

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



DENEYSEL SKLERODERMA MODELİNDE
SEKUKİNUMAB VE METFORMİN
TEDAVİLERİNİN CXCL4 VE CHEMERİN
DÜZEYLERİNE OLAN ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Tuba Kaya KARATAŞ

2022

ONAY SAYFASI

.....
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Necip İLHAN

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Necip İLHAN

Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ

Prof. Dr. Kadirhan SUNGUROĞLU

Prof. Dr. Cumhuri BİLGİ

Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Uzm. Ecz. Tuba KAYA KARATAŞ
19.04.2022

Prof. Dr. Necip İLHAN
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi zorlu ve emek isteyen bir süreç olup bu süre zarfında bilgi ve birikimlerini benimle paylaşarak bana rehberlik eden başta tez danışmanım Prof. Dr. Necip İLHAN olmak üzere, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, tezin hazırlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA ve Prof. Dr. Adile Ferda DAĞLI'ya, eğitim sürecimde beni her daim destekleyen eşim Doç. Dr. Ahmet KARATAŞ'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	4
3.1. Genel Bilgiler	6
3.1.1. Sistemik Skleroz	6
3.1.1.1. Tanı ve Sınıflama	6
3.1.1.2. Epidemiyoloji	6
3.1.1.3. Etiyoloji	7
3.1.1.4. Patogenez	8
3.1.1.5. Klinik Bulgular	10
3.1.1.6. Tedavi	14
3.1.2. Platelet Faktör-4	17
3.1.3. Kimerin	20
3.1.4. Sekukinumab	23
4. GEREÇ VE YÖNTEM	28
4.1. Deney Hayvanları	28
4.2. Çalışma Grupları	28
4.3. Deneysel Uygulamalar	28
4.4. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması	29
4.5. Biyokimyasal Analizler	29
4.5.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	29
4.5.2. CXCL4 Düzeyinin Belirlenmesi	29
4.5.3. Kimerin Düzeyinin Belirlenmesi	31
4.6. Histopatolojik Analizler	33
4.7. İstatistiksel Analizler	34
5. BULGULAR	35
5.1. Serum ve Doku CXCL4 Düzeyleri	35
5.2. Serum ve Doku Kimerin Düzeyleri	37

5.3. Histopatolojik Değerlendirme	39
6. TARTIŞMA	44
7. KAYNAKLAR	54
8. ÖZGEÇMİŞ	64



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deneysel skleroderma modelleri	5
Tablo 2. CXCL4 ELISA kit içeriği	30
Tablo 3. Kimerin ELISA kit içeriği	32
Tablo 4. Çalışma gruplarında serum ve doku CXCL4 düzeyleri	35
Tablo 5. Çalışma gruplarında serum ve doku kimerin düzeyleri	38
Tablo 6. Çalışma gruplarında dermal hücre sayıları ve dermal kalınlıklar	42



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Sistemik skleroz patogenezinde sorumlu tutulan mekanizmalar	9
Şekil 2.	Platelet faktör 4'ün kimyasal yapısı	18
Şekil 3.	Platelet faktör 4 (CXCL4)'ün biyolojik yapısı	18
Şekil 4.	CXCL4 ve Th17 yolağı arasındaki ilişki	20
Şekil 5.	Kimerin izoformlarının sentezlenmesi	21
Şekil 6.	Kimerinin metabolik etkileri	22
Şekil 7.	Kimerin ve sistemik skleroz patogenezi arasındaki olası ilişki	23
Şekil 8.	IL-17' nin inflamasyon, vaskülopati ve fibroz üzerine olan etkileri	24
Şekil 9.	CXCL4 düzeyi ELISA standart eğri grafiği	31
Şekil 10.	Kimerin düzeyi ELISA standart eğri grafiği	33
Şekil 11.	Gruplardaki serum CXCL4 düzeyleri	36
Şekil 12.	Gruplardaki doku CXCL4 düzeyleri	37
Şekil 13.	Gruplardaki serum kimerin düzeyleri	38
Şekil 14.	Gruplardaki doku kimerin düzeyleri	39
Şekil 15.	Kontrol grubunda FTS enjeksiyonu yapılan farelerin normal histopatolojik görünümü (hematoksilen eozin, x100)	40
Şekil 16.	Sham grubunda BLM enjeksiyonu yapılan farelerin histopatolojik görünümü: dermal kalınlık, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrozda belirgin artış. (hematoksilen eozin, x100)	40
Şekil 17.	Sekukinumab grubundaki farelerin histopatolojik görünümü: dermal kalınlık, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrozda ılımlı artış. (hematoksilen eozin, x100)	41
Şekil 18.	Metformin grubundaki farelerin histopatolojik görünümü: dermal kalınlık, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrozda ılımlı artış. (hematoksilen eozin, x100)	41
Şekil 19.	Gruplardaki dermal kalınlık	42
Şekil 20.	Gruplarda birim alanda lenfosit sayısı	43
Şekil 21.	Gruplarda birim alanda mast hücre sayısı	43

KISALTMALAR LİSTESİ

ACE	: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
AMPK	: Adenozin Mono Fosfat Protein Kinaz
BLM	: Bleomisin
CXCL4	: Kemokin C-X-C Motif Ligand 4
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DQA	: DQ Alfa
DRB	: DR Beta
FTS	: Fosfat ile Tamponlanmış Salin
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
IL	: İnterlökin
İAH	: İnterstisyel Akciğer Hastalığı
mTOR	: Mammalian Target Of Rapamycin
PDE-5	: Fosfodiesteraz Tip 5
pDH	: Plazmasitoid Dendritik Hücreler
RF	: Raynaud Fenomeni
RNA	: Ribonükleik Asit
sc	: Subkutan
SRK	: Skleroderma Renal Krizi
SSk	: Sistemik Skleroz
STAT	: Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
Th	: T helper
TNF	: Tümör Nekroz Faktör

1. ÖZET

Sistemik skleroz (SSk) patogenezi net olarak bilinmeyen kronik, otoimmün hastalıktır. Sekukinumab, interlökin (IL)-17A'ya bağlanarak etki eden bir monoklonal antikordur. Metformin pleiotropik etkileri olan oral anti-diyabetik bir ilaçtır. CXCL4 ve chemerin (kimerin) SSk'de inflamasyon ve fibroz süreçlerinde rol aldığı düşünülen kemokin ve adipositokindir. Çalışmamızın amacı, deneysel skleroderma modelinde serum ve deri dokusundaki CXCL4 ve kimerin moleküllerinin düzeylerini ve sekukinumab ve metformin tedavilerinin bu moleküller üzerindeki etkilerini belirlemektir.

Çalışmada kullanılan deney hayvanları 40 adet Balb/c dişi farelerden oluşturuldu. Çalışma için bu hayvanlardan alınan serum ve deri dokuları kullanıldı. 4 grup olacak şekilde fareler gruplandırıldı. 4 hafta süre ile her gün, subkutan (sc) olarak 100 µl fosfatla tamponlanmış salin (FTS) kontrol grubundaki farelere, 100 µg BLM (100 µl FTS içerisinde) diğer gruptaki farelere uygulandı. Haftada bir sc olarak 10 mg/kg dozunda sekukinumab 3. gruptaki farelere; günlük 50 mg/kg metformin (oral) 28 gün boyunca 4. grup farelere uygulandı. 4. hafta sonunda gruptaki farelerin hepsi sakrifiye edilerek analizler için doku örnekleri alındı. Histopatolojik analizlerle birlikte, serum ve doku CXCL4 ile kimerin düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi.

Yapılan BLM enjeksiyonları dermal fibroza neden oldu. Ek olarak, BLM grubunda serum ve doku CXCL4 ile kimerin düzeyleri arttı. Sekukinumab ve metformin tedavisi ile dermal kalınlık, doku CXCL4 ve kimerin düzeyleri azaldı.

Sonuç olarak, CXCL4 ve kimerin SSk fibrotik süreç ve anti-fibrotik tedavilerin değerlendirilmesinde hedef biyomarker olabilirler.

Anahtar Kelimeler: Deneysel skleroderma, CXCL4, kimerin, sekukinumab, metformin

2. ABSTRACT

THE EFFECTS OF SECUKINUMAB AND METFORMIN THERAPY ON CXCL4 AND KIMERIN LEVELS IN EXPERIMENTAL MODEL OF SCLERODERMA

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic, autoimmune disease of unknown pathogenesis. Sekukinumab is a monoclonal antibody that blocks interleukin (IL)-17A. Metformin is an oral anti-diabetic drug with pleiotropic effects. CXCL4 and kimerin are chemokines and adipocytokines that are thought to be involved in inflammation and fibrosis processes in SSc. The aim of our study is to determine the levels of CXCL4 and kimerin molecules in serum and skin tissue and the effects of secukinumab and metformin treatments on these molecules in experimental model of scleroderma.

The experimental animals used in the study consisted of 40 Balb/c female mice. Serum and skin tissues from these animals were used for the study. The mice were divided as 4 groups. Every day for 4 weeks, 100 µl of phosphate-buffered saline (FTS) was administered subcutaneously (sc) to the mice in the control group, and 100 µg of BLM (in 100 µl of FTS) to the mice in the other group. In addition, mice of group 3 were given 10 mg/kg secukinumab (sc) once a week; mice of group 4 were administered 50 mg/kg metformin (oral) daily for 28 days. At the end of the study, all mice were sacrificed and serum and tissue samples were taken. In addition to histopathological analysis, serum and tissue CXCL4 and kimerin levels were evaluated by ELISA method.

Repeated BLM injections had induced dermal fibrosis. In addition, serum and tissue CXCL4 and kimerin levels were increased in the BLM group. With

secukinumab and metformin treatment, dermal thickness, tissue CXCL4 and kimerin levels were significantly decreased.

In conclusion, CXCL4 and kimerin SSk may be target biomarkers in the evaluation of fibrotic process and anti-fibrotic therapy efficacy.

Keywords: Experimental scleroderma, CXCL4, kimerin, secukinumab, metformin.



3. GİRİŞ

Sistemik skleroz (SSk) (skleroderma) sistemik tutulumla karakterize otoimmün bir bağ dokusu hastalığı olup özellikle deri ve akciğer sistemlerini etkilemektedir. En sık görüldüğü yaş aralığı 30-50'dir (1,2). SSk patogenezi net olarak bilinmemekte olup patogeneizde T ve B hücreleri, monosit/makrofaj ile fibroblastlar arasında olan kompleks ilişki üzerinde durulmaktadır. SSk dokularda mikrovasküler hasar ve inflamasyonla başlayıp progresif bir seyirle fibroza kadar ilerlemektedir. (3-5).

Kemokin C-X-C motif ligand 4 (CXCL4) (platelet faktör-4 olarak da bilinir) megakaryosit ve plazmositoid dendritik hücreler (pDH) tarafından salgılanan güçlü antianjiyogenik özelliklere sahip bir kemokindir (6,7). CXCL4 T helper (Th) hücrelerinin farklılaşmasında, çoğalmasında önemli bir düzenleyici rol oynamaktadır. CXCL4'ün Th17 yolağını uyardığı ve IL-17 düzeyleri ile pozitif korele olduğu saptanmıştır (8,9).

Kimerin adipoz dokudan salgılanan, parakrin ve otokrin etkileri olan bir kemotaktik proteindir. pDH ve makrofajlarda eksprese edilir, makrofaj ve monositler için kemoatraktan olarak etkisini göstermektedir (10-12). Kimerin makrofaj ve inflamatuvar sitokinler üzerinden inflamasyon sürecine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca kimerinin fibroblastların adiposit hücrelerine farklılaşması ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (13, 14).

Sekukinumab IL-17A'yı hedef alıp birçok hücre tipinde bulunan IL-17 reseptörü ile etkileşimini inhibe ederek etki gösterir. Sekukinumab sonuç olarak pro-inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salımını inhibe eder (15, 16).

Metformin diyabet tedavisinde kullanılan bir tedavi ajanıdır. Etkilerini adenosin mono fosfat protein kinaz (AMPK) enziminin aktivasyonu ile gösterir. Metformin ayrıca mammalian target of rapamycin (mTOR)'u inhibe etmektedir (17). mTOR ise Th17/Treg hücrelerinin balansını Th17 yolağına doğru değiştirerek inflamasyonun başlatılmasında rol oynar (18, 19).

Skleroderma hayvan modelleri, patojenik mekanizmaların ve tedavi seçeneklerinin araştırılmasında önemli araçlardır. Deneysel skleroderma modelleri Tablo 1'de gösterilmiştir (20). Bunlar içerisinde Bleomisin (BLM) ile oluşturan deneysel skleroderma modeli sıklıkla kullanılmaktadır. Kemoterapötik bir ajan olan BLM, tümör hücrelerinde tek ve çift sarmallı deoksiribonükleik asit (DNA) kırıklarına neden olarak hücre siklusunu bloke etmektedir. Bu etkisini, hidroksil ve süperoksit radikallerinin üretimine yol açarak göstermektedir. Serbest radikallerin normalden fazla üretimi ve immün sistem ile ilişkili olarak fibroblastların aktivasyonu ve fibroza yol açan inflamatuvar bir süreç başlamaktadır (21).

Tablo 1. Deneysel skleroderma modelleri

Bleomisin ile indüklenmiş fibroz
Hipokloröz asit ile indüklenmiş fibroz
Topoizomeras-I ve komplet Freund's adjuvan ile indüklenmiş fibroz
Sklerodermatöz Graft-versus-Host Hastalığı
Genetik modeller

Bu çalışmada BLM ile oluşturulan deneysel skleroderma modelinde serum ve deri dokusundaki CXCL4 ve kimerin moleküllerinin değişimi ile sekukinumab ve metformin tedavilerinin bu moleküller üzerinde olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.1. Genel Bilgiler

3.1.1. Sistemik Skleroz

Başlıca deri ve akciğer olmak üzere tüm sistemleri etkileyebilen SSk vaskülopati, ekstraselüler matriks birikimi, fibroz ile karakterize, kronik ve otoimmün inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın en önemli bulgusu erken dönemlerde görülen Raynaud fenomeni (RF) ile birlikte ilerleyen dönemlerde görülen deride kalınlaşma ve sertleşme ile karakterize deri fibrozudur (1, 2).

3.1.1.1. Tanı ve Sınıflama

Sistemik sklerozun erken tanınması ve erken tedavi edilebilmesi amacıyla çeşitli sınıflandırma kriterleri oluşturulmuştur. İlk olarak 1980 yılında American College of Rheumatology tarafından sınıflandırma kriterleri oluşturulmuştur. Ancak erken dönem SSk'lı hastalar için tanı koymadaki sensitivitesi düşük olması nedeniyle, American College of Rheumatology /European League Against Rheumatism 2013 yılında yeni sınıflandırma kriterleri yayınlamıştır (22, 23).

3.1.1.2. Epidemiyoloji

Nadir olması nedeniyle, SSk için epidemiyolojik veriler azdır ve çeşitli çalışmalarda bildirilen insidans ve prevalans yapılan tanımlamaya ve coğrafik özelliklere göre değişkenlik göstermektedir. Prevalansı yaklaşık milyonda 250-600 arasında iken, insidansı milyonda 11-21'dir. Kadınlarda 3-5 kat daha sık görülmektedir (1, 24, 25).

3.1.1.3. Etiyoloji

Sistemik sklerozun etiyolojisine yönelik araştırmalar devam etmekle birlikte halen tam olarak anlaşılamamıştır. Genetik faktörler altında çeşitli çevresel faktörlerin SSk gelişimine katkıda bulunduğu düşünölmektedir.

Sistemik sklerozda ailesel kümelenme ve SSk'li hastaların aile üyelerinde başka otoimmün hastalıkların görölmesi etiyolojide genetik faktörlerin rol aldığını düşöndürmektedir. Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları, majör doku uygunluk kompleksi molekülleri genetik bölgesinin SSk ile ilişkisini doğrulamıştır. İnsan lökosit antijeni (HLA) DR beta (DRB)1*1602, DRB1*1104, DQ alfa (DQA)1*0501 ve DQB1*0301 gibi spesifik bazı HLA lokuslarının SSk ile ilişkisi bilinmektedir. Ayrıca, signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) protein, tyrosine phosphatase non-receptor type 22 ve interferon regulatory factor 5 gibi HLA dışı lokuslar da SSk etiyolojisinde suçlanmıştır (26-28).

Genetik faktörler dışında enfeksiyöz ajanlar (Sitomegalovirüs, Epstein Bar virus ve Parvovirus B19) ve kimyasal maddeler (Bleomisin, Benzen, Toluen, Silikon, Silikoz, L-Triptofan, Trikloroetilen, Polivinil Klorür) gibi çevresel faktörler SSk etiyolojisinden sorumlu tutulmaktadır. Sigara içmek etiyolojide suçlansa da risk faktörü olduğu yönünde veriler yetersizdir (29, 30).

Fetal hücreler plasentayı geçerek annenin kan ya da dokularında saptanabilir bu durum mikrokimerizm olarak tanımlanmıştır. SSk etiyolojisinde suçlanan hipotezlerden biride mikrokimerizm etkisiyle, annede oluşan graft-versus-host reaksiyonu sonucu skleroderma klinik özelliklerin ortaya çıkmasıdır (31).

3.1.1.4. Patogenez

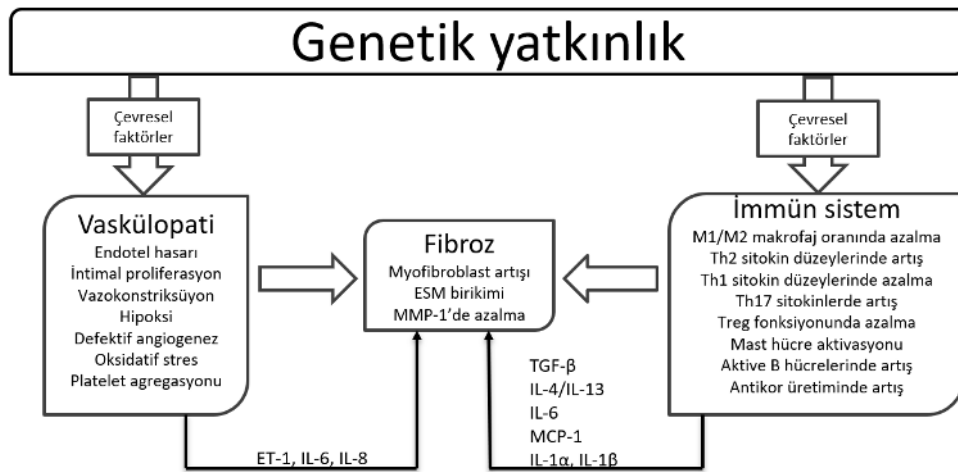
Sistemik skleroz patogenezi oldukça kompleks olmakla birlikte genetik zemini yatkın olan bireylerde vaskülopati, immün aktivasyon ve doku fibrozu gelişmesi hastalığın en belirgin özelliğidir (Şekil 1). Preklinik dönemde görülebilen RF vaskülopatinin habercisidir. Bununla birlikte telenjektazi, dijital ülser, renal kriz ve pulmoner hipertansiyon SSk'de vaskülopati varlığının klinik kanıtlarıdır. Vaskülopati virüsler, çevresel faktörler, otoantikörler, proteolitik enzimler ve sitokinler dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilir. Vasküler hasar sonrası endotel hücre aktivasyonu ve takiben sitokinler ve adezyon molekülleri aracılığı ile inflamatuvar hücrelerin adezyonu ve migrasyonu gerçekleşir. Ayrıca aktif endotel hücrelerinden salgılanan endotelin-1 etkisi ile vazokonstriksiyon, lökositlerin adezyonu ve vasküler düz kas hücrelerin proliferasyonu tetiklenir. Bununla birlikte endotel hücreleri mezenkimal hücrelere dönüşür ve böylece vazodilatasyon mekanizmaları bozulur. Diğer taraftan aktive trombositler tarafından tromboksan-A₂, platelet kaynaklı büyüme faktörü ve TGF-beta(β) salgılanır ve böylece pıhtılaşma, tromboz, vazokonstriksiyon ve fibroblast aktivasyonu gerçekleşir. Sonuçta, vasküler hasar sonunda kronik doku hipoksisi, artmış oksidatif stres, azalmış anjiyogenez ve yaygın mikroanjiyopati ile birlikte kompensatuvar vasküler onarım mekanizması bozulmaktadır (1, 30, 32).

Doğal ve kazanılmış immün sistem düzensizliği ile oluşan immün aktivasyon ve inflamasyon SSk'nin patogenezinde merkezi bir rol oynamaktadır. Özellikle T hücrelerinin SSk patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Th1/Th2 dengesinde Th2 lehine bozulma sonucu TGF- β , IL-4, IL-5, IL-13 gibi pro-fibrotik sitokinler artar ve interferon- γ gibi anti-fibrotik sitokinler azalır sonuçta

artan kollajen sentezi ve miyofibroblast farklılaşması ile daha fazla fibroz oluşur (4, 5, 32). Diğer taraftan T ve B lenfositler arasındaki kompleks ilişki sonrası fibrojenik fibroblast hücreler oluşur (98).

Vaskülopati ve otoimmüniteye bağlı inflamasyon sonucu, mezenkimal hücre farklılaşması ve aktivasyonu, hücre dışı matriks birikimi, kontrolsüz fibroblast aktivasyonu ile doku fibrozu oluşmaktadır (30, 32).

Sonuçta, SSk patogenezinde T ve B hücreleri, monosit/makrofaj ile fibroblastlar arasında olan kompleks bir ilişki üzerinde durulmaktadır. Bu hücreler normalde denge içerisinde çalışmaktadır. Hastalığın tipine ve evresine göre bu denge SSk'de bozulmaktadır. Patogenezin bu kompleks yapısı immün cevabın dinamik olmasından kaynaklanmaktadır. Endotelial hücre aktivasyonu ve proliferasyonu, fibroblastik hücreye dönüşümü, neovaskülarizasyon ve ekstraselüler matriks üretimindeki artışın patojenik sürece katkı yaptığı düşünülmektedir (33).



Şekil 1. Sistemik skleroz patogenezinde sorumlu tutulan mekanizmalar

3.1.1.5. Klinik Bulgular

Raynaud fenomeni

Raynaud fenomeni çoğu zaman SSk'nin ilk klinik bulgusudur. Soğuk ve stres gibi bazı kolaylaştırıcı faktörlerle vazospazm gerçekleşir sonuçta trifazik renk değişikliği oluşur. Bu tablo daha yaygın olarak üst ekstremitelerde olmak üzere parmaklarda görülmektedir. Bu değişiklikler dilde, burunda ve kulakta görülebilir. Bununla birlikte soğukla ortaya çıkan RF nadiren koroner, pulmoner ve renal damarlarda görülebilir. Vazospazma bağlı gelişen iskemik değişiklikler başlangıçta iyi sınırlı beyaz renk değişikliği ile solukluk, daha sonra deoksijenizasyona bağlı koyu mavimsi renk değişikliği, daha sonra reaktif hiperemi ile birlikte kırmızı renk değişikliğine yol açar. Tüm hastalarda bu üç faz görülmeyebilir. RF sınırlı kutanöz SSk'de viseral tutulumdan birkaç yıl önce görülebilir, ancak diffüz kutanöz SSk'de aynı anda veya cilt değişikliklerinden kısa bir zaman sonra ortaya çıkabilir. RF progresif seyrederek dijital pitting, dijital ülser ve doku kayıplarına neden olabilir (34, 35).

Deri bulguları

Sistemik sklerozun en sık saptanan klinik bulgularından biri deri tutulumudur. Dirsek ve diz distalindeki deri tutulumu lokalize kutanöz SSk olarak sınıflandırılırken, dirsek veya diz proksimalindeki deri tutulumu ve/veya gövde tutulumu diffüz kutanöz SSk (DkSSk) olarak sınıflandırılır. Deri tutulumu inflamasyon (ödematöz), fibrotik ve atrofik evrelerden oluşmaktadır. İnflamasyon evresi ellerde çukurlaşmayan ödem ile ilişkilidir ve birkaç ay sürebilir. Ödem sonucu kompresyon nöropatileri gibi bası bulguları görülebilir. Kaşıntı, yanma ağrısı ve eritem yaygındır. Bu başlangıç evresinde progresif bir şekilde cilt

kalınlaşmaya başlar ve takiben fibrotik evre sonucunda fibroz gelişir. Fibrotik süreçte, sklerodaktili olarak tanımlanan metakarpofalangeal ve metatarsofalangeal eklemlerin distalinde derideki kalınlaşma ve sertlik proksimale doğru ilerlemektedir. Yüz tutulumu ağız açıklığında azalmaya neden olabilir. Depigmentasyon alanları nedeniyle deride tipik olarak tuz-biber görünümü saptanabilir. Eklemlerin ekstansör yüzeylerinde travma ile ilişkili alanlarda kalsiyum hidroksiapatit depolanması sonucu subkutan kalsinoz gelişebilir. Kalsinoz, deri ülserleri ve sekonder enfeksiyonlara yol açabilir. Hastalığın ilerleyen yıllarında özellikle üst kollar ve gövde derisi, altta yatan subkutan doku halen fibrotik olmasına rağmen sertleşmede azalma ve klinik olarak normal cilde dönmeye başlayabilir.

Yüzde, mukozal yüzeylerde, ellerde ve bazen de gövdede kılcıl damarların genişlemesine bağlı olarak telenjiektaziler görülebilir. Telenjiektaziler hastalık ilerledikçe artabilirler ve bu hastalarda pulmoner arteriyel hipertansiyon gelişme ihtimalinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir (1, 36-38).

Eklemler bulguları

Artralji ve miyalji sıklıkla bulunur. Romatoid artritte olduğu gibi proksimal interfalangeal, metakarpofalangeal, el ve ayak bileği eklemlerinde sinovit ve inflamatuvar artrit görülebilir. Ancak erozyon nadirdir. Hastalığın geç evrelerinde distal kemik rezorpsiyonu ve osteoliz görülebilir. Eklemler kontraktürleri görülebilir. Tendon kılıfının inflamasyonu ve fibroza bağlı tendon sürtünme sesi, özellikle DkSSk'nin yaklaşık %30'unda görülebilir. Bunlar kötü prognoz ile ilişkilidir (39-41).

Kas bulguları

Sistemik skleroz hastalarının %10'unda polimiyozite benzer bir inflamatuvar miyozit görülebilir. Ayrıca, SSk'li hastalarda, beslenme bozukluğu, eklem tutulumu ve deri fibrozu nedeniyle kas gücünde azalma görülebilir. SSk'de doğrudan kas tutulumu nedeniyle kas fibrozu ve atrofiye yol açan fibrozan miyopati de görülebilir (41, 42).

Gastrointestinal bulgular

Sistemik sklerozda gastrointestinal sistem tutulumu sıklıkla görülmektedir. Ağız boşluğundan anüse kadar her yer tutulabilir. Düz kas fibrozu gastrointestinal sistem tutulumunun önemli bir özelliğidir. Azalmış ağız açıklığı, ksrostomi ve diş eti iltihabı gibi orofaringeal tutulum bulguları görülebilir. Gastroözefageal reflü hastalığı, özofagusta dismotilite, azalmış alt özofagus sfinkter basıncı ve gastrik boşalmada gecikme olması nedeniyle SSk hastalarında görülen ciddi bir sorundur. Dispepsi, erken doyma, bulantı, kusma ve anoreksiye yol açabilen gastroparezi gibi mide bulguları görülebilir. Gastrik telenjektazilerin bir sonucu olarak görülen gastrik antral vasküler ektazi gastrointestinal kanamaya yol açabilir. Hastalığın ince barsak motilite bozukluğu aşırı bakteri çoğalmasına neden olur bu durum sonucunda diyare, malabsorbsiyon veya psödoobstrüksiyon oluşabilir. SSk hastalarında şiddetli kabızlık özellikle kolon ve anal tutuluma bağlı olarak gözlenir. Kolonik tutulumda, mukozal müsküler atrofisine bağlı geniş ağızlı divertikül ve megakolon görülebilir. Anorektal kapasite, azalmış motilite, kompliyans ve sfinkter basıncı sonucunda rektal prolapsus ve fekal inkontinans SSk hastalarında görülen önemli gastrointestinal sistem sorunlarıdır (1, 43-45).

Akciğer bulguları

Pulmoner tutulum SSk'de mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. En sık görülen akciğer bulguları interstisyel akciğer hastalığı (İAH) ve pulmoner arteriyel hipertansiyondur. Daha az görülen pulmoner belirtiler olarak obstrüktif hava yolu hastalığı, plörit, aspirasyon pnömonisi ve pulmoner hemoraji sayılabilir. SSk ilişkili İAH alveolar inflamasyon, epitel hasarı ve fibroblast aktivasyonu sonucu pulmoner interstisyumda kalınlaşma olarak tanımlanmıştır. İAH hastaların % 80'inde görülmektedir. SSk hastalarında İAH gelişimi açısından risk faktörleri arasında anti-topoizomera I varlığı, erkek cinsiyet, Afro-Amerikan ırkı ve yaygın cilt tutulumu yer alır. SSk'de İAH respiratuar volümde ve difüzyon kapasitesinde azalma sonucunda akciğer fonksiyonlarında bozulmaya neden olmaktadır (46-48). Pulmoner arteriyel hipertansiyon diğer yaygın pulmoner bulgudur. Pulmoner arteriyel hipertansiyon genellikle hastalığın geç döneminde, ortalama 10 yıl sonra ortaya çıkar. SSk hastalarında %30 - %50 sıklıkta pulmoner arteriyel hipertansiyon görülebilmektedir. Efor dispnesi, göğüs ağrısı ve alt ekstremitelerde ödem pulmoner arteriyel hipertansiyon açısından klinik ipuçlarıdır. Bu tür hastalara ekokardiyografik değerlendirme ve gerekirse sağ kalp kateterizasyon yapılması önerilmektedir (1, 49).

Kardiyak bulgular

Perikardit, perikardiyal efüzyon, dilate kardiyomiyopati ve aritmiler SSk hastalarında görülen kardiyak bulgulardır. Otopsi serilerinde hastaların çoğunda yamalı miyokardial fibroz saptanmıştır. Kardiyak bulgular kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Perikardiyal efüzyon DkSSk'de daha sıktır ve skleroderma renal krizi (SRK) için öngörücüdür (1, 50, 51).

Böbrek bulguları

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerinin keşfinden önce SRK, SSk'de önde gelen ölüm nedeniydi. Hastaların yaklaşık %10'unda görülmektedir. Genellikle hastalığın ilk 3 yılında görülür. SRK gelişiminde Afro-Amerikan ırkı, perikardiyal efüzyon, tendon sürtünme sesi, yeni başlangıçlı anemi, DkSSk, anti-RNA polimeraz III antikoru ve yüksek doz kortikosteroid kullanımı gibi birçok risk faktörü belirlenmiştir. Akut SRK gelişen hastalarda hızlı bir şekilde ortaya çıkan hipertansiyon ile birlikte akut böbrek yetmezliği görülmektedir. Mikroanjiyopati nedeniyle hemolitik anemi ve trombositopeni sıklıkla görülür. Ancak, kronik SRK'de renal fonksiyonlarda ılımlı azalma dışında klinik bulgu saptanmayabilir ve bu tablo yıllar sonra ortaya çıkabilir. Erkek cinsiyet, ileri yaşta başlangıç ve 3 mg/dL'den fazla serum kreatinin olması SRK için kötü prognoz göstergeleridir (1, 52-55).

3.1.1.6. Tedavi

Güncel olarak SSk tedavisinde henüz hastalığın doğal seyrini değiştirebilecek evrensel olarak kabul edilmiş tedavi edici bir ajan yoktur. Erken hastalık döneminde asemptomatik süreç, kompleks patogeneze ve heterojenite tedavi başarısını etkileyen önemli sorunlardır (56). Tedavi etkilenen organın ve klinik bulguların varlığına göre yönetilmelidir. Ayrıca sağlıklı beslenme, düzenli egzersiz ve psikolojik destek gibi konularla ilgili hasta eğitimi yapılmalıdır (57). Bu ajanlardan herhangi birinin etkinliğini doğrulayan büyük randomize kontrollü çalışmaların genel bir eksikliği olmasına rağmen, çeşitli ajanlar SSk'nin çeşitli belirtileri için incelenmiştir.

Vaskülopati tedavisinde hastaların soğuk, stres, sigara ve vazokonstriktör madde gibi tetikleyici faktörlerden kaçınmaları önemli basamaktır. RF tedavisinde vazodilatasyon yapan ilaçlar tercih edilmektedir. Bu amaçla topikal nitrogliserin, intravenöz (iv) prostaglandin analogları, kalsiyum kanal blokerleri, fosfodiesteraz tip 5 (PDE-5) inhibitörleri, ACE inhibitörleri ve anjiotensin reseptör blokerleri kullanılabilmektedir. Sempatektomiden çok ciddi vakalarda yararlanılabilir. Ayrıca yeni oluşan dijital ülserlerin sayısını azaltmak amacıyla endotelin reseptör antagonisti olan bosentan kullanılabilir (58-60). RF sıklığını azaltmak, iskemiye azaltmak ve ülser oluşumunu önlemek bu süreçte en önemli tedavi hedeflerimizdir.

Deri tutulumunda siklofosamid, mikofenolat mofetil, metotreksat, azatioprin ve hidrosiklorokin gibi immünsupresif tedavi ajanları kullanılmaktadır. Hastalığın inflamatuvar yükü ve progresyonuna göre karar verilmektedir. Ancak bu ilaçların deri fibrozundaki etkinliğine yönelik net bir veri yoktur. Kalsinoz tedavisinde warfarin, bifosfanat gibi çeşitli tedavi ajanları kullanılmış ancak etkin bir tedavi ajanı bulunmamaktadır (61).

İnflamatuvar artrit varlığında hidrosiklorokin, metotreksat gibi temel etkili antiromatizmal ilaçlarla tedavi edilebilir. Anti-TNF ajanlar, dirençli şiddetli inflamatuvar artritte kullanılabilir. SSk'de inflamatuvar miyozitin tedavisinde metotreksat ve azatioprin gibi immünsupresif ajanlar kullanılabilir (49).

Sistemik skleroz ilişkili İAH tedavisinde siklofosamid, mikofenolat mofetil, tosilizumab, rituksimab, azatioprin gibi immünsupresif tedaviler kullanılmaktadır. Ayrıca immünsupresif tedavilere rağmen ilerleyici olan hastalarda antifibrotik tedavi (nintedanib) kullanılabilir. Ancak bu tedavilerin başlatılması için kesin kriterler oluşturulmamıştır. SSk ilişkili pulmoner arteriyel

hipertansiyon tedavisinde fosfodiesteraz-5 inhibitörleri (Sildenafil, Tadalafil), endotelin reseptör antagonistleri (Ambrisentan, Bosentan, Masitentan) ve/veya prostasiklin analogları (Epoprostenol, Treprostinil, Beraprost, İloprost) gibi vazodilatör tedaviler kullanılmaktadır. Monoterapide düzelme olmayan veya şiddetli pulmoner arteriyel hipertansiyonu olan hastalarda kombinasyon tedavisi düşünülebilir (56, 62, 63).

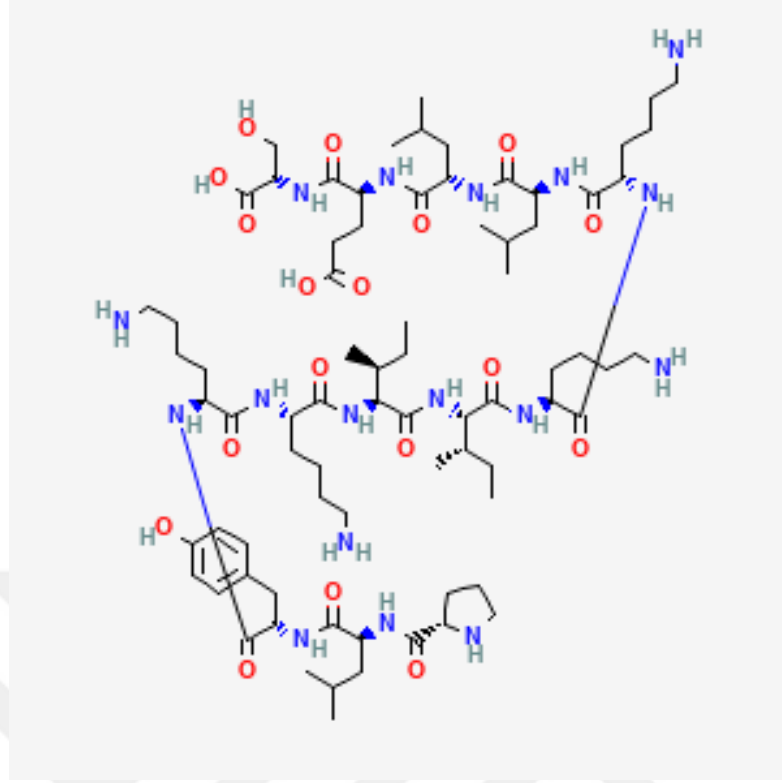
Güncel olarak, SSk ile ilişkili kardiyak tutulumda immünsupresif tedavi ajanlarının veya vazodilatör tedavisinin etkinliğine yönelik yeterli bir kanıt yoktur (64).

Mide yanması ve reflü gibi gastroözofageal yakınmaları olan hastalarda, yatak başının yüksekte tutulması, baharatlı yiyeceklerden kaçınılması, az ve sık beslenme gibi yaşam tarzı ve diyet değişiklikleri önerilir. Şiddetli vakalarda, proton pompa inhibitörleri ile H₂ blokerlerinin kombinasyonu düşünülebilir. Gastroparezisi olan hastalar proton pompa inhibitörlerine ek olarak metoklopramid gibi prokinetik ajanlar kullanılabilir. Özofagus darlıklarında periyodik endoskopik dilatasyonlar yapılabilir. Gastrik antral vasküler ektaziye sekonder kanaması olan hastalarda lazer koagülasyon düşünülmelidir. İnce bağırsakta aşırı bakteriyel çoğalma sendromu olan hastalarda antibiyotik tedavileri kullanılabilir (65, 66).

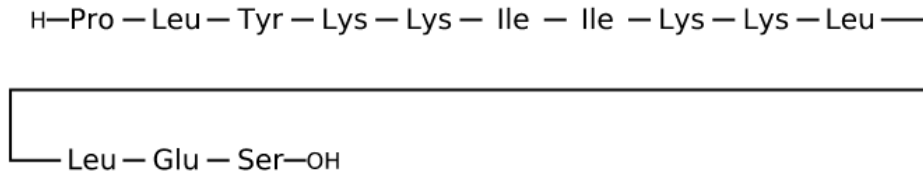
Skleroderma renal kriz tedavisinde ACE inhibitörleri kullanılmaktadır. ACE inhibitörleri tolere edilen maksimum dozda kullanılmalıdır. Böbrek fonksiyonu başlangıçta azalmaya devam edebilir ancak ACE inhibitörüne devam edilmelidir. SRK önlenmesine yönelik profilaktik ACE kullanımı önerilmemektedir. Hastaların bir kısmı diyaliz veya böbrek transplantasyonu gibi istenmeyen durumlar ile sonuçlanabilir (49).

3.1.2. Platelet Faktör-4

Platelet faktör-4, 1955 yılında anti-heparin aktivitesine sahip bir trombosit protein olarak keşfedilmiştir (67). Embriyogenez, ateroskleroz, hematopoez, lökositlerin göçü, anjiyogenez, tümör büyümesi ve yayılması gibi çeşitli biyolojik süreçlerde görev alan, normal ve malign hücreler tarafından eksprese edilen ve salgılanan, 8-14 kDa'lık yaklaşık 50 küçük proteinden oluşan kemokin ailesine sahip bir proteindir. Kemokinler, moleküllerin amino terminal kısmındaki korunmuş sisteinler (C) tarafından tanımlanan moleküler yapıya bağlı olarak iki ana (CXC ve CC) ve iki küçük (C ve CX3C) alt gruba ayrılır. CXC alt grubu, çoğunlukla indüklenebilir ve pro-inflamatuvar sitokinlerden oluşur. Ayrıca, tripeptid "ELF" (glu-leu-arg) motifi ELR-CXC veya non-ELR-CXC kemokinlerin varlığına veya yokluğuna göre sınıflandırılmaktadır (68-70). Platelet faktör 4, non-ELR-CXC bir kemokindir ve güncel olarak kemokin C-X-C motif ligand 4 (CXCL4) olarak isimlendirilmektedir. Platelet faktör-4'ün kimyasal ve biyolojik yapısı şekil 2 ve 3'de gösterilmiştir (71).



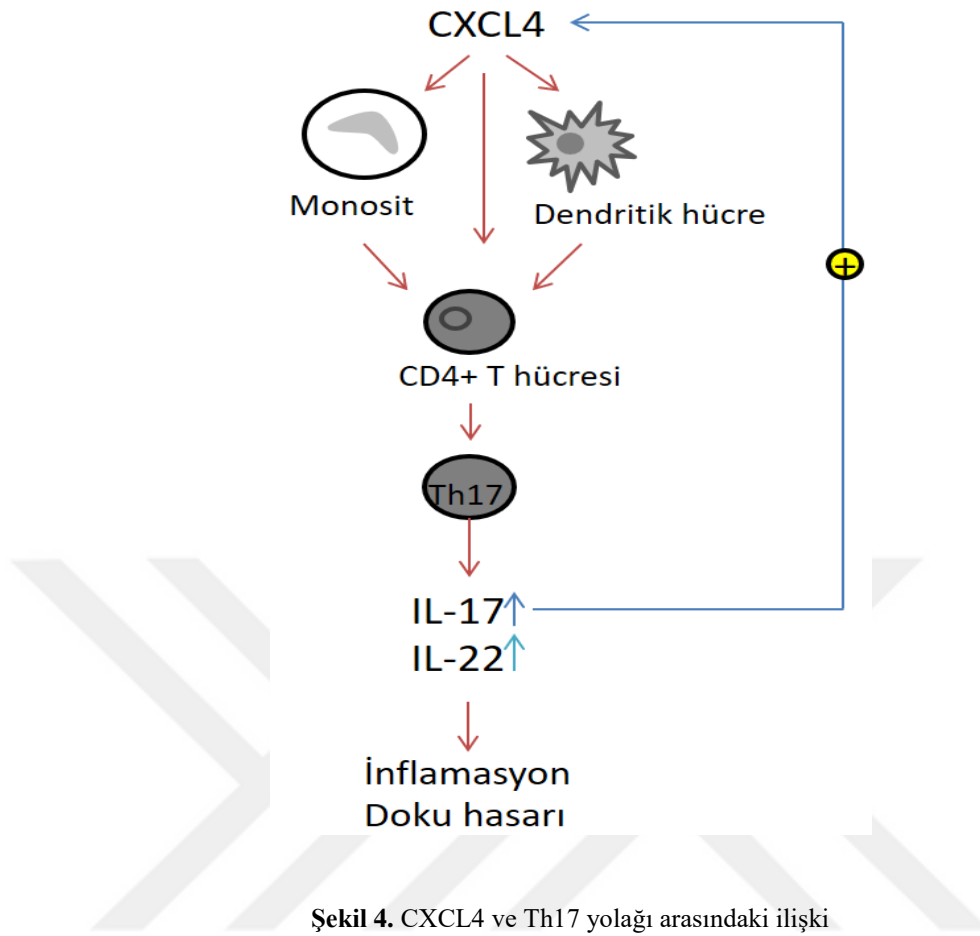
Şekil 2. Platelet faktör 4 (CXCL4)'ün kimyasal yapısı



Şekil 3. Platelet faktör 4 (CXCL4)'ün biyolojik yapısı

CXCL4, megakaryosit ve pDH tarafından salgılanan güçlü antianjiyogenik özelliklere sahip bir kemokindir. CXCL4, endotelial hücrelerde ve aktive olmuş T-lenfositlerde bulunan CXCR3B olarak bilinen CXCR3 G-protein kenetli kemokin reseptörünün bir ek varyantı ile bağlanır. Ayrıca, CXCL4 proteoglikanlar ve negatif yüklü moleküllere direkt olarak bağlanabilir (72, 73). Bununla birlikte SSk'li hastalarda, spesifik immün komplekslerdeki DNA'ya bağlanarak plazmasitoid

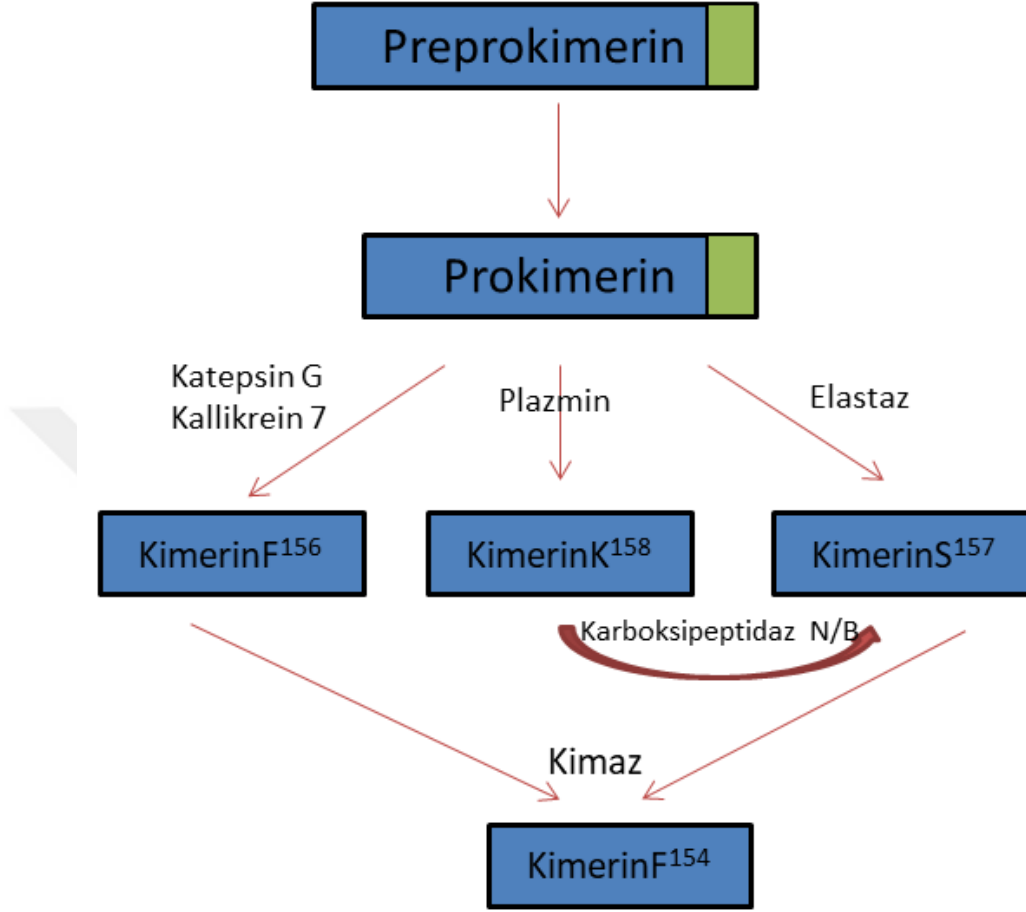
dendritik hücre (pDC) hiperaktivasyonuna ve CXCR3'ten bağımsız olarak inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine neden olduğu gösterilmiştir. CXCL4'ün endotelial hücre migrasyon inhibisyonu, proliferasyon ve anjiyogenezin inhibisyonu, granülosit ve monosit aktivasyonu, naturel killer (NK) hücresi ve T-hücresi aktivasyonu, farklılaşma ve kemotaksis etkiler de dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (74, 75). Ayrıca T hücreleri, monositler, dendritik hücreler gibi immün yollar üzerinde düzenleyici etkiye sahiptir. CXCL4 Th hücrelerinin farklılaşmasında, çoğalmasında düzenleyici rol oynamaktadır. Literatürde çelişkili sonuçlar bulunmakla birlikte CXCL4'ün Th17 yolağını uyardığı ve IL-17 düzeyleri ile pozitif korele olduğu saptanmıştır. IL-17'nin dendritik hücreleri stimüle ettiği gösterilmiştir. Bu uyarı dendritik hücrelerden salınan CXCL4 düzeylerini artırabilir (Şekil 4) (7-9). SSk'li hastalarda CXCL4 düzeylerinin deri fibrozu, akciğer fibrozu ve pulmoner hipertansiyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur (75). SSk tanılı hastalarda CXCL4 düzeylerinin yüksek olduğu saptanmışsa da CXCL4'ün SSk patogenezindeki yeri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu bulgular CXCL4'ün SSk'de vaskülopati ve fibroz ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.



3.1.3. Kimerin

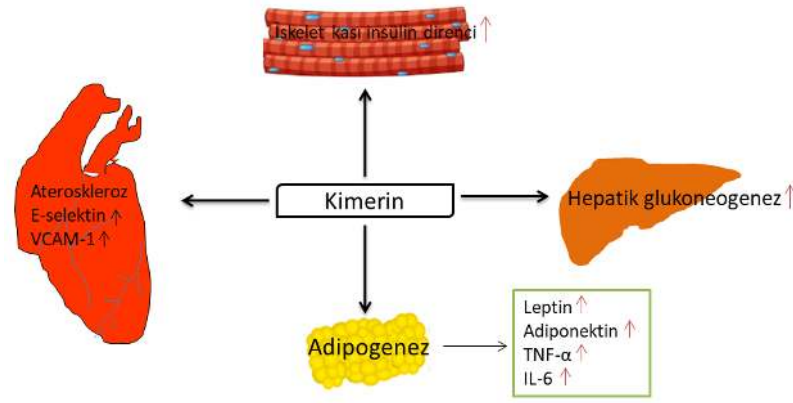
Kimerin adipoz dokudan salgılanan, lipoliz ve glukoz alımı gibi çeşitli otokrin ve obezite ile ilişkili inflamasyon gibi parakrin etkileri olan bir kemotaktik proteindir (76, 77). Glukoz homeostazı, inflamasyon ve birçok fizyolojik süreçle ilişkili olduğu bilinmektedir. pDH ve makrofajlarda eksprese edilir, makrofaj ve monositler için kemoatraktan olarak etkisini göstermektedir. Fare ve insan adipositlerinde yüksek düzeylerde eksprese edilen bir adipokindir. Ayrıca plasenta, karaciğer, akciğer, böbrek, beyaz ve kahverengi yağ dokusu, kas hücresi ve pankreas gibi birçok dokuda eksprese edilmektedir (78, 79). Kimerin, 163 amino asitten oluşan preprokimerin olarak sentezlenmektedir. Daha sonra 140 amino asitten oluşan inaktif form olan prokimerin olarak salgılanır. Katepsin G, elastaz ve

triptaz gibi bazı proteazlar tarafından C-terminalinin bölünmesi yoluyla terminal amino asitten yoksun farklı biyoaktif izoformları oluşmaktadır (Şekil 5) (79).



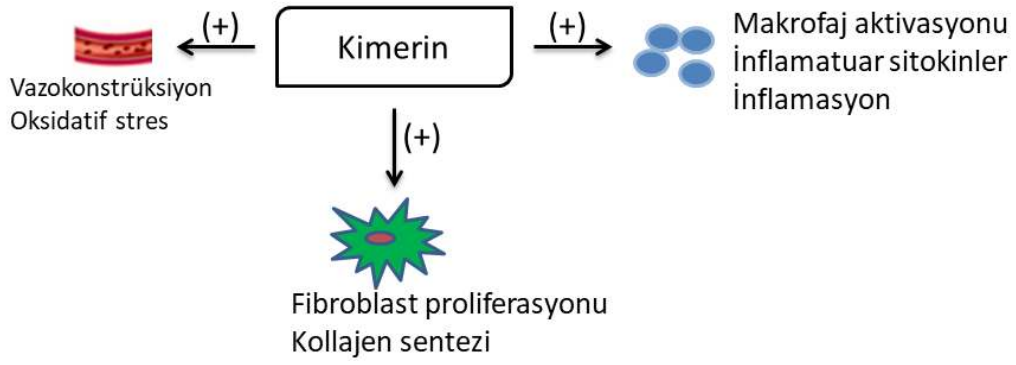
Şekil 5. Kimerin izoformlarının sentezlenmesi

En aktif formu kimerin 21-157 formu olarak bilinmektedir. Kimerin; kimerin benzeri reseptör 1 (CMKLR1 veya ChemR23), G protein-bağlı reseptör 1 (GPR1) ve C-C kemokin reseptörü benzeri 2 (CCRL2) reseptörler aracılığıyla adipogenez, osteoklastogenez, anjiyogenez ve inflamatuvar süreçler gibi çeşitli hücre tipleri üzerinde farklı etkiler göstermektedir (Şekil 6) (79, 80).



Şekil 6. Kimerinin metabolik etkileri

Kimerin CMKLR1 aracılığıyla makrofajları ve inflamatuvar sitokinleri uyarak inflamasyon gelişimine katkıda bulunmaktadır. Kimerinin obezite, sistolik kan basıncı, açlık serum insülini, HOMA-IR ve serum trigliserid düzeyi gibi çeşitli metabolik sendrom bileşenleriyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (81, 82). Ayrıca kimerinin adiposit ve fibroblast hücrelerinin farklılaşmasında rol oynadığı gösterilmiştir (83, 84). Kimerinin SSk patogenezinde rol oynayan inflamasyon, vasküler hasar ve fibrotik süreçlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kimerin vasküler yatakta oksidatif stress ve vazokonstrüksiyon etkiler göstererek vasküler hasara neden olabilmektedir. Ayrıca dendritik hücre, makrofaj ve inflamatuvar sitokinleri aktive ederek inflamasyonu tetiklemektedir. Diğer taraftan fibroblast aktivasyonu ile kollajen üretimini uyatabilmektedir (Şekil 7) (84). Yapılan kohort çalışmasında SSk’de hastalık süresi ile kimerin düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. SSk’de dermal fibroblastlarda düzeyi azalmışken damar duvarında artmış olarak bulunmuştur. Bu açıdan SSk’de vaskülopati ile ilişkili olabileceği üzerinde durulmaktadır (84, 85). Diğer taraftan bazı çalışmalarda kimerinin anti-inflamatuvar etkiler gösterdiği belirtilmiştir (14, 86).

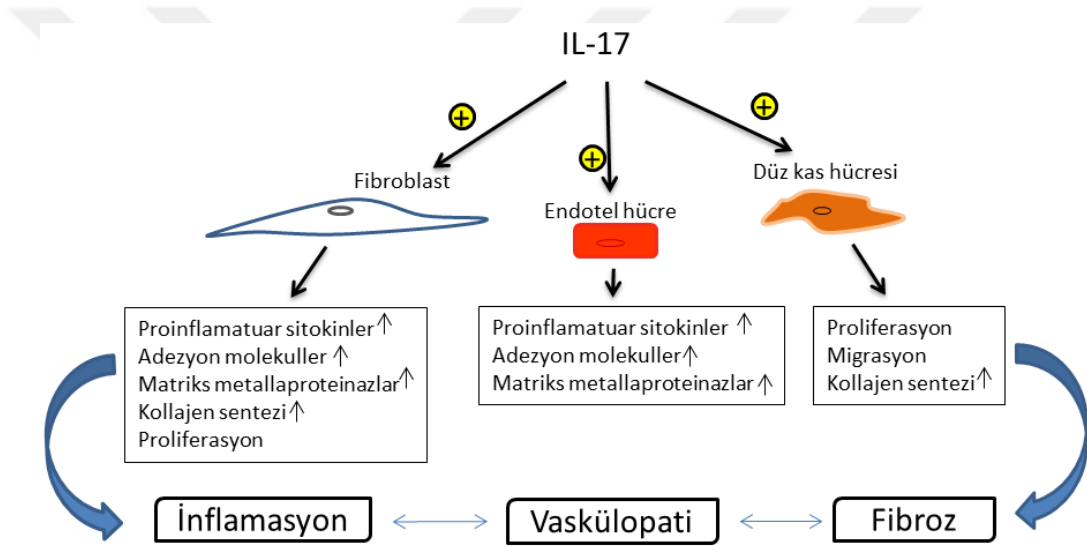


Şekil 7. Kimerin ve sistemik skleroz patogenezi arasında olası ilişki

3.1.4. Sekukinumab

Sekukinumab psöriyazis, psoriatik artrit (PsA) ve ankilozan spondilit (AS) tedavisinde kullanılan, seçici olarak IL-17A'yı hedefleyen ve IL-17 reseptör etkileşimini inhibe eden yüksek afiniteli, rekombinant tam insan monoklonal immünoglobulin G1/kappa antikorudur. (87, 88). Sekukinumab gibi terapötik proteinler, tipik olarak metabolizmaya uğramazlar. Sekukinumab yavaş sc absorpsiyonu, düşük klirens ve uzun yarı ömür gibi farmokokinetik özellikler sergilemektedir. Klerenste zamana bağlı bir değişiklik olduğuna yönelik yeterli bir kanıt yoktur. Sekukinumabın yavaş sc Emilimi göz önüne alındığında, çeşitli klinik çalışmalarda tek bir sc 150 veya 300 mg doz alan plak psoriazis hastalarında dozdan 5 ila 6 gün sonra doruk konsantrasyonlara ulaşılmıştır. sc uygulamasıyla ortalama biyoyararlanımın %73 olduğu saptanmıştır. Sekukinumab insan IL-17A'sına bağlanır ve bu sitokinin biyoaktivitesini nötralize eder. IL-17A, çeşitli otoimmün ve inflamatuvar süreçler için çok önemli olan Th17 hücrelerinin temel sitokinidir. IL-17A ayrıca bellek efektör CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerince de üretilmektedir. IL-17A, sedef hastalığı, AS ve PsA gibi otoimmün hastalıklarda başlıca pro-inflamatuvar sitokinlerden biri olarak kabul edilmektedir. Nötralizasyonu,

inflamasyon ve doku yıkımı gibi immün aracılı hastalığın altta yatan yapısal özelliklerini tedavi edebilir. IL-17A fibroblast ve endotel hücrelerini uyararak pro-inflamatuar sitokinler, adezyon molekülleri ve matriks metalloproteinazların salınımını artırmaktadır. Ayrıca IL17A düz kas hücrelerini proliferere ederek kollajen sentezinin artmasına neden olmaktadır (Şekil 8) (89). Sonuçta IL-17'nin SSk'deki inflamasyon, vaskülopati ve fibroz ile ilişkili önemli bir yolak olduğu göz önüne alındığında IL-17'yi hedef alan tedaviler ile anti-inflamatuar ve anti-fibrotik etkinlik sağlanabilir.



Şekil 8. IL-17'nin inflamasyon, vaskülopati ve fibroz üzerine olan etkileri

3.1.5. Metformin

1950'lerden beri diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan metformin, tip 2 diyabet tedavisinde günümüzde en sık kullanılan birinci basamak tedavi ajanıdır. Monoterapi şeklinde veya insülin veya diğer glukoz düşürücü tedavilerle kombinasyon halinde sık reçete edilen bir tedavi ajanıdır. Metformin, Fransız leylağı olarak da bilinen *Galega officinalis*'ten elde edilen bir biguaniddir. Metforminin farklı mekanizmalar üzerinden etki gösterdiği belirtilmektedir. Son

zamanlarda, özellikle anti-proliferatif, imm nmod le edici ve anti-fibrotik aktivite gibi yeni pleiotropik özellikleri ortaya konulmuştur (17, 90).

Mitokondriyal solunum zinciri kompleks 1'i inhibe edici etkisi metforminin glukoz düşürücü etkisinin en çok çalışılan ve yaygın olarak kabul edilen etki mekanizmasıdır. Ayrıca metforminin çeşitli mekanizmalar yoluyla hepatik glukoneogenezi transkripsiyonel olarak düzenlediği  ne sürülmüştür. İlk olarak, metforminin siklik adenosin mono fosfat (cAMP) birikimini azaltarak hepatik glukagon sinyalini antagonize ettiği ve böylece glukoneogenik genlerin cAMP regülatuar eleman bağlayıcı protein (CREB) aracılı transkripsiyonunu önlediği  ne sürülmüştür (91 , 92). Bu mekanizmanın klinik önemi, metforminin glukagon ile uyarılan hepatik glukoz üretimini azaltmadığını gösteren prediyabetik bireyler üzerinde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (93). Ek olarak, metforminin glukoneogenik gen ekspresyonunun down regülasyonuna neden olan AMPK'yi aktive ettiği d ş n lmektedir. Bununla birlikte, AMPK aktivasyonunun, CREB transkripsiyonel kompleksinin çözülmesine aracılık ettiği ve bunun da azalmış glukoz-6-fosfataz ve fosfoenolpiruvat karboksikinaz 1 ekspresyonuna yol açtığı ileri sürülmektedir. Ayrıca transkripsiyon dışında allosterik, substrat ve redoks gibi farklı etki mekanizmalarına sahiptir (94).

Metformin, aktive olan AMPK'nin aracılık ettiği yol ile anti-inflamatuar etkiler gösterebilmektedir. AMPK'nin tedavi edici potansiyelini düşündüren bulgu ise, mTOR'u inhibe ederek Th17 hücre sayısını baskılaması ve STAT3'  inhibe etmesi olarak belirlenmiştir (95). AMPK, enerji metabolizmasının çok önemli bir düzenleyicisidir, bununla birlikte anti-inflamatuar etkileri çeşitli insan hücre tiplerinde ve çoklu hayvan hastalık modellerinde bildirilmiştir. AMPK'nin nükleer

faktör kappa B sinyali, çoklu mitojenle aktive olan protein kinaz yolları, reaktif oksijen türlerinin üretiminin azaltılması ve JAK-STAT yolağının inhibisyonu gibi çoklu sinyal yollarını inhibe ettiği öne sürülmektedir. Örneğin, AMPK α_2 knockout farelerde, STAT1'e bağlı inflamatuvar yanıtta artış olduğu gösterilmiştir. AMPK'nin farmakolojik veya genetik aktivasyonu ile AMPK'nin vasküler inflamasyona karşı potansiyel olarak koruyucu olduğu gösterilmiştir (96-100).

IL-6 yanıtının AMPK aracılı baskılanması için potansiyel mekanizmalardan biri orphan nükleer reseptör küçük heterodimer partner (SHP)'in uyarılmasıdır. Primer sıçan hepatositlerinin uzun süreli metformin tedavisi ile çekirdekte STAT3 ile birlikte lokalize olan SHP'nin AMPK'ye bağlı biriktiği böylece DNA bağlanmasının azaldığı ve pro-inflamatuvar genlerin ekspresyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, HepG2 insan hepatom hücrelerinde, kronik aminoimidazole-4-carboxamide riboside aracılı AMPK aktivasyonunun, JAK1/JAK2 tirozin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu baskılayarak IL-6 sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir (101, 102).

Kang ve ark. (103) yaptıkları bir çalışmada metforminin AMPK'yi aktifleştirerek mTOR-STAT3 yolunu inhibe ettiğini ve böylece Th17 hücrelerinin popülasyonunda azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Myofibroblastların infiltrasyonunu aktive eden TGF- β , deri fibrozunda önemli rol oynamaktadır (104). Yapılan çalışmalar TGF- β 'nın uyardığı derideki fibrozu oral metforminin inhibe ettiğini göstermiştir (105, 106). Ayrıca, oral metforminin myofibroblast farklılaşmasını da etkilediği gösterilmiştir (107).

Sekukinumab ve metformin tedavileri CXCL4 ve kimerin gibi kemokin ve adipositokinlerin düzeylerini etkileyerek anti-inflamatuvar ve anti-fibrotik özellikler

gösterebilir. Bu çalışmada BLM ile oluşturulan deneysel skleroderma modelinde serum ve deri dokusundaki CXCL4 ve kimerin moleküllerinin değişimi ile sekukinumab ve metformin tedavilerinin bu moleküller üzerinde olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 09.04.2020 tarih ve 389184 sayılı etik onayı alınarak çalışmaya başlandı. Çalışma planı daha önce yapılan çalışmadan elde edilen serum ve dokular kullanılarak oluşturuldu.

4.1. Deney Hayvanları

Çalışmada ortalama 6 hafta yaşında ve 20-25 gram ağırlıklarında, 40 adet Balb/c dişi fareler kullanıldı. Çalışma için bu hayvanlardan alınan serum ve deri dokuları kullanıldı. 12 saat güneş ışığı alacak şekilde dizayn edilen özel odada, özel olarak hazırlanmış kafeslerde barındırılan farelerin beslenmesinde Elazığ Yem Fabrikası'ndan temin edilen standart fare yemi kullanıldı. Farelerin su ihtiyacı için kafeslere uçlarda damlalık mekanizması bulunan özel şişeler yerleştirdi. Deneysel uygulamalar için tüm farelerin sırt bölgesi tıraş edildi.

4.2. Çalışma Grupları

40 adet balb/c cinsi dişi fareler grup 1 (kontrol grubu), grup 2 (sham grubu), grup 3 (sekukinumab grubu) ve grup 4 (metformin grubu) olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

4.3. Deneysel Uygulamalar

100 µl FTS kontrol grubundaki farelere, 100 µg BLM (100 µl FTS içerisinde) diğer gruptaki farelere her gün, sc olarak 4 hafta süre ile uygulandı. Ek olarak, haftada bir 10 mg/kg dozunda sekukinumab sc olarak grup 3'teki farelere, günlük 50 mg/kg dozunda metformin (oral) grup 4'teki farelere 28 gün boyunca uygulandı.

4.4. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

4. haftanın sonunda, intraperitoneal olarak uygulanan ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) ile yapılan anestezi ile tüm fareler dekapite edilerek çalışmada kullanılan kan ve doku örnekleri elde edildi. Farelerden kan örnekleri ve histopatolojik analizler için sırt derileri alındı. Alınan kan örneklerinin 10 dakika boyunca 3000 rpm’de santrifüj edilmesi ile elde edilen serumlar ve alınan sırt derileri çalışılacağı güne kadar -80C’de saklandı.

4.5. Biyokimyasal Analizler

4.5.1. Doku Homojenizasyonunun Hazırlanması

Deri dokuları -80 °C’den alınarak kan ve artıkların temizlenmesi amacıyla üç kez fosfat tamponu ile yıkanarak kurutuldu. Doku örnekleri 100 mg olarak tartıldı ve homojenizasyon amacı ile ependorf tüplerin içerisine konuldu. Daha sonra 0.5 mm çaplı zirkonyum oksit boncuk her bir ependorf tüpün içerisine yerleştirildi. 1 ml olacak şekilde fosfat tamponu örneklerin tümüne eklendi. Ependorf tüpler ağızları kapatılarak homojenizatörün (Bullet Blender) içerisine yerleştirilip 5 dakika süresince homojenize edildi. Oluşan süpernatant tabaka tekrar ependorf tüplere alındı ve 10 dakika 4000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen üstteki süpernatant alındı ve enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) çalışmalarında kullanıldı.

4.5.2. CXCL4 Düzeyinin Belirlenmesi

Örneklerin (süpernatantlar ve serum) CXCL4 düzeylerinin belirlenmesinde Sunred Biological Technology Co. Ltd. (Shanghai, CHINA) firması tarafından üretilen mouse PF-4 ELISA kiti kullanıldı. Üretici firmanın kataloğunda (Katalog

No: 201-02-0687) belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olacak şekilde ELISA yöntemiyle çalışıldı. Kit setinde bulunan malzemeler Tablo 2’de verildi.

Tablo 2. CXCL4 ELISA kit içeriği

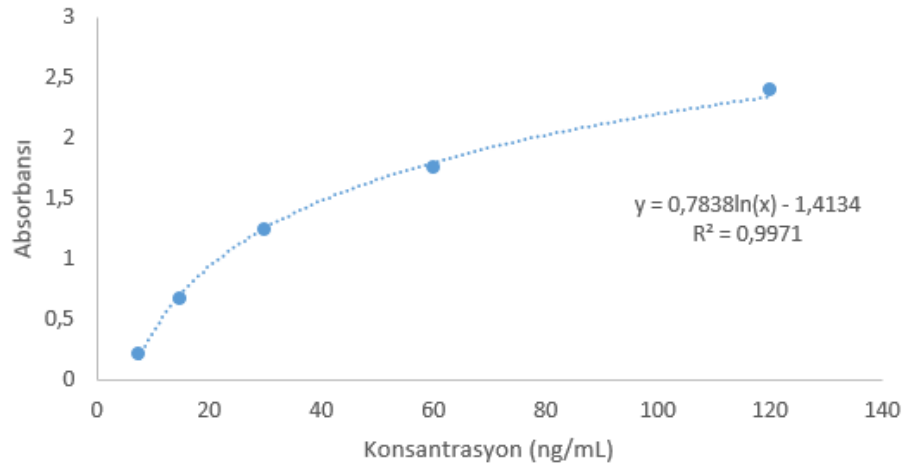
Malzemeler	Miktarları
Antikor kaplı ELISA plate	12 Kuyucuk × 8 (96’lık)
Standart dilüenti	3 mL
Stok standart solüsyonu	0,5 mL
Plate üzerini kapatmak için membran	2 adet
Streptavidin-Horse Radish Peroksidaz (HRP) konjugatı	6 mL
Yıkama solüsyonu	30X 20 mL
Biotinli CXCL-4 monoklonal antikor	1 mL
Kromojen solüsyonu A	6 mL
Kromojen solüsyonu B	6 mL
Stop solüsyonu	6 mL
Tüketici talimat klavuzu	1 adet
Hermetik çanta 1 adet	1 adet

Kitin çalışma prosedürü;

- Standartlar hazırlandı ve 50 µl kuyucuklara eklendi.
- Örneklerden 40 µl alındı kuyucuklara eklendi ve üzerine 10 µl CXCL4 monoklonal antikor eklendi.
- Streptavidin-HRP konjugat 50 µl kuyucukların hepsine eklendi.
- 37 °C’de 60 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyonu takiben Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) otomatik yıkayıcı cihazı ile 5 kez yıkama yapıldı.
- Takiben 50 µl kromojen A sonra 50 µl kromojen B solüsyonu eklendi ve 37 °C’de 10 dk. inkübe edildi.

- 50 µl stop solüsyonu eklenerek enzim aktivitesi durduruldu ve sarı renkli ürün oluştu.
- Sarı renkli ürünün absorbans okuması ChroMate P4300 microplate reader (Awareness Technology Instruments, Palm City, FL, USA) cihazında spektrofotometrik olarak 450 nm’de yapıldı ve Şekil 9’da verilen standart eğri grafiği elde edildi. Bu grafiğe göre değerlendirilen sonuçlar ng/mL olarak verildi.
- Kitin ölçüm aralığı 0.8-200 ng/mL, minimum ölçülebilir düzeyi (sensivitesi) 0.773 ng/mL, intra-assay değeri CV < %10, inter- assay değeri CV < %12 idi.

CXCL4 tayini için ELISA standart eğri grafiği



Şekil 9. CXCL4 düzeyi ELISA standart eğri grafiği

4.5.3. Kimerin Düzeyinin Belirlenmesi

Örneklerin (süpernatantlar ve serum) kimerin düzeylerinin belirlenmesi için Sunred Biological Technology Co. Ltd. (Shanghai, CHINA) firmasınca üretilen mouse kimerin ELISA kit kullanıldı. Üretici firmanın kataloğunda (Katalog

No:201-02-5786) belirtilen şekilde çalışma prosedürlerine uygun olarak ELISA yöntemiyle çalışıldı. Kit setinde bulunan malzemeler Tablo 3'te verildi.

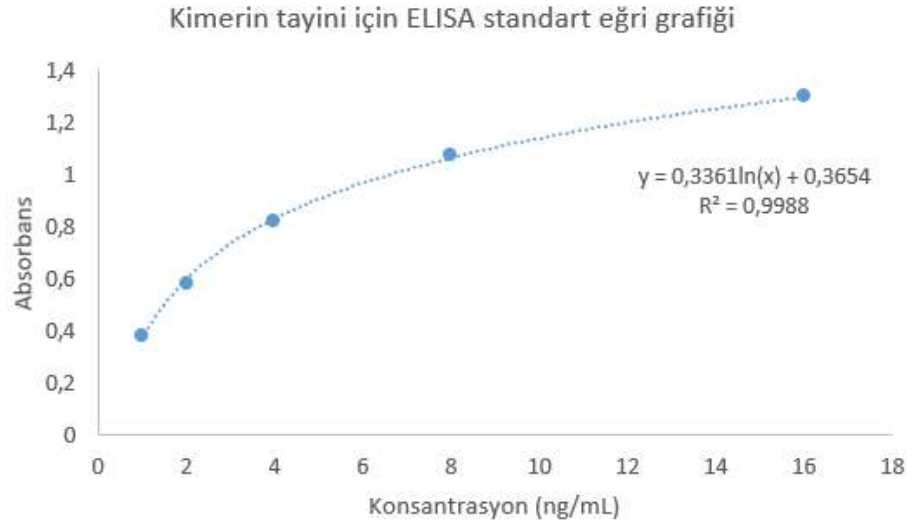
Tablo 3. Kimerin ELISA kitinin içeriği

Malzemeler	Miktarları
Antikor kaplı ELISA plate	12 Kuyucuk $\times$ 8 (96'lık)
Standart dilüenti	3 mL
Stok standart solüsyonu	0,5 mL
Plate üzerini kapatmak için membran	2 adet
Streptavidin-Horse Radish Peroksidaz (HRP) konjugatı	6 mL
Yıkma solüsyonu	30X 20 mL
Biotinli kimerin monoklonal antikor	1 mL
Kromojen solüsyonu A	6 mL
Kromojen solüsyonu B	6 mL
Stop solüsyonu	6 mL
Tüketici talimat klavuzu	1 adet
Hermetik çanta 1 adet	1 adet

Kitin çalışma prosedürü;

- Standartlar hazırlandı ve 50 μ l kuyucukların hepsine eklendi.
- Örneklerden 40 μ l alındı kuyucuklara eklendi ve üzerine 10 μ l kimerin monoklonal antikor eklendi.
- Streptavidin-HRP konjugat 50 μ l kuyucuklara eklendi.
- 37 °C'de 60 dk. inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) otomatik yıkayıcı cihazı ile 5 kez yıkama yapıldı.
- Ardından önce 50 μ l kromojen A sonra 50 μ l kromojen B solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 10 dk. inkübe edildi.

- 50 µl stop solüsyonu eklenerek enzim aktivitesi durduruldu ve sarı renkli ürün oluştu.
- Sarı renkli ürünün absorbans okuması ChroMate P4300 microplate reader (Awareness Technology Instruments, Palm City, FL, USA) cihazında spektrofotometrik olarak 450 nm’de yapıldı ve Şekil 10’da verilen standart eğri grafiği elde edildi. Bu grafiğe göre değerlendirilen sonuçlar ng/mL olarak verildi.
- Kitin ölçüm aralığı 0.1-30 ng/mL, minimum ölçülebilir düzeyi (sensivitesi) 0.097 ng/mL, intra-assay değeri CV < %9, inter- assay değeri CV < %11 idi.



Şekil 10. Kimerin düzeyi ELISA standart eğri grafiği

4.6. Histopatolojik Analizler

Doku örnekleri önce formalin solüsyonuna eklendi ve parafin bloklar aynı gün içerisinde hazırlandı. Sonrasında bloklardan kesitler alınarak Hematoksilen-Eosin ve Masson-Trichrom ile boyandı. Preperatlar uzman bir patolog tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BX-50) X40, X100, X200 ve X400 büyütmede

incelenerek inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibroz açısından değerlendirildi. Her bir denekte, en az iki farklı preparatta, X100 büyütmede, en az 5 farklı ölçümün ortalaması alınarak epidermo-dermal bileşke ile dermis-subkutan yağ dokusu bileşkeşi arası dermal kalınlık olarak belirlendi.

4.7. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan sonunda elde edilen verilerin, lisansı Fırat Üniversitesi tarafından alınmış IBM-SPSS (versiyon 22) programı kullanılarak, istatistiksel analizleri yapıldı. Gruplar arasındaki olası farklılıkların anlamlılığı için Kruskal Wallis ve Post Hoc Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. P değeri 0.05'in altında olan analizler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Serum ve Doku CXCL4 Düzeyleri

BLM uygulanan grup II farelerde serum CXCL4 düzeyi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında % 80.4 oranında artmıştı ($p=0.016$). BLM uygulanan farelerde, doku CXCL4 düzeyi kontrol grubuna göre % 50.4 oranında yükselmişti ($p=0.034$). Serum CXCL4 düzeyi sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde Grup II'ye göre sırasıyla % 31.1 ve % 17.7 oranında azalmıştı ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştı (sırasıyla; $p=0.101$, $p=0.501$). Sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde serum CXCL4 düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı değildi (sırasıyla; $p=0.170$, $p=0.085$) (Şekil 11). Sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde doku CXCL4 düzeyi Grup II'ye göre sırasıyla % 40.3 ve % 28 oranında azalmıştı (sırasıyla; $p=0.034$, $p=0.035$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde doku CXCL4 düzeylerinde istatistiksel olarak farklılık saptanmadı (sırasıyla; $p=0.691$, $p=0.270$). (Tablo 4) (Şekil 12). Grupların serum ve doku CXCL4 düzeyleri arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı (kontrol grubu için $p=0.757$, BLM grubu için $p=0.183$, sekukinumab grubu için $p=0.2$, metformin grubu için $p=0.145$).

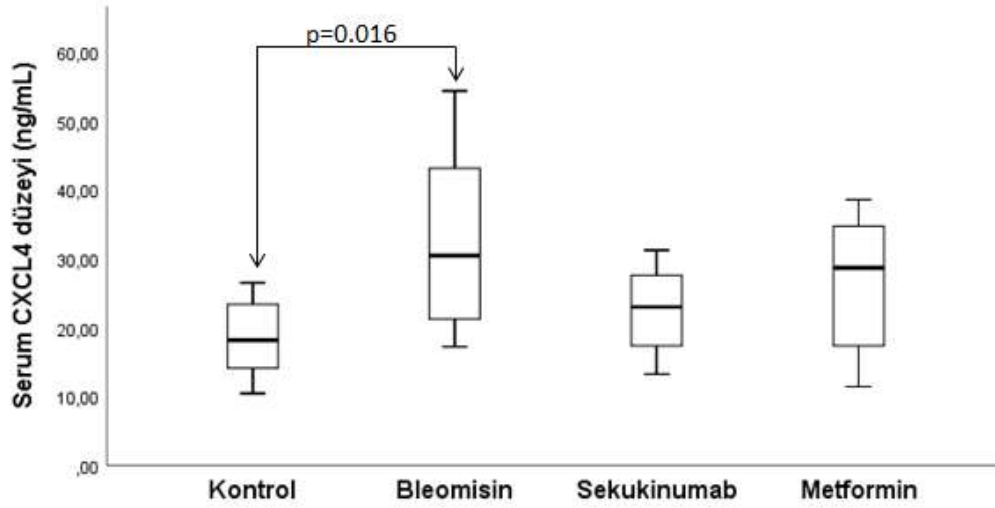
Tablo 4. Çalışma gruplarında serum ve doku CXCL4 düzeyleri

	Grup I (Kontrol) (n=10)	Grup II (BLM) (n=10)	Grup III (Sekukinumab) (n=10)	Grup IV (Metformin) (n=10)
Serum CXCL4 (ng/mL)	18.1±5.58	32.65±14.03 ^a	22.48±7.26	26.2±9.89
Doku CXCL4 (ng/mL)	16.42±3.01	24.7±9.64 ^a	17.60±4.42 ^b	19.31±12.16 ^b

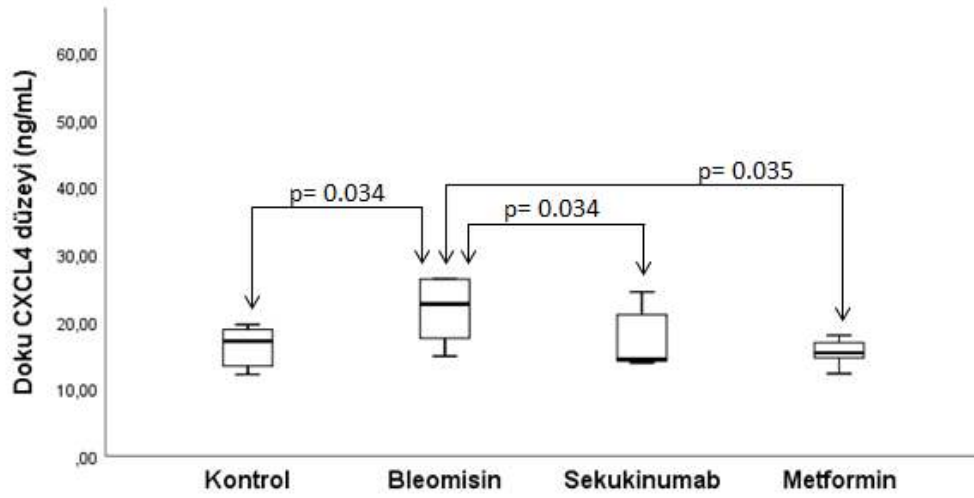
*Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Grup I ile karşılaştırıldığında: ^ap<0.05

Grup II ile karşılaştırıldığında: ^bp<0.05



Şekil 11. Gruplardaki serum CXCL4 düzeyleri



Şekil 12. Gruplardaki doku CXCL4 düzeyleri

5.2. Serum ve Doku Kimerin Düzeyleri

Doku kimerin düzeyi, BLM uygulanan grup II farelerde kontrol grubuna göre %19.9 oranında artmıştı ($p=0.04$). Serum kimerin düzeyi, BLM uygulanan grup II farelerde kontrol grubuna göre artmıştı ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p=0.233$). Sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde serum kimerin düzeyleri grup II'ye benzerdi (sırasıyla; $p=0.806$, $p=0.962$). Kontrol grubuna göre, sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde serum kimerin düzeylerinde istatistiksel olarak farklılık saptanmadı (sırasıyla; $p=0.221$, $p=0.290$) (Şekil 13). Grup II'ye göre, sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde doku kimerin düzeyleri sırasıyla % 13.6 ve %16.4 azalmıştı (sırasıyla; $p=0.151$, $p=0.033$). Sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde doku kimerin düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi (sırasıyla; $p=0.683$, $p=0.962$). (Tablo 5) (Şekil 14). Ayrıca kontrol grubu serum kimerin düzeyi, kontrol grubu doku kimerin düzeyine göre %187.9 oranında daha azdı ($p<0.001$). Benzer şekilde BLM grubunda serum kimerin düzeyi, BLM grubu doku kimerin düzeyine göre %149.5 oranında daha azdı ($p<0.001$). Diğer taraftan sekukinumab ve metformin gruplarında doku

kimerin düzeyi serum kimerin düzeyine göre sırasıyla %116.4 ve %124.1 daha fazlaydı (her ikisi için $p<0.001$).

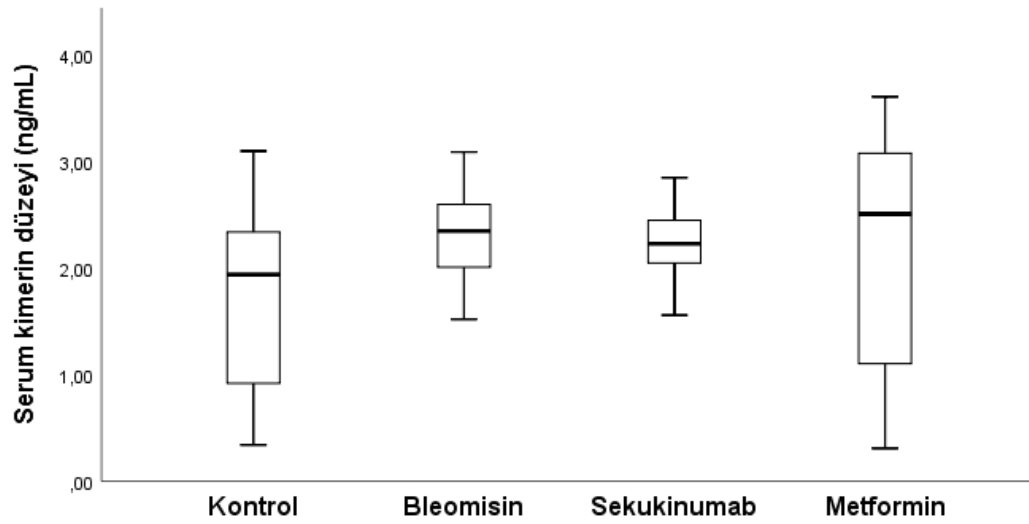
Tablo 5. Çalışma gruplarında serum ve doku kimerin düzeyleri

	Grup I (Kontrol) (n=10)	Grup II (BLM) (n=10)	Grup III (Sekukinumab) (n=10)	Grup IV (Metformin) (n=10)
Serum kimerin (ng/mL)	1.68±1.02	2.32±0.47	2.31±0.51	2.16±1.17
Doku kimerin (ng/mL)	4.83±0.94	5.79±0.94 ^a	5±0.99	4.84±0.74 ^b

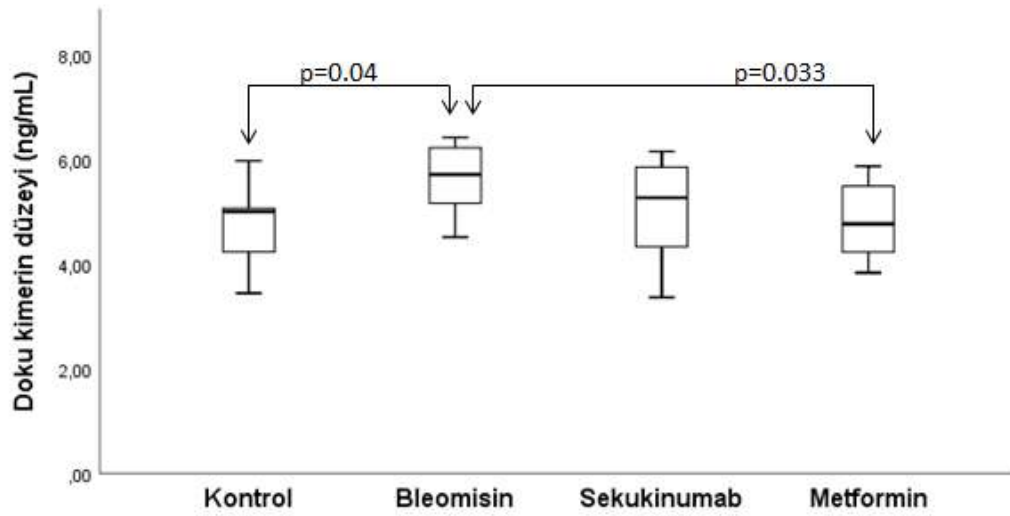
*Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Grup I ile karşılaştırıldığında: ^a $p<0.05$

Grup II ile karşılaştırıldığında: ^b $p<0.05$



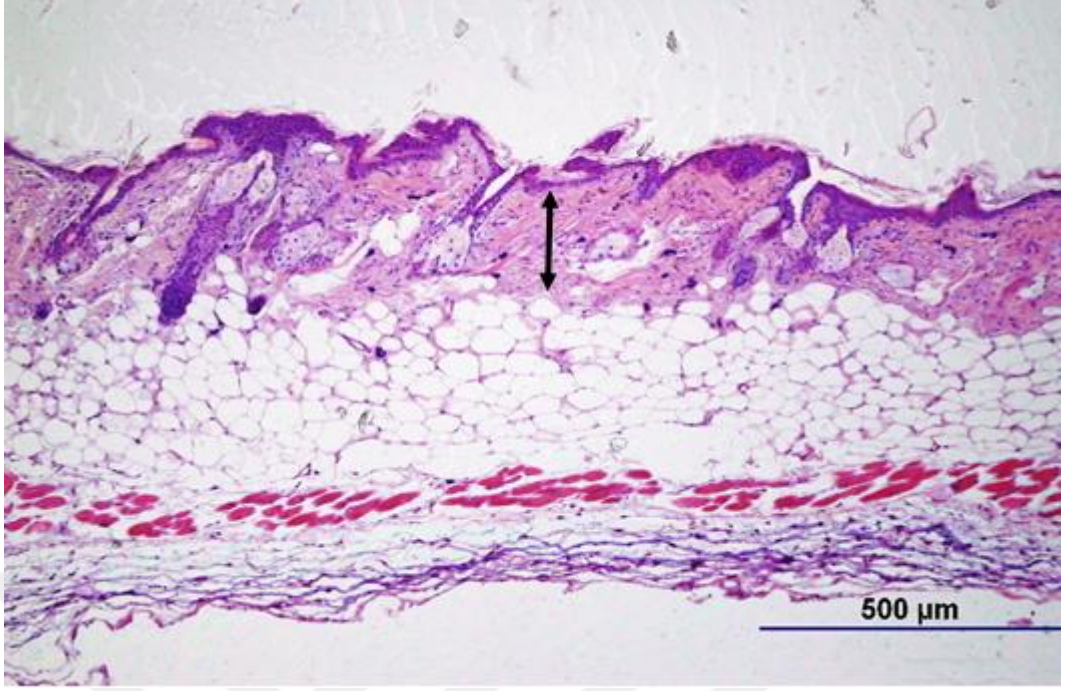
Şekil 13. Gruplardaki serum kimerin düzeyleri



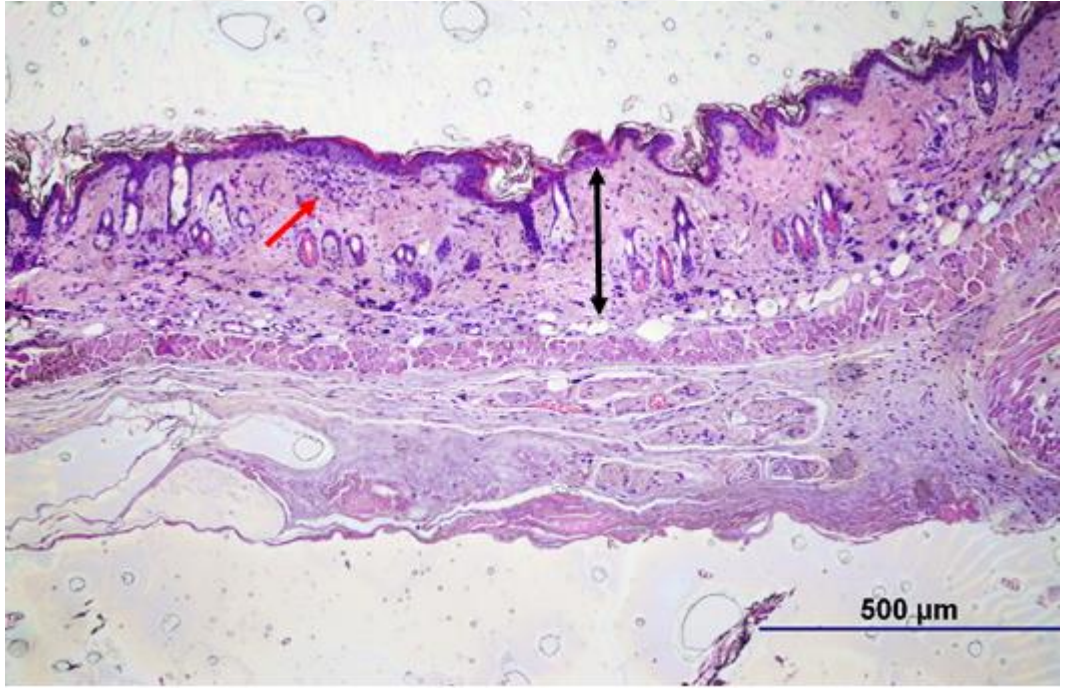
Şekil 14. Gruplardaki doku kimerin düzeyleri

5.3. Histopatolojik Değerlendirme

Sadece FTS enjeksiyonu yapılan I. gruptaki farelerin deri doku histopatolojik değerlendirilmesinde dermal fibrozun oluşmadığı görüldü (Şekil 15). Ancak, BLM uygulamaları ile dermal kalınlık, inflamatuvar hücre infiltrasyonuna ve dermal fibrozda belirgin olarak artmıştı (Şekil 16-19). Sekukinumab ve metformin uygulanan farelerde dermal kalınlık, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve dermal fibroz ılımlı olarak artmıştı (Şekil 17 ve 18). Sekukinumab ve metformin grubunda dermal kalınlık grup II'ye göre azalmıştı (sırasıyla p:0.004, p:0.012) (Şekil 19). Lenfosit ve mast hücre infiltrasyonu açısından grup II'ye göre sekukinumab grubunda anlamlı azalma saptandı (sırasıyla p:0.017, p:0.046) (Tablo 6) (Şekil 20 ve 21).



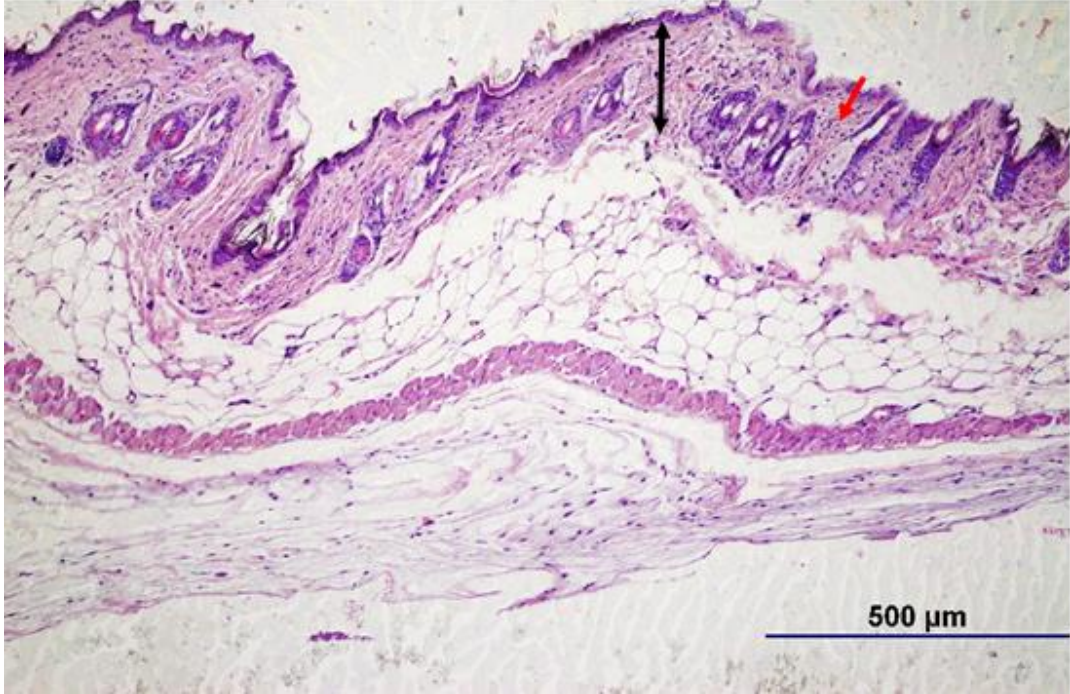
Şekil 15. Kontrol grubunda FTS enjeksiyonu yapılan farelerin normal histopatolojik görünümü (hematoksilen eozin, x100, siyah ok: dermal kalınlık)



Şekil 16. Sham grubunda BLM enjeksiyonu yapılan farelerin histopatolojik görünümü: fibrozis ile dermal kalınlıkta belirgin artış, yoğunlaşan inflamatuvar hücreler (hematoksilen eozin, x100, siyah ok: dermal kalınlık, kırmızı ok: inflamatuvar hücreler)



Şekil 17. Sekukinumab grubundaki farelerin histopatolojik görünümü: hafif fibrozis ile dermal kalınlıkta ılımlı artış ve seyrek inflammatuar hücreler (hematoksilen eozin, x100, siyah ok: dermal kalınlık, kırmızı ok: inflammatuar hücreler)



Şekil 18. Metformin grubundaki farelerin histopatolojik görünümü: hafif fibrozis ile dermal kalınlıkta ılımlı artış ve seyrek inflammatuar hücreler (hematoksilen eozin, x100, siyah ok: dermal kalınlık, kırmızı ok: inflammatuar hücreler)

Tablo 6. Çalışma gruplarında dermal hücre sayıları ve dermal kalınlıklar

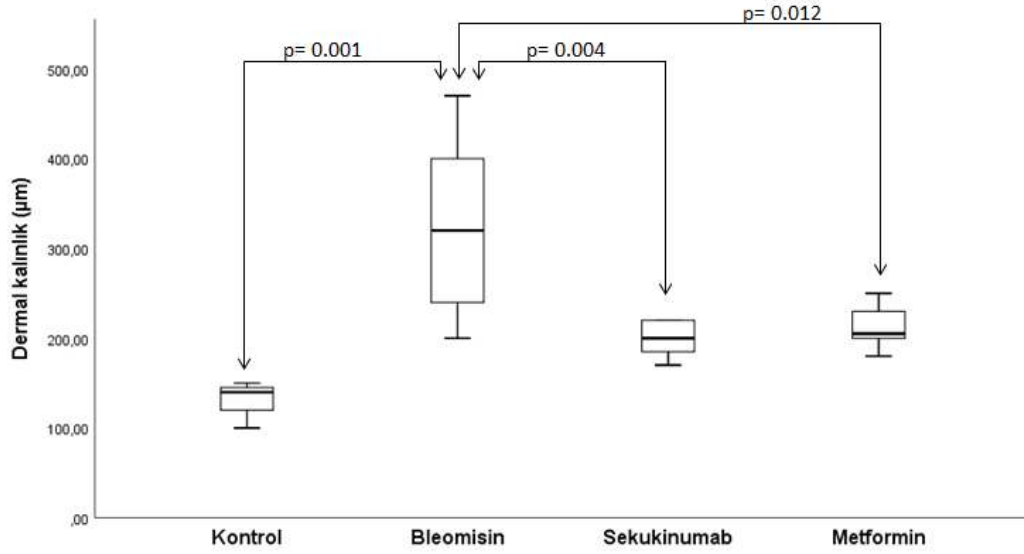
	Kontrol	BLM	SEK	MET	P1	P2	P3
Dermal kalınlık (µm)	131.4±18.6	322.2±101.4	200±19.2	212.5±23.1	0.001	0.004	0.012
Lenfosit (n/HPF)	1.57±0.53	2.11±0.6	1.37±0.51	2.25±0.7	0.079	0.017	0.622
Mast hücre (n/HPF)	3.35±1.45	5.91±2.47	3.83±1.22	4.2±1.27 ^b	0.023	0.046	0.162

BLM: bleomisin, HPF: herbir alandaki hücre sayısı, MET: metformin, SEK: sekukinumab

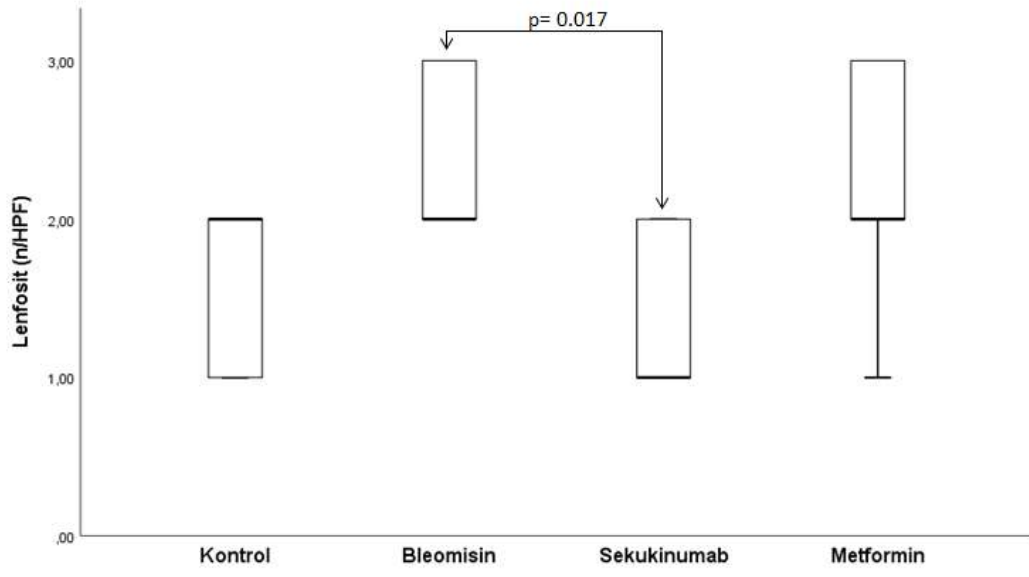
P1: BLM grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında

P2: Sekukinumab grubu BLM grubu ile karşılaştırıldığında

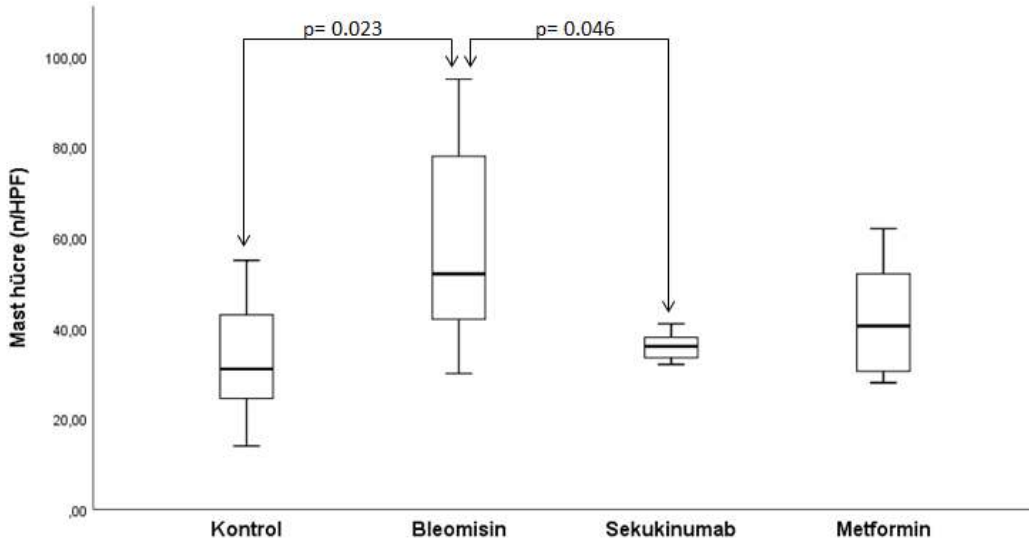
P3: Metformin grubu BLM grubu ile karşılaştırıldığında



Şekil 19. Gruplardaki dermal kalınlık



Şekil 20. Gruplarda birim alanda lenfosit sayısı



Şekil 21. Gruplarda birim alanda mast hücre sayısı

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, BLM ile uyarılmış deneysel skleroderma modelinde sekukinumab ve metformin uygulamaları ile serum ve deri dokusunda CXCL4 ve kimerin düzeylerinin değişimi araştırılmıştır. BLM uygulanan grup II farelerde dermal doku kalınlığında ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda artış, dermal fibroz oluşumu gözlenmiştir. Yalnızca BLM uygulanan grup II farelerde serum ve doku CXCL4 düzeylerinde anlamlı artış saptandı. Sekukinumab uygulanan farelerde doku CXCL4, metformin uygulanan farelerde ise doku CXCL4 ve kimerin düzeylerinde anlamlı azalma saptandı.

Sistemik skleroz etiyolojisi henüz tam olarak bilinmeyen multisistemik tutulumla karakterize, kronik bir hastalıktır. Vaskülopati, immun aktivasyon ve yapısal olarak normal kollajenin artan miktarlarda birikmesi ile hücre dışı matriksin aşırı sentezinin bu hastalığın gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir. Vasküler ve immünolojik süreçlerin sklerodermanın patogenezinde merkezi olduğu düşünülmekte ancak ilk olayların ne olduğu ve sırasıyla farklı süreçlerin fibroz gelişimini nasıl tetiklediği net değildir. Bu mekanizmaların hücre-hücre, hücre-sitokin ve hücre-matriks etkileşimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (4, 108-110).

Etkilenen dokuya immün hücrelerin infiltrasyonu, hastalığın erken döneminde genellikle fibroz oluşumundan önce meydana gelir. Doğal ve kazanılmış immün sistemin yapıları SSk gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar. Naturel killer hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler doğal immün sistemin önemli ana bileşenleridir. Diğer taraftan T ve B lenfositler kazanılmış immün sistemin ana hücreleridir. Tüm bu hücreler arasında kompleks ilişki sonrası TGF-

β , interferon (IFN)-I, IL-4, IL-10, IL-13 gibi tip 2 sitokinler salgılanır ve genellikle hastalıkta efektör hücre olarak kabul edilen aktive edilmiş fibrojenik fibroblast popülasyonunun oluşumuyla sonuçlanır (111). Makrofajlar M1 ve M2 alt tiplerine ayrılmaktadır. M1 tip makrofajlar IL-1, IL-6, IL-12 ve TNF- α ile inflamatuvar süreçleri uyarırken, M2 tip makrofajlar ise IL-4, IL-10, IL-13 yoluyla uyarıldıktan sonra inflamasyonu azaltır ve doku onarımını destekleyerek fibroblast aktivasyonuna neden olur. SSk patogeneğinde M2 polarizasyonu önemli rol oynayan mekanizmalardan biridir (112).

CD4 + T hücrelerinin SSk patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. T helper (Th)-1, Th2, Th17 ve Treg CD4 + T hücrelerinin alt tipleridir. Erken dönem SSk patogeneğinde Th2 hücreler, daha geç dönemde ise Th1 hücreler baskındır. Th1 lenfositler matrix metalloproteinaz ve metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) dengesini düzenleyerek kollajen degradasyonuna yol açar ve üretimini düzenler. Fibrotik evrede Th2 sitokinleri (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13) kollajen sentezini artırır (1, 3, 113-116). SSk patogeneğinde Th17/Treg dengesi önemli bir rol oynamaktadır. Bu dengenin Th17 yolağına doğru kayması sonucu fibrotik süreç tetiklenmektedir. Th17 hücreleri esas olarak interlekin (IL)-17 sekrete etmektedir. IL-17’de IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin yapımını uyararak inflamasyonu tetiklemektedir. Ayrıca IL-17’nin kollajen sentezinden sorumlu fibroblastların proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Fibroblastların aktivasyonu sonucu artan kollajen sentezi SSk’de fibrotik süreçte önemli bir basamaktır. Çalışmalarda SSk hastalarında IL-17 düzeylerinin sağlıklı popülasyona göre yüksek olduğu bulunmuştur (1, 3, 117, 118).

Kurasawa ve ark. (118) tarafından yapılan çalışmada SSk hastalarının deri ve bronkoalveolar sıvısında IL-17'nin yüksek düzeyde eksprese olduğu saptanmıştır. Yang ve ark. (119) tarafından SSk tanılı hastalarda Th17 hücrelerinin hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu ve IL-17 düzeylerinin fibroblastik aktiviteyi artırarak kollajen üretimini artırdığı saptanmıştır. Radstake ve ark. (120) tarafından yapılan çalışmada ise SSk hastalarında dolaşımdaki Th17'nin ve intrasellüler IL-17 ekspresyonunun artmış olduğu bulunmuştur. Ayrıca, Fenoglio ve ark. (121) tarafından yapılan çalışmada SSk hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla Th17 hücresinin artmış olduğu ve immün cevabın özellikle Th17 yolağına doğru kaydığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Almanzar ve ark. (122) tarafından 135 SSk hastası üzerinde yapılan çalışmada dolaşımdaki Th17 hücre sayısının ve intrasellüler IL-17 ekspresyonunun artmış olduğu bulunmuştur. Buna ilaveten Zhou ve ark. (123) SSk tanılı hastalarda IL-17A düzeyi ile modifiye rodnan skoru arasında pozitif korelasyon olduğunu saptamıştır. Truchetet ve ark. (124) tarafından yapılan çalışmada ise interstisyel akciğer hastalığı olan SSk tanılı hastalarda IL-17 düzeyinin sağlıklı kontrole göre yüksek olduğu saptanmıştır. IL-17 eksikliği olan deney hayvanlarında BLM ile uyarılan pulmoner fibrozun daha az seviyelerde olduğu ortaya konulmuştur (125). Yapılan başka bir çalışmada SSk hastalarında IL-17'nin deri fibroblastlarından monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, IL-8, matrix metalloproteinaz-1 sentezini uyardığı görülmüştür (126). Diğer taraftan IL-17'nin insanlarda pro-inflamatuar ve anti-fibrotik gibi dual bir etkiye sahip olduğunu iddia eden yayınlarda bulunmaktadır (127).

Çalışmamızda BLM ile oluşturulan skleroderma modelinde sekukinumab tedavisi ile dermal kalınlık, inflamasyon ve fibrozun azaldığı görülmüştür. Bu

etkinin olası mekanizması IL-17'nin fibroblast, endotel hücre ve düz kas hücresi üzerinden artmış pro-inflamatuar sitokin düzeyleri, matrix metalloproteinaz artışı, myofibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezinde artış gibi etkilerinin sekukinumab tedavisi ile baskılanması sonucu olabilir.

Ayrıca fibroblastların proliferasyonundan sorumlu tutulan bir diğer yolak mTOR aktivasyonudur. SSk tanıılı hastalarda fibroblastlardaki fosforile mTOR düzeyleri artmış olarak bulunmuştur. mTOR inhibisyonu ile fibroblastların baskılandığı gösterilmiştir. SSk tanıılı hastalarda mTOR aktivasyonu ile fibroblastlardan sentezlenen kollajen üretiminin arttığı saptanmıştır (128-130). Zhu ve ark. (18) tarafından yapılan çalışmada SSk tanıılı hastalarda fibroblastlardaki fosforile mTOR düzeyleri artmış olarak bulunmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada mTOR inhibisyonu ile fibroblastların baskılandığı gösterilmiştir (131). SSk tanıılı hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada mTOR aktivasyonu ile fibroblastlardan sentezlenen kollajen üretiminin arttığı saptanmıştır (132). Yoshizaki ve ark. (133) tarafından yapılan çalışmada deneysel skleroderma modelinde rapamisin ile mTOR inhibisyonu sonrasında deri fibrozunun azalmış olduğu gösterilmiştir. Yapılan deneysel bir çalışmada oral verilen metforminin radyasyon ile uyarılan dermal fibrozu baskıladığı saptanmıştır (134).

mTOR yolağı ayrıca T hücrelerinin aktivasyonunda ve farklılaşmasında da rol oynamaktadır. mTOR aktivasyonu Th17 aktivasyonuna yol açar ve Th17/Treg dengesini Th17 yolağına kaydırır. mTOR inhibisyonu ile Treg yolağı baskın hale geçer (95). Yapılan bir çalışmada metformin tedavisinin IL-17 düzeyini azalttığı, Treg sayısını artırdığı saptanmıştır (103). Bu veriler Th17 yolağı ve ilişkili

yolakların SSk patogeneğinde ve tedavisinde önemli bir hedef konumunda olduğunu göstermektedir. Yaptığımız çalışmada metformin tedavisi ile dermal kalınlık düzeyinde anlamlı azalma saptanırken inflamatuvar hücre infiltrasyonunda parsiyel bir azalma olmuştur. Bu etki metformin tedavisinin mTOR inhibisyonu üzerinden fibroblast proliferasyonunu daha fazla baskılaması ile ilişkili olabilir. Çalışmamızda kullanılan metformin dozu inflamasyon yolağında kısmi bir baskılamaya neden olduğundan anti-inflamatuvar etki için daha fazla dozda metformin tedavisine gerek olduğu düşünülebilir.

Kanser, ateroskleroz gibi hastalıkların patogeneğinde CXCL4'ün antianjiyogenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, CXCL4'ün endotelial hücre proliferasyonu ve anjiyogenezin inhibisyonu, monosit aktivasyonu, T-hücresi aktivasyonu ve kemotaksis etkiler de dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte CXCL4 heparin bağlanması ve nötralizasyonu ile heparinin kullanılabilirliğini sınırlayarak prokoagulan bir etki gösterebildiği gibi trombomodüline bağlanma ile protein C aktivasyonunu kolaylaştırarak antikoagulan etki gösterebilir (135).

Bununla birlikte SSk'li hastalarda plazma CXCL4 düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre artmış olduğu saptanmıştır. Ayrıca CXCL4 düzeyleri deri ve akciğer fibrozu ile ilişkili olarak bulunmuştur. Proteomik çalışmalarda CXCL4'ün büyük ölçüde SSk hastalarından alınan pDH'ler tarafından üretildiği tespit edilmiştir. SSk hastalarının cildinde CXCL4 ile birlikte lokalize olan artan sayıda pDH olması, pDH'lerin aynı zamanda etkilenen dokuda CXCL4'ün ana kaynağı olduğunu göstermektedir (136-139). Aynı zamanda, CXCL4'ün Toll-like reseptör-9 ile uyarılan pDH'lerde IFN- α üretimini indüklediği gösterilmiştir (136). Yakın

zamanda yapılan bir başka çalışmada, pDH'lerin SSk hastalarının cildine infiltre olduğu ve yüksek miktarlarda CXCL4 ve IFN- α salgıladığı doğrulanmıştır (140). Üstelik, CXCL4'ün pDH'lerin Toll-like reseptör-8 ve Toll-like reseptör-9 aktivasyonunu güçlendirdiği gösterilmiştir (140). BLM ile oluşturulmuş SSk fare modelinde, pDH'lerin azaltılması, deri ve akciğer fibrozunu hafifletmiş ve SSk patogenezinde pDH'lerin önemini vurgulamıştır (13). CXCL4 knock out fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada CXCL4'ün endotel hücreleri ve fibroblastları etkileyerek deride, akciğerlerde ve kalpte fibroz gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (141).

Yapılan bir çalışmada CXCL4'ün SSk'de endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve c-Abl/Fli-1 sinyal yolu yoluyla tüp oluşumunu inhibe ederek anti-anjiyogenez etkiler gösterdiği bulunmuştur (75). Ayrıca CXCL4'ün SSk'de TGF- β ve platelet kaynaklı büyüme faktörü yolu ile indüklenen anjiyogenez üzerinde antagonistik etki yaptığı gösterilmiştir (75). Bununla birlikte SSk ve çok erken skleroderma hastalarında serum CXCL4 düzeylerinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (136). SSk'li hastalarda CXCL4 düzeylerinin pulmoner hipertansiyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur (136). Bu veriler SSk'nin vaskülopati patogenezinde CXCL4'ün önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Bununla birlikte CXCL4'ün Th17 yolağını uyardığı ve IL-17 düzeyleri ile pozitif korele olduğu saptanmıştır. Literatürde çelişkili sonuçlar bulunmakla birlikte IL-17'nin dendritik hücreleri stimüle ettiği gösterilmiştir. Bu uyarı dendritik hücrelerden salınan CXCL4 düzeylerini artırabilir (8, 142). Yapılan deneysel çalışmada CXCL4 aşırı ekspresyonu ile BLM ile uyarılan fibrozun şiddetlendiği gözlenirken anti-CXCL4 antikoru ile fibrozun düzeldiği gösterilmiştir (141).

Tüm bu gelişmeler ışığında SSk tanılı hastalarda CXCL4 düzeylerinin yüksek olduğu saptanmışsa da CXCL4'ün SSk patogenezindeki yeri henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Yaptığımız çalışmada da literature benzer şekilde BLM ile oluşturulan skleroderma modelinde serum ve doku CXCL4 düzeyi artmıştır. IL-17A'ya seçici olarak bağlanan sekukinumab uygulanan farelerde ise doku CXCL4 düzeyleri, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibroz azalmıştır. Bu bulgu IL-17'nin CXCL4'ün salınımını uyarabildiğini ve CXCL4 ile IL-17 arasında pozitif bir etkileşim olduğunu doğrulayabilir. Metformin tedavisi uygulanan farelerde benzer şekilde doku CXCL4 düzeyleri, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibroz azalmıştır. Metformin tedavisi mTOR yolağı üzerinden IL-17 inhibisyonu sonucu CXCL4'ü baskılamış olabilir ve bu etki üzerinden anti-fibrotik etkilerin ortaya çıktığı düşünülebilir.

Yağ dokusunun en büyük endokrin dokulardan biri olduğuna inanılmaktadır. Yağ dokusu, cilt homeostazının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (143). Dermal fibroz gelişiminden önce intradermal yağ dokusunun bozulduğu saptanmıştır. Ayrıca yağ dokusunun fibroblast kaynağı olabileceği ve böylece kollajen üretimi artarak fibroz sürecine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (144).

Yağ dokusundaki adipositler tarafından salgılanan hücre sinyal proteinlerine adipokin adı verilmektedir. Adipokinler, homojen olmayan bir protein grubudur. Adipokinlerin immün yanıtı modüle ettiği kabul edilmektedir ve bugüne kadar her iki sistem arasında karşılıklı bağımlılık bildirilmiştir (145). Adipokinler, CD4+, CD8+ T lenfositleri ve Th17 hücrelerinin birikmesi ve farklılaşması ile

sonuçlanan birçok bağışıklık hücresinin aktivasyonunu ve düzenlenmesini etkiler (146). Örneğin Leptin ve resistin adipokinlerinin patojenik Th17 cevabını indüklediği gösterilmiştir (147, 148).

Adipokin olan kimerin, ağırlıklı olarak yağ dokusu ve derinin bazal ve suprabazal katmanlarındaki keratinositler tarafından salgılanan otokrin ve parakrin etkileri olan, immünomodülatör bir proteindir (79). Kimerin, sistemik skleroz, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve psoriasis hastalığındaki inflamatuvar süreçlerle ilişkilendirilmektedir. Kimerin reseptörü (ChemR23) endotel hücrelerinin yüzeyinde lokalizedir ve ekspresyonu TNF- α , IL-1 β ve IL-6 tarafından düzenlenir. ChemR23 yoluyla sinyal transdüksiyonunda yer alan sinyal yolları, endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu uyararak endotel bariyer disfonksiyonuna yol açmaktadırlar (149). Serum proteazlar, makrofajlara bağlanan ve pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6 ve IFN- γ) salgılanmasını uyaran farklı izoformların oluşumuyla sonuçlanan kimerini parçalama yeteneğine sahiptir. Ayrıca, bu kimerin izoformları, pDH'ler ve naturel killer hücrelerini uyarıyor gibi görünmektedir. pDH'ler patojenlerle savaşır, ancak cilt lezyonlarında inflamasyonu şiddetlendirebilir ve SSk hastalarında fibroz ile ilişkilendirilmiştir (150). Ayrıca, psoriasis gibi diğer kutanöz hastalıklarda, lezyonlu ciltte, aynı hastaların etkilenmemiş cildine oranla kimerin mRNA seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (151). Muhtemel mekanizma, inflamatuvar hücrelerin potansiyel çekiciliğine neden olan kimerin birikimini içerir. Adalimumab ile tedavi edilen romatoid artrit hastalarında hastalık aktivitesinin azalması ve pro-inflamatuvar sitokin seviyeleri ile bağlantılı olan kimerin düzeyinin azalması kimerinin pro-inflamatuvar etkisini doğrulamaktadır (152). Bununla birlikte, SSk'li hastalarda serum kimerin düzeyi

sağlıklı bireylere göre yüksek olarak saptanmıştır. Kimerinin, hastalık süresi 1 yılın altında olan erken SSk hastalarında cilt sklerozunun gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, kimerin seviyesinin modifiye Rodnan deri skoru ile pozitif korele olduğu bildirilmiştir (85). Bununla birlikte, SSk hastalarında serum kimerin düzeyi ile dijital ülserlerin varlığı arasında ilişki rapor edilmiştir (85). Ayrıca artmış kimerin düzeyinin böbrek fonksiyon bozukluğu riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır (153).

Yapılan bir çalışmada kimerin düzeyinin SSk'de hastalık süresi ile pozitif korele olduğu saptanmıştır. Ayrıca kimerin düzeyi SSk'de dermal fibroblastlarda azalmışken damar duvarında artmış olarak bulunmuştur (84, 154). Vermi ve ark. (155) yaptıkları çalışmada lupus eritematöz deri lezyonlarında, dermal kan damarlarının endotelinde ve sekonder lenfoid organların yüksek endotel venlerinde kimerinin eksprese olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca kimerin ile diyabetes mellitusun uzun süreli vasküler komplikasyonları arasında ilişki olduğu ileri sürülmüştür (156).

Esteghamati ve ark. (157) tarafından yapılan çalışmada tip 2 diabetes mellitus'lu hastalarda metformin tedavisi ile kimerin düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Ayrıca psoriasis hastalarında yapılan çalışmada IL-17'i nötralize eden sekukinumab tedavisi ile kimerin düzeyinin istatistiksel olarak değişmediği gösterilmiştir (158).

Diğer taraftan bazı çalışmalarda kimerinin anti-inflamatuar etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Cash ve ark. (14) tarafından yapılan deneysel bir çalışmada kimerinin CMKLR1 aracılığı pro-inflamatuar mediatör ekspresyonunda eşzamanlı bir azalma ile anti-inflamatuar aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmada BLM ile oluşturulan skleroderma modelinde serum ve doku kimerin düzeyi artmıştır. Sekukinumab uygulanan farelerde ise literatüre benzer şekilde serum ve doku kimerin düzeyleri belirgin olarak azalmamıştır, ancak dermal kalınlık, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibroz azalmıştır. Bu veriler kimerinin SSk'de inflamasyon ve fibroz süreçleri ile olan etkisinin IL-17 yolağı üzerinden olmadığını veya daha zayıf ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Metformin tedavisi uygulanan farelerde doku kimerin düzeyi ve dermal kalınlık azalmıştır. Metforminin, AMPK üzerinden farklı yolların etkilenmesi, nükleer faktör kappa B sinyali, çoklu mitojenle aktive olan protein kinaz yolları, reaktif oksijen türlerinin üretiminin azaltılması ve JAK-STAT yolağının inhibisyonu gibi farklı mekanizmalar üzerinden doku kimerin düzeylerinde azalmaya neden olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak CXCL4 ve kimerin, SSk patogenezinde kompleks bir şekilde farklı yollar ile ilişkili olabilir. Çalışmamızın sonuçları CXCL4'ün IL-17 yolağı ile ilişkili olduğunu gösterirken, serum kimerin düzeylerinin IL-17 yolağı ile daha zayıf ilişkili olduğunu veya olmadığını desteklemektedir. Bu bulgular bize heterojen klinik bulgulara sahip SSk hastalarının tedavilerine vermiş oldukları yanıtların neden farklı olduğunu açıklayabilir. Bu açıdan CXCL4 ve kimerin düzeyleri SSk hastalarında inflamasyon, vaskülopati ve fibroza yönelik tedavi seçiminde yol gösterici olabilir. Bu veriler ışığında literatüre önemli katkılar yapacağı düşünülmektedir. Ancak bu biyomarkerların SSk patogenezi ile ilişkisi ve tedavideki yerinin belirlenmesi için daha detaylı moleküler analizlerin yapıldığı klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet* 2017; 390: 1685-1689.
2. 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.
3. Cutolo M, Soldano S, Smith V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. *Expert Rev Clin Immunol* 2019; 15: 753-754.
4. Sakkas LI, Platsoucas SD. T-cells and B-cells in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rev* 2010; 6: 276-282.
5. Chizzolini C. T cells, B cells, and polarized immune response in the pathogenesis of fibrosis and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20: 707-712.
6. Zucker MB, Katz IR. Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 693-702.
7. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127.
8. Affandi AJ, Silva-Cardoso SC, Garcia S, et al. CXCL4 is a novel inducer of human Th17 cells and correlates with IL-17 and IL-22 in psoriatic arthritis. *Eur J Immunol* 2018; 48: 522-531.
9. Liu CY, Battaglia M, Lee SH, et al. Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells. *J Immunol* 2005; 174: 2680-2686.
10. Herová M, Schmid M, Gemperle C, Hersberger M. ChemR23, the receptor for kimerin and resolvin E1, is expressed and functional on M1 but not on M2 macrophages. *J Immunol* 2015; 194: 2330-2337.
11. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by kimerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 2003; 198: 977-985.
12. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, et al. The role of kimerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 2007; 109: 3625-3632.
13. Kafaja S, Valera I, Divekar AA, et al. pDCs in lung and skin fibrosis in a bleomycin-induced model and patients with systemic sclerosis. *JCI Insight* 2018; 3: 98380.
14. Cash JL, Hart R, Russ A, et al. Synthetic kimerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *Journal of Experimental Medicine* 2008; 205: 767-775.
15. Frieder J, Kivelevitch D, Menter A. Secukinumab: a review of the anti-IL-17A biologic for the treatment of psoriasis. *Ther Adv Chronic Dis* 2018; 9: 5-21.
16. 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.
17. Anabtawi A, Miles JM. Metformin: nonglycemic effects and potential novel indications. *Endocr Pract* 2016; 22: 999-1007.

18. Zhu X, Chu H, Jiang S, et al. Sirt1 ameliorates systemic sclerosis by targeting the mTOR pathway. *J Dermatol Sci* 2017; 87: 149-158.
19. Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol* 2011; 12: 295–303.
20. Marangoni RG, Varga J, Tourtellotte WG. Animal models of scleroderma: recent progress. *Curr Opin Rheumatol* 2016; 28: 561-570.
21. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gaudie 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.
22. 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.
23. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1747-1755.
24. Allanore Y, Simms R, Distler O, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1: 15002.
25. Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008; 66: 198-202.
26. 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.
27. Murdaca G, Contatore M, Gulli R, Mandich P, Puppo F. Genetic factors and systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2016; 15: 427-432.
28. Ota Y, Kuwana M. Updates on genetics in systemic sclerosis. *Inflamm Regen* 2021; 41: 17.
29. Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev* 2008; 8: 36-40.
30. Asano Y. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis: An Understanding Based on a Common Pathologic Cascade across Multiple Organs and Additional Organ-Specific Pathologies. *J Clin Med* 2020; 9: 2687.
31. 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.
32. Rosendahl AH, Schönborn K, Krieg T. Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). *Kaohsiung J Med Sci* 2022; 38: 187-195.
33. Koca SS, Ozgen M, Isik A. Sistemik skleroz etiyopatogenezi RAED Dergisi 2012; 4: 39-46.
34. Nihtyanova SI, Brough GM, Black CM, Denton CP. Clinical burden of digital vasculopathy in limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 120–123.
35. Burbelo PD, Gordon SM, Waldman M, et al. Autoantibodies are present before the clinical diagnosis of systemic sclerosis. *PLoS One* 2019; 14: e0214202.

36. Solanki KK, Hor C, Chang WSJ, Frampton C, White DHN. Clinical utility of hypo- and hyperpigmentation of skin in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis* 2017; 20: 767-773.
37. Leroy V, Henrot P, Barnetche T, et al. Association of skin hyperpigmentation disorders with digital ulcers in systemic sclerosis: Analysis of a cohort of 239 patients. *J Am Acad Dermatol* 2019; 80: 478-484.
38. Herrick AL, Assassi S, Denton CP. Skin involvement in early diffuse cutaneous systemic sclerosis: an unmet clinical need. *Nat Rev Rheumatol* 2022; 15: 1–10.
39. Young A, Namas R, Dodge C. Hand Impairment in Systemic Sclerosis: Various Manifestations and Currently Available Treatment. *Curr Treatm Opt Rheumatol* 2016; 2: 252–269.
40. Avouac J, Walker UA, Hachulla E. Joint and tendon involvement predict disease progression in systemic sclerosis: a EUSTAR prospective study. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 1.
41. Johnstone EM, Hutchinson CE, Vail A, et al. Acro-osteolysis in systemic sclerosis is associated with digital ischaemia and severe calcinosis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51: 2234–2238.
42. Schanz G, Henes J, Ulmer A. Magnetic resonance imaging findings in patients with systemic scleroderma and musculoskeletal symptoms. *Eur Radiol* 2013; 23: 212–221.
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. Shreiner A, Murray C, Denton C, Khanna D. Gastrointestinal manifestations of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord* 2016; 1: 247–256.
45. Emmanuel A. Current management of the gastrointestinal complications of systemic sclerosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13: 461–472.
46. Highland KB, Silver RM. New Developments in Scleroderma Interstitial Lung Disease. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 737–745.
47. Nihtyanova SI, Schreiber BE, Ong VH, et al. Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66:1625-1635.
48. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1283–1289.
49. Sobolewski P, Maślińska M, Wieczorek M, et al. Systemic sclerosis - multidisciplinary disease: clinical features and treatment. *Reumatologia* 2019; 57: 221-233.
50. Fernández-Codina A, Simeón-Aznar CP, Pinal-Fernandez I, et al. Cardiac involvement in systemic sclerosis: differences between clinical subsets and influence on survival. *Rheumatol Int* 2017; 37: 75–84.
51. Desai CS, Lee DC, Shah SJ. Systemic sclerosis and the heart: current diagnosis and management. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 545–554.

52. Bose N, Chiesa-Vottero A, Chatterjee S. Scleroderma renal crisis. *Semin Arthritis Rheum* 2015; 44: 687–694.
53. Steen VD. Kidney involvement in systemic sclerosis. *Presse Med* 2014; 43: e305–314.
54. Steen VD, Medsger TA, Osial TA, et al. Factors predicting development of renal involvement in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 1984; 76: 779–786.
55. Bertrand D, Dehay J, Ott J, et al. Kidney transplantation in patients with systemic sclerosis: a nationwide multicentre study. *Transpl Int* 2017; 30: 256–265.
56. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 1327–1339.
57. Czirják L. Practical approach to the therapy of systemic sclerosis. *Z Rheumatol* 2004; 63: 451–456.
58. Rirash F, Tingey PC, Harding SE, et al. Calcium channel blockers for primary and secondary Raynaud's phenomenon. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 12: CD000467.
59. Roustit M, Blaise S, Allanore Y, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors for the treatment of secondary Raynaud's phenomenon: Systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1696–1699.
60. Bakst R, Merola JF, Franks AG, et al. Raynaud's phenomenon: Pathogenesis and management. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59: 633–53.
61. Zhu JL, Black SM, Chen HW, Jacobe HT. Emerging treatments for scleroderma/systemic sclerosis. *Fac Rev* 2021; 10: 43.
62. Yasuoka H. Recent Treatments of Interstitial Lung Disease with Systemic Sclerosis. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 2016; 9: 97–110.
63. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis – Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med* 2019; 380: 2518–2528.
64. Bruni C, Ross L. Cardiac involvement in systemic sclerosis: Getting to the heart of the matter. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2021; 35: 101668.
65. Gatta L, Scarpignato C. Systematic review with meta-analysis: rifaximin is effective and safe for the treatment of small intestine bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; 45: 604–616.
66. Bharadwaj S, Tandon P, Gohel T, et al. Gastrointestinal manifestations, malnutrition, and role of enteral and parenteral nutrition in patients with scleroderma. *J Clin Gastroenterol* 2015; 49: 559–564.
67. Deutsch E, Johnson SA, Seegers WH. Differentiation of certain platelet factors related to blood coagulation. *Circ Res* 1955; 3: 110–115.
68. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121–127.
69. Bruserud O, Kittang AO. The chemokine system in experimental and clinical rheumatology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 341: 3–12.

70. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270: 27348–27357.
71. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 71773156, Platelet Factor 4 (human) Pub Chem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/71773156>. Erişim Tarihi 2.07.2022.
72. Kowalska MA, Rauova L, Poncz M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 2010; 125: 292-296.
73. Vandercappellen J, Van DJ, Struyf S. The role of the CXC chemokines plateletfactor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22: 1–18.
74. Carvalheiro T, Zimmermann M, Radstake TRDJ, Marut W. Novel insights into dendritic cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2020; 201: 25-33.
75. Jiang Z, Chen C, Yang S, et al. Contribution to the peripheral vasculopathy and endothelial cell dysfunction by CXCL4 in Systemic Sclerosis. *J Dermatol Sci* 2021; 104: 63-73.
76. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006; 444: 847-853.
77. Nedvıdkov J, Smitka K, Kopsk V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res* 2005; 54:133-140.
78. Roman AA, Parlee SD, Sinal CJ. Kimerin: apotential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine* 2012; 42: 243-251.
79. Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. Processing, signaling, and physiological function of kimerin. *IUBMB Life* 2014; 66: 19-26.
80. Lehrke M, Becker A, Greif M. et al. Kimerinis associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *Eur J Endocrinol* 2009; 161: 339-344.
81. Ernst MC, Sinal CJ. Kimerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 660-667.
82. Ress C., Tschoner A., Engl J, et al. Effect of bariatric surgery on circulating kimerin levels. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 277-280.
83. Sun JX, Zhang C, Cheng ZB, et al. Kimerin in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2021; 520: 8-15.
84. olkiewicz J, Stochmal A, Rudnicka L. The role of adipokines in systemic sclerosis: a missing link? *Arch Dermatol Res* 2019; 311: 251-263.
85. Akamata K, Asano Y, Taniguchi T, et al. Increased expression of kimerin in endothelial cells due to Fli1 deficiency may contribute to the development of digital ulcers in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2015; 54: 1308-1316.
86. Bondue B, De Henau O, Luangsay S, et al. The kimerin/ChemR23 system does not affect the pro-inflammatory response of mouse and human macrophages ex vivo. *PLoS One* 2012; 7: e40043.

87. 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.
88. 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.
89. Wei L, Abraham D, Ong V. The Yin and Yang of IL-17 in Systemic Sclerosis. *Front Immunol.* 2022; 13: 885609.
90. 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.
91. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature.* 2013;494(7436):256-260.
92. Johanns M, Lai YC, Hsu MF, et al. AMPK antagonizes hepatic glucagon-stimulated cyclic AMP signalling via phosphorylation-induced activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4B. *Nat Commun.* 2016; 7: 10856.
93. Konopka AR, Esponda RR, Robinson MM, et al. Hyperglucagonemia mitigates the effect of metformin on glucose production in prediabetes. *Cell Rep.* 2016;15(7):1394-1400.
94. LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocr Rev.* 2021 Jan 28;42(1):77-96.
95. 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.
96. Nerstedt A, Cansby E, Amrutkar M, Smith U, Mahlapuu M. Pharmacological activation of AMPK suppresses inflammatory response evoked by IL-6 signalling in mouse liver and in human hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Aug 15;375(1-2):68-78.
97. Zhao X, Zmijewski JW, Lorne E, et al. Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295(3): 497-504.
98. He C, Li H, Viollet B, Zou MH, Xie Z. AMPK Suppresses Vascular Inflammation In Vivo by Inhibiting Signal Transducer and Activator of Transcription-1. *Diabetes.* 2015 Dec;64(12):4285-97.
99. Bess E, Fisslthaler B, Frömel T, Fleming I. Nitric oxide-induced activation of the AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit attenuates I κ B kinase activity and inflammatory responses in endothelial cells. *PLoS One.* 2011;6(6):e20848.
100. Jeong HW, Hsu KC, Lee JW, Ham M, Huh JY, Shin HJ, Kim WS, Kim JB. Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Apr;296(4):E955-64

101. Kim YD, Kim YH, Cho YM, Kim DK, Ahn SW, Lee JM, Chanda D, Shong M, Lee CH, Choi HS. Metformin ameliorates IL-6-induced hepatic insulin resistance via induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner (SHP) in mouse models. *Diabetologia*. 2012 May;55(5):1482-94.
102. Nerstedt A, Johansson A, Andersson CX, Cansby E, Smith U, Mahlapuu M. AMP-activated protein kinase inhibits IL-6-stimulated inflammatory response in human liver cells by suppressing phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Diabetologia*. 2010 Nov;53(11):2406-16.
103. Kang KY, Kim YK, Yi HL. Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int Immunopharmacol* 2013; 16: 85-92.
104. Kawakami T, Ihn H, Xu W, et al. 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.
105. Li L, Huang W, Li K, et al. Metformin attenuates gefitinib-induced exacerbation of pulmonary fibrosis by inhibition of TGF-beta signaling pathway. *Oncotarget* 2015; 6: 43605-43619.
106. Lu J, Shi J, Li M, et al. Activation of AMPK by metformin inhibits TGF-beta-induced collagen production in mouse renal fibroblasts. *Life Sci* 2015; 127: 59-65.
107. Bai J, Zhang N, Hua Y, et al. Metformin inhibits angiotensin II-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *PLoS One* 2013; 8: 72120.
108. Krieg T, Meurer M. Systemic scleroderma. Clinical and pathophysiologic aspects. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 457-481.
109. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-205.
110. Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 152-157.
111. N. Dumoitier, S. Lofek, L. Mouthon, Pathophysiology of systemic sclerosis: state of the art in 2014. *Press. Medicale* 2014; 43:e267-e278.
112. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep* 2014; 6:13.
113. Volkman ER, Varga J. Emerging targets of disease-modifying therapy for systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2019; 15: 208-224.
114. Boleto G, Allanore Y, Avouac J. Targeting Costimulatory Pathways in Systemic Sclerosis. *Front Immunol* 2018; 9: 2998.
115. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 583-594.
116. 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.

117. Torok KS, Kurzinski K, Kelsey C, 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.
118. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2455-2463.
119. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. *Arthritis Res Ther* 2014;16: R4.
120. Radstake TR, van Bon L, Broen J, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PLoS One* 2009; 4:e5903.
121. Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, et al. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clin Immunol* 2011; 139: 249-257.
122. Almanzar G, Klein M, Schmalzing M, et al. Disease Manifestation and Inflammatory Activity as Modulators of Th17/Treg Balance and RORC/FoxP3 Methylation in Systemic Sclerosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2016; 171: 141-154.
123. Zhou Y, Hou W, Xu K, et al. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. *Hum Immunol* 2015; 76: 22-29.
124. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R166.
125. Cipolla E, Fisher AJ, Gu H, et al. IL-17A deficiency mitigates bleomycin-induced complement activation during lung fibrosis. *FASEB J* 2017; 31: 5543-5556.
126. Park MJ, Moon SJ, Lee EJ, et al. IL-1-IL-17 Signaling Axis Contributes to Fibrosis and Inflammation in Two Different Murine Models of Systemic Sclerosis. *Front Immunol* 2018; 9: 1611.
127. Wei L, Abraham D, Ong V. The Yin and Yang of IL-17 in Systemic Sclerosis. *Front Immunol*. 2022 May 4;13:885609.
128. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005; 105: 4743-4748.
129. Wang Y, Zhang S, Liang Z, et al. Metformin attenuates bleomycin-induced scleroderma by regulating the balance of Treg/Teff cells and reducing spleen germinal center formation. *Mol Immunol* 2019; 114: 72-80.
130. Gilbane AJ, Denton CP, Holmes AM. Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells. *Arthritis Res Ther* 2013; 15: 215.
131. Liang M, Lv J, Chu H, et al. Vertical inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling demonstrates in vitro and in vivo anti-fibrotic activity. *J Dermatol Sci* 2014; 76: 104–111.

132. Ponticos M, Papaioannou I, Xu S, et al. Failed degradation of JunB contributes to overproduction of type I collagen and development of dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 243-253.
133. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2476-2487.
134. Kim JM, Yoo H, Kim JY, et al. Metformin Alleviates Radiation-Induced Skin Fibrosis via the Downregulation of FOXO3. *Cell Physiol Biochem* 2018; 48: 959-970.
135. Sandset PM. CXCL4-platelet factor 4, heparin-induced thrombocytopenia and cancer. *Thromb Res* 2012; 129: S97-S100.
136. van Bon L, Affandi AJ, Broen J, et al. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 433-443.
137. Volkmann ER, Tashkin DP, Roth MD, et al. Changes in plasma CXCL4 levels are associated with improvements in lung function in patients receiving immunosuppressive therapy for systemic sclerosis-related interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 305.
138. Haddon DJ, Wand HE, Jarrell JA, et al. Proteomic Analysis of Sera from Individuals with Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis Reveals a Multianalyte Signature Associated with Clinical Improvement during Imatinib Mesylate Treatment. *J Rheumatol.* 2017; 44: 631-638.
139. Lande R, Lee EY, Palazzo R, et al. CXCL4 assembles DNA into liquid crystalline complexes to amplify TLR9-mediated interferon- α production in systemic sclerosis. *Nat Commun* 2019; 10: 1731.
140. Ah Kioon MD, Tripodo C, Fernandez D, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. *Sci Transl Med* 2018; 10:eaam8458.
141. Affandi AJ, Carvalheiro T, Ottria A, et al. CXCL4 drives fibrosis by promoting several key cellular and molecular processes. *Cell Rep.* 2022;38(1):110189.
142. Silva-Cardoso SC, Bekker CPJ, Boes M, Radstake TRDJ, Angiolilli C. CXCL4 is a driver of cytokine mRNA stability in monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol* 2019; 114: 524-534.
143. Rivera-Gonzalez G, Shook B, Horsley V. Adipocytes in skin health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4: a015271.
144. Marangoni RG, Korman BD, Wei J, et al. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67: 1062-1073.
145. Ghigliotti G, Barisione C, Garibaldi S, et al. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. *Inflammation* 2014; 37: 1337-1353.
146. Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, et al. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *J Clin Invest* 2016; 126: 4626-4639.
147. Reis BS, Lee K, Fanok MH, et al. Leptin receptor signaling in T cells is required for Th17 differentiation. *J Immunol* 2015; 194: 5253-5260.

148. Osborne LC, Joyce KL, Alenghat T, et al. Resistin-like molecule α promotes pathogenic Th17 cell responses and bacterial-induced intestinal inflammation. *J Immunol* 2013; 190: 2292-2300.
149. Mariani F, Roncucci L. Kimerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution. *Inflamm Res* 2015; 64: 85-95.
150. Ah Kioon MD, Tripodo C, Fernandez D, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. *Sci Transl Med* 2018; 10: eaam8458.
151. Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S, et al. Kimerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med* 2009; 206: 249-258.
152. Herenius MM, Oliveira AS, Wijbrandts CA, et al. Anti-TNF therapy reduces serum levels of kimerin in rheumatoid arthritis: a new mechanism by which anti-TNF might reduce inflammation. *PLoS One* 2013; 8: e57802.
153. Zylla S, Rettig R, Völzke H, et al. Serum kimerin levels are inversely associated with renal function in a general population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018; 88: 146-153.
154. Chighizola CB, Raschi E, Privitera D, et al. Serum kimerin in systemic sclerosis: a novel marker of early diffuse disease? *Clin Exp Rheumatol* 2017; 106: 223-224.
155. Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, et al. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 2005; 201: 509-515.
156. Hu W, Yu Q, Zhang J, et al. Rosiglitazone ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expression of kimerin and ChemR23 in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Inflammation* 2012; 35: 1287–1293.
157. Esteghamati A, Ghasemiesfe M, Mousavizadeh M, Noshad S, Nakhjavani M. Pioglitazone and metformin are equally effective in reduction of kimerin in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig* 2014; 5: 327-332.
158. Fassio A, Gatti D, Gisondi P, et al. Effects of secukinumab on serum adipocytokines: preliminary data. *Reumatismo* 2017;69: 105-110.