hasta gruplarına göre minör tükürük bezi asinuslarında TGF- β 1 sinyal skorları.

	TGF- β 1 Asinus			
	Negatif	Zayıf Pozitif	Orta pozitif	Güçlü pozitif
SjS Grubu, n, (%)	23, (41,8)	20, (36,4)	10, (18,2)	2, (3,6)
SSc Grubu, n, (%)	3, (27,3)	2, (18,2)	1, (9,1)	5, (45,5)
Çakışma Sendromu Grubu, n, (%)	3, (14,3)	10, (47,6)	4, (19)	4, (19)

*SjS: Sjögren Sendromu, SSc: Sistemik skleroz, TGF- β 1: Tümör büyüme faktörü beta 1

Fibrosis dereceleri 3 üzerinden değerlendirilmiş olup fibrosis derecesi 3 olan hasta SSc, SSc-SjS çakışma sendromu veya SjS grubunda bulunmamaktaydı. Genel olarak her 3 hastalık grubunda da fibrosis görülürken fibrosis skoru 0 olan hasta sayısı SjS grubunda daha fazlaydı. Buna rağmen gruplar arasında fibrosis açısından anlamlı fark bulunmadı ($P=0,833$). Hastalık gruplarındaki fibrosis ile ilgili veriler hasta sayısı ve yüzde şeklinde Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6: Tüm hasta gruplarındaki fibrosis derecesi verileri

	Fibrosis Derecesi		
	2	1	0
SjS Grubu, n, (%)	10, (17,5)	37, (65)	10, (17,5)
SSc Grubu, n, (%)	4, (26,7)	9, (60)	2, (13,3)
Çakışma Sendromu Grubu, n, (%)	5, (22,7)	15, (68,1)	2, (9,1)

*SjS: Sjögren Sendromu, SSc: Sistemik skleroz

SjS hastalarının boyanma özelliklerinin birbirleriyle ve fibrosis ve yaş değişkenleri ile olan korelasyonu Spearman korelasyon analizi ile yapıldı ve aşağıdaki sonuçlar bulundu (Tablo 7). SjS hastalarında PTEN ve TGF- β 1 arasında negatif korelasyon olduğu gözlemlendi ($r= -0,425$, $P=0,005$). SSc ve çakışma sendromu gruplarında hasta sayısı az olduğu için korelasyon analizleri yapılamadı.

Tablo 7: Sjögren Sendromu hasta grubunda mTOR, PTEN, TGF- β 1, fibrosis ve yaş değişkenlerinin birbirleriyle Spearman analizine göre korelasyon verileri

	mTOR	PTEN	TGF-β1 asinus	Fibrosis	Yaş
	r ve p değeri	r ve p değeri	r ve p değeri	r ve p değeri	r ve p değeri
mTOR		r=0,219 p=0,163	r= -0,120 p=0,413	r=0,052 p=0,712	r=0,065 p=0,641
PTEN	r=0,219 p= 0,163		r= -0,425 p=0,005	r= -0,038 p=0,802	r=0,047 p=0,755
TGF-β1 asinus	r= -0,120 p=0,413	r=-0,425 p=0,005		r=0,052 p=0,713	r=0,084 p=0,550
Fibrosis	r=0,052 p=0,712	r=-0,038 p=0,802	r=0,052 p=0,713		r= -0,071 p=0,598
Yaş	r=0,065 p=0,641	r=0,047 p=0,755	r=0,084 p=0,550	r= -0,071 p=0,598	

*mTOR: *mammalian target of rapamycin*, PTEN: *phosphatase tensin homolog*, TGF- β 1: *tumor growth factor beta 1*

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda yer alan hasta gruplarında yaş, cinsiyet ve hastalık süresi dağılımları birbirine benzer olarak bulundu (Tablo 1). Sikka semptomu literatüre göre SSc hastalarında daha fazla (%72,7) bulundu. Ancak çalışmaya alınan SSc hastalarının ya sikka semptomu olan ya da SjS düşündüren otoantikör pozitifliği olduğu için dudak biyopsisi alınan SSc hastaları olduğu düşünüldüğünde bu durumun genel popülasyonu yansıtmadığı düşünülmüştür.

Minör tükürük bezinde İHK boyanma paternleri mTOR için gruplar arasında fark göstermemesine rağmen ($P=0,604$), mTOR yolağı hem SjS, hem SSc, hem de çakışma sendromunda aktif rol oynuyor gibi görünmektedir. Romatolojik hastalıklarda ortak bir yolak olduğunu düşündürdüğü için mTOR, romatolojik hastalıkların birbirinden ayrılmasında kullanışlı olmayabilir. Ancak otoimmün hastalıkların tedavisinde bir hedef olarak romatoloji pratiğinde mTOR inhibitörleri yerini alabilir.

Daha önce literatürde insan SjS hasta dokusu üzerinde mTOR inhibitörü ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Shah ve arkadaşlarının SjS fare modeli üzerinde mTOR inhibitörü sirolimus ile yaptıkları deneyde sirolimusun lakrimal gland üzerinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir¹⁸³. Bu çalışmada elde edilen veriler insanlarda da SjS tedavisinde mTOR inhibitörlerinin denenmesi açısından cesaret vermektedir.

Asinüslarda TGF- β 1 ile boyanma paterninde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P=0,004$). Bir fibrosis göstergesi

olan TGF- β 1 ile asinuslarda verilen güçlü pozitiflik, beklendiği üzere fibrosis ile karakterize olan SSc hastalarında %45,5 ve SjS hastalarında %3,6 bulunmuştur ($P=0.001$). Çakışma sendromu hasta grubunda bu oran %19,6 bulunmuş olup bu durum çakışma sendromundaki SSc'da tükürük bezindeki fibrosisin tek başına SSc'ye göre daha ılımlı seyrettiğini düşündürmektedir.

Bir diğer anlamlı fark, gruplar arasında PTEN boyanma paterni için bulunmuştur ($P=0,023$). PTEN boyanma paterni SjS ve SSc hastalarında anlamlı farklılık göstermemesine karşın ($P=0.420$) çakışma sendromu ile karşılaştırıldığında hem SjS ($P=0.026$) hem de SSc hastalarında ($P=0.027$) anlamlı farklılık göstermekte idi. Bu durum epitelyopatogenezin çakışma sendromunda SjS ve SSc'dan farklı bir yol izlediğini düşündürmektedir. Öte yandan, her ne kadar PTEN, endojen bir mTOR inhibitörü olarak bilinse de, daha önce literatürde artmış mTOR aktivitesine artmış PTEN düzeylerinin eşlik ettiği gösterilmiştir. Bu durum PTEN yolağının zayıflamış bir etkisi sonucunda gözlenmiş olabileceği üzerinde durulmuştur¹⁸⁴. Bizim çalışmamızda da artmış PTEN düzeyleri, artmış mTOR düzeyleri ile birlikte olup bu durum otoimmün süreçte zayıflamış PTEN yolağı nedeni ile gözlenmiş olabilir. Ancak yine de ileri incelemeler ile PTEN ve PTEN ilişkili moleküllerin otoimmün hastalık süreçlerinde etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

SjS hasta grubu içerisinde yapılan Spearman korelasyon analizi ile mTOR ile PTEN veya TGF- β 1 arasında bir ilişki olduğu gösterilememiştir. Bu durum PTEN ve TGF- β 1'in mTOR'dan bağımsız olarak diğer yollar üzerinden çalıştığını düşündürmektedir. Ayrıca yine SjS'nda TGF- β 1 ve PTEN arasında negatif ilişki olduğu gösterilmiştir. Normal fizyolojik hücre işlevlerinde TGF- β 1'in PTEN üzerine hem arttırıcı hem azaltıcı etkisi bulunmaktadır. Ras/ERK yolağı aktive olduğunda, SMAD4 bağımsız sinyal yolağı üzerinden TGF- β 'nın PTEN üzerine baskılayıcı etkisi görülmektedir¹⁸⁵. Ancak Ras/ERK yolağı inaktive edildiğinde TGF- β klasik SMAD bağımlı yoldan PTEN molekülünün ekspresyonunu arttırmaktadır¹⁸⁶. SjS'nda TGF- β 1 ile PTEN arasında negatif korelasyon bulunması, SjS'nda

Ras/ERK yolağının aktif olduğunu akla getirirse de bu çalışmanın bir kısıtlılığı olarak başka moleküller veya diğer yolaklar çalışılmadığı için kesin bir bilgiye ulaşılamamaktadır.

Bu çalışmanın diğer kısıtlılıkları SSc ve çakışma sendromu hasta gruplarında az sayıda hasta bulunması ve tüm hastaların biyopsi materyallerinin teknik hatalar nedeni ile boyanamamasıdır.

Sonuç olarak mTOR yolağı ile ilgili olarak hem mTOR hem de yolağın indirekt göstergeleri olan PTEN ve TGF-β1'in SjS, SSc ve overlap hastalarında artmış aktivitesi gösterilmiştir. Daha fazla sayıda hasta ile yapılacak çalışmaların benzer sonuçlar vermesi halinde mTOR yolağı inhibitörlerinin SjS ve SSc tedavisinde yer alması düşünülebilir. Ancak mTOR inhibitörleri sonrasında PTEN ve TGF-β1 düzeylerini gösteren çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmanın bir diğer sonucu olan PTEN ve TGF-β1'in mTOR'dan bağımsız olarak SSc, SjS ve çakışma sendromunda görev aldığı sonucu göz önünde bulundurulduğunda öncelikle mTOR inhibitörleri ile PTEN ve TGF-β1 düzeyleri ve patogeneze olan etkileri değerlendirilmelidir.

6. ÖZET

SJÖGREN SENDROMU VE SİSTEMİK SKLEROZ HASTALARININ MİNÖR TÜKÜRÜK BEZİ PATOLOJİLERİNDE mTOR YOLAĞININ ROLÜ

Giriş: Sjögren Sendromu (SjS) ekzokrin bezlerde T hücre infiltrasyonu ile karakterize olan, kronik, sistemik ve inflamatuvar bir hastalıktır. T hücre yanında epitel hücrelerinin de epitelyopatogenezdeki rolü anlaşıldığından beri SjS etiyolojisi için otoimmün epiteliit terimi önerilmiştir. Sistemik sklerosis (SSc) ise özellikle ciltte olmak üzere artmış fibrosis ile karakterli ve patofizyolojisi hala çok iyi anlaşılmamış bir otoimmün hastalıktır. Son zamanlarda SSc fare modelinde tümör büyüme faktörü beta 1 (*Transforming growth factor-β1*, TGF-β1) ve memeli rapamisin hedefi (*mammalian target of rapamycin*; mTOR) artmış düzeyleri gösterilmiştir. mTOR bir multiprotein kompleks olup hücre büyümesini, çoğalmasını ve sağkalımını kontrol eder. Fosfataz ve tensin homolog (*Phosphatase and tensin homolog*, PTEN), mTOR yolağını Protein kinaz B (PKB veya diğer adı ile Akt) molekülünü inhibe ederek etkiler. Diğer yandan mTOR inhibisyonu azalmış interlökin (IL) 4, IL6, IL7 ve TGF-β düzeylerine yol açar. Sistemik otoimmün hastalıklarda MAPK, AKT, NF-κB, Bcl-2 ailesi ve JAK/STAT yolağı gibi pek çok molekül yolağının önemli rolleri vardır. Ancak tüm bunların arasından Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K)/AKT/mTOR yolağı bir tedavi hedefi olması nedeni ile öne çıkabilir. Daha önceden SSc ve SjS hayvan modellerinde mTOR yolağının rolü araştırılmıştır. SSc'de mTOR yolağının rolü ile ilgili veriler kısıtlı olup, daha önce yapılan bir çalışmada 6 SSc hastasının cildinden elde edilen fibroblastların kültüründe araştırılmıştır. Ancak SjS hastaları ile yapılmış bir insan çalışması henüz bulunmamaktadır. Bu

nedenle SjS ve SSc gibi otoimmün hastalıklarda bir tedavi hedefi olabilecek mTOR yolağının aktivitesini SjS, SSc ve SjS-SSc çakışma sendromlu hastaların minör tükürük bezi biyopsileri üzerinde araştırmayı amaçladık.

Materyal- Metot: Hastanemiz romatoloji polikliniğine Ocak 2007 ile Aralık 2015 tarihleri arasında başvurmuş ve hastanemizde minör tükürük bezi biyopsisi alınmış hastalar retrospektif olarak tarandı. ACR 2012 SjS için sınıflandırma kriterlerine uyan hastalar SjS hasta grubuna, ACR/EULAR 2013 SSc için sınıflandırma kriterlerini karşılayan hastalar SSc hasta grubuna ve her iki kriterleri de karşılayan hastalar çakışma sendromu hasta grubuna dahil edildi. Hastalar SjS, SSc ve çakışma sendromu olmak üzere üçe ayrıldı. Minör tükürük bezi biyopsisi örnekleri, mTOR ve mTOR yolağının indirekt göstergeleri olan PTEN ve TGF-β1 açısından histokimyasal olarak değerlendirildi. mTOR ve TGF-β1 için boyanma paterni, boyanmanın yoğunluğuna göre, 0-3 arasında skorlandı. PTEN içinse skorlar 0, 1 ve 2 olarak verildi. Tüm boyama kesitleri kör olarak yorumlandı. Biyopsi örnekleri ayrıca fibrosis açısından da değerlendirildi.

Sonuçlar: Toplamda 58 SjS (57 kadın [%98,3] ve ortalama yaş $58,3 \pm 13,1$), 14 SSc (13 kadın [%92,8] ve ortalama yaş $53,8 \pm 14,2$) ve 23 SjS-SSc çakışma sendromlu hasta (23 kadın [%100] ve ortalama yaş $48 \pm 9,3$) çalışmaya dahil edildi. SjS grubunda mTOR için boyanma şiddeti 6 hastada (%11,1) güçlü, 20 hastada (%37) orta şiddette ve 25 hastada (%46,3) hafif şiddette pozitif bulundu. Üç SjS hastasında (%5,6) mTOR negatif idi. Boyanma paternleri mTOR için gruplar arasında fark göstermezken ($P=0,604$), PTEN ve asinüslarda TGF-β1 boyanma paterni gruplar arasında anlamlı farklı bulundu (sırasıyla $P=0,023$ ve $P=0,004$). PTEN boyanma paterni SjS ve SSc hastalarında anlamlı farklılık göstermemesine karşın ($P=0.420$) çakışma sendromu ile karşılaştırıldığında hem SjS ($P=0.026$) hem de SSc hastalarında ($P=0.027$) anlamlı farklılık göstermekte idi. Öte yandan asinüslarda TGF-β1 boyanma

paterni SjS ile karşılaştırıldığında hem SSc hastalarında ($P=0.001$), hem de çakışma sendromu hastalarından ($P=0.038$) anlamlı şekilde farklı idi.

Tartışma: Sonuçlar mTOR yolağının hem SSc, hem SjS, hem de SSc-SjS çakışma sendromunda aktif rol oynayan bir ortak yolak olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca PTEN ve TGF- β 1 de mTOR'dan bağımsız olarak hastalıklarda rol oynuyor gibi görünmektedir. Ortak yolak olması nedeni ile ayırt ettirici olmasa da önümüzdeki yıllarda mTOR inhibitörlerinin romatoloji pratiğinde kullanılabileceği düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: mTOR inhibitör, Sjogren sendromu, sistemik skleroz, PTEN, TGF- β

7. SUMMARY

THE ROLE OF mTOR PATHWAY IN MINOR SALIVARY GLAND BIOPSY MATERIALS OF SJOGREN SYNDROME AND SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS

Background: Sjogren's Syndrome (SjS) is a chronic, systemic, inflammatory disease, characterized by T cell infiltration into exocrine glands. The term of "autoimmune epitheliitis" is also recommended for SjS etiology, since epithelial cells play an important role on autoimmune process beside T cells. Systemic Sclerosis (SSc) is also an autoimmune disease with increased fibrosis and unclarified pathogenesis. Recently, increased activity of *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) and *mammalian target of rapamycin* (mTOR) was established in a mouse model of SSc. mTOR, a multiprotein complex, controls cell growth, proliferation and survival. *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) affects mTOR pathway by inhibiting Protein kinase B (PKB or Akt). On the other hand, inhibition of mTOR causes decreased interleukin (IL) 4, IL6, IL17 and TGF- β . In systemic autoimmune disorders, many molecular pathways, such as MAPK, AKT, NF- κ B, Bcl-2 family and JAK/STAT pathway, have important roles. But phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mTOR pathway distinguishes due to being a treatment target. Previously, the role of mTOR in autoimmune diseases had been investigated in SSc and SjS models. But a study with human subjects has not been published yet. Therefore, we aimed to examine the activity of mTOR pathway, which is a potential treatment target for SjS and SSc, in minor salivary gland biopsies of SjS, SSc and SjS-SSc overlap syndrome patients.

Methods: We retrospectively scanned SjS, SSc and SjS-SSc overlap syndrome patients, who admitted to our outpatient Romatology clinic between January 2007 and December 2015 and were performed a minor salivary gland biopsy. The patients were divided into 3 groups: SjS group (who met ACR 2012 classification criteria for SjS), SSc group (who met ACR/EULAR 2013 classification criteria for SSc) and SjS-SSc overlap syndrome group (who met both of 2 criteria sets). All biopsy specimens were investigated with mTOR, PTEN and TGF- β 1, that are direct and indirect markers of mTOR pathway. The staining patterns of mTOR and TGF- β 1 was expressed as intensity of staining and was graded from 0 to 3. For PTEN, the slides were graded from 0 to 2. Slides were read blindly. The biopsy specimens were also examined for the degree of fibrosis.

Results: Totally 58 SjS (57 female [98.3%] and mean age 58.3 ± 13.1), 14 SSc (13 female [92.8%] and mean age 53.8 ± 14.2) and 23 SjS-SSc overlap syndrome patients (23 female [%100] and mean age 48 ± 9.3) were enrolled. In SjS group, mTOR staining intensity was strong in 6 patients (11.1%), moderate in 20 patients (37%) and weak in 25 patients (46.3%). Three SjS patients (5.6%) showed negative staining for mTOR. While there was not any statistically significance between groups for mTOR staining ($P=0,604$), a significance for both PTEN and TGF- β 1 was found (in an order $P=0,023$ and $P=0,004$). For PTEN staining, no significance was established between SjS and SSc groups ($P=0.420$). On the other hand, when PTEN staining was compared between overlap syndrome and SjS and SSc groups, P values were $P=0.026$ and $P=0.027$ respectively. TGF- β 1 staining pattern was different from both SSc group ($P=0.001$) and overlap syndrome group ($P=0.038$).

Conclusion: mTOR pathway seems to play a mutual role in both SjS, SSc and overlap syndrome. Plus, PTEN and TGF- β 1 may also have a role in these diseases, probably with another pathways from PI3K/Akt/mTOR pathway. Because of that mTOR is a mutual pathway in SSc, SjS and overlap syndrome, mTOR could not be used to distinguish the diseases. But, in future, mTOR inhibitors can take place in Rheumatology practice.

Key Words: mTOR inhibitor, Sjogren syndrome, systemic sclerosis, PTEN, TGF- β .



8. KAYNAKLAR:

1. Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. *Arch Intern Med.* 2004;164(12):1275-1284. doi:10.1001/archinte.164.12.1275.
2. Moriyama M, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Nakashima H NS. T helper subsets in Sjögren's syndrome and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis: a critical review. *J Autoimmun.* 2014;Jun(51):81-88. doi:10.1016/j.jaut.2013.07.007.
3. Manno R, Boin F. Immunotherapy of systemic sclerosis. *Immunotherapy.* 2010;2(6):863-878. doi:10.2217/imt.10.69.
4. Lafyatis R. Targeting fibrosis in systemic sclerosis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2006;6(4):395-400. doi:10.2174/187153006779025766.
5. Liang M, Lv J, Chu H, Wang J, Chen X, Zhu X, Xue Y, Guan M ZH. Vertical inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling demonstrates in vitro and in vivo anti-fibrotic activity. *J Dermatol Sci.* 2014;76(2):104-111. doi:10.1016/j.jdermsci.2014.08.002.
6. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1886-1918. doi:10.3390/ijms13021886.
7. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(6):596-603. doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009.
8. Wu T, Mohan C. The AKT Axis as a Therapeutic Target in Autoimmune Diseases. *Endocrine, Metab Immune Disord -Drug Targets.* 2009;9:145-150.

9. Shah M, Edman MC, Janga SR, Shi P, Dhandhukia J, Liu S, Louie SG, Rodgers K, Mackay JA H-AS. A rapamycin-binding protein polymer nanoparticle shows potent therapeutic activity in suppressing autoimmune dacryoadenitis in a mouse model of Sjögren's syndrome. *J Control Release*. 2013;171(3):269-279. doi:10.1016/j.jconrel.2013.07.016.
10. Pillemer SR, Matteson EL, Jacobsson LT, Martens PB, Melton LJ 3rd, O'Fallon WM FP. Incidence of physician-diagnosed primary Sjögren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc*. 2001;76(6):593-599. doi:10.4065/76.6.593.
11. Gøransson LG, Haldorsen K, Brun JG, et al. The point prevalence of clinically relevant primary Sjögren's syndrome in two Norwegian counties. *Scand J Rheumatol*. 2011;40(3):221-224. doi:10.3109/03009742.2010.536164.
12. Maldini C, Seror R, Fain O, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome in a French multiracial/multiethnic area. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(3):454-463. doi:10.1002/acr.22115.
13. Thomas E, Hay EM, Hajeer A, Silman AJ. Sjögren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol*. 1998;37(10):1069-1076. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9825745>. Accessed July 13, 2016.
14. Qin B, Wang J, Yang Z, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(11):1983-1989. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205375.
15. Birlik M, Akar S, Gurler O, et al. Prevalence of primary Sjögren's syndrome in Turkey: a population-based epidemiological study. *Int J Clin Pract*. 2009;63(6):954-961. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01749.x.
16. Lessard CJ, Li H, Adrianto I, et al. Variants at multiple loci implicated in both innate and adaptive immune responses are associated with Sjögren's syndrome. *Nat Genet*. 2013;45(11):1284-1292. doi:10.1038/ng.2792.

17. Li Y, Zhang K, Chen H, et al. A genome-wide association study in Han Chinese identifies a susceptibility locus for primary Sjögren's syndrome at 7q11.23. *Nat Genet.* 2013;45(11):1361-1365. doi:10.1038/ng.2779.
18. Foster H, Walker D, Charles P, Kelly C, Cavanagh G, Griffiths I. Association of DR3 with susceptibility to and severity of primary Sjögren's syndrome in a family study. *Br J Rheumatol.* 1992;31(5):309-314. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1581772>. Accessed July 13, 2016.
19. Nocturne G, Boudaoud S, Miceli-Richard C, et al. Germline and somatic genetic variations of TNFAIP3 in lymphoma complicating primary Sjögren's syndrome. *Blood.* 2013;122(25):4068-4076. doi:10.1182/blood-2013-05-503383.
20. Bolstad AI, Le Hellard S, Kristjansdottir G, et al. Association between genetic variants in the tumour necrosis factor/lymphotoxin α /lymphotoxin β locus and primary Sjögren's syndrome in Scandinavian samples. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):981-988. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200446.
21. Triantafyllopoulou A, Moutsopoulos H. Persistent viral infection in primary Sjögren's syndrome: review and perspectives. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007;32(3):210-214. doi:10.1007/s12016-007-8004-7.
22. Jonsson R, Theander E, Sjöström B, Brokstad K, Henriksson G. Autoantibodies present before symptom onset in primary Sjögren syndrome. *JAMA.* 2013;310(17):1854-1855. doi:10.1001/jama.2013.278448.
23. Miyasaka N, Yamaoka K, Tateishi M, Nishioka K, Yamamoto K. Possible involvement of Epstein-Barr virus (EBV) in polyclonal B-cell activation in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 1989;2(4):427-432. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2551309>. Accessed July 13, 2016.
24. Fox RI. Epidemiology, pathogenesis, animal models, and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 1994;6(5):501-508. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7993708>. Accessed July 13, 2016.

25. Triantafyllopoulou A, Moutsopoulos HM. Autoimmunity and coxsackievirus infection in primary Sjogren's syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1050:389-396. doi:10.1196/annals.1313.090.
26. Sumida T, Yonaha F, Maeda T, et al. Expression of sequences homologous to HTLV-I tax gene in the labial salivary glands of Japanese patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1994;37(4):545-550. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147932>. Accessed July 13, 2016.
27. Vernant JC, Buisson G, Magdeleine J, De Thore J, Jouannelle A, Neisson-Vernant C MN. T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis, and Sjögren syndrome. *Lancet.* 1988;1(8578):177. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=T-lymphocyte+alveolitis%2C+tropical+spastic+paresis%2C+and+Sj%C3%B6gren+syndrome.+Lancet>.
28. Mariette X, Zerbib M, Jaccard A, Schenmetzler C, Danon F, Clauvel JP. Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1993;36(2):280-281. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8381650>. Accessed July 13, 2016.
29. Ramos-Casals M, Muñoz S ZP. Hepatitis C virus and Sjögren's syndrome: trigger or mimic? *Rheum Dis Clin North Am.* 2008;34(4):869-884. doi:10.1016/j.rdc.2008.08.007.
30. Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(9):544-556. doi:10.1038/nrrheum.2013.110.
31. Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;56(5):456-469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410795>. Accessed July 13, 2016.
32. Bolstad AI, Jonsson R. Genetic aspects of Sjögren's syndrome. *Arthritis Res.* 2002;4(6):353-359.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453311>. Accessed July 13, 2016.

33. Bolstad AI, Jonsson R. The role of apoptosis in Sjögren's syndrome. *Ann médecine interne*. 1998;149(1):25-29.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11490513>. Accessed July 13, 2016.

34. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum*. 1984;27(2):147-156.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6696772>. Accessed July 13, 2016.

35. Robinson CP, Yamamoto H, Peck AB H-BM. Genetically programmed development of salivary gland abnormalities in the NOD (nonobese diabetic)-scid mouse in the absence of detectable lymphocytic infiltration: a potential trigger for sialoadenitis of NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol* . 1996;79(1):50-59.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Genetically+programmed+development+of+salivary+gland+abnormalities+in+the+NOD+\(nonobese+diabetic\)-scid+mouse+in+the+absence+of+detectable+lymphocytic+infiltration](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Genetically+programmed+development+of+salivary+gland+abnormalities+in+the+NOD+(nonobese+diabetic)-scid+mouse+in+the+absence+of+detectable+lymphocytic+infiltration).

36. Humphreys-Beher MG, Peck AB. New concepts for the development of autoimmune exocrinopathy derived from studies with the NOD mouse model. *Arch Oral Biol*. 1999;44 Suppl 1:S21-S25.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414851>. Accessed July 13, 2016.

37. Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome or autoimmune epithelitis? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007;32(3):199-200.

doi:10.1007/s12016-007-8042-1.

38. Moutsopoulos HM, Kordosis T. Sjögren's syndrome revisited: autoimmune epithelitis. *Br J Rheumatol*. 1996;35(3):204-206.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620292>. Accessed July 13, 2016.

39. Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Functional expression of a costimulatory B7.2 (CD86) protein on human salivary gland epithelial cells that interacts with the CD28 receptor, but has reduced binding to CTLA4. *J Immunol*. 2001;166(5):3107-3113.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207262>. Accessed July 13, 2016.

40. Ittah M, Miceli-Richard C, Eric Gottenberg J-, et al. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):R51. doi:10.1186/ar1912.

41. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg J-E, et al. Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol.* 2008;38(4):1058-1064. doi:10.1002/eji.200738013.

42. Amft N, Curnow SJ, Scheel-Toellner D, et al. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2001;44(11):2633-2641. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710719>. Accessed July 13, 2016.

43. Jonsson R, Gordon TP, Kontinen YT. Recent advances in understanding molecular mechanisms in the pathogenesis and antibody profile of Sjögren's syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2003;5(4):311-316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14531959>. Accessed July 13, 2016.

44. Ogawa N, Ping L, Zhenjun L, Takada Y, Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002;46(10):2730-2741. doi:10.1002/art.10577.

45. Pers J-O, Daridon C, Devauchelle V, et al. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1050:34-39. doi:10.1196/annals.1313.004.

46. Båve U, Alm G V, Rönnblom L. The combination of apoptotic U937 cells and lupus IgG is a potent IFN-alpha inducer. *J Immunol.*

2000;165(6):3519-3526. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975873>.
Accessed July 13, 2016.

47. Båve U, Nordmark G, Lövgren T, et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum*. 2005;52(4):1185-1195. doi:10.1002/art.20998.

48. Båve U, Vallin H, Alm GV RL. Activation of natural interferon-alpha producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines. *J Autoimmun* . 2001;17(1):71-80. doi:10.1006/jaut.2001.0519.

49. Sawalha AH, Potts R, Schmid WR, Scofield RH, Harley JB. The genetics of primary Sjögren's syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2003;5(4):324-332. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14531961>.
Accessed July 13, 2016.

50. Bikker A, van Woerkom JM, Kruize AA, et al. Increased expression of interleukin-7 in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome correlates with increased inflammation. *Arthritis Rheum*. 2010;62(4):969-977. doi:10.1002/art.27318.

51. Bikker A, Moret FM, Kruize AA, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, van Roon JAG. IL-7 drives Th1 and Th17 cytokine production in patients with primary SS despite an increase in CD4 T cells lacking the IL-7R α . *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(6):996-1005. doi:10.1093/rheumatology/ker448.

52. Bikker A, Hack CE, Lafeber FPJG, van Roon JAG. Interleukin-7: a key mediator in T cell-driven autoimmunity, inflammation, and tissue destruction. *Curr Pharm Des*. 2012;18(16):2347-2356. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390698>. Accessed July 13, 2016.

53. Hall JC, Casciola-Rosen L, Berger AE, et al. Precise probes of type II interferon activity define the origin of interferon signatures in target tissues in rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17609-17614. doi:10.1073/pnas.1209724109.

54. Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol*. 2008;181(4):2898-2906. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684981>. Accessed July 14, 2016.
55. Kang KY, Kim H-O, Kwok S-K, et al. Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R179. doi:10.1186/ar3504.
56. Sarigul M, Yazisiz V, Bassorgun CI, et al. The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Lupus*. 2010;19(2):138-145. doi:10.1177/0961203309348234.
57. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos NM MH. Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol* . 2008;173(5):1389-1396. doi:10.2353/ajpath.2008.080246.
58. Tengné P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1998;41(12):2238-2248. doi:10.1002/1529-0131(199812)41:12<2238::AID-ART20>3.0.CO;2-V.
59. García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Rosas J, et al. Primary Sjögren syndrome: clinical and immunologic disease patterns in a cohort of 400 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81(4):270-280. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169882>. Accessed July 24, 2016.
60. Bacman S, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Hubscher O, Arana R, Borda E. Autoantibodies against lacrimal gland M3 muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjögren's syndrome. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci. 1998;39(1):151-156.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430556>. Accessed July 24, 2016.

61. Dawson L, Tobin A, Smith P, Gordon T. Antimuscarinic antibodies in Sjögren's syndrome: where are we, and where are we going? *Arthritis Rheum.* 2005;52(10):2984-2995. doi:10.1002/art.21347.

62. Haneji N, Nakamura T, Takio K, et al. Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science.* 1997;276(5312):604-607. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9110981>. Accessed July 24, 2016.

63. Loch H, Pelck R, Manthorpe R. Diagnostic and prognostic significance of measuring antibodies to alpha-fodrin compared to anti-Ro-52, anti-Ro-60, and anti-La in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 2008;35(5):845-849. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18381788>. Accessed July 24, 2016.

64. Gordon TP, Cavill D, Neufing P, Zhang Y-J, Pietropaolo M. ICA69 autoantibodies in primary Sjögren's syndrome. *Lupus.* 2004;13(6):483-484. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15303579>. Accessed July 24, 2016.

65. Winer S, Astsaturov I, Cheung R, et al. Primary Sjögren's syndrome and deficiency of ICA69. *Lancet.* 2002;360(9339):1063-1069. doi:10.1016/S0140-6736(02)11144-5.

66. Shen L, Suresh L, Lindemann M, Xuan J, Kowal P, Malyavantham K AJJ. Novel autoantibodies in Sjogren's syndrome. *Clin Immunol.* 2012;145(3):251-255. doi:10.1016/j.clim.2012.09.013.

67. Asmussen K, Andersen V, Bendixen G, Schiødt M, Oxholm P. A new model for classification of disease manifestations in primary Sjögren's syndrome: evaluation in a retrospective long-term study. *J Intern Med.* 1996;239(6):475-482. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8656140>. Accessed July 24, 2016.

68. Schiødt M, Christensen LB, Petersen PE, Thorn JJ. Periodontal

disease in primary Sjögren's syndrome. *Oral Dis.* 2001;7(2):106-108.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11355434>. Accessed July 24, 2016.

69. Roguedas AM, Misery L, Sassolas B, Le Masson G, Pennec YL, Youinou P. Cutaneous manifestations of primary Sjögren's syndrome are underestimated. *Clin Exp Rheumatol.* 22(5):632-636.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485020>. Accessed July 24, 2016.

70. Skopouli FN, Papanikolaou S, Malamou-Mitsi V, Papanikolaou N, Moutsopoulos HM. Obstetric and gynaecological profile in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 1994;53(9):569-573. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979594>. Accessed July 24, 2016.

71. Zufferey P, Meyer OC, Grossin M, Kahn MF. Primary Sjögren's syndrome (SS) and malignant lymphoma. A retrospective cohort study of 55 patients with SS. *Scand J Rheumatol.* 1995;24(6):342-345.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8610217>. Accessed July 24, 2016.

72. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med.* 1978;89(6):888-892.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/102228>. Accessed July 24, 2016.

73. Lazarus MN, Robinson D, Mak V, Møller H, Isenberg DA. Incidence of cancer in a cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45(8):1012-1015.
doi:10.1093/rheumatology/kei281.

74. Yoneyama K, Tochigi N, Oikawa A, Shinkai H, Utani A. Primary localized cutaneous nodular amyloidosis in a patient with Sjögren's syndrome: a review of the literature. *J Dermatol.* 2005;32(2):120-123.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15906542>. Accessed July 24, 2016.

75. Lindvall B, Bengtsson A, Ernerudh J, Eriksson P. Subclinical myositis is common in primary Sjögren's syndrome and is not related to muscle pain. *J Rheumatol.* 2002;29(4):717-725.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950012>. Accessed July 24, 2016.

76. Anaya J-M, Tobon GJ, Vega P, Castiblanco J. Autoimmune disease aggregation in families with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 2006;33(11):2227-2234. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17086607>. Accessed July 24, 2016.
77. D'Arbonne F, Ansart S, Le Berre R, Dueymes M, Youinou P, Pennec Y-L. Thyroid dysfunction in primary Sjögren's syndrome: a long-term followup study. *Arthritis Rheum.* 2003;49(6):804-809. doi:10.1002/art.11460.
78. Kurumagawa T, Kobayashi H, Motoyoshi K. Potential involvement of subclinical Sjögren's syndrome in various lung diseases. *Respirology.* 2005;10(1):86-91. doi:10.1111/j.1440-1843.2005.00627.x.
79. Matsuyama N, Ashizawa K, Okimoto T, Kadota J, Amano H, Hayashi K. Pulmonary lesions associated with Sjögren's syndrome: radiographic and CT findings. *Br J Radiol.* 2003;76(912):880-884. doi:10.1259/bjr/18937619.
80. Gyöngyösi M, Pokorny G, Jambrik Z, et al. Cardiac manifestations in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 1996;55(7):450-454. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774163>. Accessed July 24, 2016.
81. Maury CP, Törnroth T, Teppo AM. Atrophic gastritis in Sjögren's syndrome. Morphologic, biochemical, and immunologic findings. *Arthritis Rheum.* 1985;28(4):388-394. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3885959>. Accessed July 24, 2016.
82. Palma R, Freire A, Freitas J, et al. Esophageal motility disorders in patients with Sjögren's syndrome. *Dig Dis Sci.* 1994;39(4):758-761. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8149841>. Accessed July 24, 2016.
83. Ramirez-Mata M, Pena Ancira FF, Alarcon-Segovia D. Abnormal esophageal motility in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 1976;3(1):63-69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1271390>. Accessed July 24, 2016.

84. Kogawa H, Migita K, Ito M, et al. Idiopathic portal hypertension associated with systemic sclerosis and Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol*. 2005;24(5):544-547. doi:10.1007/s10067-005-1084-y.
85. Leppilahti M, Tammela TL, Huhtala H, Kiilholma P, Leppilahti K AA. Interstitial cystitis-like urinary symptoms among patients with Sjögren's syndrome: a population-based study in Finland. *Am J Med*. 2003;115(1):62-65.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Interstitial+cystitis-like+urinary+symptoms+among+patients+with+Sj%C3%B6gren%27s+syndrome%3A+a+population-based+study+in+Finland>.
86. Matsuda M, Hamano H, Yoshida T, et al. Seronegative Sjögren syndrome with asymptomatic autoimmune sclerosing pancreatitis. *Clin Rheumatol*. 2007;26(1):117-119. doi:10.1007/s10067-005-0119-8.
87. Chai J, Herrmann DN, Stanton M, Barbano RL, Logigian EL. Painful small-fiber neuropathy in Sjogren syndrome. *Neurology*. 2005;65(6):925-927. doi:10.1212/01.wnl.0000176034.38198.f9.
88. Mori K, Iijima M, Koike H, et al. The wide spectrum of clinical manifestations in Sjögren's syndrome-associated neuropathy. *Brain*. 2005;128(Pt 11):2518-2534. doi:10.1093/brain/awh605.
89. Alexander EL. Neurologic disease in Sjögren's syndrome: mononuclear inflammatory vasculopathy affecting central/peripheral nervous system and muscle. A clinical review and update of immunopathogenesis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1993;19(4):869-908.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8265827>. Accessed July 24, 2016.
90. Coates T, Slavotinek JP, Rischmueller M, et al. Cerebral white matter lesions in primary Sjögren's syndrome: a controlled study. *J Rheumatol*. 1999;26(6):1301-1305.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381047>. Accessed July 24, 2016.
91. Rabadi MH, Kundi S, Brett D, Padmanabhan R. Neurological pictures. Primary Sjögren syndrome presenting as neuromyelitis optica. *J*

Neurol Neurosurg Psychiatry. 2010;81(2):213-214.
doi:10.1136/jnnp.2009.183913.

92. Rossi R VSM. Subacute aseptic meningitis as neurological manifestation of primary Sjögren's syndrome. *Clin Neurol Neurosurg*. 2006;108(7):688-691. doi:10.1016/j.clineuro.2005.05.015.

93. Venegas Fanchke P, Sinning M MM. Primary Sjogren's syndrome presenting as a generalized chorea. *Park Relat Disord* . 2005;11(3):193-194. doi:10.1016/j.parkreldis.2004.10.006.

94. Hietaharju A, Yli-Kerttula U, Häkkinen V, Frey H. Nervous system manifestations in Sjögren's syndrome. *Acta Neurol Scand*. 1990;81(2):144-152. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2327235>. Accessed July 24, 2016.

95. Valtýsdóttir ST, Gudbjörnsson B, Lindqvist U, Hällgren R, Hetta J. Anxiety and depression in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2000;27(1):165-169. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648034>. Accessed July 24, 2016.

96. Tapinos NI, Polihronis M, Moutsopoulos HM. Lymphoma development in Sjögren's syndrome: novel p53 mutations. *Arthritis Rheum*. 1999;42(7):1466-1472. doi:10.1002/1529-0131(199907)42:7<1466::AID-ANR21>3.0.CO;2-L.

97. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15(2):202-205. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3361530>. Accessed July 24, 2016.

98. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum*. 2008;58(1):15-25. doi:10.1002/art.23177.

99. Steen VD, Oddis C V, Conte CG, Janoski J, Casterline GZ, Medsger TA. Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County,

Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982. *Arthritis Rheum.* 1997;40(3):441-445.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082931>. Accessed July 24, 2016.

100. Peterson LS, Nelson AM, Su WP, Mason T, O'Fallon WM, Gabriel SE. The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted County 1960-1993. *J Rheumatol.* 1997;24(1):73-80.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002014>. Accessed July 24, 2016.

101. Sato H, Lagan AL, Alexopoulou C, et al. The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere antibody positivity in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):558-564. doi:10.1002/art.20065.

102. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, et al. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet (London, England).* 1998;351(9102):559-562. doi:10.1016/S0140-6736(97)08357-8.

103. Lynch CJ, Singh G, Whiteside TL, Rodnan GP, Medsger TA, Rabin BS. Histocompatibility antigens in progressive systemic sclerosis (PSS; scleroderma). *J Clin Immunol.* 1982;2(4):314-318.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6982903>. Accessed July 24, 2016.

104. Briggs D, Stephens C, Vaughan R, Welsh K, Black C. A molecular and serologic analysis of the major histocompatibility complex and complement component C4 in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.*

1993;36(7):943-954. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8318041>.

Accessed July 24, 2016.

105. Tan FK, Stivers DN, Foster MW, et al. Association of microsatellite markers near the fibrillin 1 gene on human chromosome 15q with scleroderma in a Native American population. *Arthritis Rheum.*

1998;41(10):1729-1737. doi:10.1002/1529-0131(199810)41:10<1729::AID-ART5>3.0.CO;2-8.

106. Ferri C, Zakrzewska K, Longombardo G, et al. Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol.*

17(6):718-720. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10609071>. Accessed

July 24, 2016.

107. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol*. 2000;12(6):520-526.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092202>. Accessed July 24, 2016.

108. Tuffanelli DL. Localized scleroderma. *Semin Cutan Med Surg*. 1998;17(1):27-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9512104>. Accessed July 24, 2016.

109. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol*. 1995;12(2-4):187-199.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650421>. Accessed July 24, 2016.

110. Gabrielli A, Avvedimento E V, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009;360(19):1989-2003. doi:10.1056/NEJMra0806188.

111. Fleischmajer R, Perlish JS. Capillary alterations in scleroderma. *J Am Acad Dermatol*. 1980;2(2):161-170.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7364973>. Accessed July 24, 2016.

112. Fleming JN, Nash RA, McLeod DO, et al. Capillary regeneration in scleroderma: stem cell therapy reverses phenotype? *PLoS One*. 2008;3(1):e1452. doi:10.1371/journal.pone.0001452.

113. Distler O, Distler JHW, Scheid A, et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res*. 2004;95(1):109-116. doi:10.1161/01.RES.0000134644.89917.96.

114. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18(7):816-827. doi:10.1096/fj.03-1273rev.

115. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C TM. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol*. 1998;110(1):47-51. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00073.x.

116. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12319-12324. doi:10.1073/pnas.1635114100.
117. Leask A, Abraham DJ. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol*. 2003;81(6):355-363. doi:10.1139/o03-069.
118. Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, et al. Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2007;56(1):334-344. doi:10.1002/art.22328.
119. Steen VD. The many faces of scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(1):1-15. doi:10.1016/j.rdc.2007.12.001.
120. Magro L, Catteau B, Coiteux V, Bruno B, Jouet J-P, Yakoub-Agha I. Efficacy of imatinib mesylate in the treatment of refractory sclerodermatous chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(11):757-760. doi:10.1038/bmt.2008.252.
121. Blocka KL, Bassett LW, Furst DE, Clements PJ, Paulus HE. The arthropathy of advanced progressive systemic sclerosis. A radiographic survey. *Arthritis Rheum*. 1981;24(7):874-884. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7259799>. Accessed July 24, 2016.
122. Medsger TA, Rodnan GP, Moossy J, Vester JW. Skeletal muscle involvement in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1968;11(4):554-568. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5676926>. Accessed July 24, 2016.
123. Eversole LR, Jacobsen PL, Stone CE. Oral and gingival changes in systemic sclerosis (scleroderma). *J Periodontol*. 1984;55(3):175-178. doi:10.1902/jop.1984.55.3.175.
124. Rout PG, Hamburger J, Potts AJ. Orofacial radiological manifestations of systemic sclerosis. *Dentomaxillofac Radiol*. 1996;25(4):193-

196. doi:10.1259/dmfr.25.4.9084272.

125. Wood RE, Lee P. Analysis of the oral manifestations of systemic sclerosis (scleroderma). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;65(2):172-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3422721>. Accessed July 24, 2016.

126. Rasker JJ, Jayson MI, Jones DE, et al. Sjögren's syndrome in systemic sclerosis. A clinical study of 26 patients. *Scand J Rheumatol.* 1990;19(1):57-65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2309104>. Accessed July 24, 2016.

127. Avouac J, Sordet C, Depinay C, et al. Systemic sclerosis-associated Sjögren's syndrome and relationship to the limited cutaneous subtype: results of a prospective study of sicca syndrome in 133 consecutive patients. *Arthritis Rheum.* 2006;54(7):2243-2249. doi:10.1002/art.21922.

128. Rothfield NF, Rodnan GP. Serum antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1968;11(5):607-617. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4176069>. Accessed July 24, 2016.

129. Yang Q, Guan K-L. Expanding mTOR signaling. *Cell Res.* 2007;17(8):666-681. doi:10.1038/cr.2007.64.

130. Huang S HP. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(4):371-377. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Targeting+mTOR+signaling+for+cancer+therapy+huang+2003>.

131. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS SD. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell.* 2009;137(5):873-886. doi:10.1016/j.cell.2009.03.046.

132. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J YK. Raptor, a binding partner of target of rapamycin

(TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002;110(2):177-189.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Raptor%2C+a+binding+partner+of+target+of+rapamycin+\(TOR\)%2C+mediates+TOR+action](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Raptor%2C+a+binding+partner+of+target+of+rapamycin+(TOR)%2C+mediates+TOR+action).

133. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P SD. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-175.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=mTOR+interacts+with+raptor+to+form+a+nutrient-sensitive+complex+that+signals+to+the+cell+growth+machinery>.

134. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*. 2006;11(6):859-871. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007.

135. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*. 2007;25(6):903-915. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.003.

136. Vander Haar E, Lee S-I, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*. 2007;9(3):316-323. doi:10.1038/ncb1547.

137. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*. 2006;16(18):1865-1870. doi:10.1016/j.cub.2006.08.001.

138. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, et al. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell*. 2006;127(1):125-137. doi:10.1016/j.cell.2006.08.033.

139. Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, et al. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep*. 2015;12(6):937-943. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.016.

140. Limon JJ, Fruman DA. Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Front Immunol.* 2012;3:228. doi:10.3389/fimmu.2012.00228.
141. Saci A, Cantley LC, Carpenter CL. Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol Cell.* 2011;42(1):50-61. doi:10.1016/j.molcel.2011.03.017.
142. Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature.* 2005;433(7025):477-480. doi:10.1038/nature03205.
143. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaerberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature.* 2013;493(7432):338-345. doi:10.1038/nature11861.
144. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1509-1518. doi:10.1038/sj.cdd.4401751.
145. Kim Y-M, Park J-M, Grunwald D, Kim D-H. An expanded role for mTORC1 in autophagy. *Mol Cell Oncol.* 2016;3(1):e1010958. doi:10.1080/23723556.2015.1010958.
146. Kim JE, Chen J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes.* 2004;53(11):2748-2756. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504954>. Accessed July 24, 2016.
147. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 2008;8(3):224-236. doi:10.1016/j.cmet.2008.07.007.
148. Li S, Oh Y-T, Yue P, Khuri FR, Sun S-Y. Inhibition of mTOR complex 2 induces GSK3/FBXW7-dependent degradation of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) and suppresses lipogenesis in cancer cells. *Oncogene.* 2016;35(5):642-650. doi:10.1038/onc.2015.123.

149. Schieke SM, Phillips D, McCoy JP, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem.* 2006;281(37):27643-27652. doi:10.1074/jbc.M603536200.
150. Chen C, Liu Y, Liu R, et al. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med.* 2008;205(10):2397-2408. doi:10.1084/jem.20081297.
151. Bentzinger CF, Romanino K, Cloëtta D, et al. Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab.* 2008;8(5):411-424. doi:10.1016/j.cmet.2008.10.002.
152. Gedaly R. mTOR Signaling in Regulatory T Cell Differentiation and Expansion. *SOJ Immunol.* 2015;3(1). doi:10.15226/soji/3/1/00122.
153. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):324-337. doi:10.1038/nri2546.
154. Yang K, Chi H. Tuning mTOR activity for immune balance. *J Clin Invest.* 2013;123(12):5001-5004. doi:10.1172/JCI73202.
155. Camps M, Rückle T, Ji H, et al. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2005;11(9):936-943. doi:10.1038/nm1284.
156. Wang X, Yue P, Chan C-B, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Mnk-mediated eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2007;27(21):7405-7413. doi:10.1128/MCB.00760-07.
157. Harding JJ, Abou-Alfa GK. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *Chinese Clin Oncol.* 2013;2(4):37.

doi:10.3978/j.issn.2304-3865.2013.07.06.

158. Hardie DG, Akman HO, Sampayo JN, et al. AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress. *Cell Metab.* 2007;6(5):339-340.

doi:10.1016/j.cmet.2007.10.001.

159. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.*

2003;17(15):1829-1834. doi:10.1101/gad.1110003.

160. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer.*

2008;8(11):851-864. doi:10.1038/nrc2501.

161. Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem.* 2003;278(32):29655-29660.

doi:10.1074/jbc.M212770200.

162. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell.* 2006;21(4):521-531. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.010.

doi:10.1016/j.molcel.2006.01.010.

163. Bernardi R, Guernah I, Jin D, et al. PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature.*

2006;442(7104):779-785. doi:10.1038/nature05029.

164. DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* 2008;22(2):239-251.

doi:10.1101/gad.1617608.

165. Li W, Petrimpol M, Molle KD, Hall MN, Battegay EJ, Humar R. Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2. *Circ Res.* 2007;100(1):79-87.

doi:10.1161/01.RES.0000253094.03023.3f.

166. Guertin DA, Sabatini DM, Ackah E, et al. Defining the Role of

mTOR in Cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(1):9-22.
doi:10.1016/j.ccr.2007.05.008.

167. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009;136(3):521-534.
doi:10.1016/j.cell.2008.11.044.

168. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*. 2008;320(5882):1496-1501. doi:10.1126/science.1157535.

169. Roccaro AM, Sacco A, Hsu EN, et al. Dual targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway as an antitumor strategy in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2010;115(3):559-569. doi:10.1182/blood-2009-07-235747.

170. Assinder SJ, Dong Q, Kovacevic Z, Richardson DR. The TGF-beta, PI3K/Akt and PTEN pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer. *Biochem J*. 2009;417(2):411-421.
doi:10.1042/BJ20081610.

171. Heit B, Robbins SM, Downey CM, et al. PTEN functions to “prioritize” chemotactic cues and prevent “distraction” in migrating neutrophils. *Nat Immunol*. 2008;9(7):743-752. doi:10.1038/ni.1623.

172. Blüml S, Sahin E, Saferding V, et al. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) in antigen-presenting cells controls Th17-mediated autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:230. doi:10.1186/s13075-015-0742-y.

173. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156-172. doi:10.1038/cr.2009.5.

174. Lamouille S, Connolly E, Smyth JW, Akhurst RJ, Derynck R. TGF-β-induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 5):1259-1273.
doi:10.1242/jcs.095299.

175. Zhang L, Zhou F ten DP. Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends Biochem Sci* . 2013;38(12):612-620. doi:10.1016/j.tibs.2013.10.001.
176. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(23):8204-8209. doi:10.1073/pnas.0502857102.
177. Lee D-F, Kuo H-P, Chen C-T, et al. IKKbeta suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance. *Int J Mol Med*. 2008;22(5):633-638. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949383>. Accessed July 24, 2016.
178. Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Pathol*. 1968;21(5):656-660. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5697370>. Accessed July 24, 2016.
179. Sülen Sarioğlu FC. *Baş Boyun Patolojisi*. 1th ed. (Sülen Sarioğlu, ed.); 2014. <http://www.cukurovanobel.com/bas-boyun-patolojisiibrbrprofdrsulen-sarioglu>.
180. Mutee AF, Kaur G, Kumar G, et al. Immunohistochemical Evaluation of mTOR and Beclin-1 Protein Expression in Human Breast Cancer and Adjacent Normal Tissues, A Study in Malaysian Patients. *Open Pathol J*. 2009;3:111-117.
181. Sakr RA, Barbashina V, Morrogh M, et al. Protocol for PTEN expression by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded human breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(4):371-374. doi:10.1097/PAI.0b013e3181d50bd5.
182. Xie S, Macedo P, Hew M, Nassenstein C, Lee K-Y, Chung KF. Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in chronic idiopathic cough. *Respir Res*. 2009;10:40. doi:10.1186/1465-9921-10-40.
183. Shah M, Edman MC, Janga SR, et al. A rapamycin-binding protein polymer nanoparticle shows potent therapeutic activity in suppressing

autoimmune dacryoadenitis in a mouse model of Sjögren's syndrome. *J Control Release*. 2013;171(3):269-279. doi:10.1016/j.jconrel.2013.07.016.

184. Kenneth Maiese. *Molecules to Medicine with mTOR: Translating Critical Pathways into Novel Therapeutic Strategies*. 1th ed. (Kenneth Maiese, ed.). Academic Press; 2016.
<http://store.elsevier.com/Molecules-to-Medicine-with-mTOR/isbn-9780128027332/>.

185. Assinder SJ, Dong Q, Kovacevic Z, et al. The TGF- β , PI3K/Akt and PTEN pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer. *Biochem J*. 2009;417(2):499-518.
doi:10.1042/bj20081610.

186. Assinder SJ, Dong Q, Kovacevic Z, Richardson DR. The TGF-beta, PI3K/Akt and PTEN pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer. *Biochem J*. 2009;417(2):411-421.
doi:10.1042/BJ20081610.

