MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RATLARDA BLEOMİSİN İLE İNDÜKLENMİŞ AKCİĞER FİBROZİSİNE TOFACİTİNİB ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. İBRAHİM SOYLU

DANIŞMAN

PROF. DR. SELİM NALBANT

İSTANBUL-2022

MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

RATLARDA BLEOMİSİN İLE İNDÜKLENMİŞ AKCİĞER FİBROZİSİNE TOFASİTİNİB ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. İBRAHİM SOYLU

DANIŞMAN

PROF. DR. SELİM NALBANT

İSTANBUL-2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, tecrübe ve yardımlarıyla yol gösteren, her zaman desteğini hissettiğim; hekim, yönetici ve eğitimci olarak bir rol model olan tez danışmanım çok değerli hocam Prof. Dr. Selim NALBANT ‘a ; Tezimin hazırlık ve çalışma aşamalarında emeğini ve desteğini esirgemeyen, Prof. Dr. Şükrü YILDIRIM‘a , Çalışmayı deney aşamasında birlikte yürüttüğümüz, yardımları ile her zaman yanımda olan Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ekibine; Moleküler analiz ve incelemeyi birlikte yürüttüğümüz Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi müdürü Prof. Dr. Ranan Gülhan Aktaş ve Moleküler tıp Doktor Öğretim üyesi Dr. Zeynep Akbulut ‘a, Patolojik inceleme sırasında yardımlarını esirgemeyen Memorial Patoloji Laboratuvarı doktoru Prof. Dr. Yıldırım KARSLIOĞLUNA Yaşamımın her anında desteğini esirgemeyen eşim Elçim SOYLU ‘ya, Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığım, tüm asistan doktor arkadaşlarıma, sağlık personellerine;
TEŞEKKÜR EDERİM Dr. İbrahim SOYLU İstanbul - 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....i
ŞEMA LİSTESİ.....iii
TABLO LİSTESİ.....iv
RESİM LİSTESİ.....v
KISALTMA LİSTESİ.....v
ÖZET.....viii
ABSTRACT.....x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....1
1.1. İdiopatik Pulmoner Fibrozis.....1
1.2. Bleomisin……...……4
1.3. Tofasitinib……...5
2. PATOFİZYOLOJİK TEORİLER 5
2.1. İnterstisyel Akciğer Hastalığı.....5
2.2. İnterstsiyel Hasarda Rol Alan Sitokinler.....7
2.3. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) ……..12
2.4. Janus Kinaz Mekanizması……13
2.5. Tofasitinib Etki Mekanizması ……..16
3. GEREÇ VE YÖNTEM ……...17
3.1 Evren ve Örneklem ……17
3.2 Verilerin Toplanması ……19
3.3 Veri Toplama Araçları ……...19
3.3.1 Kan serumundan sitokinlerin çalışılması ……...19
3.3.2 Akciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi ……...24
3.4 Verilerin İstatistiksel Analizi.....29
4. BULGULAR ……..... 31
5. TARTIŞMA
…….....39
6. SONUÇ …….....43
7. KAYNAKLAR ……..... 44

ŞEKİL LİSTESİ

Şema 1 : Deney grupları,gruplardaki rat sayısı ve yüzdesi.....18
Şema 2: Deneysel Taslak 19

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Ölçüm Parametrelerinin Dağılımı.....29

Tablo 2: Bireylerin Aerodinamik ve Ses Handikap İndeksi 29
(SHİ-10) Skorlarına İlişkin Normallik Testi

Tablo 3: Deney Gruplarına Göre Ölçüm Değerlerinin Dağılımı……..30

Tablo 4: KL-6 ile İnterlökin Değerleri Arasındaki
İlişkinin Değerlendirilmesi.....32

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Akciğer Orjinal Kesiti 25
Resim 2: Akciğer Orjinal 8 bit resim.....26
Resim 3: Thresholded Image for Total Area Measurement.....26
Resim 4: Color Deconvoluted Image for Fibrosis.....27
Resim 5: Thresholded Connective Tissue Area.....27
Resim 6 : Binary Image of Segmented Connective Tissue.....28

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Deney Gruplarına Göre Toplam Doku Alanı Dağılımı
Grafik 2: Deney Gruplarına Göre Bağ Doku Alanı Dağılımı
Grafik 3: Deney Gruplarına Göre Bağ Doku Oranı Dağılımı
Grafik 4: Deney Gruplarına Göre Interlökin-6 Ölçümlerinin Dağılımı
Grafik 5: Deney Gruplarına Göre Interlökin-10 Ölçümlerinin Dağılımı
Grafik 6: Deney Gruplarına Göre Interlökin-13 Ölçümlerinin Dağılımı
Grafik 7: Deney Gruplarına Göre Interlökin-17 Ölçümlerinin Dağılımı
Grafik 8: Deney Gruplarına Göre KL-6 Ölçümlerinin Dağılımı

KISALTMALAR

İAH:.....İnterstisyel Akciğer Hastalığı

İİAH:.....İdiopatik interstisyel Akciğer Hastalıkları

İPF:.....İdiopatik Pulmoner Fibrozis

RA:.....Romatoid artrit

SLE:.....Sistemik Lupu Eritematozus

SSc:.....Sistemik Skleroderma

PM/DM:.....Polimyozit, Dermatomyozit

RF:.....Romatoid faktör

Anti-CCP:.....Anti-sitrüline peptit

DMARD:.....Hastalık Modifiye Edici Antiromatizmal ilaç

JAK :.....Janus-Kinaz

BLM:.....Bleomisin

IL-6:.....İnterlökin- 6

IL-17:.....İnterlökin- 17

IL-13 :.....İnterlökin- 13

TH1 :.....T Helper 1

IFN-gama: …….İnterferon gama

TGF-beta : …… Trombosit Growth Faktör Beta

KOAH : …….. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

JAK/STAT : …… ……. Janus protein kinaz-sinyal transdüktörü ve transkripsiyon aktivatörü

MHC : …… Major histocompatibility complex

HRCT : ……Yüksek Çözünürlüklü Bilgisayarlı Tomografi,

SFT : ……Solunum fonksiyon testleri

KL-6 :..... Krebs von den Lungen

DLCO :..... Difüzyon Kapasitesi

FVC :..... Zorlu Vital Kapasite

DAS28:..... Hastalık Aktivite Skoru

ÖZET

Giriş ve Amaç : Romatolojik hastalıklarla ilişkili olarak meydana gelen ve hayat kalitesini etkileyen en ciddi patolojilerden birisi interstisyel akciğer hastalığıdır. İnterstisyel akciğer hastalığı romatolojik hastalıklara bağlı olarak hastalığın evresine , mevcut tedaviye bağlı olarak farklı histolojik paternler içerebilir. Akciğer fibrozisi gelişmiş İAH lı olgularda romatolojik hastalık gelişme oranları cinsiyetler arasında anlamlı farklılık göstermemektedir. Ancak romatolojik hastalığa sekonder İAH gelişiminin cinsiyetlere göre dağılımında farklar mevcuttur. Romatolojik hastalığı olan erkeklerde İAH gelişme riski kadınlara oranla üç kat daha fazladır. RA, SSc gibi hastalıklarda en sık tutulum gösteren ekstra artiküler organ akciğerdir. Altta yatan hastalığın neden olduğu immünolojik hadiseler akciğerde hasara neden olur ve bu olaylar İAH için genel olarak başlangıç teşkil eder. Mevcut DMARD ajanların İAH gelişimini önlemesi üzerine net veriler elde edilebilmiş değildir. Ancak son dönemde Janus-Kinaz (JAK) inhibitörlerinin akciğerde meydana gelene interstisyel hasarları önleyebildiği yönünde yayınlar mevcuttur. Bu konuda net bir patofizyolojik mekanizmasının ortaya konulması ve tedavi algoritması geliştirilmesi hastalığın kontrol ve yönetimi kolaylaştırabilecektir

Gereç ve Yöntem: Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (MÜDEHAM)'da daha önceden yetiştirilen yaklaşık 200-250 gr ağırlığında, erkek , 27 adet Spraque-Dawley albino rat çalışmada kullanıldı. Ratlar genel anestezi altında intrakardiyak kan alma tekniği ile sakrifiye edildi. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji laboratuvarında ve Memorial Patoloji Laboratuvarında örneklerin akciğer dokuları patolojik olarak incelendi ve İmageJ programı ile bağ doku alanları ve oranları belirlendi. Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi'nde deneklerden alınan kan örneklerinde IL-6, IL-10,IL-13, IL-17, KL-6 düzeyleri ölçüldü.

İstatiksel Analiz: Çalışma kapsamında toplanan veriler IBM Sosyal Bilimler için veri analizi programı paket versiyon 23.0 ile analiz edildi. Sürekli veriler için ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum tanımlayıcı değer olarak verildi. Normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi.

Gruplar arası karşılaştırmalarda, “ANOVA Testi”, gruplar arasında anlamlı farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Post-Hoc “Bonferroni Testi” kullanıldı. Ölçüm değerleri arasındaki ilişkiler “Pearson Korelasyon Testi” ile değerlendirildi. Sonuçlar, p değerinin 0,05’ten küçük olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular : Çalışmaya 23 adet erkek cinsiyette *Wistar Albino rat* alındı. Kontrol grubu dışındaki gruplarda bleomisin aracılığı ile fibrozis gelişimi sağlandı. A1 ve A2 grupları tofasitinib ile tedavi edildi. Bağ dokusu alanı ve bağ dokusu oranı ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur . Çalışma kapsamındaki deneklerin KL-6 ölçümleri ile interlökin ölçümleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Toplam doku alanı dağılımları A1 grubunun en yüksek, A2 grubunun ise en düşük olduğu görülmektedir. Deney gruplarının interlökin-6 ölçümleri A1 grubunun en düşük olduğu görüldü. İnterlökin-10 ölçümleri A2 grubunun interlökin-10 ölçümlerinin en yüksek, A1 grubunun ise en düşük olduğu görüldü. İnterlökin-13 ölçümlerinin en yüksek, kontrol grubunun ise en düşük ölçüldü. İnterlökin-17 ölçümlerinin en yüksek A2 grubunda ölçüldü. A1 grubunun KL-6 seviyesi en yüksek saptandı.

Tartışma ve Sonuç: Tofasitinib profilaktik olarak uygulanan denekler de bağ doku gelişimi daha az saptanmıştır. Ayrıca yine bu grupta proinflamatuar sitokin IL-6 seviyesi düşük saptanmıştır. Kontra inflamatuar bir sitokin olan IL-10 seviyeleri de daha yüksek ölçüldü. Tofasitinib in romatolojik hastalıklarda meydana gelen interstisyel akciğer hastalığı gelişiminde koruyucu etkisi olabileceği düşünüldü. Sonuç olarak tofasitinib romatolojik hastalıklarda hastalıklara bağlı artiküler semptomlarla birlikte interstisyel hasara yönelik koruyucu olabilir. Mevcut bulgular daha büyük çalışmalarla da desteklenmelidir.

Anahtar Kelime: İnterstisyel akciğer hastalığı, Tofasitinib, JAK/STAT, Romatoid Artrit,Sistemik Skleroderma

ABSTRACT

Aim: Interstitial lung disease is one of the most serious pathologies associated with rheumatic diseases and affecting quality of life. Interstitial lung disease may have different histological patterns depending on the stage of the disease, the treatment available, depending on the rheumatological diseases. The rates of rheumatologic disease development in ILD patients with lung fibrosis do not differ significantly between genders. However, there are differences in the distribution of the development of ILD secondary to rheumatologic disease by gender. Men with rheumatic diseases are three times more likely to develop ILD than women. The most frequently involved extra-articular organ in diseases such as RA and SSc is the lung. Immunological events caused by the underlying disease cause lung damage and these events are generally the beginning of ILD. There are no clear data on the current DMARD agents preventing the development of ILD. However, there are recent reports that Janus-Kinase (JAK) inhibitors can prevent interstitial damage to the lung. In this regard, revealing a clear pathophysiological mechanism and developing a treatment algorithm will facilitate the control and management of the disease.

Material and Method: Twenty-three male Spraque-Dawley albino rats, weighing approximately 200-250 g, previously bred in Maltepe University Experimental Animals Application and Research Center (MÜDEHAM) were used in the study. Rats were sacrificed by intracardiac blood collection technique under general anesthesia. Lung tissues of the samples were pathologically examined in the Pathology laboratory of Maltepe University Medical Faculty Hospital and Memorial Pathology Laboratory, and connective tissue areas and ratios were determined with the ImageJ program. IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, KL-6 levels were measured in blood samples taken from the subjects at Maltepe University Cancer and Stem Cell Research Center.

Statistical Analysis: The data collected within the scope of the study were analyzed with the IBM data analysis program package version 23.0 for Social Sciences. For continuous data, mean, standard deviation, median, minimum and maximum descriptive values were given. Normality assumption was evaluated with the Shapiro-Wilk test.

In comparisons between groups, the "ANOVA Test" was used, and the Post-Hoc "Bonferroni Test" was used to determine which group caused the significant difference between the groups. The relationships between the measurement values were evaluated with the “Pearson Correlation Test”. The results were considered statistically significant when the p value was less than 0,05.

Result: Twenty-three male Wistar Albino rats were included in the study. Fibrosis development was achieved by means of bleomycin in groups other than the control group. Groups A1 and A2 were treated with tofacitinib. A statistically significant difference was found between the groups in the measurements of connective tissue area and connective tissue ratio. It was determined that there was no statistically significant relationship between KL-6 measurements and interleukin measurements of the subjects within the scope of the study ($p>0.05$). It is seen that the total tissue area distributions are the highest in the A1 group and the lowest in the A2 group. Interleukin-6 measurements of the experimental groups were the lowest in the A1 group. Interleukin-10 measurements It was seen that the interleukin-10 measurements of the A2 group were the highest, while the A1 group was the lowest. Interleukin-13 measurements were the highest and the control group had the lowest. Interleukin-17 measurements were highest in the A2 group. The KL-6 level of the A1 group was the highest.

Conclusion: Connective tissue development was found to be less in subjects treated with tofacitinib prophylactically. In addition, the proinflammatory cytokine IL-6 level was found to be low in this group. Levels of IL-10, a contra-inflammatory cytokine, were also measured higher. It was thought that tofacitinib may have a protective effect on the development of interstitial lung disease in rheumatological diseases. In conclusion, tofacitinib may be protective against interstitial damage in rheumatologic diseases with disease-related articular symptoms. Existing findings should also be supported by larger studies.

Key Words: Interstitial lung disease, Tofacitinib, JAK/STAT, Rheumatoid Arthritis, Systemic Scleroderma

RATLARDA BLEOMİSİN İLE İNDÜKLENMİŞ AKCİĞER FİBROZİSİNE TOFASİTİNİB ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. İdiopatik Pulmoner Fibrozis

İnterstisyel akciğer hastalığı(İAH), akciğer parankim dokusunun bir kısmının veya tamamının etkilenmesi ile oluşan histopatolojik bir hastalıktır. İAH ilişkili mortalite ve morbidite oranları önemli toplumsal sorunlar oluşturmaktadır. İAH farklı etyolojilere sahşp hastalıklara sekonder meydana gelen hastalık grubunun ortak başlığıdır. Bu grupta yer alan bazı hastalıklar : Mesleki Hastalıklara ilişkin İAH; Kollajen-vasküler Hastalıklarla ilişkili İAH, Granülomlarla seyirli İAH, Kalıtsal hastalıklar ile ilişkili İAH, İlaç ilişkili İAH ve İdiopatik İAH dir. İİAH lı olgular içinde en sık görülen hastalık İdiopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) dir.[1,2]

İPF ile ilişkili mortalite ve morbidite oranları yüksektir. İPF gelişiminde rolü olan sebepler ; genetik, çevresel etkilerle birlikte anormal immünolojik yanıtı takip eden fibrotik bir kaskadın olduğudur. İPF insidansına ilişkin veriler incelendiğinde ABD merkezli veriler: 2000 sonrasını içeren 17 yıllık bir çalışmada ölüm oranlarının: 2000 yılların başında 100.000'de 18,81 iken 2017 de 20,66'ya ulaştığı gözlemlemiştir. Hastalığın görülme sıklığı yaşla paralel olarak artmaktadır. İmmünolik bozukluklara bağlı görülen romatolojık hastalıklarda uzun dönemde sıklıkla gözlenir. Aynı romatolojik hastalığa sahip olan kadın ve erkekler arasında; erkekler de hastalığın görülme riski kadınlara oranla üç kat daha fazladır.[1,3]

Yaş, mevcut enfeksiyon varlığı, cinsiyet, çevresel faktörler, altta yatan romatizmal hastalıklar vb. sebeplere bağlı olarak akciğer dokusunda hasar meydana gelmektedir. Endotel hasarının hücresel onarımı sürecinde; travma sonrası kas veya cilt dokusunda meydana gelen fibröz yapılara benzer biçimde akciğer endotelyal alanda tip II epitelyal

hücreler, alveolar makrofajlar, fibroblastlar tarafından fibrotik doku onarımı meydana getirilmektedir. IPF nin moleküler, genetik, inflamatuar yönlerini aydınlatmaya yönelik olarak farklı sayıda değişik çalışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalarda fibrozisten sorumlu mekanizmanın *MUC5B, ECT2 (Epitelyal hücre dönüştürücü faktör 2)* gibi genetik bozukluklar nedeniyle gerçekleştiği belirtilmektedir. Ayrıca genetik mutasyon saptanmayan olgularda da anormal inflamatuar yanıta bağlı, makrofajlar ve sitokinler aracılığıyla fibrozis gelişimi görülebilir. Fibröz doku akciğerde endotelyal alanda yer alan vasküler, parankim, alveoller, plevra dahil olmak üzere tüm akciğer dokusundan gözlenebilir. [2,3,8]

Romatolojik hastalık alt gruplarında: Romatoid artrit(RA), Sistemik Lupus Eritematozus (SLE), Sistemik Skleroderma (SSc), Polimiyozit/Dermatomiyozit (PM/DM)… gibi hastalıklarda uzun dönemde sıklıkla İAH gözlenmektedir. Romatolojik hastalıklarla ilişkili olarak meydana gelen ve hayat kalitesini etkileyen en ciddi patolojilerden birisi interstisyel akciğer hastalığıdır. İnterstisyel akciğer hastalığı RA, SLE, SSc gibi hastalıklara bağlı olarak hastalığın evresine , hali hazırda kullanmış olduğu olduğu tedaviye, tedavinin yanıtına bağlı olarak farklı histolojik paternler içerebilir. Romatolojik hastalık tanısı mevcut hasta gruplarında İAH varlığının saptanması ve ciddiyenin tespit edilmesinde bazı zorluklar vardır. Ayrıca mevcut hastalığa sekonder gelişmiş ileri evre İAH varlığı, hastalarda önemli bir mortal sorun teşkil eder. Erken dönem İAH varlığı skleroderma gibi hastalarda hastalığın ilk bulgusu olabileceği üzerinde durulmaktadır. Romatolojik sebeplere sekonder İAH gelişimi genellikle ilerleyen yaşlarda daha sık geliştiği gösterilmiştir. Diyabet, serebrovasküler olaylar, osteoporotik komplikasyonlar (kırık vb.) obezite ve diğer kronik hastalıklar, ileri hasta yaşı, hastaların hareket kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır. Azalmış hareket kapasitesi ile ilişkili olarak nefes darlığı, oksijen açlığı gibi sorunların çok az yaşanması İAH ın erken evrelerde tanınmasını engelleyen sebeplerden bazılarıdır.[2,3,6,7]
Çalışmamızda özellikli olarak üzerinde duracağımız konu romatolojik hastalıklar (RA, SLE, SSc, PM/DM vb) ile ilişkili İAH saptanması ve tedavisi için seçenekler sunabilmektir.

İAH ve Romatolojık hastaların demografik özelliklerinde önemli benzerlikler vardır. Akciğer fibrozisi gelişmiş İAH lı olgularda romatolojik hastalık gelişme oranları cinsiyetler arasında anlamlı farklılık göstermemektedir. Ancak romatolojik hastalığa sekonder İAH

gelişiminin cinsiyetlere göre dağılımında farklar mevcuttur. Romatolojik hastalığı olan erkeklerde İAH gelişme riski kadınlara oranla üç kat daha fazladır. RA, SLE ve diğer bağ dokusu hastalıklarında İAH varlığının saptanmasında veya yeni tanı konulmasında bazı güçlükler mevcuttur. Bu güçlükler insidans ve prevalans gibi verilerin sağlıklı bir şekilde oluşturulmasında engel teşkil etmektedir. Kesin bir tarama yönteminin olmaması, var olan tarama yöntemleri konusunda fikir birliği oluşmaması, klinik semptomların İAH varlığını tam olarak ortaya koyamaması istatiksel olarak kayıtların tutulmasında ki bazı zorluklardır.[1,3,6,7]

RA, SSc gibi hastalıklarda en sık tutulum gösteren ekstra artiküler organ akciğerdir. Altta yatan hastalığın neden olduğu immünolojik hadiseler akciğerde hasara neden olur ve bu olaylar İAH için genel olarak başlangıç teşkil eder. Herhangi bir romatolojik hastalık paternine sahip hastaların, hastalığın hangi aşamasında İAH gelişmekte olduğuna dair sorusunun cevabı henüz net olarak verilememektedir. RA ve SSc gibi hastalıklarda İAH gelişme oranları diğer bağ doku hastalıklarına oranla daha yüksektir. Bazı hastalarda romatolojik hastalık tanısı aldıkları sırada İAH gelişmiş olduğu saptanmıştır. Beş yıldan uzun süredir RA ve bazı bağ doku hastalığı olan olgularda İAH varlığı çok yüksek oranlarda gözlenmektedir. RA ve SSc gibi olgularda akciğer hasarı eklem tutulumları başlamadan hastalığa sekonder gelişen ilk bulgu olabilir. [7,8,9]

Bazı araştırmalardan elde edilen veriler, RA lı olguların %10 unda İAH geliştiğini göstermiştir. PM/DM, SSc gibi hastalıklarda oranların çok daha yüksek olduğu kabul edilmektedir. SSc li olgularda İAH gelişebilme olası %50-60, Sjögren sendromlu olgularda akciğer tutulumu % 45-70 arasında saptanabilmektedir. Bu durum hasta yönetimi yanında, mortalite açısından da önemli bir problemdir.[7,8] Sjögren sendromu tanısı ile ilişkili İAH cinsiyete göre dağılımlarına bakıldığında kadınlarda daha fazla akciğer tutulumu olduğu gösterilmiştir. Akciğer tutulumu gelişiminde yer alan risk faktörleri de erkek cinsiyet, sigara kullanımı, uzun süredir sebat eden kronik hastalığın (diyabet,hipertansiyon,böbrek yetmezliği) olması gibi durumlar akciğer patolojisi gelişimini ciddi şekilde etkilemektedir ve ölümcül olmaktadır. Yine bir diğer hasalık gurubu olan SLE de akciğer tutulum oranları %5 ve altında oranlara sahiptir. Akciğer tutulumu saptanan olguların hastalık durumu akciğer tutulumu saptanmayan gruba göre daha ağır seyir göstermektedir.[2,7,13] Sistemik skleroz gibi agresif seyirli ve yaygın akciğer tutulumu olan bağ doku hastalıklarında mortalite riskinin yüksek olduğu düşünüldüğünde, erken tanı konulması, tedavisinin düzenlenerek mevcut hastalığı önlenebilmesi veya seyrinin yavaşlatılması çok önemlidir.[2,7,13]

Sistemik bağ dokusu hastalığı mevcut olan hastalarda nefes darlığı, öksürük gibi şikayetlerin varlığı yada periungual, perioral siyanoz saptanması İAH dan şüphelenilmesi açısından çok önemli fizik muayene bulgulardır. Erkek cinsiyete sahip, sigara kullanımı olan veya mikropartiküle maruz kalanlarda ilave olarak İAH gelişmesi, hastalık yönetimini ciddi şekilde zorlamaktadır. RA lı olgularda buna ilaveten romatoid faktör (RF) ve anti-sitrüline peptit (Anti-CCP) değerlerinde yüksek pozitiflik olması bu hastaların mevcut İAH nın agresif seyredebileceği konusunda önemli bir veri olmaktadır. İAH ileri yaşlı olgularda önemli bir halk sağlığı olmakla beraber romatoloji içinde önemli bir ilgi alanıdır. Mevcut DMARD ajanların İAH gelişimini önlemesi üzerine net veriler elde edilebilmiş değildir. Bazı ajanların akciğer patolojilerinin gelişmesine kısmi engel sağladı belirtilsede mutlak başarı henüz mümkün olmamıştır. Bu sebeple bu alanda çalışmalar hızlı bir şekilde devam etmektedir. Bu soruna yönelik yeni bir çözüm olarak Janus-Kinazların inhibe edilmesi öner sürülmektedir. Son dönemde Janus-Kinaz (JAK) inhibitörlerinin akciğerde meydana gelen interstisyel hasarları önleyebildiği yönünde yayınlar mevcuttur. Bu konuda net bir patofizyolojik mekanizmasının ortaya konulması ve tedavi algoritması geliştirilmesi hastalığın kontrol ve yönetimi kolaylaştırabilecektir.[7,8,10,11] Biz de çalışmamızda bir JAK inhibitörü olan tofasitinib hayvan modelinde kullanarak İAH üzerine olan etkilerini inceledik.

1.2. Bleomisin

Bleomisin (BLM) kanser hastalıklarında kullanılan antitümoral etkili bir ilaçtır. *Streptomyces verticillus,* Streptomyces cinsi Gram pozitif bakteridir. BLM *Streptomyces verticillus* arafında üretilen geniş spektrumlu glikopeptid yapıda bir antibiyotiktir. Baş-boyun kanserlerinde, lenfoproliferatif hastalıklarda, Hodgkin Hastalığında, uterus ve serviks kanserlerinin tedavi amaçlı kullanılabilir bir ajandır. Bleomisin DNA, RNA, protein sentezini bloke ederek antineoplastik etki gösterir. Bu etkiyi Bleomisin demir molekülleri ile birleşerek sağlar. Demir bağlı Bleomisin kompleksleri süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşumunu sağlar. Serbest radikaller protein ve DNA, RNA üretimini engelleyici etki gösterir. Bleomisine hayvanlarda geliştirilen fibrozis modellemelerde en sık kullanılan ajandır. Tek doz veya birkaç doz uygulamada fibrozis gelişimi sağlayabilir. İntravenöz, intratrakeal veya subkutan uygulanabilir. Biz çalışmamızda intratrakeal olarak uyguladık ve fibrozis gelişimi sağladık.

1.3.Tofasitinib

Tofasitinib otoimmün hastalıkların tedavi onayı alan ilk JAK inhibitörü ilaçlardandır. Sentetik olarak elde edilmiştir. Moleküle ait formül *C16H20N6O·C6H8O7*. Açık formülü *(3R, 4R) -4- methyl- 3- (methyl- 7H- pyrrolo [2,3-d] pyrimidin -4-ylamino)-b-oxo-1-piperidine propanenitrile citrate* dir. [72] Tofasitinib hedefe yönelik immünomodülatör ajandır. Otoimmün hastalıklarda DMARD tedavi seçeneği olarak araştırılmaktadır. Oral olarak kullanılabilen, selektif olarak JAK1 ve JAK3 inhibisyonu yapan tedavi ajanıdır. Sitokin sinyallerini inhibe ederek bağışıklık sistemine ait birçok farkı mekanizmayı etkiler.

2.PATOFİZYOLOJİK TEORİLER

2.1 İnterstisyel Akciğer Hastalığı

Akciğerde meydana gelen interstisyel akciğer hastalığının mekanizmasını net olarak ortaya koyabilmek henüz mümkün olmamıştır. Ancak bu konuda farklı hastalıklara yönelik farklı mekanizmalarla ortaya atılmıştır. Romatolojik hastalık alt gruplarında akciğerde meydana gelen interstisyel hastalık etyolojisi üzerinde sitokinlerin ve T, B lenfositlerin rolleri üzerinde durulmakta ve çalışmalarda yer verilmektedir. Akciğerde endotel düzeyinde meydana gelen kronik inflamasyon neticesinde endotelde tip 2 alveolar hücrelerin etkilenmesi ile beraber inflamasyon alanına lenfosit ve makrofajların migrasyonu gerçekleşir. İnflamasyonun devam etmesine bağlı olarak interferon, fibroblast, monosit ve sitokinlerle birlikte sürekli olarak bir yıkım ve onarım süreci izlenir. Parankimal alanda meydana gelen anormal doku onarımı sonucunda interstisyel hasarın ve fibrozisin meydana geldiği öne sürülmüştür. [9,10,11]

İnterlökinler insan immünolojik yapısını regüle edici yapıya sahip maddelerdir. Hücresel savunma elemanları makrofaj ve nötrofiller, T ve B lenfositler, epitelde yer alan hücreler vb sitokin salınımı meydana getirebilirler. Başlıca görevleri hücreler arasında etkileşim kurulmasının sağlayarak hücrenin hayatta kalmasına, enfeksiyonlara yanıt oluşturulmasına, hasarlı doku alanlarının onarımlarına katkı sunmak gibi çeşitli rolleri üstlenirler. İnterlökinler tarafından uyarılan hücreler bulundukları dokuya göre farklı hücresel aktiviteler göstermektedirler.[13,14,15]

T helper 2 hücreleri ilişkili sitokinlerin rol aldığı tip 4 alerjik reaksiyon SSc, sarkoidoz, Sjögren sendromu, IPF gibi bazı hastalıkların gelişimine neden olmaktadır. Hücresel immünolojik sistemin kronik inflamasyona sekonder sitokinlerin aşırı uyarılması ile fibrozis gelişir. IL-6, IL-17, IL-13 gibi sitokinler fibriller kollojen yapısından olan Tip 1 ve benzer yapıda olan tip 3 kollajenin üretimini indükleyerek fibrozis gelişimine neden olur. Bu sitokinlerin seviyelerindeki artışın profibrotik etkileri domine ettiği görülmektedir. [18,20,30,31]

T helper hücreleri; TH1 hücreleri üzerinde IFN-gama salınımı yaparken TH2 hücreleri üzerinden IL-13, IL-4, IL-5 salgılar, TH17 hücrelerinde de IL-17 nin salınımı gerçekleştirilir. Bu ve diğer sitokinler akciğer fibrozisine farklı şekilde katkıda bulunurlar. Biline en güçlü fibrotik sitokin TGF-beta dır. TGF beta dokularda depo şeklinde bulunur ve uyarılması sonrası endotelyal alana geçerek fibrozise giden sürecin tamamlanmasını sağlar.[15,16,17] Bir Th2 sitokin olan IL-13 diğer bir profibrotik sitokindir ve TGF-beta nın salınmasını indükler.[23] Profibrotik etkinliğe sahip olduğu düşünülen T helper 2 (TH2) hücreleri bazı sitokinler ile ortak bir etkinlik ile fibrozise ilerleyebilir. Sitokinlerin görevleri, ne kadar süreyle etkili oldukları tamamıyla açıklanabilmiş değildir. Sitokinler T helper hücrelerinin uyarıcı etkisinin devamlılığı ile farklı yanıtları domine edebilmektedir. Genel olarak profibrotik olarak sınıflanan sitokinlerin, genel kabul gören etkileri, fibrozis gelişimini desteklediği yönündedir. TH2 hücrelerinin uyarısı ile salgılanan profibrotik etkili sitokinler İnterlökin -4 (IL-4), İnterlökin-13 (IL-13), trasnforme büyüme faktör –β (TGF-β) dir. Profibrotik sitokinler hücresel uyarılar üzerinden fibroblast hücrelerini indükleyerek myofibroblast dönüşümü sağlayarak fibrozis gelişimine neden olurlar. IL-4 ve IL-13 ün etkisiyle başlayan kaskad TGF-β üzerinde bir hücre içi protein olan SMAD lara iletilir. SMAD lar transkripsiyona neden olarak matrix proteinleri üretimini destekler. Ayrıca endotel hasarına bağlı olarak dokuya göç eden makrofajlar daha fazla TGF-β salınımına neden olarak fibrozisi destekler.[2,12] TGF-β Hücre yüzeyindeki SMAD reseptörlerini etkileyerek hücrenin çoğalma,transformasyon, hücre ölümü gibi farklı şekillerde alveolar epitel yapısına etkiler.[14] B lenfositlerde hücrelerin indüksiyonu ile fibrozisi desteklemektedir. B lenfositler CD19 ların ve otoantikorların aşırı düzeylerde üretimine katkı sağlamaktadır. Humoral ve hücresel yanıtın meydana getirmiş olduğu hasarlar çeşitli romatolojik hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmekte ve beraberinde interstisyel akciğer hastalığının eşlik etmesine sebep olmaktadır. B lenfosit hücreleri T helper 2 hücreleri üzerinden diğer profibrotik etkilere sahip sitokinlerin salınımına katkı sağlar. B lenfosit hücreleri T Helper 2 hücreleri üzerinden IL-6, IL-4, IL-13 sitokinleri ile etkileşimi sağlar. Bleomisin uygulaması ile akciğer fibrozi geliştirilen hayvan modellerinde yapılan kan düzey ölçümlerinde IL -13 ve IL-4

seviyelerinde artış saptanmıştır. Bu sitokinlerin baskılanması ile yapılan çalışma grubunda ise fibrozis gelişiminin daha az görüldüğü gösterilmiştir. Sitokinler hücresel uyarım ile Tip 2 alveolar hücrelerinin remodalüasyonunu teşvik eder.[18,19] Bu uyarımlar ve remodülasyon interstisyel hasar ve neticesinde fibrozis sonuçlanır. T lenfositler ve makrofajlar fibrotik etkilerini IL-4,IL-13 ,TGF-B vb sitokinler üzerinden gerçekleştirmektedirler. [18,19,20] Bleomisin indüksiyon yöntemi ile fibrozis geliştirilen deneklerde yapılan ölçümlerde profibrotik sitokinler ile eş zamanlı olarak olarak Janus Kinaz -1 seviyelerinde de artışlar saptanmıştır.[14,15] Yine T Helper 17 hücreleri , regülatör T hücreleri ile birlikte SSc gibi hastalıklarda fibroziste rol alabilmektedir. [12,2]

2.2. İnterstsiyel Hasarda Rol Alan Sitokinler

IL-6 makrofaj, B lenfositler, dendritik hücreler gibi hücrelerden salgılanan ve otoimmünite, kronik inflamasyondan sorumludur. Önemli bir proinflamatuar sitokindir. Artan IL-6 seviyeleri anjiogenez-vaskülarizasyon, endotelyal fonksiyonda bozuklukların gelişmesine de neden olur. Akciğerde meydana gelen enfektif süreçlere önemli bir katkı sağlamaktadır.[30] IL-6 seviyesinin artması akciğerde fibrozis gelişimine neden olur. IL-6 seviyesi bleomisin uygulanarak pulmoner fibrozis geliştirilen farelerde yüksek ölçülmüştür. IL-6 nın seviyesi hastalığın şiddetini belirlemektedir.[30,31] IL-6 reseptörüne bağlandıktan sonra januz kinazların aktivasyonunu gerçekleştirir. Aktive hale gelmiş olan JAK sistemi STAT3 ü indükleyerek fosforilasyonunu sağlar. Bu mekanizma ilişkili olarak da akciğer endotelinde yer alan fibroblast hücrelerinin miyofibroblastlara dönüşümü ile fibrozise ilerleme sağlamış olur. Rekürren enfeksiyonlar, oto inflamasyonlar, süreğen toksin maruziyeti IL-6 seviyesinin düzenli olarak artmasına neden olmaktadır. Artan IL-6 akciğer endotelyal alanda daha fazla fibrozis gelişimine neden olabilmektedir. IL-6 seviyelerinde ki yükseklik SSc olgularda fiziksel aktivitede kısıtlılık ve mortalite hakkında fikir verebilmektedir.[31,32,34] IL-6 seviyelerindeki artışın akciğerin difüzyon ve kompliyansında ki azalma ile ciddi bir ilişkisi olabilir.[34,35,31]

IL-17, CD4 hücreler ile ilişkili Th17 hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir. IL-17 akciğer endotelinde viral, bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarına karşı koruyucu rol oynar. Fibroblast, epitel hücreleri, nötrofiller gibi hücre yüzeylerinde IL-17 ye ait reseptörler mevcuttur. Ancak IL-17 bu olumlu etkilerinin yanında süreğen IL-17 yükseklikleri akciğer

endoteli için ciddi sorunlara yol açmaktadır. IL-17 nin yüksek olması granüler seri hücrelerin yoğun şekilde akciğer endotelyal alana göç etmesine neden olur. İkinci olarakta lenfositlerinde farklılaşmasını indükler. Bu sürece IL-6, IL-13 gibi diğer sitokinler tarafından ayrıca katkıda sağlanır. Artarak devam eden inflamatuar süreç dokuda hasarlanmalarla beraber endotelyal alanın yeniden onarılması ile seyreder. Fibroblast ve bölgede yer alan düz kas hücrelerinin ekspresyonu meydana gelir. Özellikler fibroblastların endotelyal alanda meydana getirmeye başladığı bariyer etkisi inflamasyonun ortadan kaldırılması ve sitokin mekanizmasının bloke edilmemesi halinde de fibrozise kadar ilerler.[39,40,41]

Mukozal bariyerde savunma rolü olan IL-17 RA, psoriasis gibi otoimmün hastalıkların etyolojisinde rol alır. RA'lı hasta gruplarında IL-17 nin akciğerde fibrozis gelişmesindeki rolü hakkında veriler net olmamak ile birlikte, IL 17 etkisi ile beraber proinflamatuar sitokinler IL-6, IL-11 seviyelerinde artışı tetiklemektedir. Bu etkileşim ile birlikte akciğer endotelyal düzeyde ve tip 2 makrofajlarda yeniden onarım süreçlerini aktifleyerek fibroblast hücrelerinin fibrozise ilerlemesine neden olur. Akciğer fibrozisi tanımlanan hastalardan yapılan biyopsi materyallerinin incelenmesine ait çalışmalarda IL-17 seviyeleri yüksek saptanmıştır . IL-17 nin İPF de ki rolü, IPF etyolojisine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Ancak özellikle romatolojik hastalıklar ile ilişkili alt gruplarda IL-17 seviyesinin yüksekliği akciğer ilişkili semptomlar ile koreledir. IL-17 akciğer endotelyal alanda inflamatuar hücrelerin, hatalı protein yapıların, yanlış programlanmış hücrelerin ortadan kaldırılmasını bloke ederek mevcut alanda kronik inflamatuar yükün artışına neden olur.[19,20] RA'lı olgularda IL-6, IL-11 indükleyerek TGF beta üzerinden fibroblastların fibrozis geliştirmesine de neden olmaktadır.[40,41,56,57]

IL-13 TH2 hücreleri tarafından düzenlenen bir sitokindir. Özellikle allerjik hastalıklarda düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Ayrıca IL-13 karaciğer, bağırsak, akciğer epitel dokusunda mevcuttur. IL-13'ün bir başka görevide bu organlarda ki epitel yapısının korunması olduğu düşünülmektedir. Epitelyal düzeyde meydana gelen hasarlar IL-13 ün bu alanda artışına neden olmaktadır. Artan IL-13 seviyeleri dokuda yeniden onarım sürecinin tetiklenmesini sağlayarak fibrozise kadar ilerleyebilir. Akciğer endotelinde gelişen kronik tekrarlayıcı bu inflamatuar süreç diğer proinflamatuvar sitokinlerle birlikte IL-13 seviyesinin yüksek seyretmesine neden olmaktadır. Akciğer dokusunda gelişen kronik ve oto inflamasyon görülen bazı hastalıklarda ilerleyen süreçlerde İPF gelişimine neden oldukları bilinmektedir. KOAH, RA, SSc vb. hastalıkları ile ilişkili akciğerde meydana gelen rekküren inflamasyonu İPF takip etmektedir. İPF nedeniyle bronkoalveolar sıvı örneklemesi yapılan

kişilerde de IL-13 seviyeleri yüksek ölçülmüştür. Artmış IL-13 tip 2 pnömosit, goblet, makrofaj hücrelerini etkiler. Bununla ilişki goblet hücrelerinde hiperplazi, alveolar alanda hasarlnamaya bağlı amfizem gelişimi de izlenmektedir. IL-13, IL-6, TNF alfa gibi sitokinlerin aracılık ettiği mekanizmayı destekler ve akciğer endotelindeki mevcut fibroblastların kollojen sentezine olanak sağlar. RA lı hasta gruplarından yapılan bir klinik çalışmada IL-13 seviyeleri yüksek bulunmuştur. IL-13 seviyeleri yüksek bulunan gruplarda interstisyel hasar ve fibrozis de benzer şekilde yüksek saptanmıştır. IL-13 ün janus kinazlar aracılığıyla JAK/STAT yolunu kullanarak TGF-beta'yı aktive eder ve alveolar endotel hasarının gerçekleştirir. [35-36-37-38]

Tüm bu profibrotik ve bağışıklık aktivitelerini düzenleyen bir diğer sitokin ise Th_2 hücreleri tarafından üretilen bir sitokin olan IL-10 dur. IL-10 en güçlü anti-inflamatuar ve fibrozis baskılayıcı özellikler barındıran bir sitokin olarak bilinmektedir. Ancak çalışmalar IL-10 nun bu rollerinde farklılıklar olduğu göstermekle beraber tam tersi etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Bunun sebebinin ise çalışmalarda ki farklı metodlar ve IL-10 yarılanma ömrünün kısalığı ile ilişkilendirilmiştir.[26,26,27] IL-10 üretimi çok farklı hücrelerden yapılabilir. Lenfoid kökenli yada myeloid kökenli tüm hücreler IL-10 salınımı meydana getirebilir. Dokulara özelleşmiş makrofaj hücreleri (mikroglia, kardiyak makrofajlar), mast hücreleri , eozinofiller, Natural Killer hücreleri, TH2 hücreleri , CD_4 -CD_8 T hücreleri, B lenfositler tarafından üretimi gerçekleştirilebilen bir sitokindir.[27] Genel kanı IL-10 un immün sistemin aktivasyonunu baskılayan antiinflamatuar bir sitokin olduğudur.

IL-10 immün sistemi çok farklı mekanizmalar üzerinden baskılama yeteneğine sahip bir sitokindir. Antijen sunucu üzerinde sitokin salınımı sınırlarken, diğer bir taraftanda nitrik oksit salınımını bloke eder. Bunlara ilave olarak inflamasyon alanından serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltmaya çalışır. IL-10 TH_1 hücrelerinin sitokin salgılamasında bloke edici etki gösterir. Buna bağlı olarak TH_1 hücrelerinden interferon gama salınması engellenmiş veya azaltılmış olur. Böylece antijen sunucu hücrelerin (makrofaj, dendritik hücreler vb) etkiside baskılanmış olur. IL-10 un inhibitör etkisine rağmen antijen sunumunu yapmış ve aktifleşmiş makrofaj gibi hücrelerde olabilir.[27] Bu durumda da IL-10 un aktif hücrelerinde sitokin salınımını engellediği gösterilmiştir. Dendritik hücrelerin hücreler üzerinde yapılan çalışmada; bu hücrelerin JAK alt birimlerinin tamamını üretebildiği gösterilmiştir.

Özellikli olarak bu çalışmada JAK3 ün bloke edilerek yapılan incelemede; dendritik hücreler tarafından aşırı miktarlarda IL-10 üretildiği gösterilmiştir. Meydana gelen IL-10 un anti-inflamatuar etkiler sergilediği gösterilmiştir.[71] IL-10 üzerine yapılan ilave çalışmalar MHC

sınıf II hücrelerinin etkinliğini baskılayarak T hücrelerinin antijene spesifik yanıt vermesini engelleyebildiğini göstermiştir.[27] IL-10 un İPF li olgulardaki rolü net değildir. Ancak bazı çalışmalarda IL-10 seviyesi yüksek saptanan veya dışarıdan IL-10 uygulaması yapılan olgularda proinflamatuar sitokinlerin düzeylerinde baskılanma gözlenmiştir.[15,17] Nükleer Faktör kappa B (NF-KB) nin aktivasyonun baskılayarak bu görevi yaptığı tanımlanmıştır.[22] Proinflamatuar sitokinlerin endotelde meydana getirdikleri inflamatuar ilişkili hasarını frenleyen ve bu olayı baskıklamakla görevli sitokinin de IL-10 olduğu düşünülmektedir.

IL-10 seviyeleri yüksek olgularda yapılan araştırmalarda bu kişilerin TGF-beta, interferon gama seviyelerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Yine bu gruplarda yapılan patolojik değerlendirmelerde akciğerdeki fibröz doku alanlarında ve fibröz doku oranlarında azalma gözlenmiştir. Bleomisin ile indüklenerek geliştirilen fibrozisli deneklere dışarıdan IL-10 verilmesi ile uygulanan bir deneyde kontrol gruplarına oranla fibrozis düzeyleri daha düşük saptanmıştır. Ayrıca bu gruplar arasında ki bir diğer fark ise akciğer endotel düzeyinde ki inflamasyonun kısmen baskılı olması ile birlikte makrofaj, monosit gibi hücrelerin total sayıları daha düşük saptanmıştır.[17,14,15] Ancak IL-10 enfeksiyonun süresine sekonder olarak farklı etkide sergilemektedir. Yapılan bazı hayvan modellerinde IL-10 nun inflamasyonu baskılama etkisinin inflamatuar ajanın maruziyet süresi ile değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Kısa süreli akciğer dokusunda meydana getirilen indüksiyon ilişkili enfeksiyonda baskılayıcı etkisi olurken, inflamatuar etkinin ortadan kaldırılmadığı durumlar IL-10 nun aşırı salgılanması neden olmaktadır. IL-10 aşırı salgılanması T ve B lenfosit hücreleri, makrofajların aşırı uyarımına bağlı olarak fibroblastların göç etmesiyle intersitsiyel hasar ve fibrozise doğru ilerlemiştir.[17,19,25] Covid -19 pozitif olgularda IL-6 ve IL-10 seviyelerinin akciğer hasarında ki rolünü inceleyen bir meta analiz çalışmasında sitokin salıverme sendromu gelişen ve yoğun bakımda takip edilen hastalarda IL-10 seviyeleri yüksek bulunmuştur. Bu durum IL-10 yanıtının IL-6 ya oranla daha hızlı olması nedeniyle yüksek saptanmış olabilir. Yine bu çalışmada yüksek Il-10 ve IL-6 oranları yüksek mortalite ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca IL-10 yüksekliğinin bu meta analizde net kar ya da zararı ortaya konabilmiş değildir. Bu yükseliğin gerekçesi olarak devam edecen yıkıcı sistemik inflamatuar yanıttan kaynaklanabilir. Otoimmun hastalıklarda IL-10 nun rolü immün supresif olarak kabul görsede yapılan recombinant IL-10 tedavisi inflamatuar barsak hastalıklı olgularda hastalığın şiddetlendiğini göstermiştir.[21,25,26] IL-10'un fonksiyonlarının daha fazla detayandırıldığı çalışmalarda, Major Doku uygunluk Kompleksi (MHC) II hücrelerini down regüle ettiği, antijen sunan hücrelerin etkinliğini bloke ederek T hücrelerin yanıtını dolaylı

olarak önlemiştir. Eş zamanlı olarak IL-10 hücre baskılanmasına ilave olarak inflamatuar etkiye sahip sitokinlerin salınımını bloke etmektedir.[26,27,51]

Bunlarla beraber anti-inflamatuar etkinin tam olarak nasıl işlediği konusunda araştırmalar devam etmektedir. IL-10 akciğer dokusundan akut inflamatuar süreçlerinde baskılayıcı rol üstlenirken sürecin daha uzun soluklu olduğu deneysel çalışmalarda fibrozisi arttığı gösterilmiştir. Bir hayvan deneyi çalışmasında B lenfosit hücrelerin göçünü arttırdığı, lenfoid dokularda yeniden onarımı desteklediği ortaya konulmuştur. Aşırı skar dokusu gelişen kişilerde IL-10 seviyeleri yüksek saptanmıştır. Benzer bir molekül olan Pentraxin 3 (PTX3), IL-10 ile benzer etkinliğe sahip bir moleküldür. Antiinflamatuar etkinlik gösterir. PTX3 üzerine yapılan çalışmalarda inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Yine benzer şekilde bu çalışmalarda da IL-10 düzeyleri de yüksek bulunmuştur. [21,22]

Ancak IL-10 enfeksiyonun süresine sekonder olarak farklı etkide sergilemektedir. Yapılan bazı hayvan modellerinde IL-10 nun inflamasyonu baskılama etkisinin inflamatuar ajanın maruziyet süresi ile değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Kısa süreli akciğer dokusunda meydana getirilen indüksiyon ilişkili enfeksiyonda baskılayıcı etkisi olurken, inflamatuar etkinin ortadan kaldırılmadığı durumlar IL-10 nun aşırı salgılanması neden olmaktadır. IL-10 aşırı salgılanması T ve B lenfosit hücreleri, makrofajların aşırı uyarımına bağlı olarak fibroblastların göç etmesiyle intersitsiyel hasar ve fibrozise doğru ilerlemiştir.[25] Covid -19 pozitif olgularda IL-6 ve IL-10 seviyelerinin akciğer hasarında ki rolünü inceleyen bir meta analiz çalışmasında sitokin salıverme sendromu gelişen ve yoğun bakımda takip edilen hastalarda IL-10 seviyeleri yüksek bulunmuştur. Bu durum IL-10 yanıtının IL-6 ya oranla daha hızlı olması nedeniyle yüksek saptanmış olabilir. Bu çalışmada yüksek IL-10 ve IL-6 oranları yüksek mortalite ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca IL-10 yüksekliğinin bu meta analizde net kar ya da zararı ortaya konabilmiş değildir. Bu yükseliğin gerekçesi olarak devam edecen yıkıcı sistemik inflamatuar yanıt öne sürülmüştür. Otoimmun hastalıklarda IL-10 nun rolü immün supresif olarak kabul görsede yapılan recombinant IL-10 tedavisi inflamatuar barsak hastalıklı olgularda hastalığın şiddetlendiği görülmüştür.[26] IL-10 un fonksiyonlarının daha fazla detayandırıldığı çalışmalarda, Major Doku uygunluk Kompleksi (MHC) II hücrelerini down regüle ettiği, antijen sunan hücrelerin etkinliğini bloke ederek T hücrelerin yanıtını dolaylı olarak önlemiştir. Eş zamanlı olarak IL-10 hücre baskılanmasına ilave olarak inflamatuar etkiye sahip sitokinlerin salınımını bloke etmektedir.

2.3.Krebs von den Lungen (KL-6)

İnterstisyel akciğer hasarı ve fibrozis gelişen olguların tanınması hastalığın seyri ve tedavisi açısından büyük öneme sahiptir. Bu olgular malesef çok geç tanı almaktadırlar. Mevcut hastalığın ilerlemesi ile beraber total akciğer kapasitesinde azalma buna bağlı nefes darlığı, ellerde ve dudaklarda morluklar gözlenebilir. Hipoksik ekstremite bulguları ile kliniğe başvuran hastaların yapılan yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (HRCT) görüntülemesi, solunum fonksiyon testleri (SFT), bronkoskopik işlemler ile yapılan biyopsiler sonrası tanı alabilmektedirler. SFT kişinin hastalık aktivite-alevlenmesine ve oryantasyonuna bağlı olarak farklı sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca HRCT mevcut hasarın gösterilmesinde kolaylık sağlasa da hastalığa ilişkin potansiyel riskleri ortaya koymakta yetersiz kalır. Hastalık sürecinin nasıl seyredeceği hakkında da öngörüde bulunulamaz. Akciğer epitel dokusundaki hasarın düzeyini belirlemek ve hastalığın aktivitesini öngörebilmek açısından Krebs von den Lungen (KL-6) kullanılabilir.

KL-6 *Mucin-1* geni tarafından üretimi yapılan, molekül ağırlığı yüksek glikolize bir proteindir. Endotelyal alanda meydana gelen inflamatuar etkiye bağlı olarak hücre yüzeyleri arasındaki disülfid bağlarının kopması neticesinde endotelyal alanda ki inflamasyona KL-6 proteinlerinin difüzyon ile transferi gerçekleşir. Akciğer silyalı epitel hücrelerden üretilen glikoproteinlerin biri olan KL-6 interstisyel akciğer hastalığı ile doğrudan ilişkili bir biyolojik belirteçtir. Tip 2 pnömosit hücrelerin hasar seviyesi ve buna cevap olarak yeniden şekillenme hakkında fikir verebilir. Sistemik sklerozlu olgularda SFT ölçümleri ile benzer göstergelere sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer otoimmün hastalıklara sekonder interstisyel akciğer hastalığı gelişen olgularda daha fazla çalışmasına ihtiyaç vardır.[28,29] KL-6 seviyeleri inflamatuar sürecin seyri ile beraber artmaktadır. Fibrozis ileri düzeyde olan olgularda KL-6 seviyelerinin daha yüksek olduğu saptanmaktadır. Bu imkanlarla birlikte hastalığın hangi aşamada olduğu ve ciddiyetini değerlendirmeyi sağlar. KL-6 seviyesinin fibrozis varlığını değerlendirmede tanısal değerinin inceleyen bir çalışmada: Akciğerlerin Karbonmonoksit Difüzyon Kapasitesi (DLCO), Zorlu Vital Kapasite (FVC) korelasyonu KL-6 seviyesi yüksek saptanmış kişilerde DLCO ve FVC azaldığı tanısal olarak gösterilmiştir. Prognostik olarak kötü seyirli olgularda KL-6 kullanım açısında uygun bir parametredir. İnterstisyel akciğer hastalığı mevcut olgular içinde yapılan karşılaştırmada KL-6 seviyesinin ileri evre olgularda çok daha yüksek saptanırken, hastalığın kontrol altında olduğu grupta KL-6 seviyelerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Romatolojik hastalıklarda skleroderma, romatoid artritli hasta gruplarında da KL-6 nın süreci öngörme ve tanısal değeri mevcuttur .[29]

2.4. Janus Kinaz Mekanizması

Janus kinaz/sinyal dönüştürücüleri ve transkripsiyon (JAK/STAT) sinyal yolağı ilk olarak 1990 yılında interferonların transkripsiyon aktivitesi incelenirken keşfedildi. Wilk ve ark. tarafından JAK1 ve JAK2 varlığı gösterilmiş oldu. Sonrasında devam eden çalışmalarla beraber TYK2 ve JAK3 ün keşfi gerçekleşti. Bugün bilinen ve üzerine medikal çalışmalar yapılan JAK reseptörleri JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 dir. STAT ailesinin de yedi üyesi vardır ve bunlar STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6 dır.[67] Janus Kinazlar üzerine yapılan çalışmalar gösterdi ki sitokin, interferon ve hormonlar tarafından taşınan sinyallerin hücreye aktarılmasında ,merkezi bir rolü olan, esas aracı moleküllerdir.[66] JAK/STAT yolağı ağırlıklı olarak sitokinlerle etkileşime girdiktikten sonra genlerde ekspresyonlara olanak sağlar.[63] İmmün sistem, inflamasyon yanıtı, antitümoral etkinliklere sahiptirler. İmmün toleransın ayarlanmasında da görev alırlar. Sitokinlerin, interferonların, büyüme hormonlarının, eritropoetinin, prolaktin gibi birçok uyarının hücresel aktarım ve gen ekspresyonlarında önemli görevler üstlenirler.[68]

JAK1 tüm dokularda yaygın olarak bulunmaktadır ve tüm STAT ları fosforile edebilir. JAK1 üzerinde reseptörü bulunan başlıca sitokinler ; IL-2, IL-4, IL-15 dir. Sınıf 2 sitokinlerden IFN-gama ve antienflamatuar etkileri olan IL-10 reseptörü de JAK 1 üzerinde yer alır.[67] Proinflamatuar etkinliğe sahip IL-6 nın da JAK1 üzerinde reseptörleri vardır. Granülosit koloni stimulan faktör ve sitokinler JAK1 ile aktive olduktan sonra savunma ve hemostazı destekleyici rol alır. JAK2 eritropoetin ve büyüme hormonlarının uyarılarına aracılık eder. Ayrıca IL-13 sitokininin sinyal iletimini sağlarlar. JAK 3 IL-4, IL-7,IL-15 gibi sitokinlerin iletiminde rol oynar.
JAK3 ayrıca immün sistemin regülasyonunda rolü olan janus kinazlardan dır.[67] T hücrelerinin fonksiyonun düzenlenmesinde etkin bir role sahiptirler. JAK1 ve JAK2 inhibisyonu yapılan deneysel çalışmalarda denekler kısa süre için de kaybedilmiştir. JAK3 ün inhibisyonu ise immün yetmezliğe yol açmaktadır. JAK3 diğer JAK reseptörleri gibi yaygın olarak tüm dokularda eksprese olabilen bir reseptör değildir. JAK ün yer aldığı alanlar endotel, kemik iliği, damar düz kas hücreleri gibi bölgelerdir.[67]

STAT1 bağışıklık düzenlenmesinde rol oynar ve MHC ilişkili antijen sunumunda katkı sunar . STAT1 pozisyonunda gelişen bozulma eksojen bakteri ve parazitlere karşı

savunma sisteminde defektlere neden olur. STAT2 ler vücudun antiviral savunmasında diğerlerine oranla daha fazla eksprese olurlar. Antiviral etkili interferonların salınımını kontrol ederler.[67] STAT3 ler bağışıklık sistemi,hücre büyümesi, tümöral oluşumlar, hücre ölümleri gibi bir çok farklı hücresel olaylarda görev alırlar. STAT3 ile etkileşime geçen sitokinler IL-6 ailesi (IL-6, IL-11, IL-31 …) ve IL-10 ailesi (IL-10, IL-19, IL-20 …) dir. STAT3 lerin immünolojik olarak uyarılması TH17 hücrelerin prpliferasyonuna neden olur. Aşırı düzeyde STAT3 indüksiyonu immün sistemin ya da kemik iliğinin supresyonuna neden olur. STAT3'e IL-6 üzerinden gelen uyarının JAK düzeyinde bloke edilmesi hücrede apopitozisin indüksiyonuna neden olur. Tam tersi mekanizmada STAT 3 ün devamlı olarak indüksiyonu kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur. Aşırı hücre ekspresyonu myelom, baş-boyun kanseri, meme kanseri gibi malignitelerin gelişmesine neden olur. STAT4 IFN, IL 12, IL 23 tarafında uyarımı yapılan protein yapılı bir STAT dır. STAT4 fosforile olması humoral bağışıklık için önemlidir. IL-21 tarafından aşırısı STAT4 indüksiyonu B lenfositlerin kontrolsüz şekilde çoğalmasına neden olur. STAT5, IL-2 ailesi ve IL-3 tarafından uyarılan ve iki adet benzer reseptörü vardır. Bunlar STAT5a ve STAT5b dir. Protein yapısındadır. Eritropoietin, büyüme hormonu, koloni stimülan faktör tarafından da uyarımı sağlanabilir. STAT 5 lenfatik yapıların gelişmesi, T hücreleri, Natural Killer hücreleri, CD8 gibi hücrelerinin gelişiminde önemli rollere sahiptirler. Hormonal ve sitokin etkileşimleri ile beraber STAT5 üzerinden de apoptosis yolu aktive edilebilir. Hormonal uyarılma ile beraber hücrelerin büyümesine olanak sağlar. STAT6 esas olarak IL-4 ve IL-13 gibi sitokinler tarafından uyarılır. IL-4 aracılığı ile TH2 hücrelerinin uyarılması gerçekleşir. Bu yolla immunglobulinler üretilir. B lenfositlerin büyüme ve çoğalmasında, mast hücrelerinin aktive olmasında, IgE üretiminde görev alır. [67]

Hücre yüzeyine gelen sitokin ve hormonal aktivasyon uyarısı JAK'ın fosforilasyonu sonucu hücre içine aktarılır. Tirozin reseptörlerinde fosforilasyon gelişir ve uyarı STAT lara aktarılır. JAK/STAT yolağı normal hücresel iletimde rol aldığı gibi onkolojik, immünolojik, inflamasyon gibi durumlarda da merkezi bir rol üstlenirler.[63] JAK 3 ün aktivitesi hematopoetik hücreler ile sınırlıdır ve bu özelliği bakımından diğer JAKlardan farklıdır. Lenfosit fonksiyonları ile yakın ilişki içindedir.[71] IL-2, IL-4, IL-21 gibi sitokinler etkilerinin JAK3 üzerinden gösterebilirler. Bu reseptörün çalışmaması ciddi immün yetmezlikler ile ilişkili olduğu bulunmuştur.[71] JAK 3 mutasyonu olanlarda ciddi immün yetmezlik geliştiğinin gösterilmesi ile birlikte JAK'ların immünolojik sistemde rolü ortaya konuldu. Sonrasında JAK üzerine odaklanan çalışmalar bu hücresel aktarıcı elemanların malignite ve

inflamasyonda ki rollerinin de ortaya konulmasını sağladı. Elde edilen veriler JAK inhibisyonu yapmanın maligniteleri engelleyici ve immünolojik hastalıkların kontrol altına alınmasına olanak sağlayacığını düşündürerek bunların inhibisyonu üzerine medikal seçenekler oluşturuldu. Bu sebeple ilk olarak hematoloji alanında ruxolitinibin kullanılması ile JAK inhibitörleri hayatımıza girdi [66]

JAKların bazılarının aşırı ekspresyonu RA, SSc gibi hastalıkların gelişmesine veya hastalığın ataklar halinde seyretmesine neden olur. Ayrıca anormal şekilde meydana gelen JAK indüksiyonu aşırı hücre proliferasyonuna neden olur. Apoptozis ve inhibisyon mekanizmalarının bypass edilmesine neden olur. Bu olaylara bağlı olarak myeloproliferatif hastalıklar, meme kanseri gibi hastalıkların gelişmesine neden olur.
IL-6, IL-11, IL-13 JAK /STAT yolunu kullanan bazı sitokinlerdir. Hücre uyarısından sonra bu sitokinler fibroblastların anormal şekilde organize olmasına olanak sağlarlar.[63] RA, SLE, SSc gibi hastalıklarda otoimmün hücreler ve bunların aracıları olan inflamatuar sitokinler otoimmün hastalıklarının gelişmesinde önemli rol oynar. Proinflamatuar sitokinlerin aşırı proliferasyonu humoral ve hücresel bağışıklık sisteminin self tolerans mekanizmaları by pass eder. Self toleranstan etkilenmeden sistemik dolaşıma giren hücrelerin medikal olarak kontrol edilelemesi ataklar ve hastalık progresyonuna zemin hazırlar.[68] Uzun süreli olarak medikal kontrol sağlanamayan kişilerde ekstra artiküler bozukluklar meydana gelir. Ekstra artiküler olarak meydana gelen önemli sorunlardan biri de İAH dır. JAK/STAT yolunun uygun şekilde inhibisyonu romatolojik hastalıklar ve organlara ait bazı bozulmaların tedavisinde alternatif seçenek olabilir. Bazı romatolojik hastalıkların seyrinde İAH gelişmesi ortak bir sorundur.
Bu hastalıkların tedavisinde hali hazırda hastalık modifiye edici ajanlar (DMARD), biyolojik ajanlar kullanılmaktadır. Tedaviye dirençli, ek organ hasarlarının geliştiği olgularda Tofasitinib alternatif tedavi seçeneği olarak onay almıştır.

2.5. Tofasitinib Etki Mekanizması

Tofasitinib JAK ların ATP bağlanma ünitelerine bağlanarak blokaj etkisi gösterir. Selektif olarak JAK1/JAK3 inhibisyonu yapmakla birlikte JAK2 inhibisyonu gerçekleştirebilir. Ghoreschi ve ark. tarafından yapılan çalışmada tofasitinib IL-6 etkinliğini inhibe ettiği göstermiştir. İn Vitro ortamda yapılan çalışmada tofasitinib IL-17 üretimini bloke ederken proinflamatuar etkili IL-16, TNF -alfa gibi sitokinlerin proliferasyonuna engel olmuştur. Tanaka tarafından yapılan bir çalışmada tofasitinib sinovyal fibroblast hücrelerinde IL-6 salınımını engellediğini gösterdi. [71] Tofasitinib B lenfositleri, CD_4 T hücrelerini ve dendritik hücreleri inhibe edebilir.[68] B lenfositlerin ve CD_4 T hücrelerinin farklılaşma ve antikor üretimini inhibe eder. B hücreleri romatolojik hastalıkların başlanmasından ve devamlılığından sorumlu hücrelerdir. Matriks metalloproteinazlar (MMP) RA gibi hastalıkların artiküler patolojilerinde kritik role sahiptir. Matriks metalloproteinazları IL-6, IL-17 gibi proinflamatuar ve profibrotik etkili sitokinlerin seviyesini arttırıcı etki gösterir. Bu etki mekanizması eklem sinovyal membranın aşırı indüksiyon ve hasarına bağlı olarak dejenarasyona neden olur. Normal fizyolojik mekanizmada metalloproteinaz doku inhibitöri (TIMP) aracılığıyla MMP lerin etkisini inhibe ederek koruyucu etki gösterir. Ancak romatolojik hastalıklarda humoral ve hücresel mekanizmada ki bozulma aşırı derecede proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonu birlikte self toleranstı bozuk hücre ve ürünlerinde artışa neden olur. Meydana gelen bu kısır döngü progresif doku ve organ hasarlarına neden olur. Tofacitinib STAT inhibisyonu yapmaktadır. Bu inhibisyon beraberinde matriks metalloproteinazların ve sitokinlerin inhibisyonuna imkan sağlar. Baskılanmış IL-6, IL-1 alt grupları MMP nın daha aktive olması ile sonuçlanır. Sonuç olarak artiküler hasarlanmlarda önleyici rol üstlenmiş olur. Tanaka tarafından yapılan çalışmada B hücrelerinde IL-6 üretiminin bloke olduğunu ancak IL-10 üretiminde herhangi bir değişimin olmadığını gösterdi. [71] Lee ve arkadaşlarının RA'lı gruplarda (daha önce DMARD tedavisi alan ve almayan) plaseboya kıyasla etkili olduğu gösterilmiştir. Van Vollenhoven ve arkadaşlarının adalimumab ile yaptığı çalışmada da benzer etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. van vollenhoven ve ark. tarafından yürütülen tofasitinib, adalimumab oral faz 3 çalışmasında metotreksat alan tüm hastalarda karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada iki ilacında benzer etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. [69] JAK1 ve JAK ün tofasitinib tarafından inhibe edilmesi sitokin sinyallerini bloke eder. Lenfosit uyarılarının sitokin blokajı ile engellenmesi bağışıklık sisteminin oluşturduğu self etkiyi düzenler. Fleischmann ve arkadaşlarının RA gruplarda 611 hastada monoterapi olarak uygulandığı çalışmada tofasitinib plaseboya göre semptomları daha fazla azalttığı ve 3. ayda DAS 28 skorunda azalma sağladığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada playboya oranla tofasitinib grubunda enfeksiyon daha fazla gözlenmiştir.

Monoterapi olarak tofasitinib uygulanan gruba ait veriler; tofasitinib DMARD tedavisi uygulanan atak döneminde ve atak dönemi dışındaki olgulara kıyasla hastalık aktivitesini sınırladığı gösterilmiştir. Artiküler ve ekstra artiküler semptomlarda gerileme sağlamıştır. DAS 28 skorunda hem istatiksel olarak hem de klinik olarak anlamlı iyileşmeler sağlanmıştır.[70] En sık yan etkiler diğer DMARD ajanlara benzer şekilde akciğer tüberkülozu, zona zoster, gibi fırsatçı enfeksiyon oranlarında artış göstermektedir. [68]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

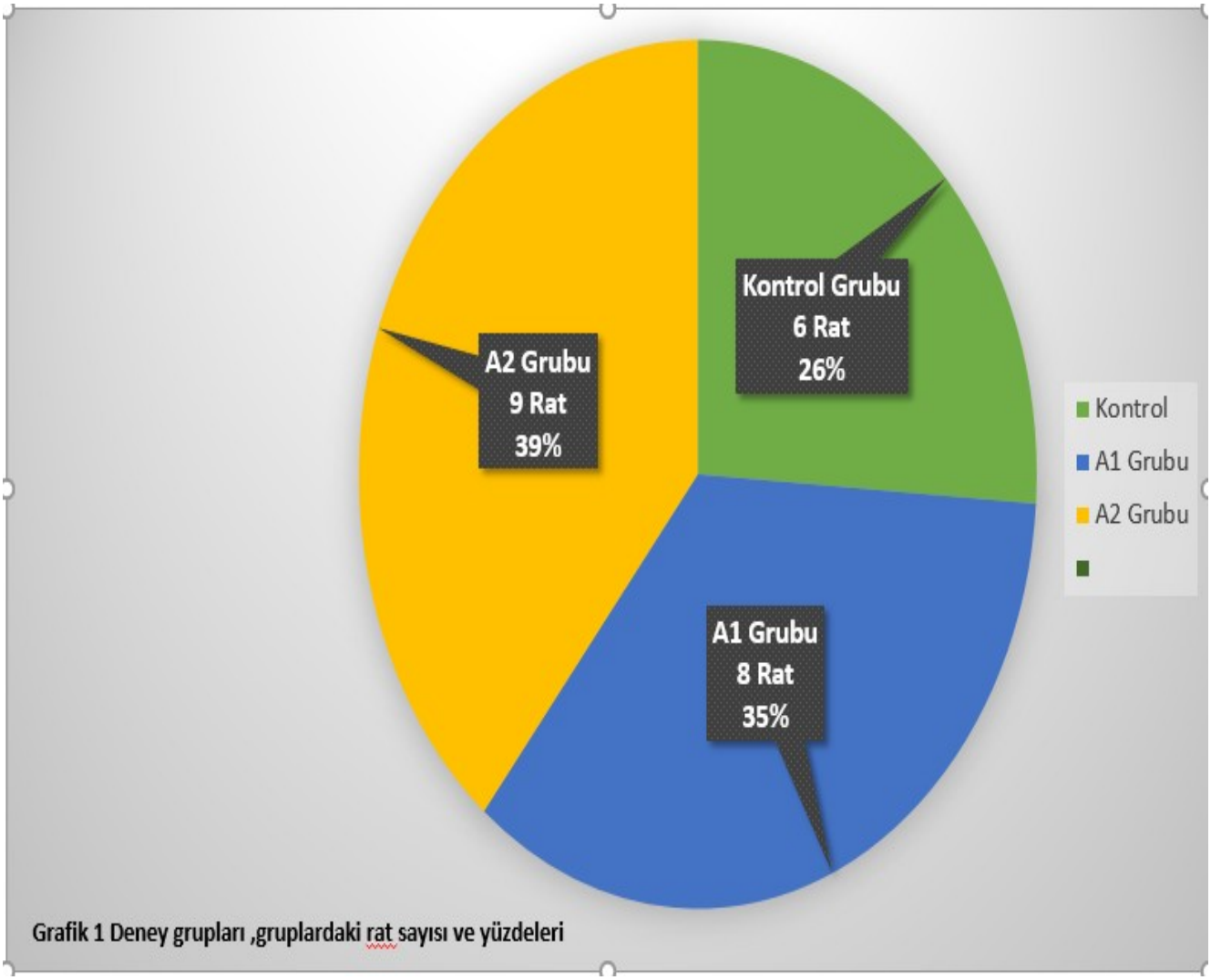
3.1. Evren ve Örneklem

Çalışma 'Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu' tarafından onay alındıktan sonra uluslararası hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.
Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (MÜDEHAM)'da daha önceden yetiştirilen yaklaşık 200-250 gr ağırlığında, erkek , 27 adet *Spraque-Dawley albino ra*t çalışmada kullanıldı. Ratlar aydınlık/ karanlık koşullarda, ayrı kafeslerde muhafaza edildi. Tüm denekler, deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları (22-24°C, 12 saat aydınlık/karanlık siklus) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi.

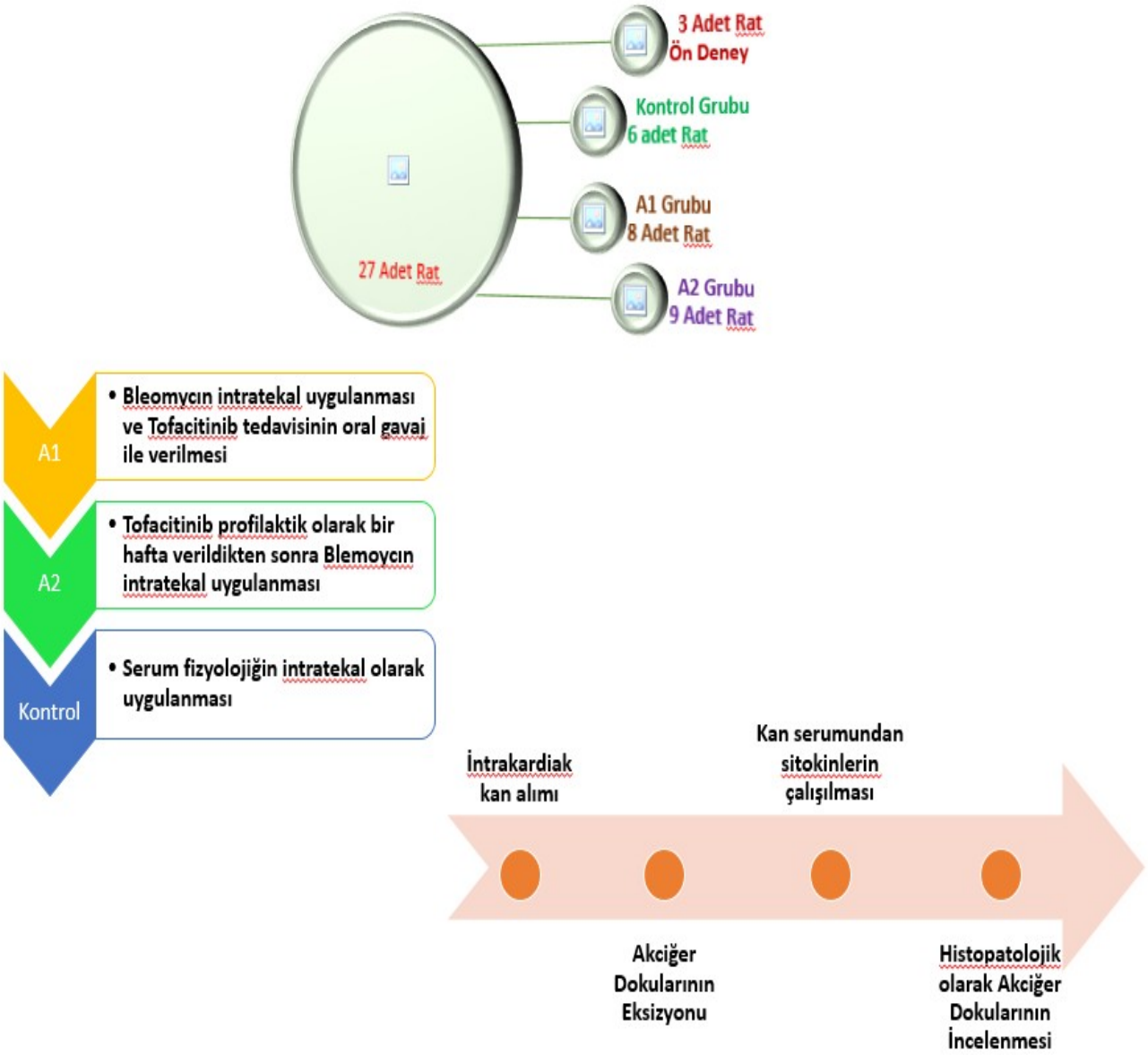
Deney modeli oluşturmak ve hayvan kaybını önlemek amacıyla 3 adet rat ön çalışma grubu olarak belirlendi. Bleomycın-s flakon fibrozisi indüklemek amaçlı kullanıldı. Bir flakon Bleomycin -s serum fizyolojik ile 3 ml, kemoterapi hazırlama ünitesinde, eklenerek sulandırıldı. Ratlara uygu dozlarda bleomisin intratrakeal olarak verilerek fibrozis gelişmesi sağlandı. Bu şekilde güvenli bleomisin dozu 2 IU/mg olarak belirlenmiş oldu. Devamında 24 adet rat rastgele olarak; kontrol grubu 6 (altı) adet, A1 grubu 9 (dokuz) adet, A2 grubu 9 (dokuz) adet olacak şekilde (Grafik 1) gruplandırıldı. A1 grubuna bleomisin 2 IU/mg ile tofasitinib 5 mg/gün yükleme eş zamanlı olarak, oral gavaj ile tofasitinib uygulaması yapıldıktan sonra bleomisin uygulaması intratrakeal olarak yapıldı. Devam eden 14 gün boyunca tofasitinib 2,5 mg/gün olarak uygulandı. A2 grubuna tofasitinib uygulaması 5mg/gün yükleme yapıldıktan sonra 2,5 mg/gün profilaktik doz uygulaması yapıldı. Bir hafta süre sonunda tüm A2 grubundaki deneklere tek doz bleomisin 2 IU/mg olarak intratrakeal

uygulandı. Kontrol grubuna sadece %0,9 serum fizyolojik (NaCl) intratrakeal uygulanarak 14 gün süre ile takip edildi.

Toplam deney süresi sonucunda A1 grubunda 1 deney kaybı dışında diğer tüm deneklerin yaşadığı gözlemlendi. Ratlar genel anestezi altında intrakardiyak kan alma tekniği ile sakrifiye edildi. Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji laboratuvarında örneklerin akciğer dokuları bağ doku boyaları ile boyandı.



Grafik 1 Deney grupları ,gruplardaki rat sayısı ve yüzdeleri



Grafik 2 Deneysel Taslak

3.2 Verilerin toplanması

Tüm ratlar önceden belirtildiği gibi intramüsküler 80 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar) ve 8 mg/kg xylazine hidroklorid (Rompun) ile genel anesteziye alındı. İntrakardiyak kan alımı yapılarak deney sonlandırıldı. İntrakardiyak olarak alınan kanlar sarı kapaklı biyokimya tüplerine konuldu ve 3000 xg de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan serum başka bir tüpe alınarak çalışıncaya kadar -80 °C'de bekletildi.

Tüm ratların akciğer dokuları ratlar intrakardiyak kan alımından sonra torakal insizyon ile akciğer dokuları eksize edildi. %20 formaldehit sıvısından muhafaza edilerek Maltepe Üniversitesi Patoloji servisinde çalışıldı. %20 'lik formaldehit çözeltisinde tespit edilen akciğer örnekleri, rutin takip işlemlerinden geçirildi. Tüm ratlara ait akciğer dokularının mümkün olduğunca homojen incelenebilmesi için a 20' şer mikron atlanarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bunlar Masson-Trikrom ile boyandı.

3.3 Veri toplama araçları

3.3.1 Kan serumundan sitokinlerin çalışılması

Ratlardan elde edilen kan serumları ve AFG Kitler oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Ön koşullar tamamlandıktan sonra her bir kit için aşağıdaki kullanım kılavuzlarında yer alan protokoller ayrı ayrı uygulandı.

Sitokin adı	**IL-6**	**IL-10**	**IL-13**	**IL-17**	**KL-6**
Marka	AFG Bİoscience marka elisa kiti	AFG Bİoscience marka elisa kit	AFG Bİoscience marka elisa kit	AFG Bİoscience marka elisa kit	ELK Teknoloji Sıçan Krebs Von den Lungen-6(KL-6) ELISA Kiti
Denek	Sıçan	Sıçan	Sıçan	Sıçan	Sıçan
Örnek tipi	plazma	plazma	plazma	plazma	plazma
Tanılama Aralığı	8 ng/L-150 ng/L	1.6 pg/ml-80 pg/ml	1.5 pg/ml-100 pg/ml	37.5 pg/ml - 1000 pg/ml	12.5-800 IU/mL
Duyarlılık	2.0ng/L	0.5 pg/ml	0.5 pg/ml	5pg/ml	5.9IU/mL

Test prosedürü:IL-6,IL-10,IL-13,IL-17 için aşağıdaki prosedürler uygulandı.

reaktif hazırlama

1: Yıkama solüsyonu - 600 ml Yıkama Tamponu (1 x) hazırlamak için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresini (30 x) deiyonize veya damıtılmış su ile seyreltilir.

2: Standartların uygulanması :

- IL-6 için :Standart seyreltme : Her tüpte 50µl standart seyreltici pipetlendi. Beşinci tüpe 100µl standart (180 ng/L) pipetlenip beşinci tüpten 100µl'yi dördüncü tüpe, dördüncü tüpten üçüncü tüpe 50µl pipetlendi. Seyreltilmemiş Standart, yüksek standart olarak (180 ng/L), Sample Diluent, sıfır standart (boş kuyu) olarak kabul edildi.

IL-6	Tüp	6	5	4	3	2	1	0
	ng/dl	180	120	80	40	20	10	0

- IL-10 , IL-13 : Her tüpte 50µl standart seyreltici pipetlendi. Beşinci tüpe 100µl standart (135 pg/ml) pipetlenip; beşinci beş tüpten dördüncüye 100µl alındı, dördüncü tüpten üçüncü tüpe 50µl pipetlendi ve aşağıdaki seyreltme serileri elde edildi. Seyreltilmemiş Standart, yüksek standart olmak üzere ayarlandı (135 pg/ml). Sample Diluent, sıfır standart "boş kuyu" (0 pg/ml) olarak ayarlandı.

IL-10	Tüp	6	5	4	3	2	1	0
	pg/ml	135	90	60	30	15	7,5	0

IL-13	Tüp	6	5	4	3	2	1	0
	pg/ml	135	90	60	30	15	7,5	0

- IL-17 : Her tüpte 50µl standart seyreltici pipetlendi. Beşinci tüpe 100µl standart (1350 pg/ml) pipetlenip; beşinci beş tüpten dördüncüye 100µl alındı,

dördüncü tüpten üçüncü tüpe 50µl pipetlendi ve aşağıdaki seyreltme serileri elde edildi. Seyreltilmemiş Standart, yüksek standart olmak üzere ayarlandı (1350 pg/ml). Sample Diluent, sıfır standart "boş kuyu" (0 pg/ml) olarak ayarlandı.

IL-17	Tüp	6	5	4	3	2	1	0
	pg/ml	1350	900	600	300	150	75	0

- Aşağıdaki işlem basamakları IL-6,IL-10,IL-13,IL-17 için sırası ile uygulandı .

Adım 1: Tüm örnekleri, çalışma standartlarını, Blanklar hazırlandı, örnekler oda ısısında santrifüj edildi.

Adım 2: Kullanılacak kuyu sayısını Test Düzen Sayfasına uygun şekilde belirlendi

Adım 3 : Standart kuyuyu test etmek için standart 50µl pipet , Test numune kuyusuna 40µl Pipet Numune seyrelticisi, ardından test numunesi 10µl eklendi. Kuyulara numune pipetlendi.

Adım 4: İnkübasyon aşaması : Yapışkan şerit ile örtülerek, 37°C de 30 dakika inkübe edildi.

Adım 5: Yıkama solüsyonunu distile su ile 30 kat seyreltildi.

Adım 6: Yıkama: Yapışkan şeridi açılarak sıvı atıldı.

Yıkama çözeltisi ile her kuyuya pipetlenip, 30 saniye içinde boşaltıldı, bu işlem beş kez tekrarlandı.

Adım 7: Boş kuyu hariç her kuyucuğa HRP-Konjugat reaktifi 50µl pipet ile eklendi..

Adım 8: Yapışkan şerit ile örtülerek, 37°C de 30 dakika inkübe edildi.

Adım 9: Yıkama: Yapışkan şeridi açılarak sıvı atıldı. Yıkama çözeltisi ile her kuyuya pipetlenip, 30 saniye içinde boşaltıldı, bu işlem beş kez tekrarlandı.

Adım 10: Kromojen Solüsyonu A 50ul ve Kromojen Solüsyon B yi ışıksız ortamda 50ul'yi her kuyuya pipetlendi, 37℃'de 15 dakika bekletildi.

Adım 11: Reaksiyonu durdurun: Durdurma Solüsyonunu her kuyucuğa 50µl pipetlendi, (mavi renk sarıya dönüşür).

Adım 12: Boşluk sıfır olarak alınacak şekilde . BioTek SYNERGY H1 (MİCROPLATELLET READER) cihazında 450 nm de absorbans ayarlanarak okuma yapıldı.

Krebs Von den Lungen-6(KL-6):

Kullanmadan önce tüm kit bileşenlerini ve numuneleri oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi..
25x yıkama tamponunu için distile su ile 1x çalışma konsantrasyonuna seyreltilir.
Biyotinlenmiş-Konjugat (1x) önce santrifüj uygulandı. Biyotinlenmiş-Konjugat 100 kat seyreltmek için ; 990µLofBiotinylated-Conjugate Diluent ile 10 µL Biyotinlenmiş-Konjugat şeklinde hazırlanır. Standardı 1.0 mL Standart Seyreltici ile sulandırıp, oda sıcaklığında 10 dakika beklediktildi. . Stok solüsyondaki standardın konsantrasyonu 800 IU/mL'dir 0,5 mL Standart Seyreltici içeren 7 tüp hazırlandı. Bir sonraki transferden önce her tüp iyice karıştırıldı.

KL-6	Konsantrasyon (IU/mL)	800	400	200	100	50	25	12,5	0
	OD	0,197	0,336	611	927	1119	1511	1755	2211

6. Streptavidin-HRP (1x) - Şişeyi açmadan önce santrifüjlendi. Streptavidin-HRP, 100 kat seyreltme gerektirdiği için , 990 µL HRP Diluent ile 10 µL Streptavidin-HRP eklenerek çözelti hazırlandı.
Test prosedürü ;
1. Tüm reaktifleri ve numuneleri oda sıcaklığına getirildi ve . Tüm numunelerin, kontrollerin ve standartların iki kopya halinde test edildi.
2. Tüm reaktifleri, çalışma standartlarını ve numuneler hazırlandı
3. Standart Diluent Buffer ile bir Blank kuyusu ayarlanıp, kuyu başına 50 µL Standart veya Numune ekleyin. Her kuyucuğa 50µL Biotinylated -Conjugate(1x) ekleyin. İyice karıştırın, sağlanan yapışkan filmler ile kaplayın. 37°C' de 1 saat inkübe edin.
4. Her kuyuyu aspire edin ve işlemi toplam üç yıkama için tekrarlayarak yıkayın.
5. Her kuyucuğa 100 µL Streptavidin-HRP (1x) ekleyin. Sağlanan yapışkan filmlerle örtün. 37°C'de 1 saat inkübe edin.

6. Her kuyuyu aspire edin ve işlemi toplam beş yıkama için tekrarlayarak yıkayın. 7. Her kuyucuğa 90 µL Substrate Solution ekleyin. 37°C'de 20 dakika inkübe edin. Plakayı karanlıkta taslaklardan ve diğer sıcaklık dalgalanmalarından uzak tutmak. Plakayı dolaylı ışık yerleştirmekten kaçının.

8. Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu ekleyin. En yüksek standart konsantrasyonunu içeren ilk dört kuyuda bariz mavi renk gelişir. Renk değişimi homojen görünmüyorsa, iyice karışmasını sağlamak için plakaya hafifçe vurun.
9. 450nm'ye ayarlanmış bir mikroplaka okuyucu kullanarak 5 dakika içinde her kuyunun optik yoğunluğunu belirleyin. BioTek SYNERGY H1 (MİCROPLATELLET READER) cihazında 450 nm de absorbans ayarlanarak okuma yapıldı.

3.3.2 Akciğer Dokusunun Histopatolojik İncelenmesi

Masson-Trikrom yöntemi ile boyanmış olan akciğer parankimi kesitleri, Memorial Patoloji Laboratuvarı'nda bulunan Leica Aperio AT-2 "whole slide scanner" cihazı aracılığıyla, yüksek çözünürlükte taranarak elektronik ortama aktarıldı. Sectra IDS7 sistemi üzerinden, tüm slide görüntüsü üzerinde, artefakt içermeyen ve parankimi koronal düzlemde temsil eden kesitler seçilip, her bir denek için x2 büyütmede ve yüksek çözünürlükte kaydedildi. Her görüntü ImageJ uygulamasında bulunan ve renk optimizasyonu sağlayan eklentiler yardımıyla iyileştirildi.

Sonraki aşamada, ImageJ betik dili yardımıyla Dr. Yıldırım Karslıoğlu tarafından hazırlanan bir görüntü analizi makrosu kullanılarak, her bir denekten seçilen görüntülerde, akciğer parankiminin toplam alanı ve bu alanda Trikrom yöntemi ile maviye boyanmış bağ dokusu kısımlarının oranı, kullanıcı etkileşimi gerektiren bir metodla otomatik olarak ölçüldü.

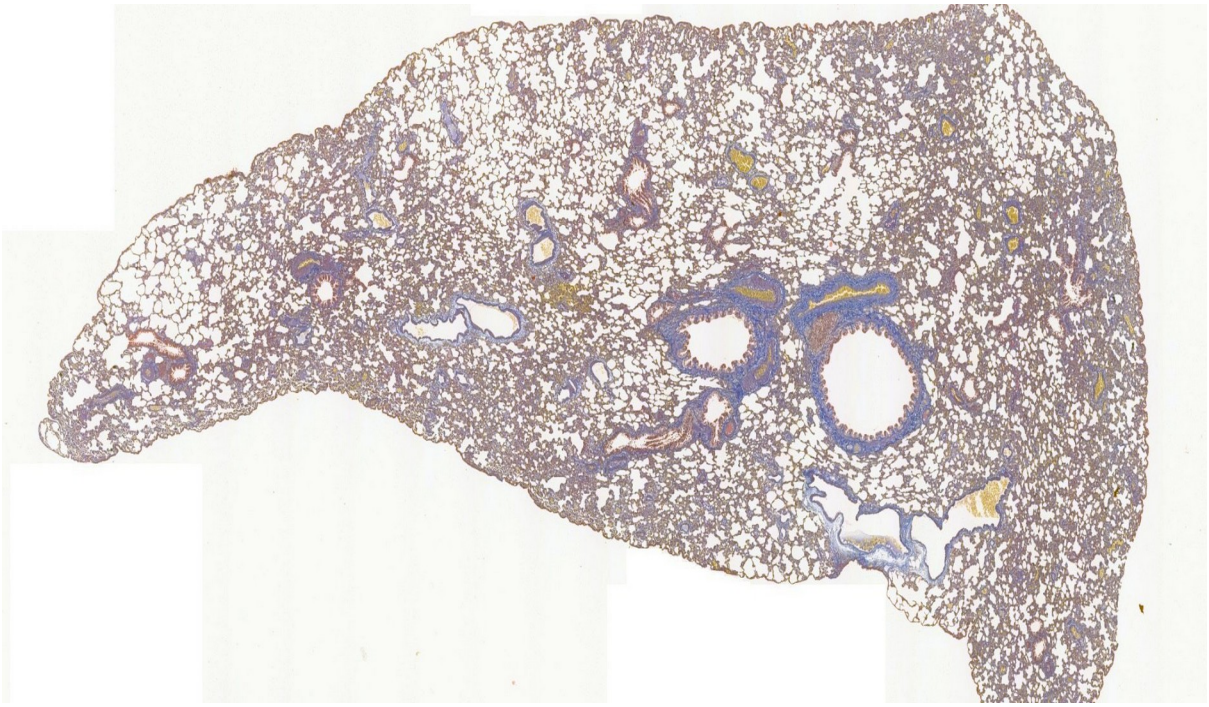
Ölçüm yöntemi ve aşamaları aşağıdaki gibidir:

1) Ölçüm yapılabilmesi için, orijinal görüntü 8-bit gri-skalalı (grey-scaled) görüntü formatına dönüştürülmüştür.

2) Dokunun toplam alanı "thresholding" adı verilen bir işlemle, doku kesiti içeren pixellerin tamamının seçilmesi yoluyla pixel cinsinden ölçülmüş ve kaydedilmiştir.
d) Orijinal görüntü, ImageJ uygulamasında bulunan "Color Deconvolution" eklentisi kullanılarak, Masson-Trikrom boyası için optimize edilmiş renk skalası ile, mavi rengin seçimini kolaylaştıracak biçimde renk kanallarına ayrılmış ve uygun görüntü seçilmiştir.
e) Bu aşamada, ikinci bir "Thresholding" uygulanmaktadır. Otomatik segmentasyonda olabilecek hataları önlemek ve bağ dokusu alanlarının doğru biçimde seçildiğinden emin olmak için, bu işlem kullanıcının görsel doğrulaması ile etkileşimli olarak gerçekleştirilmektedir. "Thresholding" için doğru eşik değer belirlendikten sonra, bağ dokusuna karşılık gelen pikseller kırmızı ile seçilmektedir.
f) Son aşamada, yalnızca bağ dokusu olarak işaretli piksellerden oluşan bir "binary" görüntü elde edilmektedir. Bu görüntü aracılığıyla, dokunun kesit yüzündeki bağ dokusu alanının toplamı gene piksel cinsinden ölçülmektedir.

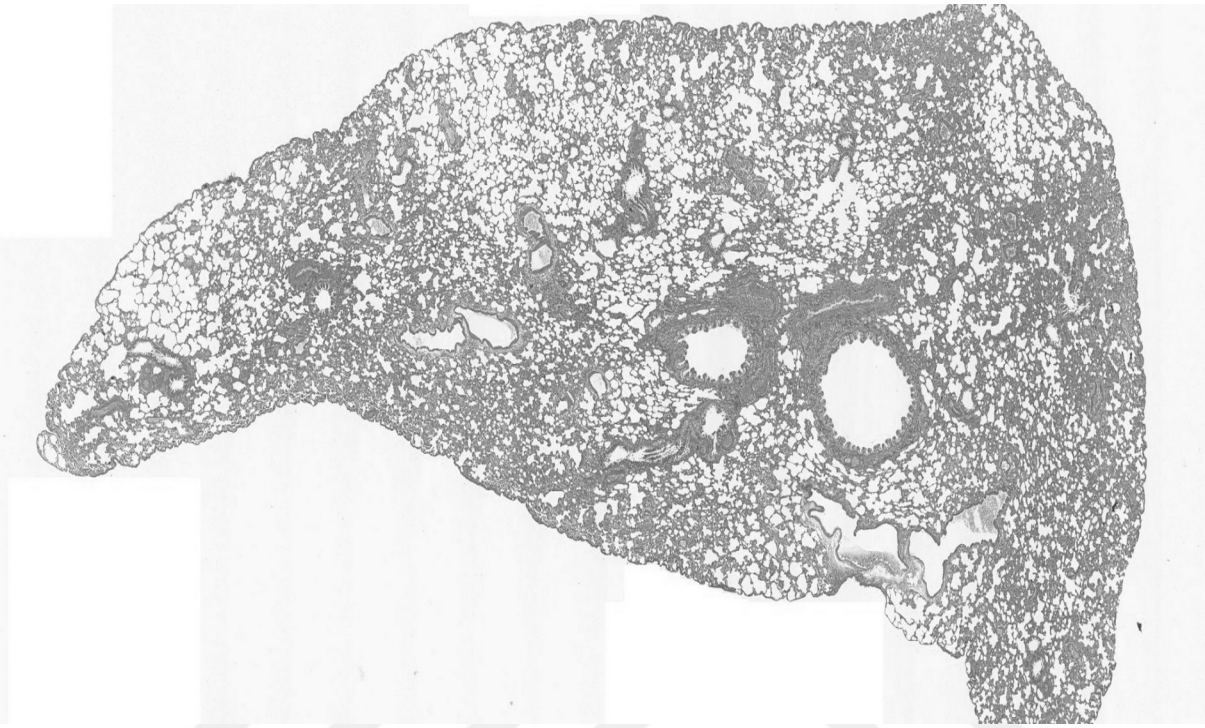
Sonuçlar ImageJ uygulamasının Results penceresinde piksel cinsinden gösterilmektedir. (Bağ dokusu alanı / Toplam doku alanı) X 100 formülü ile, bağ dokusunun oransal değeri "yüzde" cinsinden elde edilmektedir.

Akciğerin Masson-Trikrom yöntemi ile boyanmış kesitinde, mavi boyalı bağ dokusunun, toplam akciğer parankimi alanına oranını ölçmenin aşamaları görülmektedir.



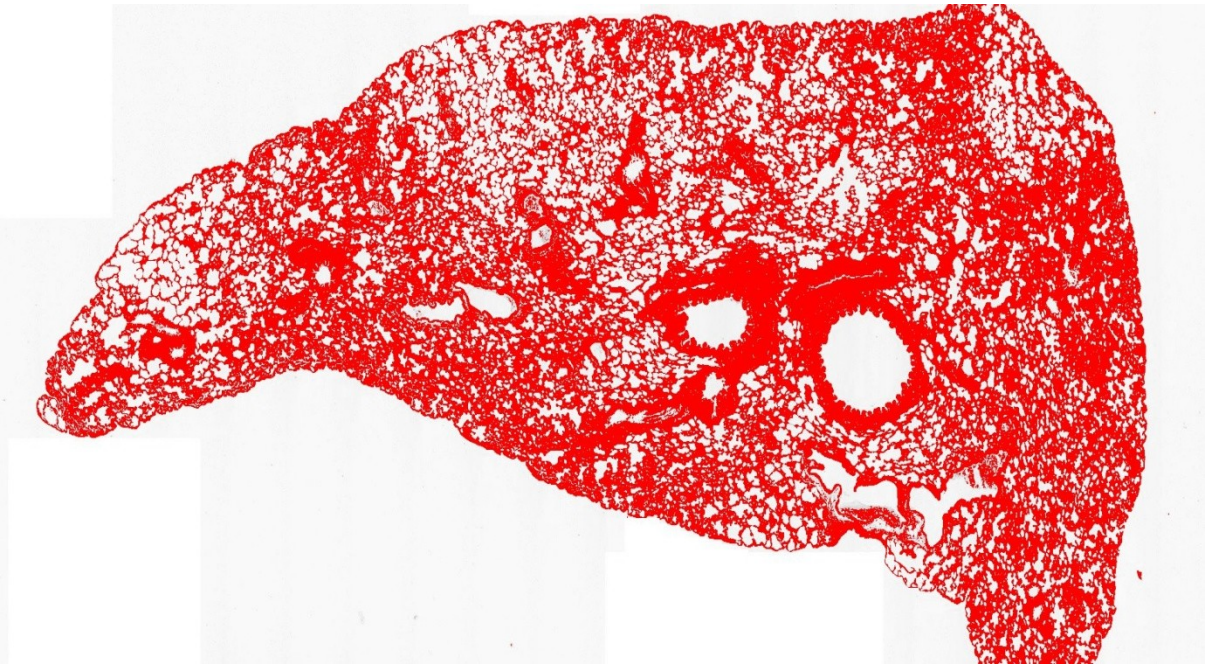
Resim1:Akciğer Orjinal Kesiti

a)Koronal düzlemdeki akciğer kesiti Masson-Trikrom histokimyasal yöntemi ile boyandıktan sonra, kollajen içeren bağ dokusu alanları mavi renk boyanarak, kolajen içermeyen parankimden ayırt edilmektedir.



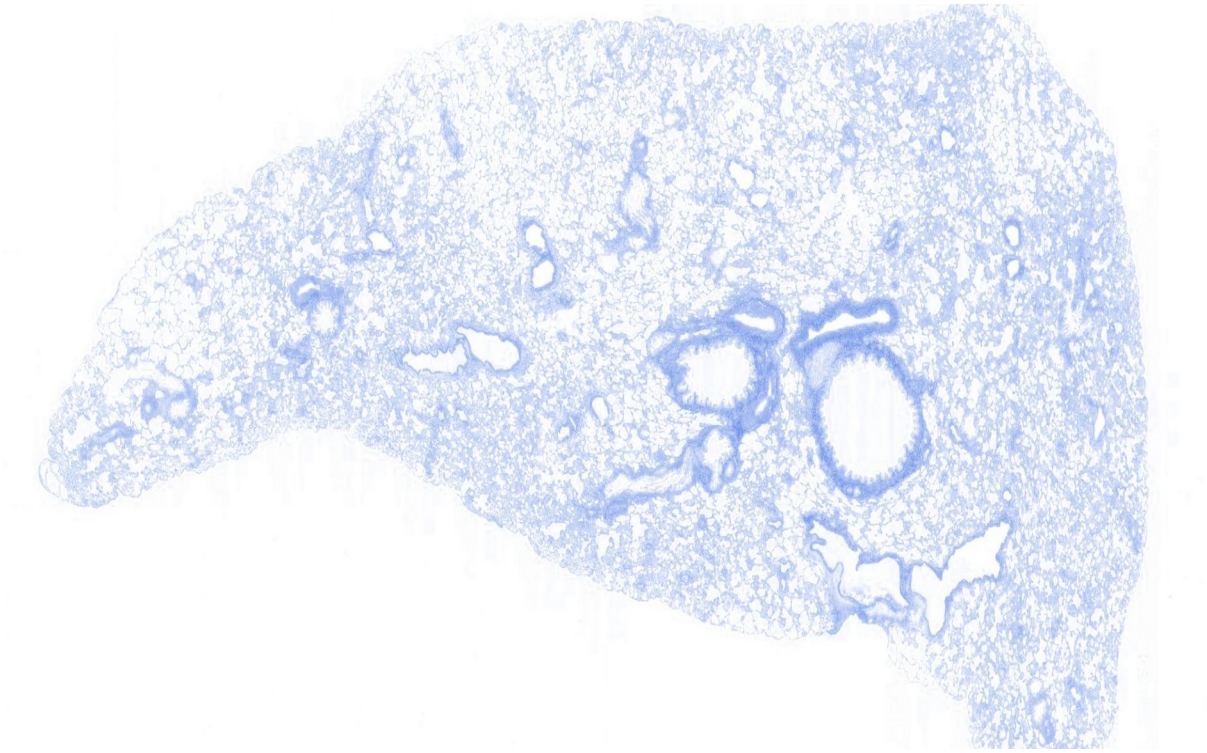
Resim 2: Akciğer Orjinal 8 bit resim

b) Ölçüm yapılabilmesi için, orijinal görüntü 8-bit gri-skalalı (grey-scaled) görüntü formatına dönüştürülmüştür.



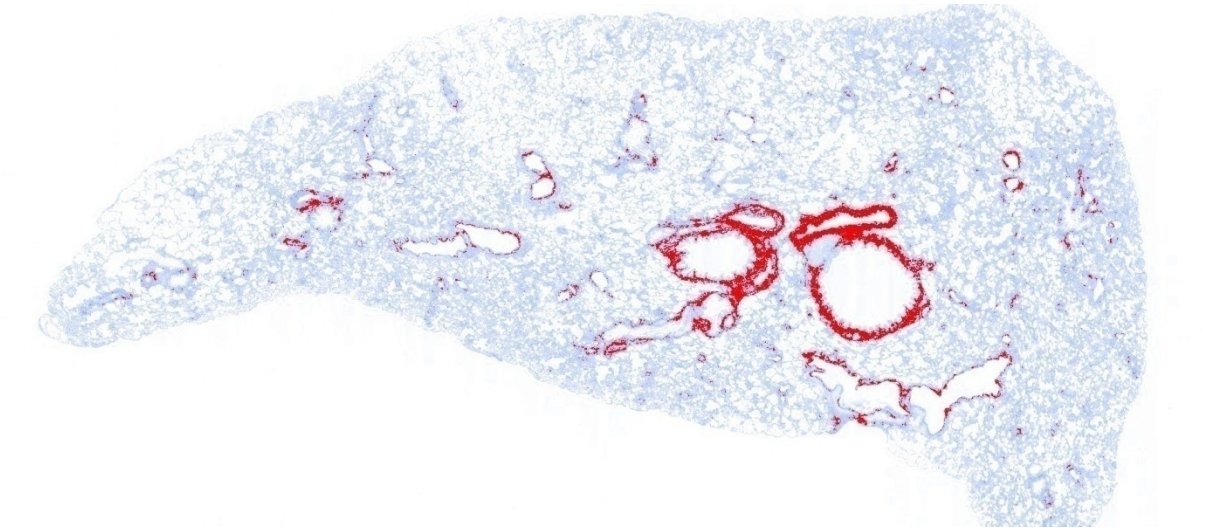
Resim3: Thresholded Image for Total Area Measurement

c) Bir sonraki aşamada, dokunun toplam alanının hesaplanabilmesi için "thresholding" adı verilen bir işlemle, doku kesiti içeren pixellerin tamamı otomatik olarak seçilmiştir (kırmızı renkte gösterilen alan). Bu aşamada dokunun kesit yüzeyinin alanı pixel cinsinden ölçülmektedir.



Resim4:Color Deconvoluted Image for Fibrosis

d) Orijinal görüntü, ImageJ uygulamasında bulunan "Color Deconvolution" eklentisi kullanılarak, Masson-Trikrom boyası için optimize edilmiş renk skalası ile, mavi rengin seçimini kolaylaştıracak biçimde renk kanallarına ayrılmış ve uygun görüntü seçilmiştir.



Resim5: Thresholded Connective Tissue Area

e) Bu aşamada, ikinci bir "Thresholding" uygulanmaktadır. Otomatik segmentasyonda olabilecek hataları önlemek ve bağ dokusu alanlarının doğru biçimde seçildiğinden emin olmak için, bu işlem kullanıcının görsel doğrulaması ile etkileşimli olarak gerçekleştirilmektedir. "Thresholding" için doğru eşik değer belirlendikten sonra, bağ dokusuna karşılık gelen pikseller kırmızı ile seçilmektedir.



Resim6: Binary Image of Segmented Connective Tissue

f) Son aşamada, yalnızca bağ dokusu olarak işaretli piksellerden oluşan bir "binary" görüntü elde edilmektedir. Bu görüntü aracılığıyla, dokunun kesit yüzündeki bağ dokusu alanının toplamı gene piksel cinsinden ölçülmektedir.

İmageJ uygulamasının Results penceresinde, akciğer dokusunun toplam yüzey alanı ve yalnızca bağ dokusundan oluşan kısımların alanı, piksel cinsinden kaydedilmek üzere gösterilmekte ve ölçüm işlemi sona ermektedir.

3.4 Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışma kapsamında toplanan veriler IBM Sosyal Bilimler için veri analizi programı paket versiyon 23.0 ile analiz edildi.

Sürekli veriler için ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum tanımlayıcı değer olarak verildi. Normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda, "ANOVA Testi", gruplar arasında anlamlı farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Post-Hoc "Bonferroni Testi" kullanıldı. Ölçüm değerleri arasındaki ilişkiler "Pearson Korelasyon Testi" ile değerlendirildi.

Sonuçlar, p değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 1. Ölçüm Parametrelerinin Dağılımı

Ölçümler	**n**	**$\bar{x}$**	**± SD**	**M**	**Alt**	**Üst**
Toplam doku alanı (pixel)	23	485086,2	81742,9	476291,0	311257,0	697603,0
Bağ dokusu alanı (pixel)	23	74729,3	38524,6	79768,0	14078,0	145616,0
Bağ dokusu oranı (%)	23	15,4	7,20	16,99	3,25	26,10
İnterlökin-6	23	20,04	3,36	19,33	15,75	27,42
İnterlökin-10	23	21,50	3,90	20,33	16,25	30,38
İnterlökin-13	23	29,85	3,26	29,01	25,13	36,48
İnterlökin-17	23	343,99	45,97	329,05	282,98	472,83
KL-6	23	27,74	15,61	23,20	13,29	84,67

* $\bar{x}$: Ortalama, SD: standart sapma, M: Medyan.

Çalışma kapsamındaki deneklerin ölçüm değerlerinin dağılımı Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 2. Bireylerin Aerodinamik ve Ses Handikap İndeksi (SHİ-10) Skorlarına İlişkin Normallik Testi

Ölçekler	İstatistik	SD	*p*-değeri
Toplam doku alanı (pixel)	0,170	23	0,057
Bağ dokusu alanı (pixel)	0,111	23	0,200
Bağ dokusu oranı (%)	0,174	23	0,054
İnterlökin-6	0,148	23	0,200
İnterlökin-10	0,140	23	0,200
İnterlökin-13	0,124	23	0,200
İnterlökin-17	0,140	23	0,200
KL-6	0,135	23	0,200

* SD: Serbestlik derecesi.

Çalışma kapsamındaki deneklerin ölçüm değerlerine ilişkin Shapiro-Wilk normallik testi sonuçları Tablo 2'de yer almaktadır. Tablo incelendiğinde tüm ölçüm değerleri için $p>0,05$ olduğundan ölçüm değerleri normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmanın bu bölümünde kurulan hipotezler doğrultusunda uygulanan analiz yöntemleri yer almaktadır.

Tablo 3. Deney Gruplarına Göre Ölçüm Değerlerinin Dağılımı

Ölçümler	Grup	N		± SD	M	Min	Maks	F	*p*	Fark*
Toplam doku alanı (pixel)	Kontrol	6	504245,5	69525,7	505107,5	425371,0	588953,0	1,380	0,274	
	A1	8	509669,9	95231,0	480780,0	434124,0	697603,0			
	A2	9	450461,1	72044,1	456195,0	311257,0	577609,0			
Bağ dokusu alanı (pixel)	Kontrol	6	**23838,8**	**7738,4**	**22770,5**	**14078,0**	**36907,0**	**19,177**	**<0,001**	**K-A$_1$, K-A$_2$**
	A1	8	**98067,5**	**23706,7**	**96436,0**	**66442,0**	**145616,0**			
	A2	9	**87911,3**	**29490,4**	**82766,0**	**48247,0**	**143412,0**			
Bağ dokusu oranı (%)	Kontrol	6	**4,7**	**1,3**	**4,4**	**3,3**	**6,3**	**45,317**	**<0,001**	**K-A$_1$, K-A$_2$**
	A1	8	**19,2**	**3,0**	**19,1**	**15,0**	**23,9**			
	A2	9	**19,2**	**4,1**	**17,2**	**15,0**	**26,1**			
İnterlökin-6	Kontrol	6	19,1	2,4	19,1	16,8	21,5	0,421	0,662	
	A1	8	20,0	3,3	19,4	15,7	26,0			
	A2	9	20,7	4,1	19,3	15,9	27,4			
İnterlökin-10	Kontrol	6	21,6	3,8	20,3	18,4	29,1	0,410	0,669	
	A1	8	20,5	4,2	19,9	16,3	26,4			
	A2	9	22,3	3,9	20,9	18,6	30,4			

İnterlökin-13	Kontrol	6	28,4	1,6	28,9	25,7	30,1	0,809	0,460
	A1	8	30,3	4,1	29,8	25,1	36,5		
	A2	9	30,4	3,3	29,8	26,0	36,2		
İnterlökin-17	Kontrol	6	336,6	29,6	327,2	301,1	379,3	0,100	0,905
	A1	8	345,8	51,7	332,5	283,0	429,6		
	A2	9	347,3	53,5	329,0	298,3	472,8		
KL-6	Kontrol	6	23,5	8,8	23,1	15,1	39,7	1,264	0,304
	A1	8	34,7	23,3	30,1	14,9	84,7		
	A2	9	24,3	8,5	22,9	13,3	39,7		

* A: Kontrol, B: A1, C: A2, $\bar{x}$: Ortalama, SS: standart sapma, M: Medyan.

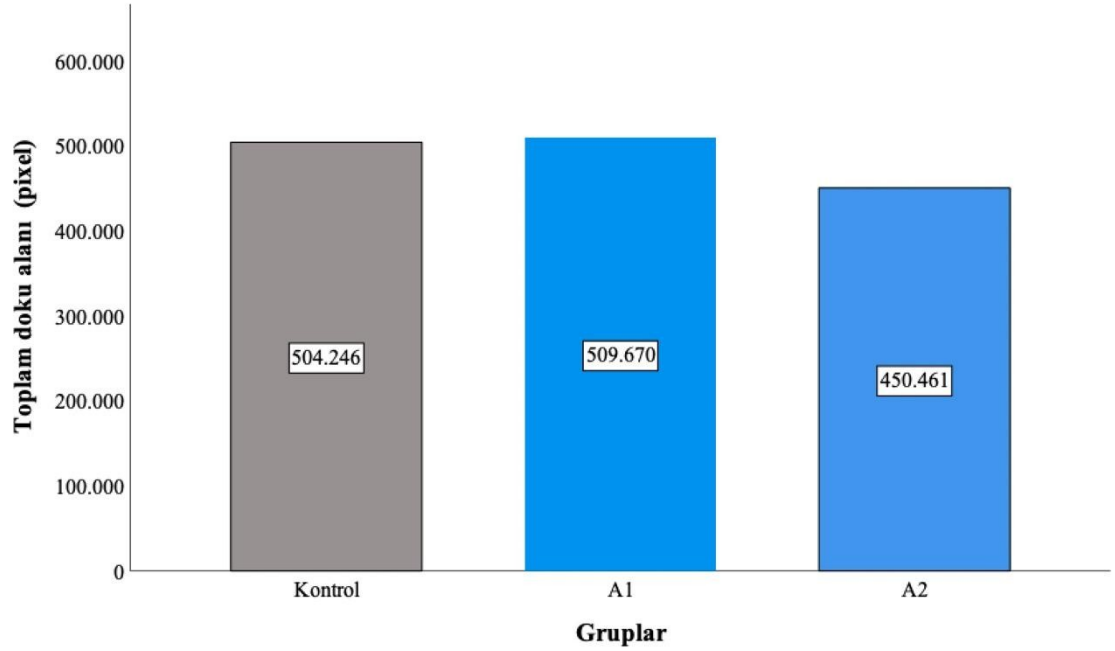
Deney gruplarına göre ölçüm değerlerinin dağılımı Tablo 3'te yer almaktadır. Tablo incelendiğinde deney gruplarına göre bağ dokusu alanı ve bağ dokusu oranı ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Bu farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için yapılan Bonferroni testi sonucunda her iki ölçüm için de farklılığın kontrol grubuyla A1 grubu ve kontrol grubuyla A2 grubunu arasındaki farklılıktan kaynaklandığı belirlenmiştir. A1 grubunun ölçümleri ile A2 grubunun ölçüleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık görülmemiştir.

Tablo 4. KL-6 ile İnterlökin Değerleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Pearson Korelasyon		KL-6
Interlökin 6	Korelasyon Katsayısı	-0,406
	p-değeri	0,055
	n	23
Interlökin 10	Korelasyon Katsayısı	0,308
	p-değeri	0,153
	n	23
Interlökin 13	Korelasyon Katsayısı	0,127
	p-değeri	0,564
	n	23
Interlökin 17	Korelasyon Katsayısı	0,375
	p-değeri	0,078
	n	23

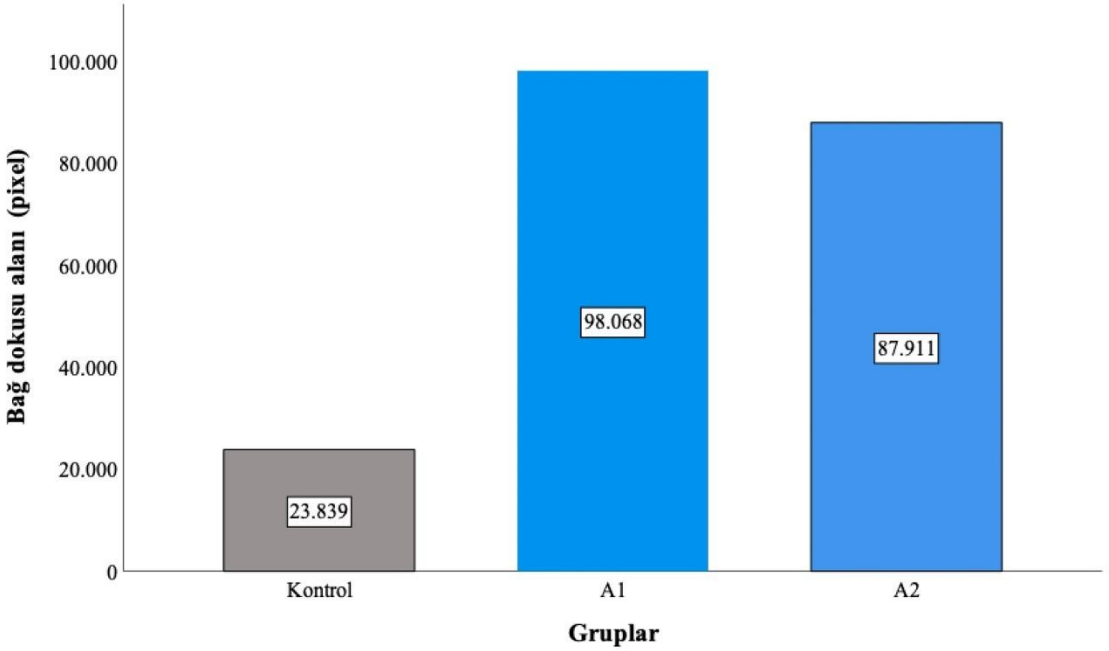
Çalışma kapsamındaki deneklerin KL-6 ölçümleri ile interlökin ölçümleri arasında bir ilişki olup olmadığının değerlendirildiği Pearson korelasyon analizi sonuçları Tablo 4'te yer almaktadır. Tablo incelendiğinde KL-6 değerleri ile interlökin değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı belirlenmiştir *(p*>0,05).

Grafik 1. Deney Gruplarına Göre Toplam Doku Alanı Dağılımı



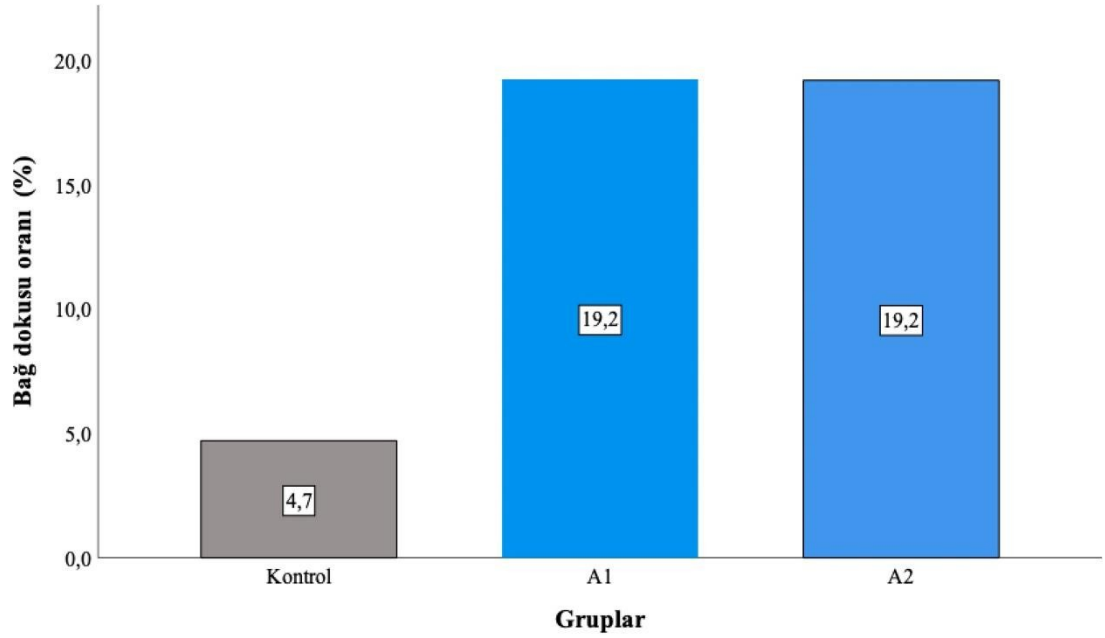
Deney gruplarının toplam doku alanı dağılımları Grafik 1'de yer almaktadır. Grafik incelendiğinde A1 grubunun toplam doku alanının en yüksek, A2 grubunun ise en düşük olduğu görülmektedir.

Grafik 2. Deney Gruplarına Göre Bağ Doku Alanı Dağılımı



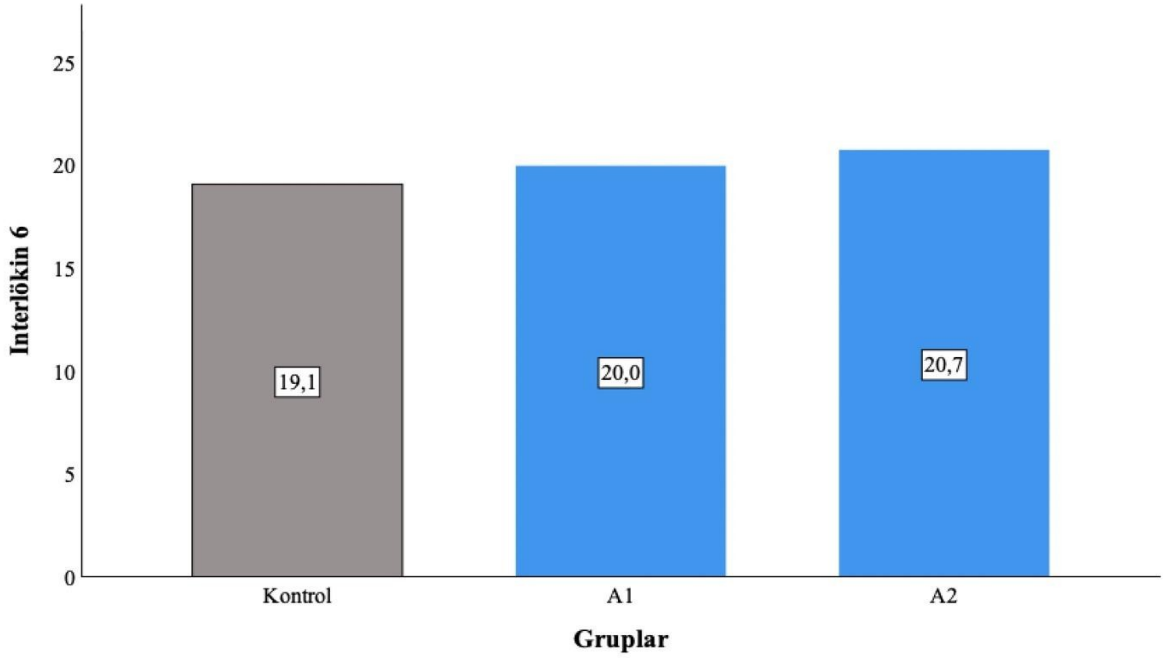
Deney gruplarının bağ doku alanı dağılımları Grafik 2'de yer almaktadır. Grafik incelendiğinde A1 grubunun bağ doku alanının en yüksek, kontrol grubunun ise en düşük olduğu görülmektedir.

Grafik 3. Deney Gruplarına Göre Bağ Doku Oranı Dağılımı



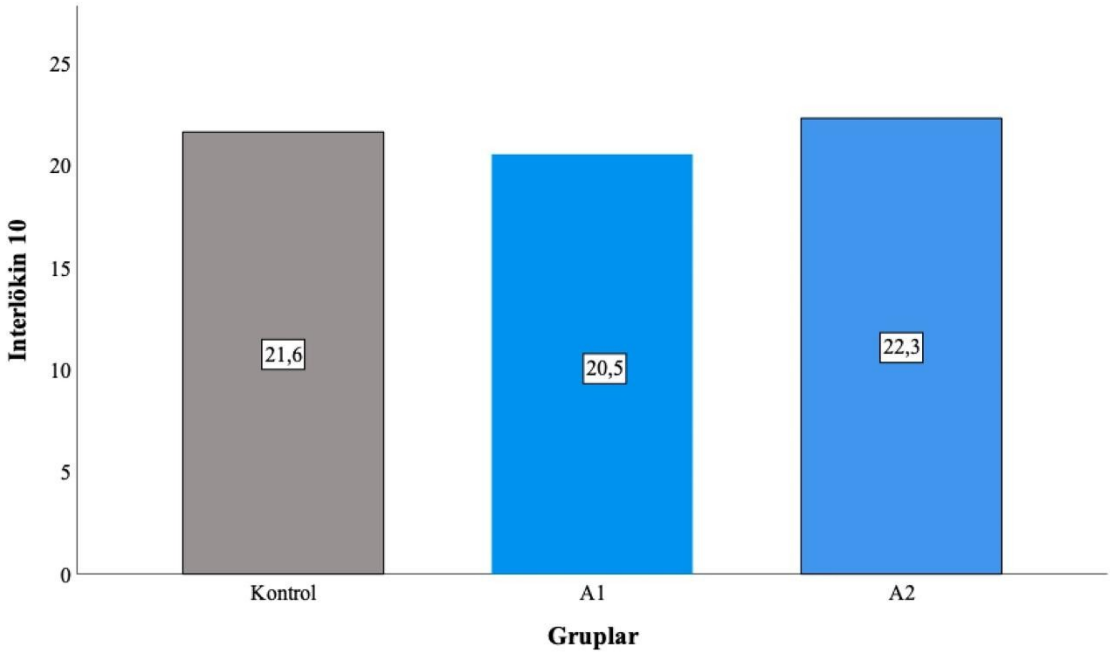
Deney gruplarının bağ doku oranı dağılımları Grafik 3'te yer almaktadır. Grafik incelendiğinde A1 ve A2 grubunun bağ doku oranının kontrol grubuna göre daha yüksek belirlenmiştir.

Grafik 4. Deney Gruplarına Göre Interlökin-6 Ölçümlerinin Dağılımı



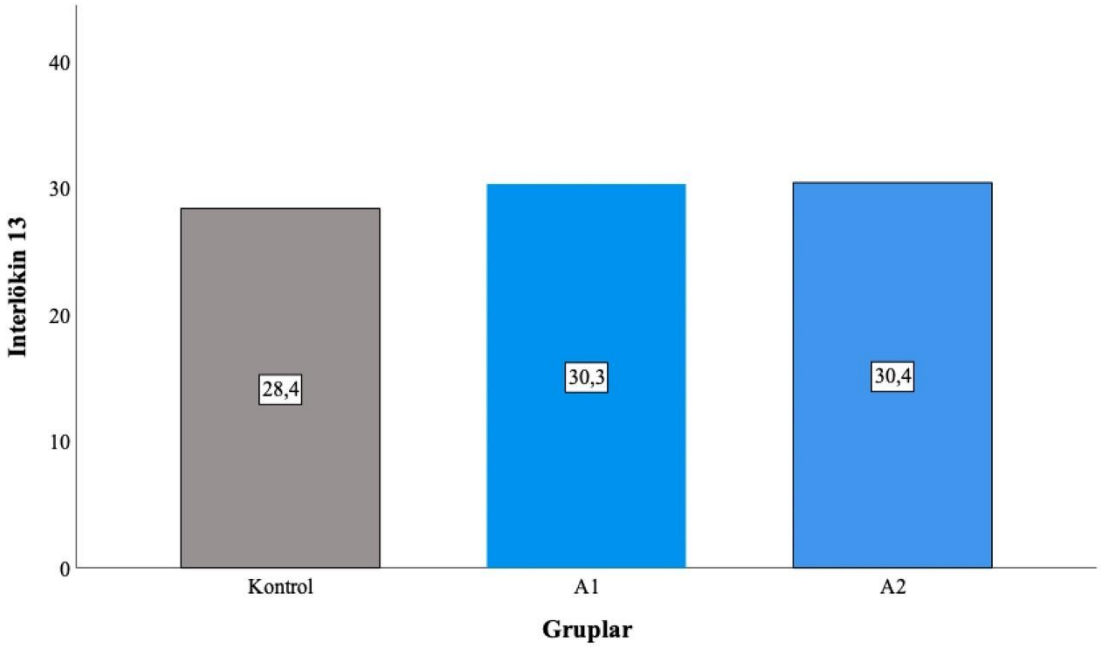
Deney gruplarının interlökin-6 ölçümlerinin dağılımları Grafik 4'te yer almaktadır. Grafik incelendiğinde A2 grubunun interlökin-6 ölçümlerinin en yüksek, kontrol grubunun ise en düşük olduğu görülmektedir.

Grafik 5. Deney Gruplarına Göre Interlökin-10 Ölçümlerinin Dağılımı



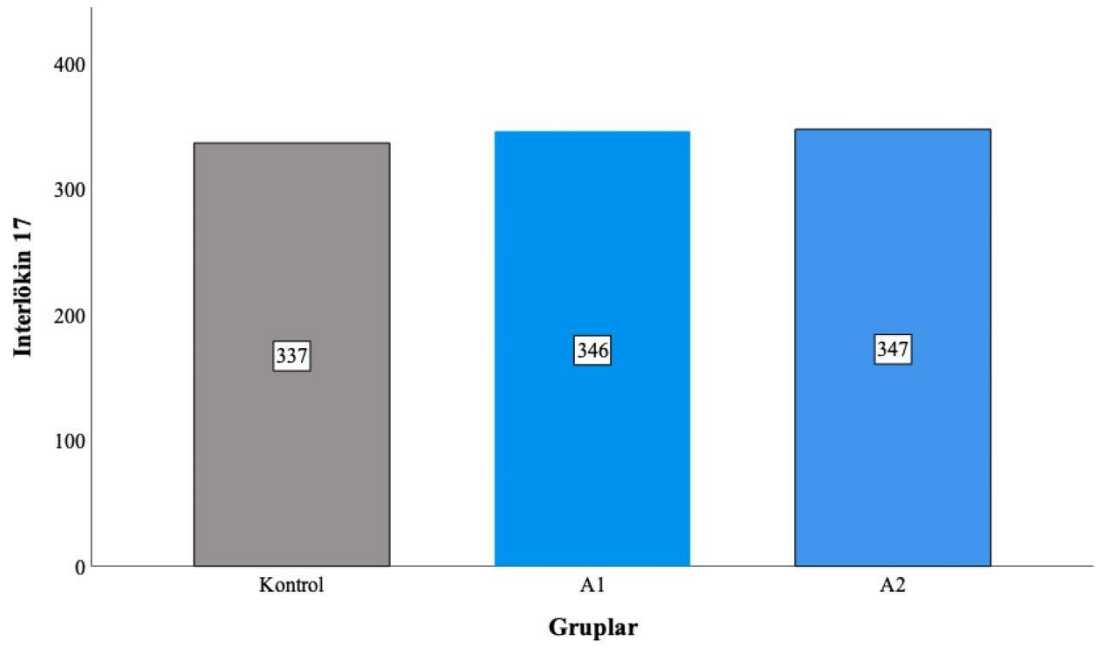
Deney gruplarının interlökin-10 ölçümlerinin dağılımları Grafik 5'te yer almaktadır. Grafik incelendiğinde A2 grubunun interlökin-10 ölçümlerinin en yüksek, A1 grubunun ise en düşük olduğu görülmektedir.

Grafik 6. Deney Gruplarına Göre Interlökin-13 Ölçümlerinin Dağılımı



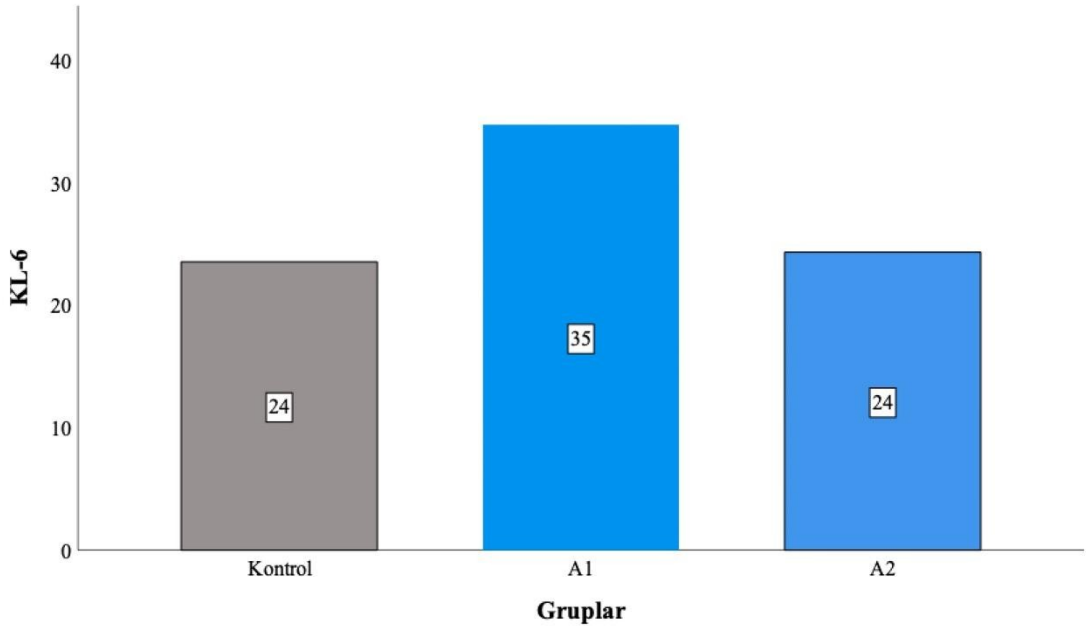
Deney gruplarının interlökin-13 ölçümlerinin dağılımları Grafik 6'da yer almaktadır. Grafik incelendiğinde A2 grubunun interlökin-13 ölçümlerinin en yüksek, kontrol grubunun ise en düşük olduğu görülmektedir.

Grafik 7. Deney Gruplarına Göre Interlökin-17 Ölçümlerinin Dağılımı



Deney gruplarının interlökin-17 ölçümlerinin dağılımları Grafik 7'de yer almaktadır. Grafik incelendiğinde A2 grubunun interlökin-17 ölçümlerinin en yüksek, kontrol grubunun ise en düşük olduğu görülmektedir.

Grafik 8. Deney Gruplarına Göre KL-6 Ölçümlerinin Dağılımı



Deney gruplarının KL-6 ölçümlerinin dağılımları Grafik 8'de yer almaktadır. Grafik incelendiğinde A1 grubunun KL-6 ölçümlerinin A2 ve kontrol gruplarından daha yüksek olduğu görülmektedir.

5. Tartışma

Janus Kinazların İnhibitörlerinin akciğer fibrozisi üzerindeki rollerini belirlemek amacıyla *Wistar Albino Rat* lar üzerinde etkinliğini incelediğimiz bu çalışmada sınırlı da olsa bu grup ilaçların ilk temsilcisi olan tofasitinibin etkili olduğunu bulduk.

Tablo 3'te yer alan verilere göre bleomisin uygulanan gruplarda akciğer fibrozis alanları kontrol gruplarına oranla daha fazla meydana gelmiştir. Bu durum istatiksel olarak anlamlıdır. Grafik 1 ve Grafik 2 nin verileri incelendiğinde bleomisin ve tofasitinibin eş zamanlı uygulandığı grubun fibrozis oranlarının yüksek olduğunu saptadık. Grafik 2 ve Grafik 3 incelediğimizde de bağ doku oranlarında ve bağ doku alanlarında anlamlı farklılıklar mevcuttur. Mevcut veriler ışığında eş zamanlı uygulama grubunda tofasitinib etkinliğinin kısıtlı olabileceği şeklinde yorumlandı. Bleomisin ve tofasitinibin eş zamanlı uygulandığı grubun verilerini tofasitinibin profilaktik uygulandığı grubun verileri ile karşılaştırdığımızda tofasitinibin profilaktik uygulandığı grubun bağ doku oranlarının düşük olduğunu gözlemledik. Tofasitinib JAK 1-3 inhibisyonu üzerinde pro inflamasyonu baskılar ve fibrozis gelişimini önleyici etki yapar.[46,48] Tofasitinibin profilaktik uygulandığı grupta, tofasitinibin belli konsantrasyonlarda olması fibrozisin önüne geçilebileceğini gösterdi. RA, SSc gibi olgularda mevcut hastalıklara ilişkin semptomların ortaya çıkması sırasında akciğer hasaranın daha önceden başladığı düşünüldüğünde, tedavinin daha erken aşamada başlanmasının interstisyel hasarı sınırlayabileceği şeklinde yorumladık.

Bizim çalışmamızda Grafik 4 de gösterildiği gibi IL-6 seviyelerinin bleomisin ve tofasitinibin eş zamanlı uygulandığı grup ile tofasitinibin profilaktik uygulandığı grupta baskılandığı gösterilmiştir. Literatüre uygun olarak tofasitinib etkisi ile IL-6 üretimi sınırlandırılmıştır. Ancak bleomisin ve tofasitinibin eş zamanlı uygulandığı grup ile tofasitinibin profilaktik uygulandığı gruplar arasında anlamlı farklılık meydana gelmemiştir. Başlangıç seviyesinin ve ara değerlerlendirilmelerin yapılmamış olması çalışmanın kısıtlılığı olarak yorumlandı.

IL-6, JAK -STAT yolağı indükleme ile birlikte IL-10 ve IL-17 nin salgılanmasında da rol alır. JAK inhibitörlerinin etkinliklerine yönelik yapılan çalışmalarda IL-6 seviyelerini baskıladığı gösterilmiştir. Tofasitinib STAT 1 ve STAT 3 ü bloke ederek IL-6 nın etkileşimini sınırlayıcı etkiye sahiptir. [47,48,51] Wang ve arkadaşları tarafından yapılan cilt düzeyindeki bir fibrozis model çalışmasında IL-6 ile uyarılan hücrelerin tofasitinib ile tedavi

edilmesi sonrası yapılan değerlendirmede, fibröz doku oranları daha düşük saptanmıştır. Tofasitinib CD4 T hücrelerinin, T helper hücrelerinin, B lenfositlerin stimüle olmasını da bloke eder.[46]

Grafik 5 verileri Grafik 2 ve 3 ile birlikte incelendiğinde; ratlarda geliştirilen indüksiyona bağlı olarak IL-10 nun arttığını gözlemledik. Tofasitinib IL-10 üzerinde ki baskılayıcı etkisi kısıtlıdır ve bizim çalışmamızda da benzer sonuç oluşmuştur. IL-10 un yüksek olduğu tofasitinibin profilaktik uygulandığı grupta bağ doku alanları bleomisin ve tofasitinibin eş zamanlı uygulandığı grupta düşük bulunması antiinflamatuar etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca tofasitinib in profilaktik olarak uygulamasının IL-10 un üzerinde baskılayıcı etki oluşmasını da sınırladığını düşündürmektedir. IL-10 seviyesinin yüksek olması, bağ doku oranlarının tofasitinibin profilaktik uygulandığı grupta daha düşük olması IL-10'un başka bir yoldan inflamasyonu ve fibrozis gelişimini sınırlayabileceğini bize düşündürmektedir. IL-10 immünoloji ve enfeksiyonlara sekonder gelişen yanıtın dengelenmesinde ve organizmanın korunmasında rol alan bir sitokindir . IL-10 genel olarak inhibitör rol oynamaktadır. IL-10'un proinflamatuar etkilerini net değildir ve bu durum kronik inflamasyon sürecinde gerçekleşebileceği konusunda fikirler vardır.[52,53,54]

Çalışmamızda gruplar arasında bağ doku oranı en az olan tofasitinibin profilaktik uygulandığı grubun IL-17 değerleri en yüksek düzeyde saptanmıştır. Aynı grupta IL-6 değerlerinin baskılanmış olduğunu gösterdik. Ayrıca fibröz doku değerlerinde de düşüklükleri patolojik olarak gösterdik. Mevcut veriler ışığından inflamasyonu bleomisin ile indüklendikten sonra gruplarda hasarların meydana geldiği, tofasitinib in JAK-1 JAK-3 gibi yolakları inhibe etmesine bağlı olarak akciğer hasarlanmasının belli düzeylerde önlenebildiğini gösterdik. Mevcut IL-17 seviyesi IL-6 ve bağ doku oranları ile kıyaslandığında belli ölçüde inflamatuar sürecin devam ettiğini gözlemledik. Ayrıca farklı yollardan IL-17 uyarımının mümkün olabileceğini düşündürdü. İnflamasyona bağlı olarak

IL-17 değerlerinin diğer proinflamatuar sitokinlerin ürünü olduğu düşünüldüğünde, fibrozis seviyesinde bir ilerleme olmasada inflamatuar sürecin devam ettiği ve IL-17 değerinin hedef seviyelere ulaştığı şeklinde yorumlandı. Çalışma süresince ilk doz bleomisin ve tofasitinib uygulama aşamalarında ve sonraki periyotta kan tetkikleri ile değerlendirilme yapılamaması çalışmanın kısıtlılığı olarak kabul edildi. Ayrıca IL-10 değerlerinde yükseklik ve IL-6 değerlerinde düşük veriler, mevcut fibröz doku oranları IL-10 üzerinde ve JAK-STAT inhibisyonu aracılığıyla inflamasyonun baskılayarak sınırlandırılmaya çalışıldığı şeklinde

yorumlandı. IL-17 CD4 T hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir. IL-6 ,TGF beta , IL-22 aralarında farklı etkileşime bağlı olarak ve JAK-STAT 3 yolunun uyarılması ile beraber TH17 hücrelerinin üretimi uyarılmış olur. [54,56] Zang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Fareler üzerinde yapılan bir kalp nakli uygulamasında kan IL-17 seviyelerindeki artış takip edilmiştir. İlk beşinci güne kadarki süreçte IL-17 seviyesi yavaş şekilde arttığı gözlemlenmiştir.[56] Ayrıca proinflmtuar sitokinlerle beraber IL-17 üretiminde IL-23 ün de katkı sağladığı gösterilmiştir. Tofasitinib JAK 1 ve JAK 3 yolunu ağırlıklı inhibe ederek diğer proinflamatuar sitokinleri ve IL-17 üretimini baskılamaya çalışır.[55,56]

Deney gruplarının interlökin-13 ölçümlerinin dağılımları Grafik 6'da yer almaktadır. Grafik incelendiğinde tofasitinibin profilaktik uygulandığı grubun IL-13 ölçümlerinin en yüksek, kontrol grubunun ise en düşük olduğu görülmektedir. Yine tofasitinibin profilaktik uygulandığı grubun IL-6 seviyeleri düşük saptanmıştır. IL-6 ve IL-13 proinflamatuar sitokinlerdir ve akciğer fibrozisi gelişiminde önemli rollere sahiptirler. Tofasitinib JAK 1-3 selektif olarak inhibe etmesi ve kısmenden JAK 2 inhibisyonu IL-13 seviyelerinde meydana gelen yüksekliği açıklayabilmektedir. Ancak proinflamatuar sürecin aktif olması doğrudan fibrozis gelişime neden olmamıştır. Tofasitinibin profilaktik uygulandığı gruba ait veriler proinflamatuar sitokinlerin yüksek olduğunu göstermiştir. Mevcut deneysel veriler sitokin seviyelerinde belli artışlar olsada fibrozis gelişiminin yeterli olmadığını bize göstermektedir. IL-10 eksikliği ve tofasitinib in fibrozisin gelişmeye başladığı başka bir basamakta blokaj etkisi yapabileceğini düşündürmüş ve bu başka bir araştırma hedefi olarak belirlenmiştir.

IL-13, T Helper 2 hücre ilişkili proinflamatuar bir sitokindir. İnflamasyonun hücresel etkileşiminde JAK/STAT mekanizmasının indüksiyonu aşamasında rol oynar. IL-13 proinflamatuar etkisini ağırlıklı olarak JAK-1, Tirozin kinaz (TYK)-2, JAK-2 yi uyararak STAT6 üzerinden gösterir. [57,58] Ayrıca IL-13 ün STAT olmadanda fibrozis gelişimine neden olacağına dair kanıtlarda gösterilmiştir. [59] IL-13 inflamasyonun başlangıç aşamasına olan katkısı kısmen aydınlatılmış olsada fibrozise olan katkılarını henüz detaylandırılabilmiş değildir. Akciğer fibrozisi gelişen olgularda alevlenme dönemlerinde IL-13 seviyeleri yüksek saptanmaktadır.[57,59]

KL-6 son zamanlarda interstisyel fibrozisin gösterilmesi amacıyla üzerinde çalışmalar yürütülen , müsinöz yapı gösteren ve tip 2 alveolar hücrelerin ağırlıklı olarak salgıladığı bir glikoprotein dir. Bizim çalışmamızda deney gruplarının KL-6 ölçümlerinin dağılımları

Grafik 8'de yer almaktadır. Grafik incelendiğinde bleomisin ve tofasitinibin eş zamanlı uygulandığı grubun KL-6 ölçümlerinin tofasitinibin profilaktik uygulandığı gruptan ve kontrol grubundan daha yüksek olduğu görülmektedir. KL-6 ölçümleri ile interlökin ölçümleri arasında bir ilişki olup olmadığının değerlendirildiği Pearson korelasyon analizi sonuçları Tablo 4'te yer almaktadır. Tablo incelendiğinde KL-6 değerleri ile interlökin değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

KL-6 ya yönelik elde olan veriler incelendiğinde serum sitokin seviyeleri ile KL-6 arasında bir ilişki ortaya koymamıştır. Tofasitinibin profilaktik uygulandığı grubun pro ve anti inflamatuar etkinliği sitokin düzeyinde daha fazla olduğu çalışmamızda görülsede bunun KL-6 seviyelerini etkilemediğini saptadık. Ancak elde ettiğimiz patolojik veriler ile KL-6 değerlerinde arasında benzer verilere ulaştık. Bağ doku alanlarını ve oranlarının fazla olduğu bleomisin ve tofasitinibin eş zamanlı uygulandığı grubun KL-6 seviyeleri diğer gruplara oranla daha fazla çıkmıştır. Yapılan çalışmalar KL-6 seviyesinin yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (HRCT) görüntüleri ile korele olduğunu göstermiştir.[28,61] Jiang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada IPF li olgularda serum KL-6 seviyelerinin bronkoalveolar sıvıdan daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.[62] Mevcut veriler gruplar arasında korele olmakla beraber serum KL-6 seviyelerinin hastalığın ciddiyetini göstermede daha etkili olduğunu sunmuşlardır. Yüksek seviyede ki KL-6 seviyeleri hastalığın daha ciddi olduğunu göstermektedir.[61,62]

6. Sonuç

İAH mortal seyreden morbiditesi yüksek önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde yaşam süresi kadınlarda ve erkeklerde güncel tedavi imkanları ile artmaktadır. Bilimin insan hayatına yaptığı bu katkı ile birlikte bazı sorunlarda gündeme gelmektedir. İlerleyen yaşlarla birlikte romatolojik hastalıklar ve malignitelerin görülme riskleri artmaktadır. Ayrıca solunumsal patolojiler KOAH, Astım gibi hastalıkların olumsuz etkileri daha uzun seyretmektedir. Bu ve bunlara benzer sebepler nihai olarak akciğerde intersitsiyel bozuklukların gelişmesine neden olmaktadır. RA, SSc, SLE gibi kronik hastalıkları olan hastalar beş-on yıllık takipleri süresince ataklar halinde ciddi solunumsal kaynaklı şikayetler belirtmektedirler. Nefes darlığı, periferik siyanoz, oksijen açlığı başlıca sorunlar olmaktadır ve yaşam kalitesini ileri düzeyde etkilemektedir. Bu sorunlar hastaların günlük hayata katılımını, sosyalleşme, bireysel ihtiyaçlarını giderebilme vb konularda önemli mağduriyetler oluşturmaktadır.

Bu ve benzeri sorunlar romatolojik hastalıklar için önemli bir sorun olarak devam etmektedir. DMARD tedavilere rağmen İAH gelişimi tam olarak önlenebilmiş değildir. Bu çalışmada ratlar üzerinde akciğer fibrozisi gelişimi sağlanarak, tofasitinib etkinliği incelendi. İleri evre romatolojık tedavilerde endikasyonu olan ilacın akciğer patolojilerinde ki rolü araştırma konusudur. Biz çalışmamızda hayvan modellerinde meydana gelen akciğer fibrozisini tofasitinibin geriletebildiğini gösterdik. Çalışmamız bu konuda bundan sonraki çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

Kaynaklar

1. Bulut S, İnterstıtıal lung diseases. Doi:10.5152/tcb.2013.29
2. Luppi F, Sebastiani M, Sverzellati N, et al. Lung complications of Sjogren's syndrome European Respiratory Review. 2020 29: 200021; Doi: 10.1183/16000617.0021-2020
3. Montesi S, Fisher j H, Martinez F J , Selman M et al. Update in Interstitial Lung Disease 2019. https://doi.org/10.1164/rccm.202002-0360UP
4. Ulke H, Mutze K, Lehmann M,Wagner D, Heinzelmann K, et al. The Oncogene ECT2 Contributes to a Hyperplastic, Proliferative Lung Epithelial Cell Phenotype in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. https:.org/10.1165/rcmb.2019-0047OC
5. Koyama K, Goto H, Morizumi S, et al. The Tyrosine Kinase Inhibitor TAS-115 Attenuates Bleomycin-induced Lung Fibrosis in Mice. https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0098OC
6. King T ,Flaherty K,Hollingsworth H. Approach to the adult with interstitial lung disease: Diagnostic testing. https://www.uptodate.com/contents/approach-to-the-adult-with-interstitial-lung-disease-clinical-evaluation
7. Lake F, Talmadge E, King T, Matteson E. Interstitial lung disease in rheumatoid arthritis https://www.uptodate.com/contents/interstitial-lung-disease-in-rheumatoid-arthritis
8. Lake F, Proudman S. Rheumatoid Arthritis and Lung Disease: From Mechanisms to a Practical Approach DOI: 10.1055/s-0034-1371542
9. Raghu G, MontesiS,King T, Nicholson M. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-idiopathic-pulmonary-fibrosis
10. Dellaripa P, Danoff S. Interstitial lung disease in dermatomyositis and polymyositis: Clinical manifestations and diagnosis https://www.medilib.ir/uptodate/show/4304
11. Juge P;Bruno C , Philippe D Recent advances in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease doi: 10.1097/MCP.0000000000000710
12. Roberto Giacomelli R, Vasiliki Liakouli V, Berardicurti O. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: current and future treatment https://link.springer.com/article/10.1007/s00296-016-3636-7
13. Gutsche M, Rosen G, Swigris J. Connective Tissue Disease-associated Interstitial Lung Disease: A review doi: 10.1007/s13665-012-0028-7

14. Willis B, Borok Z. TGF-β-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease https://doi.org/10.1152/ajplung.00163.2007
15. Liu T, Jin H, Ullenbruch M,et al. Regulation of Found in Inflammatory Zone 1 Expression in Bleomycin-Induced Lung Fibrosis: Role of IL-4/IL-13 and Mediation via STAT-6 Doi: https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3425
16. Olson A,Gifford A, Inase N, et al. The epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial lung diseases at risk of a progressive-fibrosing phenotype Doi: 10.1183/16000617.0077-2018 https://err.ersjournals.com/content/27/150/180077.long
17. P Keane M, Strieter R. The importance of balanced proinflammatory and antiinflammatory mechanisms in diffuse lung disease. http://respiratory-research.com/content/3/1/5
18. Hussein M, El-Barbary A, Nada D, et al. Identification of serum interleukin-13 and interleukin-13 receptor subunit expressions: Rheumatoid arthritis–associated interstitial lung disease. Doi: 10.1111/1756-185X.14084
19. Zhang J, Wang D, Wang L,Wang S, C. Roden A, Zhao H. Profibrotic effect of IL-17A and elevated IL-17RA in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid arthritis-associated lung disease support a direct role for IL-17A/IL-17RA in human fibrotic interstitial lung disease. https://doi.org/10.1152/ajplung.00301.2018
20. She Y, Yu Q , Tang X. Role of interleukins in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. https://doi.org/10.1038/s41420-021-00437-9
21. Sun L , Louie C M, Vannella M K ,Wilke A C et al.New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. Doi: 10.1152/ajplung.00122.2010
22. Spight D, Zhao B, Haas M,Wert S et al. Immunoregulatory effects of regulated, lung-targeted expression of IL-10 in vivo. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15466252/
23. Atamas S, Chapoval S, Keegan A. Cytokines in chronic respiratory diseases. Doi: 10.3410/B5-3
24. Shamskhoua E, Kratochvil M ,Orcholski M, Nagy N et al. Hydrogel-based delivery of IL-10 improves treatment of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.02.017
25. Emily H. Steen E H, Xinyi Wang X, Swathi Balaji A,et al. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. https://doi.org/10.1089/wound.2019.1032

26. Lu L, Zhang H, J.Dauphars D , He Y. A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.012
27. Saraiva M, Vieira P. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. https://doi.org/10.1084/jem.20190418
28. Lee S J, Lee Y E ,Ha Y, Kang H E , Lee J Y, Wook Song Y. Serum KL-6 levels reflect the severity of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-019-1835-9
29. M. Fathi,S. Barbasso Helmers,I. E. Lundberg . KL-6: a serological biomarker for interstitial lung disease in patients with polymyositis and dermatomyositis. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02459.x
30. Le T T,Karmouty-Quintana H,Melicoff E et al. Blockade of IL-6 Trans Signaling Attenuates Pulmonary Fibrosis. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4169999/
31. Shieh J, Tseng H,Jung F, Yang S, Lin J. Elevation of IL-6 and IL-33 Levels in Serum Associated with Lung Fibrosis and Skeletal Muscle Wasting in a Bleomycin-Induced Lung Injury Mouse Model. https://doi.org/10.1155/2019/7947596
32. Renaud L, Silveira W,Takamura N,et al. Prominence of IL6, IGF, TLR, and Bioenergetics Pathway Perturbation in Lung Tissues of Scleroderma Patients With Pulmonary Fibrosis. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00383
33. Smetana K, Brabek J. Role of Interleukin-6 in Lung Complications in Patients With COVID-19: Therapeutic Implications. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00383
34. Renaud L, Silveira W, Takamura N, et al. Prominence of IL6, IGF, TLR, and Bioenergetics Pathway Perturbation in Lung Tissues of Scleroderma Patients With Pulmonary Fibrosis. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00383
35. Wijsenbeek M, Kool M, Cottin V. European Respiratory Journal. 2018 52: 1802111; Doi:10.1183/13993003.02111-2018
36. Glisinski K, Schlobohm A, Paramore S et al. Interleukin-13 disrupts type 2 pneumocyte stem cell activity. Doi: 10.1172/jci.insight.131232
37. D Karo-Atar, A Bordowitz, O Wand, et al. A protective role for IL-13 receptor α 1 in bleomycin-induced pulmonary injury and repair. https://www.nature.com/articles/mi201556

38. Wilson M, Madala S, Ramalingam T, Bernadette R. et al. Bleomycin and IL-1β–mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. https://doi.org/10.1084/jem.20092121
39. Wang T, Liu Y, Zou J, Cheng Z. Interleukin-17 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition via the TGF-β1 mediated Smad2/3 and ERK1/2 activation. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183972
40. IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly Gurczynski S, Moore B https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6048455/
41. Mi S, Li Z, Yang HZ, Liu H, Wang JP et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-β1-dependent and -independent mechanisms. J Immunol 187: 3003–3014, 2011. doi:10.4049/jimmunol.1004081
42. Dhillon S. Tofacitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis https://doi.org/10.1007/s40265-017-0835-9
43. J.A. Hodge, T.T. Kawabata, S. Krishnaswami, J.D. Clark, et al. Mechanism of action of tofacitinib – an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=9615
44. Sandborn W, Su C, Sands B, D'Haens G, Vermeire S. Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. Doi: 10.1056/NEJMoa1606910
45. Guimarães P, Quirk D, Furtado H ,Maia N , et al. Tofacitinib in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. Doi: 10.1056/NEJMoa2101643
46. Wang W, Bhattacharyya S, Marangoni R. The JAK/STAT pathway is activated in systemic sclerosis and is effectively targeted by tofacitinib https://doi.org/10.1177/2397198319865367
47. Aung W, Wang C, Xibei J, Okamura A, Kobayashi T, Matsushita T. Immunomodulating role of the JAKs inhibitor tofacitinib in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma.https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.12.007 https://www.jdsjournal.com/article/S0923-1811(20)30426-6/fulltext
48. Vacchi A, Manfredi A, Cassone G, et al. Tofacitinib for the Treatment of Severe Interstitial Lung Disease Related to Rheumatoid Arthritis.https://doi.org/10.1155/2021/6652845
49. Sonomoto K, Yamaoka K, Kubo S, et al. Effects of tofacitinib on lymphocytes in rheumatoid arthritis: relation to efficacy and infectious adverse events. https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket466

50. Maeshima K, Yamaoka K, Kubo S, et al. The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon-gamma and interleukin-17 production by human CD4+ T cells. Arthritis Rheum, 2012, vol. 64 (pg. 1790-8)
51. Barrera M, Aguilera S, Castro I, et al. Tofacitinib counteracts IL-6 overexpression induced by deficient autophagy: implications in Sjögren's syndrome . https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa670
52. Wang Y, van Boxel-Dezaire A,Cheon H, Yang J. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. https://doi.org/10.1073/pnas.1315862110
53. Dang C, Lu Y, Chen X. Li Q,Baricitinib Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Modulating the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.650708
54. Palmroth M, Kuuliala K, Peltomaa R, et al. Tofacitinib Suppresses Several JAK-STAT Pathways in Rheumatoid Arthritis In Vivo and Baseline Signaling Profile Associates With Treatment Response. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.738481
55. Hammitzsch A, Chen L, de Wit J, et al. Inhibiting ex-vivo Th17 responses in Ankylosing Spondylitis by targeting Janus kinases. https://www.nature.com/articles/s41598-018-34026-1
56. Zhang M, Xu M, Wang K, Li L, Zhao J. Effect of Inhibition of the JAK2/STAT3 Signaling Pathway On the Th17/IL-17 Axis in Acute Cellular Rejection After Heart Transplantation in Mice. Doi: 10.1097/FJC.0000000000001007
57. Jiang H, Harris M,Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. https://doi.org/10.1067/mai.2000.107604
58. Yamanaka K, Fujisawa T, Kusagayab H et al. IL-13 regulates IL-17C expression by suppressing NF-κB-mediated transcriptional activation in airway epithelial cells https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.207
59. Schwartz D, Kanno Y, Villarino A. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. Doi: 10.1038/nrd.2017.267
60. Murray L,Zhang H,Oak S,et al. Targeting Interleukin-13 with Tralokinumab Attenuates Lung Fibrosis and Epithelial Damage in a Humanized SCID Idiopathic Pulmonary Fibrosis Model. Doi: 10.1165/rcmb.2013-0342OC
61. Sakamoto K, Taniguchi H, Kondoh Y, et al. Serum KL-6 in fibrotic NSIP: Correlations with physiologic and radiologic parameters. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.08.011

62. Jiang D,Xiao H,Dong R et al. Krebs von den Lungen-6 levels in untreated idiopathic pulmonary fibrosis. https://doi.org/10.1111/crj.13475
63. Montero P, Milara J, Roger I, Julio J. Role of JAK/STAT in Interstitial Lung Diseases; Molecular and Cellular Mechanisms. Doi: 10.3390/ijms22126211
64. Wong A, Ryerson C, Guler S. Progression of fibrosing interstitial lung disease https://doi.org/10.1186/s12931-020-1296-3
65. Parker J, Glaspole I, Lancaster L, et al. A Phase 2 Randomized Controlled Study of Tralokinumab in Subjects with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. https://doi.org/10.1164/rccm.201704-0784OC
66. Villarino A, Kanno Y, O'She J. Mechanisms and consequences of Jak–STAT signaling in the immune system. https://www.nature.com/articles/ni.3691
67. Hu X, Li J, Fu M, et al. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. https://www.nature.com/articles/s41392-021-00791-1
68. Cornez I,Yajnanarayana P, Wolf A,Wolf D. JAK/STAT disruption induces immuno-deficiency: Rationale for the development of JAK inhibitors as immunosuppressive drugs. https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.035
69. van Vollenhoven R, Roy Fleischmann R, Stanley Cohen S, et al. Tofacitinib or Adalimumab versus Placebo in Rheumatoid Arthritis List of authors. Doi: 10.1056/NEJMoa1112072
70. Fleischmann R, Kremer J, Cush J et al. Placebo-Controlled Trial of Tofacitinib Monotherapy in Rheumatoid Arthritis Doi: 10.1056/NEJMoa1109071
71. Tanaka Y. Recent progress and perspective in JAK inhibitors for rheumatoid arthritis: from bench to bedside. https://doi.org/10.1093/jb/mvv069
72. Xina P, Xua X, Deng C. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106210
73. Thorpe J, Wilson R, Mesiano S, Malemud C. Tofacitinib Inhibits STAT Phosphorylation and Matrix Metalloproteinase-3, -9 and -13 Production by C28/I2 Human Juvenile Chondrocytes. https://doi.org/10.2147/OARRR.S363736