

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

**BLEOMİSİN İLE UYARILMIŞ DENEYSEL SKLERODERMA
MODELİNDE SEKUKİNUMAB VE METFORMİN
TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Çiğdem ÇELİK

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

ELAĞIĞ 2018

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA _____ **Danışman**

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....
.....
.....
.....
.....
.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitiminin zorlu sürecinde bana yol gösteren, hoşgörü ve sabır ile bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, başta tez danışmanım Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA olmak üzere, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN, Uzm. Dr. Ahmet KARAKAŞ, Uzm. Dr. Burak ÖZ, Uzm. Dr. Zeynel Abidin AKAR, Dr. Fatma PULGAT ve uzmanlık eğitimime katkıda bulunan diğer İç Hastalıkları Anabilim dalı öğretim üyelerine, tezin hazırlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Adile Ferda DAĞLI, Doç. Dr. Ebru ÖNALAN ETEM, Dr. Öğretim Görevlisi Faruk KILIÇ ve Dr. İlay BURAN’a sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

ÖZET

Sistemik sklerozun patogenezi tam olarak bilinmese de, immün aktivasyonun patogeneze önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Sekukinumab, interleukin (IL)-17A'yı bloke eden bir monoklonal antikordur. Metformin yaygın olarak kullanılan oral anti-diyabetik bir ilaçtır. Son zamanlarda, metforminin yeni pleiotropik etkileri, özellikle anti-proliferatif ve anti-fibrotik aktivitesi açıklanmıştır. Çalışmamızın amacı, bleomisin (BLM) ile oluşturulmuş deneysel deri fibrozunda sekukinumab ve metformin uygulamalarının profilaktik ve teröpatik etkinliklerinin belirlenmesidir.

Çalışmaya ortalama 6 hafta yaşında ve 20-25 gram ağırlıklarında, 50 adet Balb/c dişi fare alındı. Fareler 5 gruba ayrıldı: (grup 1 [kontrol], 2 [sham], 3 [sekukinumab], 4 [metformin] ve 5 [sekukinumab + metformin]). Kontrol grubundaki farelere 100 µl fosftla tamponlanmış salin (FTS), diğer gruptaki farelere ise 100 µg BLM (100 µl FTS içerisinde), 4 hafta süre ile her gün, subkutan (sc) olarak uygulandı. Ek olarak, 3. ve 5. gruptaki farelere 10 mg/kg dozunda sekukinumab haftada bir sc; 4. ve 5. grupundaki farelere günlük 50 mg/kg metformin (oral) 28 gün olarak uygulandı. Fare gruplarının hepsi 4. hafta sonunda kurban edildi ve yapılacak analizler için doku örnekleri alındı. Histopatolojik analizlere ek olarak, doku IL-17A ve kollajen 3A mRNA düzeyleri real-time PCR yöntemi değerlendirildi.

Tekrarlayan BLM enjeksiyonları dermal fibroza neden olmuştu. Ek olarak, BLM grubunda doku IL-17 ve kollajen 3A mRNA ekspresyonları artmıştı. Sekukinumab ve metformin dermal fibrozu hafifletmişti. Sekukinumab ve metformin dermal kalınlığı, doku IL-17A ve kollajen 3A mRNA düzeylerini anlamlı azaltmıştı.

Sonuç olarak, sekukinumab ve metforminin BLM ile uyarılmış dermal fibroz modelinde anti-fibrotik etkiler sergileyebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel skleroderma, sekukinumab, metformin

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF SECUKINUMAB AND METFORMIN TREATMENTS ON BLEOMYCIN INDUCED EXPERIMENTAL SCLERODERMA MODEL

Although the pathogenesis of systemic sclerosis is not exactly known, it is thought that immune activation has prominent roles in pathogenesis. Secukinumab is monoclonal antibody against interleukine (IL)-17A. Metformin is a widely used anti-diabetic medication. Recently, the pleiotropic effects of metformin have been disclosed, in particular its anti-proliferative, immunomodulating, and anti-fibrotic activities. The purpose of our study is to determine the prophylactic and therapeutic efficacy of secukinumab and metformin on bleomycin (BLM) induced skin fibrosis.

50 Balb/c female mice which their average age is 6 weeks and their average weight is 20-25 grams were selected. The mice were divided into 5 groups: (group 1 [control], 2 [sham], 3 [secukinumab], 4 [metformin] and 5 [secukinumab + metformin]). The mice in the control group received 100 µl phosphate buffered saline (PBS), while the mice in other groups received 100 µl (100 µg) BLM in PBS subcutaneously (sc) every day for 4 weeks. In addition, mice in groups 3 and 5 received secukinumab at a dose of 10 mg/kg/week sc, and mice in the groups 4 and 5 received oral metformin (50 mg/kg/day) for 28 days. All groups of mice were sacrificed at the end of 4th week and tissue samples were taken for analysis. In addition to histopathological analysis, skin tissue mRNA expressions of IL-17 collagen 3A were measured by real-time PCR.

Repeated BLM injections had caused dermal fibrosis. In addition, mRNA expressions of IL-17 and collagen 3A were increased in the BLM group. Secukinumab and metformin ameliorated dermal fibrosis. They decreased dermal thickness and IL-17A and collagen 3A mRNA levels.

In conclusion, secukinumab and metformin may exhibit anti-fibrotic effects in the BLM induced skin fibrosis.

Keywords: Experimental scleroderma, secukinumab, metformin.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Skleroderma	3
1.1.1.1. Tanı ve Sınıflama	3
1.1.1.2. Epidemiyoloji	5
1.1.1.3. Etiyoloji	6
1.1.1.4. Patogenez	7
1.1.1.5. Klinik bulgular	8
1.1.1.6. Tedavi	10
1.1.2. Bleomisin (BLM)	13
1.1.2.1. Bleomisin ile uyarılan dermal fibroz	13
1.1.3. Sekukinumab	14
1.1.4. Metformin	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Deney Hayvanları	16
2.2. Çalışma grupları ve uygulamalar	16

2.3. Doku örneklerinin toplanması	16
2.4. Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler	17
2.5. Doku mRNA düzeylerinin belirlenmesi	17
2.6. İstatistiksel Analizler	18
3. BULGULAR	19
3.1. BLM ile Uyarılmış Dermal Fibroz	19
3.2. Sekukinumab ve metformin tedavileri	22
4. TARTIŞMA	24
5. KAYNAKLAR	278
6. ÖZGEÇMİŞ	41

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. ACR 1980 skleroderma sınıflandırma kriterleri	3
Tablo 2. ACR/EULAR 2013 skleroderma sınıflandırma kriterleri	4
Tablo 3. ACR/EULAR 2013 skleroderma sınıflandırma kriterlerindeki öğelerin/alt öğelerin tanımları	5
Tablo 4. Çalışma gruplarında dermal hücre sayıları ve dermal kalınlıklar	20



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Çalışma gruplarında histopatolojik bulgular (hematoksilen eozin, x100)	19
Şekil 2. Çalışma gruplarında histopatolojik bulgular (Masson Trikrom, x100)	20
Şekil 3. Çalışma gruplarında histopatolojik kesitlerin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi (α -SMA, x400)	21
Şekil 4. Çalışma gruplarında kollajen 3A1 mRNA ekspresyonları	22
Şekil 5. Çalışma gruplarında IL-17 mRNA ekspresyonları	22



KISALTMALAR LİSTESİ

ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
ACR	: American College of Rheumatology
ARB	: anjiotensin reseptör blokerleri
ANA	: Anti-nükleer antikor
Anti-Scl-70	: Anti-topoizomerez I
BLM	: Bleomisin
CMV	: Sitomegalovirüs
CTGF	: Kollojen doku büyüme faktörü
DLCO	: Karbonmonoksit difüzyon kapasitesi
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EBV	: Epstein bar virüs
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EULAR	: European League Against Rheumatism
ERK1	: Ekstraselüler sinyal bağımlı kinaz-1
ESM	: Ekstraselüler matriks
ET	: Endotelin
FTS	: Fosfat ile tamponlanmış salin
FUHADEK	: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
GİS	: Gastrointestinal sistem
GÖR	: Gastroözefagial reflü
GVHR	: graft-versus-host reaksiyonuna
HLA	: İnsan lökosit antijeni
HPF	: Her bir alandaki hücre sayısı
YRBT	: Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi
ICAM-1	: İnterselüler adhezyon molekülü 1
IL	: İnterlökin
ILD	: İnterstisyel akciğer fibrozu
iv	: İntravenöz

KKB	: Kalsiyum kanal blokerleri
KML	: Kronik myeloid lösemi
MAPK	: Mitojen-aktif protein kinaz
MCTD	: Mikst bağ doku hastalığı,
MHC	: Major histokompatibilite kompleksi
MIP-1	: Makrofaj enflamatuar protein-1
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NO	: Nitrik oksit
PAH	: Pulmoner arteriyel hipertansiyon
PDE-5	: Fosfodiesteraz tip 5
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PM/Scl	: Polimiyozit/skleroderma
RA	: Romatoid artrit
RF	: Raynaud fenomeni
RNA	: Ribonükleik asit
RNP	: Ribonükleoprotein
RT-PCR	: Real-time polymerase chain reaction
Sc	: Subkutan
SF	: Serum fizyolojik
SLE	: Sistemik lupus eritematoz
SRK	: Skleroderma renal krizi
SSk	: Sistemik skleroz
STAT	: Signal transducers and activators of transcription
TGF	: Transformasyon edici büyüme faktörü
TNF	: Tümör nekroz faktör
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Skleroderma veya diğer adıyla sistemik skleroz (SSk) kas-iskelet, deri, mide-bağırsak, kalp ve böbrek, akciğer olmak üzere pek çok sistemi tutabilen ancak etiyojisi henüz tam olarak aydınlatılamayan kronik bir hastalıktır. Skleroderma 30 ve 50 yaşlar arasında pik yapar ve kadınlarda erkeklerden üç kat daha sık görülmektedir (1). Patogenezinde, sırasıyla ortaya çıkan, immün aktivasyon, vaskülopati ve yaygın fibroz suçlu tutulmaktadır (2).

İmmün aktivasyon ve vaskülopati (endotelyal hiperaktivasyon) sonucu fibroblastik aktivasyon, ekstrasellüler matriks yapımında artış ve ekstrasellüler matriks degradasyonunda azalma, skleroderma patogenezinin temel özellikleri olarak bilirse de, sklerodermanın patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır (3-6). Patogenezin endotelyal hücre hasarı ve immün aktivasyon bölümü için çevresel ve genetik faktörlerin yanında mikrokimerizm tetikleyici risk faktörleri olarak belirtilmektedir (6). Vaskülopati ile ilişkili Raynaud fenomeni (RF) ve kapilleroskopik anormallikler sklerodermanın öncül bulgularındandır ve bu bulgular prelinik dönemde bile saptanabilmektedir. Meydana gelen proliferasyonun nedeni net olarak bilinmemektedir, ancak dokularda iskemi ile sonuçlanmaktadır. Vaskülopati endotelyal hasar sonucu, enflamatuvar hücrelerin adezyonuna ve migrasyonuna neden olmaktadır (7).

Skleroderma hastalarının deri lezyonlarının histopatolojik incelenmesinde T lenfositler, makrofajlar, mast hücreleri ve daha az oranda B lenfosit infiltrasyonları saptanmıştır (2). Sklerodermada interlökin (IL)-4, IL-17 ve TGF- β gibi T lenfosit aracılı sitokinler ve T lenfosit aktivasyon belirteçlerinden olan IL-2 reseptör ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Aktive olan T lenfositler, CD154/CD40 ligandı aracılığı ile fibroblastlara bağlanarak direkt veya IL-4 ve TGF- β gibi profibrotik sitokinler aracılığı ile dolaylı olarak fibroblastik aktivasyona ve sonuçta kollajen, fibronektin gibi ekstrasellüler matriks (ESM) yapıtaşlarının sentezinde artışa neden olmaktadır. Fibroblastlar (miyofibroblastlar), ESM yapıtaşlarının sentezi yanında, IL-6, tranforme edici büyüme faktörü (TGF)- β 1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve kollajen doku büyüme faktörü (CTGF) gibi pro-fibrotik sitokin ve büyüme

faktörlerini de üretirler. Böylece, fibroblastlar bir kez aktive olduktan sonra otokrin özellik kazanmakta ve aktivasyon için enflamatuar hücre uyarımına gereksinimleri kalmamaktadır (8-13). Ayrıca skleroderma hastalarında dermal fibroblastların apoptoza dirençli oldukları gösterilmiş ve bu da artmış bcl-2 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (14). ESM degradasyonu ise matriks metalloproteinaz (MMP)'lar ile sağlanmaktayken, doku MMP inhibitörleri (tissue inhibitor of metalloproteinases [TIMPs]) bu dengeyi fibroenez lehine kaydırmaktadır. Sklerodermada MMP-1, 3 ve 13 düzeylerinin ve aktivitelerinin azaldığı, TIMP-1, 2 ve 3 üretiminin ise arttığı gösterilmiş ve MMP/TIMP dengesinin bozulduğu ileri sürülmüştür (15, 16).

Sklerodermalı hastalarda artan IL-17 düzeyi endotelial hücrelerden interselüler hücre adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerinin üretimini artırarak, enflamatuar hücre infiltrasyonuna yardımcı olmaktadır (8-13).

Sekukinumab IL-17A'ya seçici olarak bağlanan ve nötralize eden yüksek afiniteli bir insan immunoglobulin (Ig) G1 monoklonal antikoru olup pro-enflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını inhibe eder (17). Sekukinumabın sedef hastalığı ve ankilozan spondilit dahil bir dizi immün aracılı enflamatuar hastalıkta etkili olduğu gösterilmiştir (18, 19). Sekukinumabın, ifade edilen reseptör üzerine olan bu etkileri, SSk tedavisinde etkin olabileceğini düşündürmektedir.

Metformin, esas etki mekanizması mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I'ın geçici inhibisyonu olan, yaygın kullanılan bir antidiyabetik ilaçtır. Son zamanlarda, özellikle anti-proliferatif, immüno-modüle edici ve anti-fibrotik aktivite gibi yeni pleiotropik özellikleri ortaya konulmuştur (20-24). Metforminin bu mekanizmalar üzerine etkisi SSk tedavisinde etkin olabileceği düşündürmektedir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Skleroderma

Skleroderma deri ve iç organların fibrozu, ESM sentezinde artış ve birikimi, vaskülopati ile karakterize multisistemik kronik otoimmün enflamatuvar bir hastalıktır. Deride sertlik ve kalınlaşma ile karakterize deri fibrozu, hastalığın tipik bulgusudur. Sklerodermada akciğer, kalp, böbrekler ve gastrointestinal sistem (GİS) sıklıkla tutulmaktadır (1).

1.1.1.1. Tanı ve Sınıflama

American College of Rheumatology (ACR) grubunun 1980 yılında belirlediği sınıflandırma kriterlerine göre, 1 major ve 2 minor kriter varlığında SSk tanısı konulabilmektedir. Bu setin % 91 duyarlılık ve % 99 özgüllük ile sergilediği bildirilmiştir (25).

Tablo 1. ACR 1980 skleroderma sınıflandırma kriterleri

Major bulgu:	Metakarpofalangeal veya metatarsophalangeal eklemlerin proksimalindeki deride sertlik
Minor bulgular:	1. Sklerodaktili 2. Parmak uçlarında ülser skarı 3. Bibaziler pulmoner fibroz

1980 ACR skleroderma klasifikasyon kriter setinin erken SSk ve yaygın cilt tutulumlu SSk'lı hastalar için tanı koymadaki düşük sensitivitesi nedeniyle, 2013 yılında ACR/European League Against Rheumatism (EULAR) ortak girişimi ile yeni sınıflandırma kriterleri yayınlanmıştır (Tablo 2 ve 3). Bu yeni kriter setinin 1980 ACR kriterlerine göre daha iyi bir performans gösterdiği ve tanı duyarlılığının eski kriterlere göre daha yüksek olduğu öne sürülmüştür (26-29).

Tablo 2. ACR/EULAR 2013 skleroderma sınıflandırma kriterleri*

Öğeler	Alt-öge(ler)	Puan [†]
Her iki el MKF eklemlerin proksimaline kadar uzanan deri kalınlaşması (yeterli kriter)	-	9
Parmaklarda deri kalınlaşması (sadece daha yüksek puan sayılır)	Ödemli parmaklar	2
	Sklerodaktili	4
Parmak uçlarında lezyonlar (sadece daha yüksek puan sayılır)	Ülserler	2
	Deprese skarlar	3
Telanjiyektazi	-	2
Anormal kapilleroskopi	-	2
PAH ve/veya İAH (maksimum skor 2)	PAH	2
	İAH	2
RF	-	3
SSk ilişkili otoantikor pozitifliği (maksimum skor 3)	Anti-sentromer	3
	Anti-topoizomeras I	3
	Anti-RNA polimeraz- III	3

* Bu kriter seti, SSk çalışmasına dahil edilmesi düşünülen herhangi bir hastaya uygulanabilir. SSk benzeri hastalığı olan (nefrojenik sklerozan fibroz, jeneralize morfea, eozinofilik fasiyit, sklerodermiyabetikorum, skleromiksödem, eritromiyalji, porfiriya, liken skleroz, graft-versus-host hastalığı, diyabetik kerioartropati) veya parmakların korunduğu deri kalınlaşmasının saptandığı hastalara bu kriterler uygulanamaz.

† Total skoru ≥ 9 olan hastalar kesin SSk tanısı alır. Total skor, her bir kategorideki saptanan maksimum puanların toplamı ile belirlenir.

ACR: American College of Rheumatology, EULAR: European League Against Rheumatism, MKF: Metakarpofalangeal, İAH: İnterstisyel akciğer hastalığı, PAH: Pulmoner arteriyel hipertansiyon, RF: Raynaud fenomeni, SSk: Skleroderma, RNA: Ribonükleik asit

Tablo 3. ACR/EULAR 2013 skleroderma sınıflandırma kriterlerindeki öğelerin/alt öğelerin tanımları

Öğeler	Tanımlar
Deri kalınlaşması	Travma, yaralanma vb sonrası skarlaşmaya bağlı olmayan deride kalınlaşma veya sertleşme olmasıdır
Şiş (puffy) parmaklar	Genellikle parmaklarda yaygın, çukurlaşmayan ve eklem kapsülünün normal sınırlarının ötesine kadar uzanan yumuşak doku kitlesinde artış olmasıdır. Normal parmaklar, falanks ve eklem yapılarının dış hatlarını takip eden dokularla distale doğru inceler. Şiş parmaklarda şekil bozulur. Daktilit gibi diğer nedenlere bağlı değildir.
Parmak ucu ülserleri veya pitting skarlar	PIF eklem veya distalinde ülserler veya skarlar olup travmaya bağlı olduğu düşünülmemektedir. Dijital pitting skarlar, travma veya eksojen nedenlerden ziyade iskemi sonucu parmak uçlarında gelişen deprese alanlardır
Telanjiyektazi	Görünür, maküler, dilate, yüzeysel, basınca solan ama baskı kaldırıldığında yavaşça dolan kan damarlarıdır. SSk-benzeri paternde telanjiyektaziler yuvarlak ve iyi sınırlı olan; ağız içinde, dudaklarda ve ellerin üzerinde bulunan; ve/veya büyük mat-benzeri telanjiyektazilerdir. Dilate yüzeysel damarlardan ve merkez arteriol ile hızla dolan spider anjiomadan ayırt edilebilir.
SSk ile uyumlu kapilleroskopi	Tırnak dibinde perikapiller hemoraji olsun veya olmasın genişlemiş kapiller ve/veya kapiller kayıp olup ayrıca kütikül üzerinde görülebilir
PAH	Standart tanımlara göre sağ kalp kateterizasyonu ile PAH tanısı konulmuştur
İAH	Bilgisayarlı akciğer tomografisi veya akciğer grafisinde bazallerde pulmoner fibroz görülmesi ve oskültasyonda Velcro rallerin duyulmasıdır.
RF	Bir hekim tarafından görülen veya hastanın ifade ettiği, soğuğa maruz kalma veya duygusal strese yanıt olarak solukluk, siyanoz ve/veya reaktif hiperemiden oluşan, parmaklarda ve sıklıkla ayak parmaklarında en az 2-faz renk değişimi söz konusudur (genellikle bir faz solukluktur).
SSk ilişkili otoantikorlar	Anti-sentromer antikor (veya ANA testinde görülen sentromer patern), anti-topoizomeraz I antikoru (anti-scl-70) veya anti-RNA polimeraz III antikoru yerel laboratuvar standartlarına göre pozitif olmalıdır

ACR: American College of Rheumatology, EULAR: European League Against Rheumatism, PAH: Pulmoner arteriyel hipertansiyon, İAH: İnterstisyel akciğer hastalığı, RF: Raynaud fenomeni, SSk: Skleroderma, ANA: anti-nükleer antikor, RNA: Ribonükleik asit.

1.1.1.2. Epidemiyoloji

Skleroderma insidans ve prevalansı popülasyonlara göre farklılık göstermekte, bu da genetik predispozisyonun ve çevresel faktörlerin epidemiyolojide rol oynadığını düşündürmektedir. Prevalansı yaklaşık milyonda

250 iken, insidansı milyonda 20'dir. Kadınlarda 3 kat daha sık görülmektedir (30, 31).

1.1.1.3. Etiyoloji

Sistemik sklerozun etiyojisi tam olarak anlaşılmamakla birlikte, deri ve iç organlarda ilerleyici fibroz ve mikrovasküler yapılarda bozulmanın görüldüğü ayrıca, çok sayıda hücrel ve hüremal immun bozukluğun birlikte rol aldığı kronik otoimmun bir hastalıktır. Etiyojisinde genetik ve çevresel etmenler birlikte suçlanmaktadır.

Ailesel olguların görülmesi, sklerodermalı olguların ailelerinde başka otoimmun hastalıkların ve diğer otoantikorların sık saptanması; değişik etnik gruplar arasında sıklık ve klinik özelliklerinin farklılıklar göstermesi; bazı insan lökosit antijeni (HLA) antijenlerinin skleroderma olgularında daha sık saptanması sebebiyle skleroderma oluşumunda genetik faktörlerin rol aldığı düşünülmektedir (32). Amerikalı yerli ırk gruplarında saptanan skleroderma olguları arasında HLA DRB1*1602, DQ*0501, DQB1*0301 daha sık saptanırken beyaz ırk sklerodermalı olgularda ise HLA DRB1*1101, DRB1*1104, DQA1*1501, DQB1*0301, DRB1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201 daha sık rastlanmaktadır. Bunun yanında yerli Amerikalı olgular arasında daha ağır hastalık ile seyreden Anti-topoizomeraz-1 antikorı daha sık iken; beyaz olgular arasında daha hafif hastalık varlığı ile seyreden Anti- sentromer antikorı daha sık pozitif saptanmıştır (33).

Mikrokimerizm plasentayı geçebilen fetal hücrelerin annenin kan ya da dokularında saptanmasıdır. Bazı araştırmacılar doku içine karışmış olan bu fetal hücrelerin, çevresel faktörlerin etkisiyle aktive olup, annede bir çeşit graft-versus-host reaksiyonu (GVHR)'na yol açtıklarını, bunun da skleroderma klinik özelliklerini başlattıklarını iddia etmiştir. Öte yandan GVHR ile skleroderma arasında klinik, histopatolojik ve serolojik benzerliklerin olması bu hipotezi desteklemektedir (13).

Bakteriyel ve viral çeşitli enfeksiyöz ajanların (sitomegalovirüs [CMV], helikobakter pilori, epstein bar virus [EBV], parvovirus B19 ve retrovirusların) skleroderma etiyojisinde rol alabileceği düşünülmüştür (34).

Kimyasal maddeler ile temas sonucu skleroderma ile oldukça benzerlik gösteren tablolar oluşabilmektedir. Çeşitli nedenlerle kullanılan bleomisin (BLM) deride renk değişikliği ve sklerotik değişikliklere neden olabilmektedir (35). Ayrıca benzen, tolüen, silikon, silikoz, L-triptofan, gadolinimün (kontrast madde içeriği nefrojenik fibroz sendromu ile ilişkilidir) skleroderma etiyolojisinde suçlanmaktadır (36).

1.1.1.4. Patogeneze

Skleroderma oluşumu vaskülopati, immün aktivasyon, oksidatif stres ve devamında artmış fibroblastik aktivasyonun görüldüğü karışık bir mekanizma ile açıklanmaktadır (30). Vaskülopati ile ilişkili RF ve kapilleroskopik anormallikler sklerodermanın öncül bulgularından olup prelinik dönemde bile saptanabilmektedir. Ayrıca, dijital ülser, telanjiektazi, pulmoner hipertansiyon ve renal kriz de sklerodermada vaskülopati varlığının klinik kanıtlarıdır. Vaskülopati, enflamatuvar hücrelerin sitokinler ve adezyon molekülleri aracılığı ile adezyonuna ve migrasyonuna neden olmaktadır (7, 37).

Skleroderma hastalarının deri lezyonlarının histopatolojik incelenmesinde T lenfositler, makrofajlar, mast hücreleri ve daha az oranda B lenfosit infiltrasyonları saptanmıştır (2, 38, 39). Sklerodermada IL-4, IL-17 ve TGF- β gibi T lenfosit aracılı sitokinler ve T lenfosit aktivasyon belirteçlerinden olan IL-2 reseptör ekspresyonunun arttığı bilinmektedir.

Skleroderma hastalarında artan IL-17 düzeyi ise endotelial hücrelerden ICAM-1, VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin üretimini arttırarak enflamatuvar hücre infiltrasyonuna yardımcı olmaktadır (8- 13).

Aktive olan T lenfositler, CD154/CD40 ligandı aracılığı ile fibroblastlara bağlanarak direkt veya IL-4 ve TGF- β gibi profibrotik sitokinler aracılığı ile dolaylı olarak fibroblastik aktivasyona ve sonuçta kollajen, fibronektin gibi ekstrasellüler matriks yapıtaşlarının sentezinde artışa neden olmaktadır. Fibroblastlar (miyofibroblastlar), ESM yapıtaşlarının sentezi yanında, IL-6, TGF- β 1, PDGF ve CTGF gibi pro-fibrotik sitokin ve büyüme faktörlerini de üretirler. Böylece, fibroblastlar bir kez aktive olduktan sonra otokrin özellik kazanmakta ve

aktivasyon için enflamatuvar hücre uyarımına gereksinimleri kalmamaktadır (8-13).

Ekstrasellüler matriks degradasyonu ise MMP'ler ile sağlanmaktayken, TIMPs bu dengeyi fibrojeniz lehine kaydırmaktadır. Sklerodermada MMP-1, 3 ve 13 düzeylerinin ve aktivitelerinin azaldığı, TIMP-1, 2 ve 3 üretiminin ise arttığı gösterilmiş ve MMP/TIMP dengesinin bozulduğu ileri sürülmüştür (15, 16). Bu durum skleroderma patogenezindeki fibrotik dokunun restorasyonunda yetersizlik olmasına neden olmaktadır (40).

Sonuçta, SSk'da endotelial hücrenin aktivasyonu, proliferasyon olmuş endotelial hücrenin fibroblastik hücreye dönüşümü, fibrotik dokunun restorasyonu için başlatılan neovaskülarizasyon ve ekstrasellüler matriks üretimindeki artış ile patojenik süreçte katkı yapabileceği düşünülmektedir (40).

1.1.1.5. Klinik bulgular

Raynaud fenomeni sklerodermanın genellikle ilk bulgusudur. RF'nin hemen ardından ve/veya çok sonraları deri ve iç organ tutulumları ortaya çıkabilir. RF, el ve ayak parmakları, daha nadiren kulak burun ve dilde stres ve soğuk gibi kolaylaştırıcı faktörlerle ortaya çıkar. Renal, pulmoner ve koroner damarlarda da soğukla ortaya çıkan RF nadiren görülebilir. Parmaklarda solukluk, kızarıklık ve morarma şeklinde görülebilen üç fazlı renk değişikliği her olguda ardışık olarak meydana gelmeyebilir (41). RF Basit bir renk değişikliği şeklinde olabileceği gibi ilerleyici iskemi, iyileşmeyen dijital ülser, gangren ve otoampütasyonlara ve sekonder enfeksiyonlara neden olabilir (42).

Deri tutulumu fibrotik, enflamatuvar ve atrofik evreler ile seyredebilir. Enflamasyon evresinde ödem sebebiyle parmaklar ve eller başta olmak üzere ön kol ve ayaklarda deri çizgilerinin kaybı ve şişlik dikkat çekicidir. Yağ ve ter bezlerinin atrofisi, deride kuruluk ve kaşıntıya neden olabilmektedir. Fibrotik süreçte, metakarpofaringeal ve metatarsofaringeal eklemlerin distalinde sınırlı deri değişiklikler görülür ve bu durum sklerodaktili olarak tanımlanır. Derideki sertleşme ve pigmentasyon değişiklikleri boyun, omuzlar, göğüs üst kısmı, bel ve pantolon kemeri gibi basınca uğrayan alanlarda daha belirgindir. Yaygın cilt tutulumlu SSk'da deri ve tendon fibrozu sonucu gelişen eklem kontraktürleri,

ciddi fonksiyon kaybına neden olabilir. Subkutan kalsinoz ön kol, dirsek veya parmaklar gibi travmaya uğrayan deri alanlarında hidroksiapatit depolanması sonucu ortaya çıkar. Kalsinoz bölgelerinde deri ülserleri ve sekonder enfeksiyonlar gelişebilir (42).

Sklerodermada, deriden sonra en sık etkilenen ikinci bölge gastrointestinal bölgedir. Orofarenksten anüse kadar her yer tutulabilir. Tüm hastaların % 75-90'ında GİS tutulumu olduğu varsayılmaktadır. GİS tutulumunun karakteristik özelliği ise düz kas fibrozudur. Hastaların yaklaşık % 80'inde özefageal disfonksiyona bağlı motilite bozukluğu görülmektedir. Hastalarda sıklıkla alt özefagus sfinkter basıncında azalma, özefageal klirenste bozulma ve gastrik boşalmada gecikme olması nedeniyle gastroözefageal reflü hastalığı meydana gelir. Sklerodermada gastrik antral vasküler ektazi, gastroparezi ve telenijektazi şeklinde gastrik tutulum belirtileri görülebilir. Bazı hastalarda yemek sonrası abdominal distansiyon ve kramp tarzında abdominal ağrı saptanabilir. Vasküler değişikliklere bağlı olarak üst GİS kanaması da meydana gelebilir. Hastalığın ince barsak tutulumunda aşırı bakteri çoğalması nedeniyle gelişen diyare ve malabsorbsiyon veya mekanik ileus semptomlarını taklit eden fonksiyonel ileus (psödoobstrüksiyon) oluşabilir. Kolon ve anal tutulumda ise şiddetli kabızlık gözlenir. Kolonik tutulumda, ek olarak megakolon ve divertikül gelişebilir. Anorektal kapasite, motilite ve komplians azalması ile sfinkter basıncında azalma, rektal prolapsus ve fekal inkontinansa neden olabilir (43-45).

Sklerodermada akciğerler GİS'ten sonra ikinci en sık tutulan organlardır. Erkek cinsiyet, difüzyon kapasitesinde azalma ve enflamatuar belirteçler akciğer tutulumunun şiddeti ile ilişkilendirilmektedir (46). Akciğer tutulumu sklerodermalı hastalarda morbidite ve mortalitenin en sık nedenidir. İnterstisyel akciğer hastalığı (İAH) ve/veya pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) en sık birlikte görülebilen klinik tablolardır. Bununla birlikte yaygın deri tutulumu ve anti-scl-70 pozitifliği olan hastalarda İAH ve PAH sıklıkla daha erken görülür. Anti-sentromer antikor pozitifliği olan hastalarda ise İAH gelişme riski düşüktür (47). Sklerodermada hastalığın erken dönemlerinde, akciğer hasarı başlamadan önce, alveollerde enflamatuar hücre birikimi olmaktadır. Akciğerlerdeki fibroblastların kollajen yapımı artmıştır. Yani akciğer fibrozu alveolit geliştikten

sonra başlamaktadır. Sklerodermada akciğer fibrozu akciğer fonksiyonlarında bozulmaya, respiratuar volümde ve difüzyon kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır (48).

Sklerodermada subklinik kalp tutulumu sıktır (41). Patoloji serilerinde, hastaların % 81'inde yama tarzında myokardiyal fibroz bulgusuna rastlandığı bildirilmektedir (49). Ekokardiyografi (EKO) ile saptanan diyastolik disfonksiyon PAH'ın erken bulgusu olabilir (50). Myokardiyal Raynaud fenomeninin bir sonucu olarak kardiyak iskemi ve ileti sisteminin tutulumu nedeniyle taşiaritmiler ortaya çıkabilmektedir (51). Ventriküler ve daha az sıklıkla atriyal erken vurular görülebilir. SSK'da kardiyak tutulum kötü prognoz işaretidir (52). Kalp tutulumun hastaların yaşam beklentisinde önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (53).

Sklerodermanın iç organ tutulumları arasında en kötü prognoz böbrek tutulumudur (54). Yaygın deri tutulumlu hastalar, akut skleroderma renal kriz (SRK)'i için yüksek risk taşırlar (55). Ek olarak, Anti-RNA polimeraz III antikor varlığı da akut SRK ile ilişkilendirilmiştir (56). SRK, çoğunlukla ilk 4 yılda gelişmektedir. Ancak, SRK'nin kronik formu yıllar sonra ortaya çıkar ve hastaların çoğunda renal fonksiyonlarda ılımlı azalma dışında klinik bulgu göstermez. Proteinüri, azotemi, arteriyel hipertansiyon (>140/90 mmHg) ve glomerüler filtrasyon hızında azalma belirlendiğinde SRK olasılığı düşünülmelidir (55).

1.1.1.6. Tedavi

Günümüzde sklerodermanın uluslararası düzeyde kabul edilmiş bir tedavi protokolu bulunmamaktadır, uygulanan tedaviler ise daha çok sklerodermanın bazı bulgularını kontrol altına almayı amaçlamaktadır (57). Skleroderma tedavisi, tutulan organ sistemlerine ve klinik bulguların ağırlığına göre düzenlenmelidir.

Vasküler sistem tutulumunda tedavideki amaç RF sıklığını azaltmak, iskemiye yavaşlatmak ve iskemi sebebiyle oluşan lezyonların iyileşmesini sağlamaktır. RF olan hastaların stres, soğuk ve sigara kullanımından kaçınmaları, ekstremitelerini sıcak tutmaları ve gerekmedikçe vazokonstrikör ilaç kullanmamaları gerekmektedir. RF tedavisinde dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokerleri (KKB), anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ve

anjiotensin reseptör blokerleri (ARB) gibi vazodilatatör ilaçların yararlı oldukları kanıtlanmıştır. Yukarıdaki tedavi ajanları ile yakınmaların kontrol altına alınamadığı veya kontrendikasyonlar nedeniyle kullanılamadığı durumlarda α -reseptör blokerleri, fosfodiesteraz tip 5 (PDE-5) inhibitörleri, topikal nitroglicerine veya intravenöz (iv) prostaglandin analogları kullanılabilir. Çok ciddi vakalarda, hastalar farmakolojik bir servikal sempatektomiden veya cerrahi dijital sempatektomiden yararlanabilir. Diğer taraftan endotelin reseptör antagonisti (ERA) olan bosentan, yeni dijital ülserlerin oluşumunu azaltabilir (57- 59).

Gastroözefageal yakınmaları olan hastalarda uygun beslenme yaklaşımları (sık ve az miktarlarda yemek vb.), yüksek yastıkta yatmak gibi yaşam şekli değişiklikleri, H₂ reseptör blokörleri ve proton pompa inhibitörleri kullanılabilir. Metoklopramid gibi prokinetik ilaçlar, üst GİS motilitesini artırmak için kullanılabilir. Özefagus darlıkları için periyodik endoskopik dilatasyonlar yapılabilir. Alt GİS semptomları varsa ve bu durum bakteriyel çoğalma ile ilişkilendirilirse, kinolonlar veya amoksisilin-klavulanik asit gibi geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılabilir (57).

Sklerodermanın pulmoner tutulumlarından en sık görüleni İAH'nin tedavisinde immünsüpresif ilaçlar etkili olabilmektedir, bu sebeple EULAR SSc hastalarında gelişen İAH tedavisinde siklofosfamid kullanımını önermiştir (57).

Sklerodermaya sekonder olarak gelişen PAH'ın tedavisinde, öncelikli olarak hastaların fonksiyonel durumunun belirlenmesi gerekmektedir (60). Medikal tedavisinde prostasiklin analogları, ERA'lar ve PDE-5 inhibitörleri kullanılabilir. Prostasiklin analoglarından iloprost, epoprostenol ve treprostinilin egzersiz kapasitesi, dispne skoru, kardiyopulmoner hemodinamikler ve yaşam süresine olumlu etkileri bildirilmiştir (60, 61). İloprost, bir prostasiklin analogu olup, inhalasyon şeklinde uygulanması daha az sistemik yan etki oluşturmaktadır. Bosentan, sitaksentan ve ambrisentan, güçlü bir vazokonstriktör ve düz kas mitojeni olan ET-1'in reseptör antagonistleridir. ET-1, etkilerini ET-A ve ET-B olarak bilinen iki reseptör üzerinden gerçekleştirmektedir. Bosentan, hastalarda egzersiz kapasitesi, pulmoner vasküler direnç ve pulmoner arter basıncı üzerine olumlu etkiler göstermektedir. ERA'ların etkileri yavaş ortaya çıktığından, ileri evrelerdeki ve hemodinamik olarak stabil

olmayan hastalarda ilk tercih olmamalıdır (60). Nitrik oksit, vazodilatör etkisini hücre içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden göstermektedir. PDE-5 inhibitörü olan sildenafil, cGMP ve böylece NO üzerinden pulmoner vasküler yapılarda vazodilatör etki göstermektedir (60). PAH' a sekonder son dönem sağ kalp yetmezliği geliştiğinde ve kombine tedavilere karşın hastanın yakınmaları kontrol altına alınamadığında atrioseptostomi, kalp-akciğer veya sadece akciğer transplantasyonu uygun seçeneklerdir (57).

Malign hipertansiyon ve hızlı ilerleyen böbrek yetmezliği bulguları ile seyreden SRK, sklerodermanın en önemli komplikasyonlarından birisidir (62). SRK riski yüksek olan hastalar, kan basıncı ve renal fonksiyonlar açısından daha sık ve düzenli olarak izlenmelidir (57). SRK tedavisinde ACE inhibitörleri ilk seçilecek ilaçlardır (57). Bazı hastalarda, tüm tedavi yaklaşımlarına karşın, geçici ve/veya kalıcı diyaliz ve sonuçta böbrek transplantasyonu gerekebilmektedir.

Sklerodermada sıklıkla karşılaşılan kalsinoz, tekrarlayan mikrotravmalara uğrayan ön kol, dirsekler ve parmaklar gibi bölgelerde gözlenmekte ve kalsinoz bulunduğu bölgelerde deriyi hasarlayarak, ülserle lezyonlara ve ikincil enfeksiyonlara neden olmaktadır (63). Değişik çalışmalarda, kalsinoz tedavisinde warfarin, minosiklin, alüminyum hidroksit, aspirin, kolşisin, probenesid, bifosfonatlar ve diltizemin etkinlikleri araştırılmıştır. Ayrıca, yüzeysel ve küçük kalsinozlarda karbondioksit lazer tedavisi, büyük kalsinozlarda ise cerrahi işlemler uygulanabilmektedir. Ancak, bu tedavi yaklaşımlarından hiçbiri kalsinozun önlenmesi ve tedavisinde standart tedavi olarak kabul edilmemektedir (63).

Günümüzde, yerleşmiş fibroz tedavisinde kullanılabilecek olan onay almış herhangi bir temel etkili ilaç bulunmamaktadır (58). Skleroderma deri fibrozunun tedavisi, bu hastalık ile ilgilenen klinisyenlerin önünde önemli bir sorun olarak kalmaya devam etmektedir. Uzun yıllardır kullanılmakta olan D-penisilaminin ise etkisi tartışmalıdır (64, 65). Kortikosteroidler, hastalık progresyonu üzerine etkili değildir (36).

Sklerodermada azatioprin, klorambusil ve 5-florourasil gibi immünsüpresifler etkisiz bulunmuştur (66, 67). Metotreksat ile yapılmış çalışmalarda (68, 69) kısmi bir etki rapor edilmiş ve bu bulgular doğrultusunda metotreksat EULAR'ın skleroderma tedavi önerilerinde yerini almıştır (35).

Ancak kliniğimizde yapılmış olan deneysel bir çalışmada metotreksat tedavisinin dermal fibroz üzerine olumlu etkisinin bulunmadığı ortaya konulmuştur (70).

1.1.2. Bleomisin (BLM)

Hayvan modelleri, hastalıkları araştırmada önemli bir rol oynamaktadır. Kronik hastalık modeli oluşturmak ise oldukça güçtür. Yıllar içinde, değişik fibroz modelleri oluşturulmuş; bu modeller içerisinde sıklıkla kullanılan modellerden birisi de BLM uygulamasıdır.

Bleomisin, *Streptomyces verticillus* adlı bakteri tarafından üretilen bir kemoterapötik bir ajandır. İnsanlarda kanser tedavisi sırasında önemli bir yan etkisi olan pulmoner fibroz oluşumuna neden olmasından dolayı hayvan modellerinde fibroz oluşturabilmek için kullanılmaktadır. BLM skuamöz hücreli karsinomlar, germ hücreli tümörler, lenfoma ve malign plevral efüzyonların tedavisinde (intraplevral uygulama ile) önemli bir rol oynamaktadır. BLM etkisinin, tümör hücrelerinde tek ve çift sarmallı DNA kırıklarına yol açmak suretiyle hücre siklusunu kesintiye uğratarak gösterdiğine inanılmaktadır. Bu, metal iyonların şelasyonu ve oluşmuş psödoenzimin oksijenle reaksiyonu sonucu oluşur ve bunlar da DNA kırıcı süperoksit ve hidroksil serbest radikallerinin üretimine yol açmaktadır. Serbest radikallerin normalden fazla üretimi pulmoner toksisiteye, fibroblastların aktivasyonuna ve akabinde fibroza yol açan enflamatuvar bir cevaba neden olabilir (71).

1.1.2.1 Bleomisin ile uyarılan dermal fibroz

1983 yılında araştırmacılar, BLM uygulaması sonrası farelerde dermal fibroz olduğunu bildirmişlerdir (72). 1999 yılında, Yamamoto ve ark. (73) BLM ile uyarılmış skleroderma fare modelini geliştirmişlerdir. Bu modelde, araştırmacılar BLM'yi fosfat ile tamponlanmış salin (FTS) içerisinde çözündürerek, değişik dozlarda (0.1, 1, 10 ve 100 µg; tüm dozlar 100 µl FTS içerisinde), Balb/c farelerin tıraş edilmiş sırt derisine, her gün, subkutan (sc) olarak enjekte etmişlerdir.

Yamamoto ve ark. (73), 1 µg ve daha yüksek dozlarda, tekrarlanan BLM uygulamalarının 3-4. haftadan sonra skleroderma benzeri biyokimyasal ve histopatolojik bulgulara yol açtığını bildirmişlerdir (73, 74). BLM uygulamaları

sonlandırıldıktan sonra da skleroderma bulgularının en az 6 hafta devam ettiği ve güneşirı uygulamaların da benzer histopatolojik bulguları oluşturabildiğı gösterilmiştir.

Sklerodermada, hastalığın doğası gereğı erken evrelerde dokularda enflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmekte ve ilerleyen evrelerde ise enflamasyon yerini belirgin fibroza bırakmaktadır. Böylece, BLM ile uyarılan dermal fibroz modeli ve diğerk modeller ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, sklerodermanın erken dönemini taklit etmekte ve hastalığın ilerleyen dönemleri konusunda yeterli bilgi sunamamaktadır. Srimatkandada ve ark. (75), 6 hafta, güneşirı 50 µg BLM uygulandığında 3. haftada fibroz geliştiğini gözlemlemişlerdir.

1.1.3. Sekukinumab

Sekukinumab, orta ve şiddetli psöriyazis, psöriyatik artrit ve ankilozan spondilit tedavisinde kullanılmaktadır (19, 76). Sekukinumab, IL-17A'yı seçici olarak hedefleyen ve IL-17 reseptörünü bloke eden rekombinant bir insan monoklonal immünoglobulin G1 (IgG1) antikorudur. Bu pro-enflamatuvar sitokinin inhibisyonu, bağışıklık fonksiyonunun ve deri histolojisinin normalleşmesini destekler ve bu nedenle psöriyaziste kullanılmaktadır (17, 77).

Sekukinumab'ın çeşitli vücut bölgelerini etkileyen kronik enflamatuvar bir cilt hastalığı olan hidradenitis suppurativanın tedavisinde kullanıldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (78- 80). Sekukinumabın ifade edilen bu etkileri dikkate alındığında SSk tedavisinde etkin olabileceğı düşünülmektedir.

1.1.4 Metformin

Metforminin esas etki mekanizması mitokondriyal solunum zinciri kompleksi 1'in geçici inhibisyonu olan yaygın kullanılan bir antidiyabetik ilaçtır. Son zamanlarda, özellikle anti-proliferatif, immune-modüle edici ve anti-fibrotik aktivite gibi yeni pleiotropik özellikleri ortaya konulmuştur (20, 24).

Metforminin, aktive olan AMP-activated protein kinase (AMPK)'ın aracılık ettiği yol ile anti-enflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. AMPK'nin terapötik potansiyelini düşündüren bulgu ise, mTOR'u inhibe ederek Th17 hücre

baskılanması yapması ve sinyal transdüktörünü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3)'ün inhibe etmesi olarak belirlenmiştir (81).

Kang ve ark. (82) yaptıkları bir çalışmada metformin ile aktive olan AMPK'nin, Th17 hücrelerinin popülasyonunda bir azalmaya katkıda bulunan mTOR-STAT3 yolunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Myofibroblastların infiltrasyonu inhibe eden TGF-beta, deri fibrozunda önemli rol oynamaktadır (83). Yapılan çalışmalar TGF-betanin uyardığı derideki bu fibroz oral metforminin inhibe ettiğini göstermiştir (21, 84-87). Ayrıca, oral metforminin myofibroblast farklılaşmasında da rol oynadığı gösterilmiştir (88).

Metforminin bu mekanizmalar üzerine etkisi SSk tedavisinde etkin olabileceği düşündürmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun (FUHADEK) 05.04.2018 tarih ve 232 sayılı onayı alınarak başlandı. Çalışma, standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

2.1. Deney Hayvanları

Çalışmaya ortalama 6 hafta yaşında ve 20-25 gram ağırlıklarında, 50 adet Balb/c dişi fare alındı. Fareler, 12 saat güneş ışığı alan bir odada, özel olarak hazırlanmış kafeslerde barındırıldı. Farelerin beslenmesinde, Elazığ Yem Fabrikası'ndan sağlanan standart fare yemi kullanılarak ve kafeslerde özel bölümlere yerleştirilmiş olan ve uç kısımlarında damlalık bulunan özel şişeler ile su verildi. Tüm farelerin sırt bölgesinde belirlenmiş olan bir bölge, sc uygulamalar için tıraş edildi.

2.2. Çalışma grupları ve uygulamalar

50 adet balb/c cinsi dişi fare 5 gruba ayrıldı: (grup 1 [kontrol grubu], 2 [sham grubu], 3 [sekukinumab grubu], 4 [metformin grubu] ve 5 [sekukinumab + metformin grubu]).

Kontrol grubundaki farelere 100 µl fosfatla tamponlanmış salin (FTS), diğer gruptaki farelere ise 100 µg BLM (100 µl FTS içerisinde) 4 hafta süre ile her gün, sc olarak uygulandı. Ek olarak, 3. ve 5. gruptaki farelere 10 mg/kg dozunda sekukinumab haftada bir sc, 4. ve 5. gruptaki farelere günlük 50 mg/kg dozunda metformin (oral) 28 gün olarak uygulandı.

2.3. Doku örneklerinin toplanması

Deney sonunda tüm gruptaki fareler, 4. haftanın sonunda, ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından farelerin dokuları hızla çıkarılıp uygun fiksatiflerle tespit edilip ardından histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Ayrıca, doku mRNA ekspresyonları ise real-time PCR yöntemi

ile değerlendirildi. Bunun için alınan doku örnekleri çalışma gününe kadar -80 °C de saklandı.

2.4. Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler

Formalin solüsyonu içerisindeki doku örneklerinden, aynı gün içerisinde, parafin blokları hazırlandı. Bloklardan alınan kesitler Hematoksilen-Eosin ve Masson-Trichrom ile boyanarak, ışık mikroskopunda (Olympus BX-50) X40, X100, X200 ve X400 büyütmede (uzman bir patolog tarafından incelenerek) enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrozun dereceleri belirlendi. Dermal kalınlık (epidermo-dermal bileşke ile dermis-subkutan yağ dokusu bileşkeşi arası uzunluk) için, her bir denekte, en az iki farklı preparatta, X100 büyütmede, en az 5 farklı ölçümün ortalaması alındı.

İmmünohistokimyasal değerlendirme, fibroblastların sayısını belirlenmesi, monoklonal anti-alfa düz kas aktin (α SMA) antikoru ticari kitinin deparafinize kesitlere uygulanması sonrası, α SMA aktivitesinin belirlenmesi ile yapıldı.

2.5. Doku mRNA düzeylerinin belirlenmesi

Real-time polymerase chain reaction analizler için toplanan doku homejenatından, uygun RNA izolasyon kiti kullanılarak, IL-17A ve kollajen 3A mRNA ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile belirlendi.

Farelerden elde edilen deri dokularından RNA izolasyonu için Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) kullanıldı. RNA ölçümleri için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) ile yapıldı. RNA miktarı μ g/ml olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı. Komplementer DNA sentezi (cDNA) için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı. Komplementer DNA Sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti ile gerçekleştirildi. (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD). Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) Tag Man Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak amplifiye edildi. Isı koşulları 50 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 10

dakika X 40 sikl s, 95  C’de 15 saniye ve 60  C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı. Real Time PCR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çalışmada Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırmalı Ct (ΔCt) yöntemi ile belirlendi.

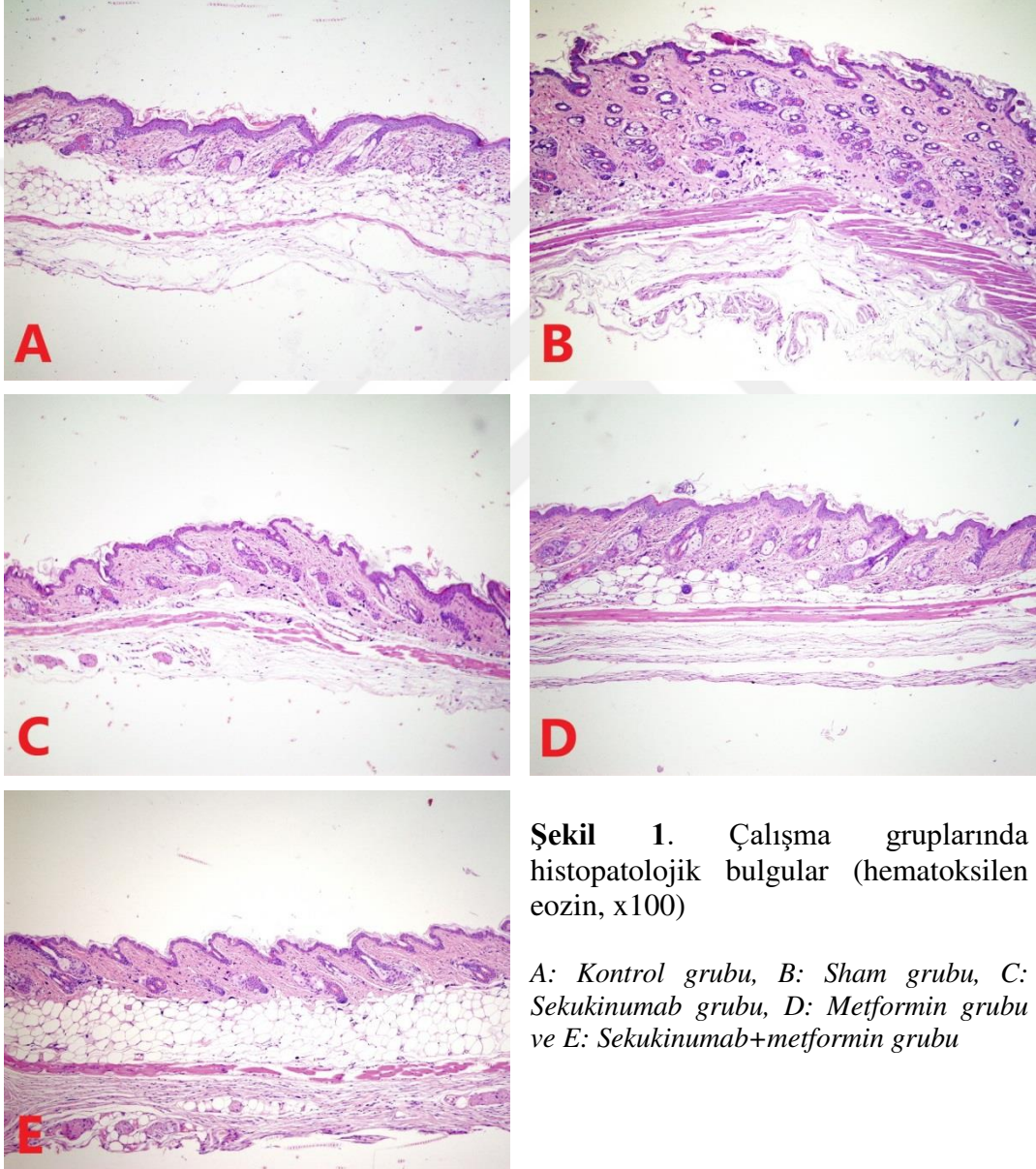
2.6. İstatistiksel Analizler

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

3. BULGULAR

3.1. BLM ile Uyarılmış Dermal Fibroz

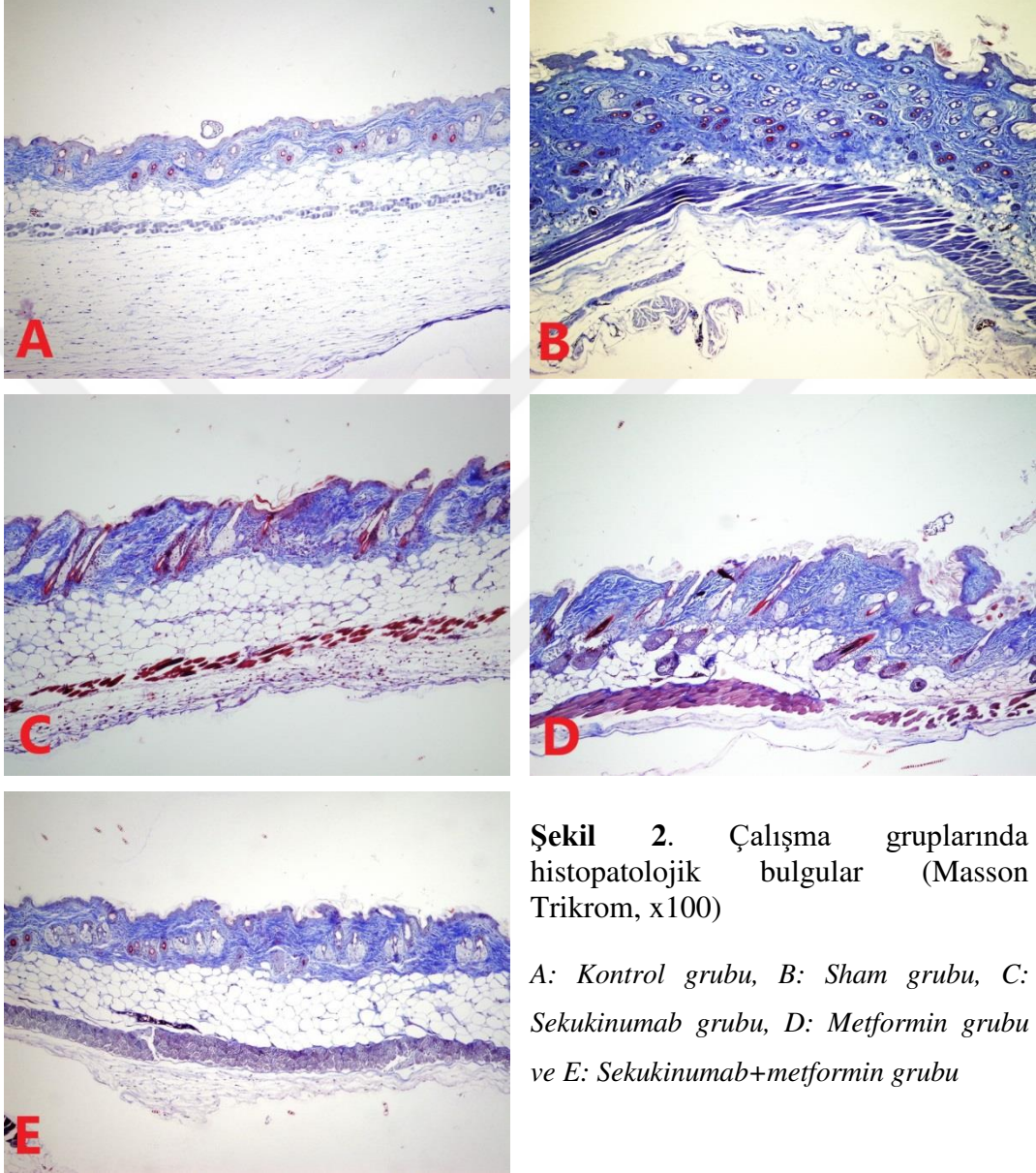
Sadece FTS enjeksiyonu yapılan I. gruptaki farelerin deri doku histopatolojik değerlendirilmesinde dermal fibrozun oluşmadığı görüldü (şekil 1A ve 2A). Ancak, BLM uygulamaları dermal ve subkutan alanlarda enflamatuvar hücre infiltrasyonuna ve dermal fibroza neden olmuştu (şekil 1B ve 2B).



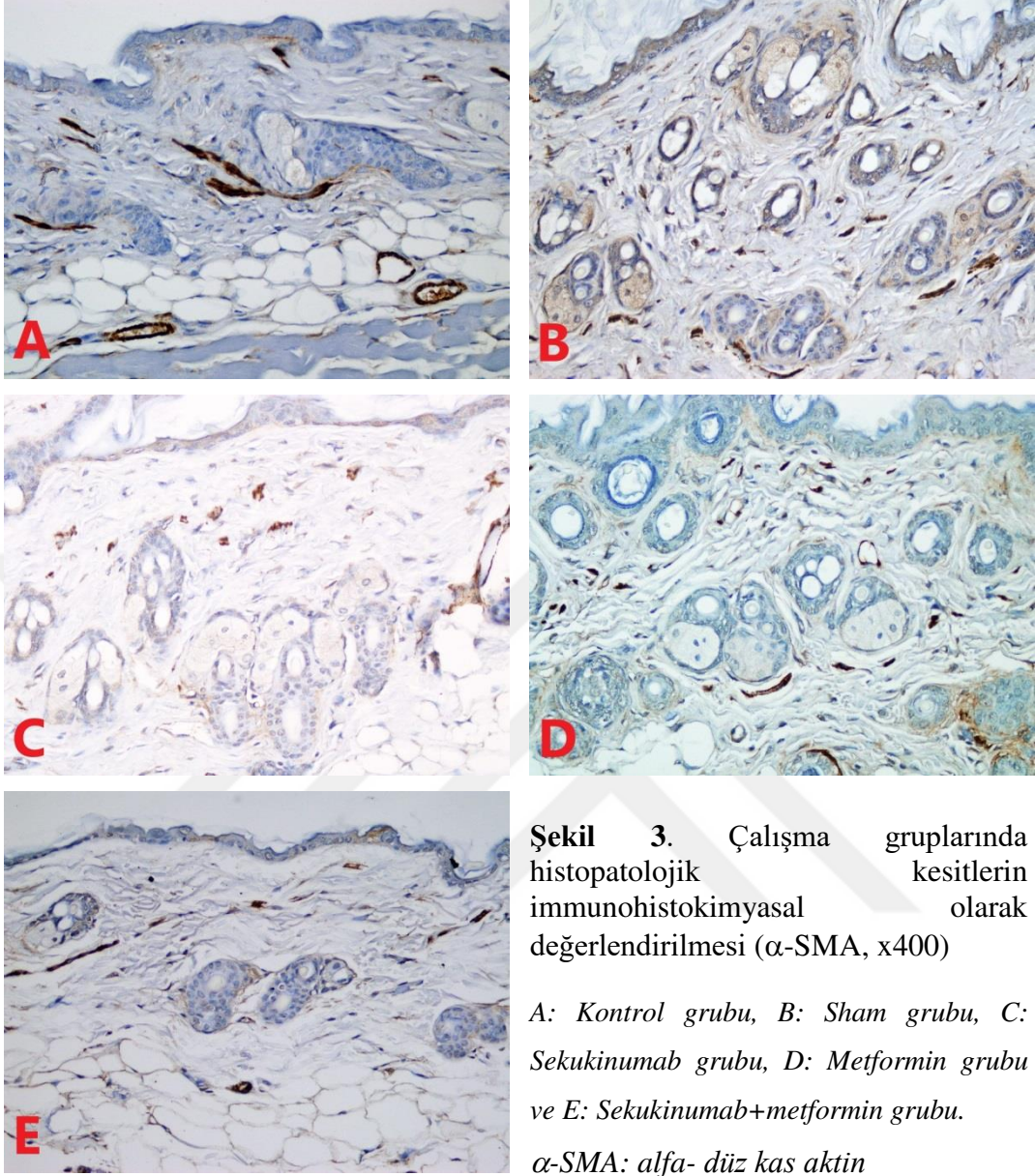
şekil 1. Çalışma gruplarında histopatolojik bulgular (hematoksilen eozin, x100)

A: Kontrol grubu, B: Sham grubu, C: Sekukinumab grubu, D: Metformin grubu ve E: Sekukinumab+metformin grubu

Subkutan BLM uygulaması dermal kalınlık ve dermal enflamatuar hücre sayısını anlamlı artırmıştır (Tablo 4). BLM uygulanan sham grubunda dermal fibroz belirgindi (Şekil 2A ve 2B).



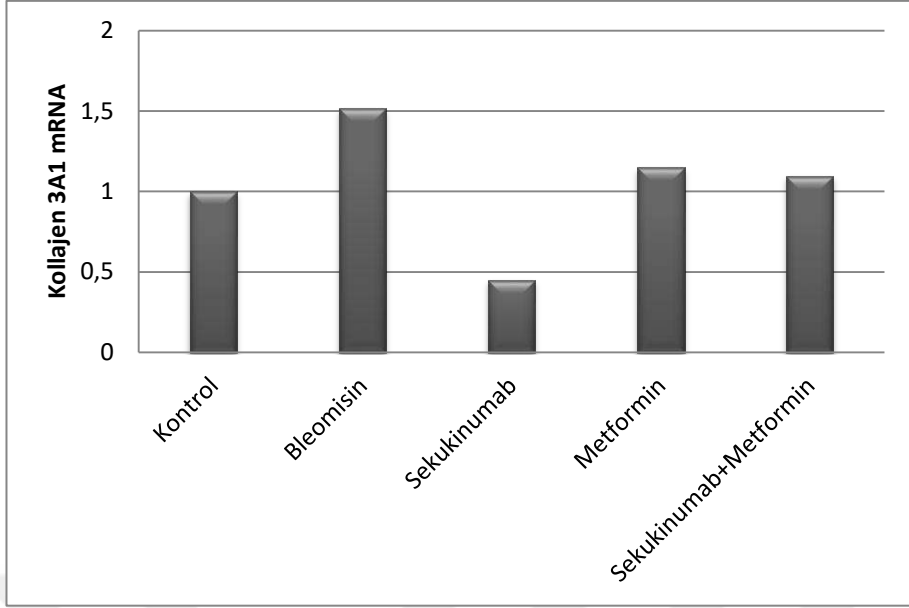
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, subkutan BLM uygulanan grupta α -SMA pozitif hücre sayısı anlamlı olarak artmıştır (Tablo 4), (Şekil 3A ve 3B). Histopatolojik bulgulara ek olarak, BLM uygulamaları kolajen 3A1 ve IL-17 mRNA ekspresyonlarını da artırmıştır (Şekil 4 ve 5).



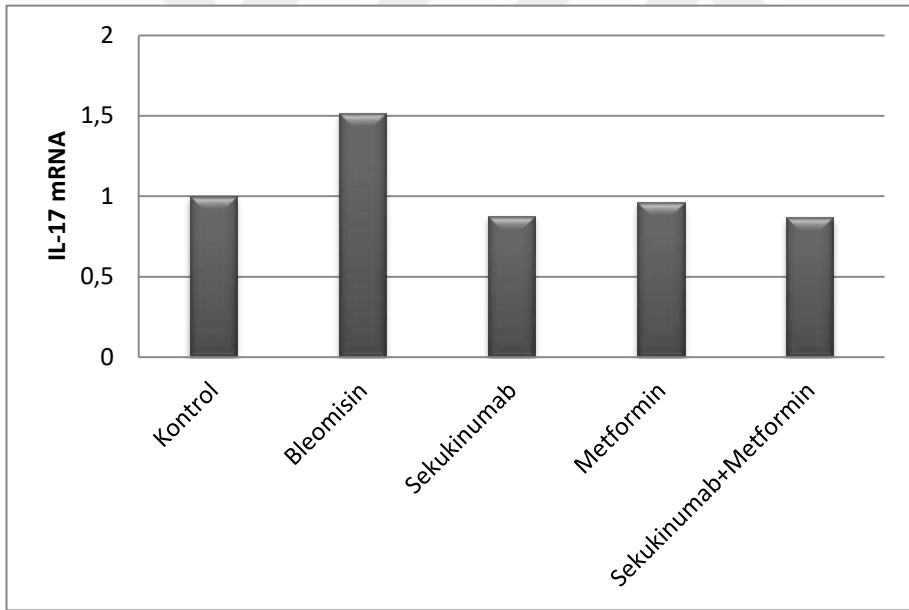
Tablo 4. Çalışma gruplarında dermal hücre sayıları ve dermal kalınlıklar

	Kontrol	BLM	Sekukinumab	Metformin	Sekukinumab + Metformin	P*
Dermal kalınlık (μm)	138.8 $\pm$ 26.9	314.1 $\pm$ 99.1 ^a	200.1 $\pm$ 18.1 ^b	215.6 $\pm$ 23.5 ^b	188.6 $\pm$ 27.3 ^b	<0.001
Miyofibroblast (n/HPF)	1.75 $\pm$ 1.17	8.20 $\pm$ 2.34 ^a	2.56 $\pm$ 0.73 ^b	2.89 $\pm$ 0.78 ^b	2.71 $\pm$ 0.76 ^b	<0.001
Lenfosit (n/HPF)	1.63 $\pm$ 0.52	2.10 $\pm$ 0.57	1.33 $\pm$ 0.50 ^b	2.22 $\pm$ 0.67	2.01 $\pm$ 0.82	0.023
Mast hücre (n/HPF)	3.25 $\pm$ 1.38	5.92 $\pm$ 2.34 ^a	3.72 $\pm$ 1.19 ^b	4.06 $\pm$ 1.27 ^b	3.84 $\pm$ 1.66 ^b	0.013

BLM: bleomisin, HPF: her bir alandaki hücre sayısı



Şekil 4. Çalışma gruplarında kollajen 3A1 mRNA ekspresyonları



Şekil 5. Çalışma gruplarında IL-17 mRNA ekspresyonları

3.2. Sekukinumab ve metformin tedavileri

Hem sekukinumab hem de metformin dermal fibrozu geriletmiştir (Şekil 1 ve 2). BLM grubu ile karşılaştırıldığında, sekukinumab ve metformin uygulanan gruplarda dermal kalınlık anlamlı oranlarda azalmıştır (Tablo 4). Benzer şekilde, BLM grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi gruplarında ortalama miyofibroblast (α -

SMA pozitif hücre) ve mast hücre sayıları anlamlı azlamıştır (Şekil 3). Ancak, sekukinumab tedavisine metformin eklemenin histopatolojik bulgular açısından ek yararı gözlenememiştir.

Hem sekukinumab hem de metformin uygulamaları kollajen 3A1 ve IL-17 mRNA ekspresyonlarını azaltmıştır (Şekil 4 ve 5). Ancak, sekukinumab tedavisine metformin eklemenin kollajen 3A1 ve IL-17 mRNA ekspresyonları açısından ek yararı gözlenememiştir.



4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, BLM ile uyarılmış deneysel skleroderma modelinde sekukinumab ve metformin uygulanmasının olası profilaktik ve tedavi edici etkinliği araştırılmıştır. Tekrarlanan BLM uygulamaları dermal enflamatuvar hücre infiltrasyonu, myofibroblastik hücre aktivitesi ve dermal kalınlıkta artışa neden olmaktadır. Sekukinumab ve metformin uygulamaları bu deneysel modelde enflamatuvar hücre infiltrasyonu, myofibroblastik hücre aktivitesi ve dermal fibroz gelişimini önlemektedir.

Skleroderma kas-iskelet, deri, mide-bağırsak, kalp, böbrek, akciğer olmak üzere pek çok sistemi tutabilen ancak, etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamayan kronik bir hastalıktır. Eldeki veriler doğrultusunda, hastalığın patogenezinde ise sırasıyla ortaya çıkan immun aktivasyon, vaskülopati ve yaygın fibroz suçlu tutulmaktadır (1, 2).

Sitokinler hücre fonksiyonu ve hücreler arası iletişimi düzenleyen protein yapılarıdır. Sitokinler arasında enfeksiyon ajanlarına ve enflamasyonu tetikleyen olaylara karşı bulunan IL'ler, lenfokinler ve TNF- α gibi hücre sinyal molekülleri bulunmaktadır. SSk'de, hastalığın patogenezinde önemli olabilecek veya patobiyojinin yararlı belirteçleri olabilecek birçok sitokin veya büyüme faktörü rol oynamaktadır. Sitokinler tedavi için diğer romatolojik hastalıklarda olduğu gibi sklerodermada da mantıklı hedefler olabilir. SSk'de, sitokinlere yönelik tedavi yöntemleri in vivo olarak hastalık patogenezinde güçlü bir bakış açısı sağlayabilir ve böylece hedefe yönelik biyolojik tedavi yöntemleri sayesinde farklı tedavi seçenekleri geliştirebilir (89).

Doğuştan gelen bağışıklık sistemindeki ana hücreler doğal katil (NK) hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler sklerodermada önemlidir. SSk'de erken cilt tutulumunda, makrofajlar dermisdeki perivasküler bölgede bulunmaktadır (98). Sklerodermanın patogenezinde rol oynayan CCL-2, TGF- β , PDGF ve IFN, sialik asit bağlayıcı immünoglobulin-1'i aktif makrofajların ürettiği bulunmuştur. Bağışıklık sisteminin bir sentinel hücresi olarak görev yapan mast hücresi dermiste miyofibroblastların yakınında yer alır. Bunlar çeşitli TLR'leri ifade eder ve ayrıca TGF- β , IL-4, IL-13, PDGF, monosit kemoatraktan protein-1, IFN- α ve ET-1 gibi immünolojik mediatörleri salgılamaktadır (99,

100). Bu sitokinler bağışıklık sisteminin uyarılmasını sağlar. Fibroblastlar, mast hücreleri ve / veya makrofajlardan TGF- β 'ya yanıtı takiben veya TLR tepkisi ile doğrudan aktivasyon yoluyla miyofibroblastlara farklılaşır. Sonraki miyofibroblast aktivasyonu, fibroza yol açan kollajen üretimini uyarır (101).

B hücreleri, humoral bağışıklık sistemi aracılığıyla otoimmünitede kritik bir rol oynamaktadır. Uyarılmış B lenfosit fonksiyonu, fibroza bağlı sistemik oto-enflamasyonu uyarır (108, 109). Sklerodermalı hastadan yapılan biyopsi materyalinde CD20 + B hücrelerin varlığı gösterilmiştir (110-111). Ayrıca, diğer B hücre aktivasyonu biyobelirteçleri, B hücre aktivasyon faktörü (BAFF) ve β 2-makroglobulin, SSk'de hastalık şiddeti ve aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur (111). Sklerodermalı hastaların neredeyse tamamında ANA pozitifdir. Anti-ScL-70 yaygın cilt tutulumlu hastalarda pozitifdir ve kötü prognoz ile ilişkilidir (112). Anti-sentromer antikorları ise sınırlı cilt tutulumlu SSk'nin karakteristiğidir ve daha iyi prognozla ilişkilidir (113, 114). SSk hastalarında kaspaz-3'e karşı oluşan antikorlar ve pulmoner fibroz, vasküler hasar ve enflamasyonun şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (115).

T lenfositler tarafından sunulan hücresel bağışıklığın SSk'de doku hasarında rol oynadığı gösterilmiştir. Perivasküler enflamatuar hücreler, fibrozu destekleyen mediatörlerden ağırlıklı olarak CD3, CD4, CD45, MHC sınıf 2 antijeni ve IL-2 reseptörü salgılar (102, 103). Bu aktivasyon bilinmeyen bir yolakla T hücrelerinin aktive olduğunu gösterir (104). Skleroderma patogenezinde Th1 ve Th2 sitokinlerinin karşıt rolleri de gösterilmiştir. Th1 IFN- γ sitokini vasıtasıyla, sırasıyla MMP ve TIMP dengesini düzenleyerek kollajen yıkımı ve sentez hızını düzenler. Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 sitokinlerini salgılayarak kollojen birikimini artırır (105-107).

Th17 hücrelerinin salgıladığı ana sitokin, IL-17 adını almıştır (120). Th17-IL-17 ekseninin sistemik ve kutanöz lupus eritematoz gibi, psöriyazis, Still hastalığı, enflamatuar bağırsak hastalıkları, romatoid artrit, ankilozan spondilit dahil pek çok otoimmün hastalığın patogenezinde rol oynadığı kanıtlanmıştır (121-126). Kurasawa ve ark. (127) tarafından yapılan bir çalışmada, SSk'li hasta grubunu kontrollerle kıyasladığı zaman daha yüksek IL-17 serum seviyelerini tespit etmişlerdir. Erken başlangıçlı lokalize skleroderma vakaları ile ilgili yapılan çalışmalar da artmış serum IL-17A seviyelerini göstermiştir (128). Ayrıca, SSk

hastalarında artan IL-17, endotelial hücrelerden ICAM-1, VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin üretimini artırarak, enflamatuvar hücre infiltrasyonuna yardımcı olmaktadır (8-13). Tersine, Nakashima ve ark. (129), SSk'de Th17 ve IL-17'nin etkileri ile ilgili araştırmalar yapmış ve IL-17A'nın kollajen sentezini azaltarak anti-fibrotik etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Sekukinumab, IL-17A'ya seçici olarak bağlanır ve keratinositler, fibroblast benzeri sinoviyositler, endotelial hücreler, kondrositler ve osteoblastlar üzerinde eksprese edilen IL-17 reseptörlerini inhibe eder. Sonuç olarak, sekukinumab, otoimmün ve enflamatuvar hastalıklarda aşağı yönlü iltihaplı yolları engeller (17, 130-134). Orta ve şiddetli psöriyazis, psöriyatik artrit ve ankilozan spondilit tedavisinde kullanılmaktadır (19, 76). Havrdova ve ark. (135) tarafından multipl skleroz hastalarında ise sekukinumab tedavisi denenmiştir. Sekukinumab ifade edilen reseptör üzerine olan bu etkileri SSk tedavisinde etkin olabileceğini düşündürmektedir.

Biancheri ve ark. (136) tarafından in vitro uygulamalarda IL-17A'nın Crohn hastalarındaki intestinal fibrozla ilişkisi ortaya konulmuştur. Mehrotra ve ark. (137) in vivo uygulamalarda IL-17A blokajının renal fibroz baskıladığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, IL-17 eksikliği olan deney hayvanlarında BLM ile uyarılan pulmoner fibrozun daha az seviyelerde olduğu ortaya konulmuştur (138). Park ve ark. (139) IL-17A gen defekti olan farelerde in vivo iki farklı modelde (BML ile uyarılan ve GVHD model) deri fibrozunun daha az olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamız, BLM ile uyarılan deri fibroz modelinde sekukinumab ile IL-17A blokajının deri fibrozunu baskıladığını ortaya koymuştur.

Metformin, anti-enflamatuvar ve anti-oksidan özelliklere sahip olup, endotel disfonksiyonunu geriye çevirebilme özelliğine de sahiptir (140-146). Metformin, ana sensör olan ve memeli hücrelerinde enerji homeostazisinin düzenleyicisi olan AMPK'yi harekete geçirerek, metabolik bozukluklar için de terapötik bir hedefe aracılık etmektedir (147). AMPK aktivasyonu, genellikle ATP'nin korunmasına ve üretilmesine neden olan birçok yolu etkilemektedir (148).

Metforminin ayrıca çeşitli başka hastalıkların tedavisinde terapötik etkinliği gösterilmiştir (81, 149, 150). Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olan

hastalarda, metformin tedavisinin sadece insülin duyarlılığını artırmadığı, aynı zamanda karaciğerde histolojik olarak steatoz ve fibrozu iyileştirdiği gösterildi (151, 152). Son zamanlarda, metformin ile ilgili olarak kabul edilen kardiyoprotektif etki, kardiyak fibrozun TGF- β sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla olduğu açıklanmıştır (153). Metforminin benzer mekanizmalar üzerine olan bu etkileri SSk tedavisinde etkin olabileceğini düşündürmektedir.

Skleroderma sıklıkla pulmoner fibroza neden olabilmektedir ve BLM ile uyarılan pulmoner fibrozun patogenik yolları skleroderma ile oldukça benzerdir. Metforminin iki farklı çalışmada (154, 155) BLM ile uyarılmış pulmoner fibrozu engellediği gösterilmiştir. Kim ve ark. (156) deney hayvanlarında oral verilen metforminin radyasyon ile uyarılan dermal fibrozu baskıladığını ortaya koymuştur. Bizim çalışmamızda metformin uygulanan farelerde dermal fibrin daha az olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, Ursini ve ark. (157) BLM ile uyarılan skleroderma modelinde oral metforminin deri fibrozunu baskıladığını bildirmişlerdir.

Metforminin anti-fibrotik etkisi AMPK üzerine olan etkilerinden kaynaklanıyor olabilir (84, 85). AMPK supresyonu fibroz ile ilişkiliyken, metformin AMPK'yı aktive ettiğ ve böylece fibroblastların aktivasyonunu baskıladığı bilinmektedir (158). Fibroblastlar ise skleroderma patogenezinde ana aktörleridir. Çalışmamızda, metformin uygulanan grupta α -SMA pozitif hücre sayısının azaldığı tespiti bu görüşü destekler niteliktedir. Metforminin anti-fibrotik etkisinin bir diğer nedeni TGF- β 1 baskılayıcı etkileri olabilir (86, 153). Skleroderma patogenezinin ana hücresel komponenti fibroblast iken, TGF- β sitokinler ve büyüme faktörlerinden en ön planda olanıdır.

Çalışmamızda, BLM ile uyarılan dermal fibroz modelinde sekukinumab ve metforminin anti-fibrotik etkileri ortaya konulmuştur. Bu bulgular daha ileri çalışmalarda bu iki ilacın skleroderma tedavisi açısından denenmesi için cesaret vermektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Gilliland BC. Systemic sclerosis (scleroderma). In Braunwald E, Fauci A, Kasper D (eds): Harrison's Internal Medicine. New York, McGraw Hill, 16th ed 2005: 1979-1989.
2. Sakkas LI. New developments in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmunity* 2005; 38: 113-116.
3. Krieg T, Meurer M. Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspects. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 457-481.
4. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-205.
5. Denton CP, Black CM. Scleroderma--clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18: 271-290.
6. Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 152-157.
7. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 675-694.
8. Pandey JP, LeRoy EC. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 10-15.
9. Ferri C, Longombardo G, Azzi A, Zakrzewska K. Parvovirus B19 and systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 267-268.
10. Ferri C, Zakrzewska K, Longombardo G. Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 718-720.
11. Kalabay L, Fekete B, Czirják L. *Helicobacter pylori* infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60. *Helicobacter* 2002; 7: 250-256.
12. Jimenez SA, Artlett CM. Microchimerism and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 86-90.
13. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1186-1191.
14. Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1667-1676.

15. Young-Min SA, Beeton C, Laughton R. Serum TIMP1, TIMP-2, and MMP-1 in patients with systemic sclerosis, primary Raynaud's phenomenon, and in normal controls. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 846-851.
16. Toubi E, Kessel A, Grushko G. The association of serum matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor levels with scleroderma disease severity. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 221-224.
17. Novartis Pharmaceuticals Corporation. Advisory committee briefing material for Cosentyx 2014. Switzerland: Novartis Pharmaceuticals Corporation, <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/UCM419023.pdf> (accessed 28 Jun 2017).
18. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M. Secukinumab in plaque psoriasis — results of two phase 3 trials. *N Engl J Med* 2014; 371: 326-338.
19. Baeten D, Baraliakos X, Braun J. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2013; 382: 1705-1710.
20. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005; 330: 1304-1305.
21. Lee SY, Lee SH, Yang EJ, Kim EK, Kim JK, Shin DY, et al. Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the STAT3 signaling pathway and regulation of the between Th17/Treg balance. *PLoS One* 2015; 10: e0135858.
22. Son HJ, Lee J, Lee SY, Kim EK, Park MJ, Kim KW, et al. Metformin attenuates experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Th17/Treg balance and osteoclastogenesis. *Mediators Inflamm* 2014; 3986 - 3997.
23. Cavaglieri RC, Day RT, Feliers D, Abboud HE. Metformin prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 412: 116-122.
24. Tripathi DM, Erice E, Lafoz E, Garcia-Caldero H, Sarin SK, Bosch J, et al. Metformin reduces hepatic resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309: 301-309.
25. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590.
26. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1747-1755.

27. Mayes M, Laing T, Gillespie B. Prevalence, incidence and survival rates of sistemic sclerosis in the Detroit Metropolitan area. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 150.
28. Tamaki T, Mori S, Takehara K. Epidemiologic study of patients with sistemic sclerosis in Tokyo. *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 366-371.
29. Geirsson AJ, Steinson K, Guthmundsson S, Sigurthsson V. Systemic sclerosis in Iceland. A nationwide epidemiological study. *Ann rheum Dis* 1994; 53: 502-505.
30. Scleroderma. EULAR online course. 2009; 20: 1-30.
31. Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008; 66: 198-202.
32. Assassi S, Arnett FC, Reveille JD, Gourh P, Mayes MD. Clinical, Immunologic and the genetic features of familial systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2031-2037.
33. Reveille JD, Fischbach M, McNearney T, Friedman AW, Aguilar MB, Lisse J, et al. Genisos Study Group. Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic, and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30: 332-346.
34. Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev* 2008; 8: 36-40.
35. Koca SS, Işık A, Ozercan IH, Ustundag B, Evren B, Metin K. Effectiveness of etanercept in bleomycin-induced experimental scleroderma. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 172-175.
36. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 520-526.
37. Lambova SN, Müller-Ladner U. Capillaroscopic pattern in systemic sclerosis - an association with dynamics of processes of angio- and vasculogenesis. *Microvasc Res* 2010; 80: 534-539.
38. Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38: 132-160.
39. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 679-685.
40. Koca SS, Ozgen M, Isik A. Sistemik skleroz etiyopatogenezi RAED Dergisi 2012; 4: 39-46.
41. Akbaş F. Sklerodermada Galektin-3 Düzeyi. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 2010.
42. Bolster MB, Silver RM. Clinical features of systemic sclerosis. *Rheumatology, Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weibblatt ME, Weisman MH. Rheumatology (eds) Mosby, 2008; 1375-1380.*

43. Weinstein WM, Kadell BM. The gastrointestinal tract in systemic sclerosis. Clements P, Furst D (eds). Systemic sclerosis. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004; 293-308.
44. Schuffler MD, Beegle RG. Progressive systemic sclerosis of the gastrointestinal tract and hereditary hollow visceral myopathy two distinguishable disorders of intestinal smooth muscle. *Gastroenterology* 1979; 77: 664-671.
45. Chung L, Lin J, Furst DE, Fiorentino D. Systemic and localized scleroderma. *Clin Dermatol* 2006; 24: 374-392.
46. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1283-1289.
47. Dick T, Mierau R, Bartz-Bazzanella P, Alavi M, Stoyanova-Scholz M, Kindler J, et al. Coexistence of anti-topoisomerase I and anti-centromere antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 121-127.
48. Rossi GA, Bitterman PB, Rennard SI, Ferrans VJ, Crystal RG. Evidence for chronic inflammation as a component of the interstitial lung disease associated with progressive systemic sclerosis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 12-17.
49. D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT. Pathologic observations in systemic sclerosis: A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med* 1969; 46: 428-440.
50. Chang B, Wigley FM, White B, Wise RA. Scleroderma patients with combined pulmonary hypertension and interstitial lung disease. *J Rheumatol* 2003; 30: 2398-2405.
51. Kostis JB, Seibold JR, Turkevich D. Prognostic importance of cardiac arrhythmias in systemic sclerosis. *Am J Med* 1988; 84: 1007-1015.
52. Gustafsson R, Mannting F, Kazam E, Waldenström A, Hallgren R. Cold-induced reversible myocardial ischemia in systemic sclerosis. *Lancet* 1989; 2: 475-479.
53. Medsger TA, Masi AT, Rodnan GP. Survival with systemic sclerosis: a life-table analysis of clinical and demographic factors in 309 patients. *Ann Intern Med* 1971; 75: 369-376.
54. Steen VD. Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 861-878.
55. Steen VD, Medsger TA, Osial TA, Ziegler GL, Shapiro AP, Rodnan GP. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 1984; 76: 779-786.
56. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 75-83.

57. Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 620-628.
58. Czirják L. Practical approach to the therapy of systemic sclerosis. *Z Rheumatol* 2004; 63: 451-456.
59. Fries R, Shariat K, von Wilmowsky H, Böhm M. Sildenafil in the treatment of Raynaud's phenomenon resistant to vasodilatory therapy. *Circulation* 2005; 112: 2980-2985.
60. Lee SH, Rubin LJ. Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension. *J Intern Med* 2005; 258: 199-215.
61. Galiè N, Seeger W, Naeije R, Simonneau G, Rubin LJ. Comparative analysis of clinical trials and evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 81-88.
62. Steen VD. Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29: 315-333.
63. Boulman N, Slobodin G, Rozenbaum M, Rosner I. Calcinosis in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34: 805-812.
64. Clements PJ, Furst DE, Wong WK. High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis: analysis of a two-year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1194- 1203.
65. Furst DE, Clements PJ. D-penicillamine is not an effective treatment in systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol* 2001; 30: 189-191.
66. Casas JA, Saway PA, Villarreal I. 5-fluorouracil in the treatment of scleroderma: a randomised, double blind, placebo controlled international collaborative study. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 926-928.
67. Furst DE, Clements PJ, Hillis S, et al. Immunosuppression with chlorambucil, versus placebo, for scleroderma. Results of a three-year, parallel, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 584-593.
68. van den Hoogen FH, Boerbooms AM, Swaak AJ. Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 364-372.
69. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR. A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1351-1358.
70. Ozgen M, Koca SS, Isik A, Ozercan IH. Methotrexate Has No Antifibrotic Effect in Bleomycin-induced Experimental Scleroderma. *J Rheumatol* 2010; 37: 678-679.

71. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 362-382.
72. Mountz JD, Downs Minor MB, Turner R, Thomas MB, Richards F, Pisko E. Bleomycin-induced cutaneous toxicity in the rat: analysis of histopathology and ultrastructure compared with progressive systemic sclerosis (scleroderma). *Br J Dermatol* 1983; 108: 679-686.
73. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 456-462.
74. Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin Immunol* 2002; 102: 209-216.
75. Srimatkandada P, Loomis R, Carbone R, Srimatkandada S, Lacy J. Combined proteasome and Bcl-2 inhibition stimulates apoptosis and inhibits growth in EBV transformed lymphocytes: a potential therapeutic approach to EBV-associated lymphoproliferative diseases. *Eur J Haematol* 2008; 80: 407-418.
76. Abrouk M, Gandy J, Nakamura M. Secukinumab in the Treatment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Review of the Literature. *Skin Therapy Letter* 2017; 22: 1-6.
77. Rich P, Sigurgeirsson B, Thaci D. Secukinumab induction and maintenance therapy in moderate-to-severe plaque psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II regimen-finding study. *Br J Dermatol* 2013; 168: 402-411.
78. Vekic DA, Cains GD. Hidradenitis suppurativa - Management, comorbidities and monitoring. *Australian Family Physician*. 2017; 46: 584-588.
79. Thorlacius L, Theut Riis P, Jemec GBE. Severe hidradenitis suppurativa responding to treatment with secukinumab: a case report. *Br J Dermatol* 2018; 179:182-185.
80. Schuch A, Fischer T, Boehner A, Biedermann T, Volz T. Successful Treatment of Severe Recalcitrant Hidradenitis Suppurativa with the Interleukin-17A Antibody Secukinumab. *Acta Dermato-Venereologica* 2017; 98: 151-152.
81. Nagai S, Kurebayashi Y, Koyasu S. Role of PI3K/Akt and mTOR complexes in Th17 cell differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013; 1280: 30-34.
82. Kang KY, Kim YK, Yi HI. Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int Immunopharmacol* 2013; 16: 85-92.
83. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGFbeta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 47-51.

84. Li L, Huang W, Li K, Zhang K, Lin C, Han R. Metformin attenuates gefitinib-induced exacerbation of pulmonary fibrosis by inhibition of TGF-beta signaling pathway. *Oncotarget* 2015; 6: 43605-43619.
85. Lu J, Shi J, Li M, Gui B, Fu R, Yao G. Activation of AMPK by metformin inhibits TGF-beta-induced collagen production in mouse renal fibroblasts. *Life Sci* 2015; 127: 59-65.
86. Park IH, Um JY, Hong SM, Cho JS, Lee SH, Lee HM, et al. Metformin reduces TGF-beta1-induced extracellular matrix production in nasal polyp-derived fibroblasts. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014; 150: 148-153.
87. Soraya H, Rameshrad M, Mokarizadeh A, Garjani A. Metformin attenuates myocardial remodeling and neutrophil recruitment after myocardial infarction in rat. *Bioimpacts* 2015; 5: 3-8.
88. Bai J, Zhang N, Hua Y, Wang B, Ling L, Ferro A, et al. Metformin inhibits angiotensin II-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *PLoS One* 2013; 8: 72120.
89. Raja J, Denton CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 2015; 37: 543-557.
90. Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 267-275.
91. Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, Tamaki Z, Fang F, Su Y, et al. Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor-beta responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am J Pathol* 2013; 182: 192-205.
92. Razonable RR, Henault M, Paya CV. Stimulation of tolllike receptor 2 with bleomycin results in cellular activation and secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 210:181-189.
93. Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C, Jin L, Arnett FC. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 694-702.
94. Farina GA, York MR, Di Marzio M, Collins CA, Meller S, Homey B, et al. Poly(I:C) drives type I IFN- and TGFbeta mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 2583-2593.
95. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, Gourh P, Agarwal SK, McNearney TA, et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 589-598.

96. Eloranta ML, Franck-Larsson K, Lovgren T, Kalamajski S, Ronnblom A, Rubin K, et al. Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1396-1402.
97. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17:1-14.
98. York MR, Nagai T, Mangini AJ, Lemaire R, van Seventer JM, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1010-1020.
99. Hugle T, Hogan V, White KE, van Laar JM. Mast cells are a source of transforming growth factor beta in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 795-799.
100. Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5:147-153.
101. York MR. Novel insights on the role of the innate immune system in systemic sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7: 481-489.
102. Kraling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995; 63: 48-56.
103. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117:557-567.
104. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 2002; 168: 3649-3659.
105. Wynn TA Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 583-594.
106. Wangoo A, Sparer T, Brown IN, Snewin VA, Janssen R, Thole J, et al. Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. *J Immunol* 2001; 166: 3432-3439.
107. Lakos G, Melichian D, Wu M, Varga J. Increased bleomycin-induced skin fibrosis in mice lacking the Th1- specific transcription factor T-bet. *Pathobiology* 2006; 73: 224-237.
108. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984; 27 :645-653.
109. Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JR. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum* 1944; 20: 975-984.

110. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12319-12324.
111. Lanteri A, Sobanski V, Langlois C, Lefevre G, Hauspie C, Sanges S, et al. Serum free light chains of immunoglobulins as biomarkers for systemic sclerosis characteristics, activity and severity. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 974-980.
112. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1363-1373.
113. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35: 35-36.
114. Sujau I, Ng CT, Sthaneshwar P, Sockalingam S, Cheah TE, Yahya F, Jasmin R. Clinical and autoantibody profile in systemic sclerosis: baseline characteristics from a West Malaysian cohort. *Int J Rheum Dis* 2015; 18: 459-465.
115. Okazaki S, Ogawa F, Iwata Y, Hara T, Muroi E, Komura K, et al. Autoantibody against caspase-3, an executioner of apoptosis, in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2010; 30: 871-878.
116. Renaudineau Y. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 156-160.
117. Kahaleh BM. Lymphocyte interactions with the vascular endothelium in scleroderma. *Clin Dermatol* 1994; 12: 253-260.
118. Gruschwitz K. Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 184-189.
119. Kuryliszyn-Moskal A. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin, vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. *Clin Rheumatol* 2004; 24: 111-116.
120. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* 2001; 20: 5332-5341.
121. Tanasescu C, Bălănescu E, Bălănescu P, Olteanu R, Badea C, Grancea C, et al. IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Intern Med* 2010; 21: 202-207.
122. Blauvelt A. T-helper 17 cells in psoriatic plaques and additional genetic links between IL-23 and psoriasis. *J Invest Dermatol* 2008; 128(5): 1064-1067.

123. Chen DY, Chen YM, Lan JL, Lin CC, Chen HH, Hsieh CW. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of adult-onset Still's disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49: 2305-2312.
124. De Nitto D, Sarra M, Cupi ML, Pallone F, Monteleone G. Targeting IL-23 and Th17-cytokines in inflammatory bowel diseases. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 3656-3660.
125. Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2012; 7: 31000.
126. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. IL-23/IL-17 axis in spondyloarthritis-bench to bedside. *Clin Rheumatol* 2016; 35: 1437-1441.
127. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2455-2463.
128. Torok KS, Kurzinski K, Kelsey C, Yabes J, Magee K, Vallejo AN, et al. Peripheral blood cytokine and chemokine profiles in juvenile localized scleroderma: T-helper cell-associated cytokine profiles. *Semin Arthritis Rheum* 2015; 45: 284-293.
129. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 2012; 188: 3573-3583.
130. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discovery* 2012; 11: 763-776.
131. Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, Antoni C. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 116-123.
132. Sanford M, McKeage K. Secukinumab: first global approval. *Drugs*. 2015; 75: 329-338.
133. Gaffen SL, Kramer JM, Yu JJ, Shen F. The IL-17 cytokine family. *Vitam Horm*. 2006; 74: 255-282.
134. Martin DA, Towne JE, Kricorian G, Klekotka P, Gudjonsson JE, Krueger JG, Russell CB. The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings. *J Invest Dermatol*. 2013; 133: 17-26.
135. Havrdova E, Belova A, Goloborodko A, Tisserant A, Wright A, Wallstroem E, et al. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept Study. *J Neurol* 2016; 263: 1287-1295.

136. Biancheri P, Pender SL, Ammoscato F, Giuffrida P, Sampietro G, Ardizzone S, Ghanbari A, Curciarello R, Pasini A, Monteleone G, Corazza GR, Macdonald TT, Di Sabatino A. The role of interleukin 17 in Crohn's disease-associated intestinal fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6(1):13. doi: 10.1186/1755-1536-6-13.
137. Mehrotra P, Collett JA, McKinney SD, Stevens J, Ivancic CM, Basile DP. IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: compensatory role of natural killer cells in athymic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(3):F385-F397.
138. Cipolla E, Fisher AJ, Gu H, Mickler EA, Agarwal M, Wilke CA, Kim KK, Moore BB, Vittal R. IL-17A deficiency mitigates bleomycin-induced complement activation during lung fibrosis. *FASEB J*. 2017;31(12):5543-5556.
139. Park MJ, Moon SJ, Lee EJ, Jung KA, Kim EK, Kim DS, Lee JH, Kwok SK, Min JK, Park SH, Cho ML. IL-1-IL-17 Signaling Axis Contributes to Fibrosis and Inflammation in Two Different Murine Models of Systemic Sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9:1611.
140. Dandona P, Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Tripathy C, Hofmeyer D, Chaudhuri A. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5043-5047.
141. Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N, et al. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 611-617.
142. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000; 6: 998-1003.
143. Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, et al. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* 2006; 55: 120-127.
144. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, Beaudoux JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* 2005; 54: 829-834.
145. Srividhya S, Ravichandran MK, Anuradha CV. Metformin attenuates blood lipid peroxidation and potentiates antioxidant defense in high fructose-fed rats. *J Biochem Mol Biol Biophys* 2002; 6: 379-385.

146. Majithiya JB, Balaraman R. Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2006; 78: 2615-2624.
147. Viollet B, Mounier R, Leclerc J, Yazigi A, Foretz M, Andreelli F. Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes Metab* 2007; 33: 395-402.
148. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 774-785.
149. Nath N, Khan M, Paintlia MK, Singh I, Hoda MN, Giri S. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol* 2009; 182: 8005-8014.
150. Zhao RR, Xu XC, Xu F, ZhangWL, ZhangWL, Liu LM, Wang WP. Metformin protects against seizures, learning and memory impairments and oxidative damage induced by pentylentetrazole-induced kindling in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 13: 414-417.
151. De Oliveira CP, Stefano JT, de Siqueira ER, Silva LS, de Campos Mazo DF, Lima VM, et al. Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2008; 38: 159-165.
152. Duvnjak M, Tomasic V, Gomercic M, Smircic Duvnjak L, Barsic N, Lerotic I. Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 57-66.
153. Xiao H, Ma X, Feng W, Fu Y, Lu Z, Xu M, et al. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGFbeta1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 504-513.
154. Rangarajan S, Bone NB, Zmijewska AA, Jiang S, Park DW, Bernard K, Locy ML, Ravi S, Deshane J, Mannon RB, Abraham E, Darley-Usmar V, Thannickal VJ, Zmijewski JW. Metformin reverses established lung fibrosis in a bleomycin model. *Nat Med*. 2018;24(8):1121-1127.
155. Gamad N, Malik S, Suchal K, Vasisht S, Tomar A, Arava S, Arya DS, Bhatia J. Metformin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: Pharmacological effects and molecular mechanisms. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:1544-1553.

156. Kim JM, Yoo H, Kim JY, Oh SH, Kang JW, Yoo BR, Han SY, Kim CS, Choi WH, Lee EJ, Byeon HJ, Lee WJ, Lee YS, Cho J. Metformin Alleviates Radiation-Induced Skin Fibrosis via the Downregulation of FOXO3. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(3):959-970.
157. Ursini F, Grembiale RD, D'Antona L, Gallo E, D'Angelo S, Citraro R, Visca P, Olivieri I, De Sarro G, Perrotti N, Russo E. Oral Metformin Ameliorates Bleomycin-Induced Skin Fibrosis. *J Invest Dermatol*. 2016;136(9):1892-4.
158. Mishra R, Cool BL, Laderoute KR, Foretz M, Viollet B, Simonson MS. AMP-activated protein kinase inhibits transforming growth factor-beta-induced Smad3-dependent transcription and myofibroblast transdifferentiation. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10461-9.

6. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Diyarbakır merkezde dünyaya geldim. İlkokulu Diyarbakır Milli Eğitim Vakfı İlkokulu'nda okudum. Orta öğrenimimi Mustafa Kemal Ortaokulu'nda ve Diyarbakır Rekabet Grubu Cumhuriyet Fen Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2006 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitime başlayıp 2013 yılında mezun oldum. 2014 yılında Konya Eğitim Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniğinde başladığım uzmanlık eğitimime Fırat Üniversitesi İç Hastalıkları Kliniğinde halen devam etmekteyim.

