

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

JÜVENİL DERMATOMİYOZİT HASTALARININ KAS BİYOPSİLERİNDE
YARDIMCI T HÜCRE PROFİLLERİ

Dr. Erdal SAĞ

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2015

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**JÜVENİL DERMATOMİYOZİT HASTALARININ KAS BİYOPSİLERİNDE
YARDIMCI T HÜCRE PROFİLLERİ**

Dr. Erdal SAĞ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Beril TALİM

ANKARA

2015

TEŞEKKÜR

Pediatric eğitimim boyunca ben ve arkadaşlarım üzerinde büyük emeği olan, kendisini tanımış olmaktan ve son tez öğrencisi olmaktan gurur duyduğum emekli öğretim üyemiz sayın Prof. Dr. Gülsev Kale'ye, tez çalışması sırasında çok daha yakından tanıma şansı bulduğum, kişiliği ve hekimliği ile örnek aldığım, ilgisi ve her konudaki desteği ile her zaman bir tez danışmanından öte olan değerli hocam, sayın Yrd. Doç. Dr. Beril Talim'e, tezime ilgili araştırmalar yapabilmem için bana yurtdışı kapılarını açan, gerek pediatriye gerekse romatolojiye ilgi duymamın en büyük sebeplerinden rol modelim Çocuk Romatoloji Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Seza Özen'e, destekleri ve yardımları için Çocuk Nöroloji Bilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Haluk Topaloğlu ve sayın Prof. Dr. Gökür Haliloğlu'na, tez çalışmamın çeşitli aşamalarında büyük yardımları olan Çocuk Patoloji Ünitesi öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmamın her aşamasında hiç şikayet etmeden, işlerimi kendi işi gibi gören, büyük emek gösteren başta Şefika Yıldırım ve Pınar Bektaş olmak üzere tüm Çocuk Patoloji Ünitesi çalışanlarına teşekkür ederim.

Bilimin gelişmesi adına desteklerini esirgemeyen ve bu çalışmanın var olmasına en büyük katkıyı sağlayan tüm hasta ve hasta yakınlarına teşekkür ederim.

Tüm çalışma sürecinde hiç yanımdan ayrılmadan bana her anlamda destek olan eşim Aslıhan Taşkıran Sağ'a, aramıza yeni katılan oğlum Arda Sağ'a, tüm manevi desteklerini asla esirgemeyen her iki aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

SAĞ, E., Jüvenil dermatomyozit hastalarının kas biyopsilerinde yardımcı T hücre profilleri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Tezi. Ankara, 2015. Jüvenil dermatomyozit (JDM) patogenezi tam olarak aydınlatılmamış, tedavi edilmediği takdirde ciddi morbidite ve sonunda yüksek mortaliteye sebep olan önemli bir hastalıktır. Hastalığın temelinde otoimmünite, inflamasyon ve vaskülopatinin olduğu gösterilmiştir. Kas tutulumu bu hastalığın en önemli tutulumudur. Bu çalışmada, Türkiye'nin en büyük ve deneyimli kas biyopsisi merkezlerinden biri olan Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Çocuk Patoloji Ünitesi'nde tanı almış JDM hastalarının kas biyopsilerinde yardımcı T hücre profillerinin belirlenmesi amaçlanmış, ayrıca kas biyopsilerinde inflamasyona katılan diğer hücre grupları tanımlanmaya çalışılmıştır. Yeterli arşiv dokusuna ulaşılabilen toplam 26 JDM hastasının (13 erkek, 13 kız) kas biyopsilerinde immünohistokimyasal yöntemle CD3, CD20, CD138, CD68, IL-17, Foxp3, IFN- γ , IFN-alfa ve IL-4 ekspresyonu ile bunların klinikopatolojik korelasyonu incelenmiştir. JDM kas biyopsisi skorlama aracına göre biyopsiler değerlendirilmiştir. Biyopsilerin ortalama JDM biyopsi skoru 17,6 olup, orta-ağır kas tutulumuyla uyumlu bulunmuştur. İnflamatuvar hücreler biyopsilerin büyük kısmında ya perivasküler ve perimisyal alanda küçük kümeler halinde ya da endomisyumda dağılmış tek tek hücreler halindeyken, biyopsilerin ikisinde lenfoid doku benzeri büyük kümeler şeklinde, bir hastada neredeyse tüm kas liflerini ortadan kaldıracak şekilde yoğun ve yaygın halde görülmüştür. Yardımcı T hücre alt gruplarına bakıldığında biyopsilerin %80'inde Th1 (IFN- γ pozitif), %92'sinde Th17 (IL-17 pozitif), %30'unda *Treg* (Foxp3 pozitif) boyanması tespit edilmiştir. IL-4 pozitif inflamatuvar hücreler hiçbir biyopside saptanmamıştır. IFN-alfa sadece iki biyopside gösterilebilmiştir. Hastaların %73'ünde T hücreleri, %88'inde B hücreleri, %57'sinde plazma hücreleri ve %100'ünde makrofajlar mevcuttur. Klinik bulgulara bakıldığında serum CK düzeyinin hiçbir parametreyle ilişkili olmadığı, kas gücü MRC skorunun skorlama aracının kas lifi bölümü, patoloğun vizüel analog skoru ve makrofaj skorlarıyla ilişkili olduğu görülmüştür. Ayrıca vizüel analog skorunun hem klinik hem de patolojik parametrelerle kuvvetli ilişkili olduğu saptanmıştır. Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak JDM'nin, inflamatuvar ortamında B hücreleri, makrofajlar,

plazma hücreleri ve T hücreleri bulunduran bir hastalık olduğu; T hücre alt tiplerinden Th1 ve Th17'nin aracılık ettiği, Th2'nin patogeneze katılmadığı; *Treg* hücrelerinin inflamasyonda yer aldığı fakat fonksiyonlarının yeterli olmadığı söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Jüvenil dermatomyozit, yardımcı T hücre, sitokin, kas biyopsisi
Destekleyen Kuruluşlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, BAB6083 projesi, Proje No: 014 D04 101 013

ABSTRACT

SAG, E., T helper cell profile in the muscle biopsies of juvenile dermatomyositis patients. Hacettepe University Medical Faculty, Thesis in Pediatrics. Ankara, 2015. Juvenile dermatomyositis (JDM) is an important disease without an enlightened pathogenesis, which causes severe morbidity and high mortality if untreated. Autoimmunity, inflammation and vasculopathy are considered the basic pathogenetic mechanisms. Muscle involvement is the most important manifestation of the disease. In this study, we aimed to define the T helper cell profile in the muscle biopsies of JDM patients diagnosed at Hacettepe University İhsan Doğramacı Children's Hospital, Pediatric Pathology Unit, which is one of the largest and most experienced muscle biopsy centers in Turkey. In addition, other components of the inflammatory infiltration were assessed. 26 patients (13 female, 13 male) with sufficient muscle tissue were included in the study. Immunohistochemical expression of CD3, CD20, CD138, CD68, IL-17, Foxp3, IFN- γ , IFN-alpha and IL-4 and their clinicopathological correlations were studied and muscle biopsies were scored using the JDM muscle biopsy scoring tool. The mean JDM biopsy score was 17,6, meaning moderate to severe muscular involvement. Inflammatory cells were in small clusters in perimysium and perivascular area or scattered throughout the endomysium in most biopsies, however in two biopsies lymphoid follicle like like big clusters were observed and in one there was a very dense and diffuse inflammatory infiltration nearly destroying all the muscle architecture. As for T helper cell subtypes, 80% of the biopsies were Th1 positive, 92% Th17 positive and 30% Treg positive. No IL-4 positive inflammatory cell was detected in any of the muscle biopsies. Only two biopsies showed IFN-alpha positivity. 73% of the biopsies had T cells, 88% had B cells, 57% had plasma cells and 100% had macrophages. From the clinical aspect, serum creatine kinase level was not correlated with any parameter, however Medical Research Council (MRC) score for muscle strength was correlated with muscle fiber domain scores, visual analogue score of the pathologist and the macrophage infiltration scores. Visual analogue score of the pathologist was strongly correlated with both clinical and histopathological features. Based on these results, it can be concluded that B cells, macrophages, plasma cells and T cells constitute the inflammatory milieu of the JDM muscle biopsies; JDM is a disease related with Th1

and Th17 T helper cell subtypes; Th2 cells are not involved in the pathogenesis; Tregs are present but not fully functional.

Key words: Juvenile dermatomyositis, T helper cell, cytokine, muscle biopsy

Supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit, BAB6083 project, Project No: 014 D04 101 013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tanım ve Sınıflama	3
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Etiyoloji	3
2.3.1. Çevresel Etkenler	4
2.3.2. Genetik ve İmmünolojik Etkenler	4
2.3.4. Etnik ve Coğrafi Etkenler	5
2.4. Patogenez	5
2.4.1. Vaskülopati	5
2.4.2. MHC-1 Ekspresyonunda Artma	6
2.4.3. Otoantikolar	6
2.4.4. İnflamasyon	8
2.4.5. Diğer Faktörler	11
2.5. Klinik Bulgular	12
2.5.1. Konstitüsyonel Belirti ve Bulgular	14
2.5.2. Kas-iskelet Sistemi Bulguları	14
2.5.3. Cilt Bulguları	15
2.5.4. Akciğer Tutulumu	16
2.5.5. Lipodistrofi	16
2.6. Tanı	16
2.7. JDM ve Kas Biyopsisi	17

2.8. Tedavi	19
2.9. Çalışmanın Amacı	21
3. HASTALAR, GEREÇLER VE YÖNTEMLER	21
3.1. Hastalar	21
3.2. Histopatoloji	22
3.2.1. İmmünohistokimyasal Boyama	22
3.2.2. Mikroskopik Değerlendirme	25
3.3. İstatistiksel Yöntemler	26
3.4. Etik Kurul Onayı	27
4. BULGULAR	27
4.1. Demografik Özellikler	27
4.2. Klinik ve Laboratuvar Bulguları	27
4.3. Histopatolojik Bulgular	30
4.3.1. İnflamatuvar Hücreler ve Sitokinler	35
5. TARTIŞMA	47
5.1. Hastaların Özellikleri	47
5.2. Histopatolojik Özellikler	50
5.2.1. Genel Bakış	50
5.2.2. Yardımcı T Hücreleri ve Sitokinleri	51
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANA	Anti nükleer antikor
Anti EJ	Anti glisil-tRNA sentetaz
Anti Ha	Anti tirozil-tRNA sentetaz
Anti HMGCR	Anti <i>3-Hydroxy-3- Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase</i>
Anti Jo-1	Anti John-1
Anti KS	Anti asparajinil-tRNA sentetaz
Anti Ku	Anti deoksiribonükleik asit-ilişkili protein
Anti La	Anti ribonükleoprotein
Anti Mi-2	Anti deoksiribonükleik asit helikaz
Anti OJ	Anti izolösil-tRNA sentetaz
Anti PM-Scl	Anti nükleolar multi-protein kompleks
Anti PL-7	Anti <i>threonyl-tRNA</i> sentetaz
Anti PL-12	Anti alanil-tRNA sentetaz
Anti Ro	Anti ribonükleoprotein
Anti SRP	Anti <i>signal recognition particle</i>
Anti Topo	Anti deoksiribonükleik asit topoizomeraz 1
Anti U1-RNP	Anti U1 ribonükleoprotein
Anti U3-RNP	Anti U3 ribonükleoprotein
Anti Zo	Anti fenilalanil-tRNA sentetaz
AST	Aspartat transaminaz
Bcl 2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
C3	Kompleman 3
CAT	<i>Cutaneous Assessment Tool</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CCL20	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
CHAQ	<i>Childhood Health Assessment Questionnaire</i>
CK	Kreatin kinaz
CMAS	<i>Childhood Myositis Assessment Scale</i>
COX	Sitokrom-C-oksidad
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidine

DAS	<i>Disease Activity Scale</i>
EMG	Elektromiyografi
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
GCP-2	<i>granulocyte chemotactic protein 2</i>
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H&E	Hematoksilen ve eozin
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN	İnterferon
IgG	İmmünglobulin G
IgM	İmmünglobulin M
IL	İnterlökin
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell α chemoattractant</i>
IPEX	İmmün fonksiyon bozukluğu, Poliendokrinopati, Enteropati, X'e bağılı kalıtım
IQR	Çeyreklikler arası mesafe
ISG15	<i>Interferon-stimulated gene 15</i>
IV	İntravenöz
IVIG	İntravenöz immünglobulin
γ	Gama
JDM	Jüvenil dermatomiyozit
kg	kilogram
LDH	Laktat dehidrogenaz
m ²	metrekare
MAA	<i>Myositis associated antibodies</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MDA-5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MIG	<i>monokine induced by gamma-interferon</i>
MIP	makrofaj inflamatuvar protein
mg	miligram
μ L	mikrolitre
MMT8	<i>Manual Muscle Testing 8</i>

MSA	<i>Myositis spesific antibodies</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MRC	<i>Medical Research Council</i>
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
NF-κB	Nükleer faktör kapa B
NK	Doğal öldürücü
NM	Neonatal miyozin
NXP2	Nükleer matriks protein 2
ort.	Ortalama
PBS	Fosfat tamponlu salin solüsyonu
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
SDH	Süksinik dehidrojenaz
TGF-β	<i>Transforming growth factor- beta</i>
Th	<i>T helper</i>
TIF-1	<i>transcriptional intermediary factor 1</i>
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-α
Treg	<i>Regulatory T</i>
tRNA	Transfer Ribonükleik Asit
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin–deoxy uridytriphosphate nick end labeling</i>
VAS	Vizüel analog skor
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Jüvenil dermatomiyozitin patogenezi	12
Şekil 3.1.	Jüvenil dermatomiyozit kas biyopsisi skorlama aracı	26
Şekil 4.1.	Biyopsi skorlama aracı parametreleri	31
Şekil 4.2.	İnflamasyon bölümü skorlarının diğer bölüm skorlarıyla ilişkisi	32
Şekil 4.3.	JDM kas biyopsisinde COX eksikliği	34
Şekil 4.4.	İnflamatuvar hücrelerin çeşitli infiltrasyon tipleri	36
Şekil 4.5.	Kas biyopsilerindeki inflamatuvar ortamın bileşenleri	37
Şekil 4.6.	T hücre skorlarının B hücre, makrofaj, IL-17, inflamasyon bölümü ve total biyopsi skorlarıyla ilişkisi	38
Şekil 4.7.	İnflamatuvar hücrelerde IFN-alfa ile pozitif boyanma	39
Şekil 4.8.	Kas liflerinde IL-4 ile pozitif boyanma	40
Şekil 4.9.	İnflamatuvar hücrelerde Foxp3 ile pozitif boyanma	41
Şekil 4.10.	Kas biyopsilerinde etkilenen alanlarda IFN-γ ile yama şeklinde pozitif boyanma	43
Şekil 4.11.	Kas biyopsilerinde etkilenen alanlarda IL-17 ile yama şeklinde pozitif boyanma	45
Şekil 4.12.	IL-17 skorlarının T hücre, B hücre ve inflamasyon bölümü skorlarıyla ilişkisi	46
Şekil 4.13.	MRC skorlarının histolojik parametrelerle ilişkisi	47

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Jüvenil dermatomiyozit ile ilişkili otoantikolarlar	7
Tablo 2.2. Jüvenil dermatomiyozitin klinik bulguları	13
Tablo 2.3. Jüvenil dermatomiyozit Bohan ve Peter tanı kriterleri	17
Tablo 2.4. Jüvenil dermatomiyozitte tedavi seçenekleri	20
Tablo 3.1. Kullanılan primer antikolarlar	24
Tablo 4.1. Hastaların biyopsi anındaki temel laboratuvar değerleri	29
Tablo 4.2. Kas biyopsilerinde skorlama aracının alt bölümleri arasındaki korelasyon	33
Tablo 4.3. İnflamasyon bileşenlerinin birbirleriyle ilişkisi	39

1. GİRİŞ

Dermatomiyozi ilk kez 1887 yılında dört farklı araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacıardan Unverricht, hastalığın kutanöz ve müküler bulgularını tanımlayıp *dermatomiyozi* terimini ortaya atmıştır (1). Jüvenil Dermatomiyozi (JDM) çocukluk çağında görülen, esas olarak cilt ve kası tutan, etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılmamış bir otoimmün vaskülopatidir (2). Erişkinlerden farklı olarak çocukluk çağında ciddi deri tutulumu (kalsinoz, ülserasyon), akciğer tutulumu, gastrointestinal vaskülopati ve santral sinir sistemi tutulumu gözlenebilir (2). Hastalığın patogenezinde otoantikolar, doku inflamasyonu ve vaskülopati bulunmaktadır. Son yıllarda çeşitli sitokinlerin hastalık patogenezine olan etkileri araştırılmaya başlanmış ve olası hedef moleküller belirlenip onlara yönelik tedavi seçenekleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Literatürde çevresel etkenler ve genetik yatkınlık zemininde kas dokusunda '*Major Histocompatibility Complex*' (MHC) I molekülünün artışı, damar duvarında kompleman aktivasyonu, Th17 (yardımcı T hücre, Th), B hücresi ve plazmositoid dentritik hücre infiltrasyonu, Tip 1 İnterferon (IFN) ve onun indüklediği sitokinlerde artışa bağlı doku hasarı şimdiye kadar gösterilen mekanizmalar arasındadır (3-9). Düzenleyici T hücrelerinin (*Treg*) ciltte neden azaldığına ve B hücreleri ile T hücreleri arasındaki bağın ne olduğuna dair veri olmaması ile erişkin kasında Th1 yanıtı ve IFN- γ ekspresyonunun daha fazla olmasına rağmen JDM biyopsilerinde Th1 yanında Th17'nin de etkili olduğunun gösterilmesi, yardımcı T hücrelerinin patogenezde ne ölçüde etkili olduğunun sorgulamasına neden olmaktadır.

CD4 (+) yardımcı T hücreleri kazanılmış immün yanıtların düzenlenmesinde ve yabancı patojenlere karşı mücadelede temel bir role sahiptir. Bu hücreler, sitokin sentez profiline ve bazı transkripsiyon faktör ekspresyonuna göre Th1, Th2, Th17, Th9 ve *Treg* olmak üzere beş kategoride incelenmektedir (10, 11). Son yıllarda yapılan çalışmalarda fonksiyonel Th1 yanıtı oluşturamayan hayvan modellerinde yine de otoimmün hastalıklar geliştirilebilmesi, klasik düşünceenin aksine otoimmüniteden yalnızca Th1'in sorumlu olmadığını düşündürmüştür. Bu gözlemden sonra yapılan çalışmalarda Th17'nin de otoimmüniteden sorumlu olduğu öne sürülmüştür (12). CD4 (+) yardımcı T hücre ailesinin bir diğer üyesi ise *Treg*

hücreleridir. Bu hücreler diğer T hücrelerinin fonksiyonlarını düzenler ve vücudun kendi antijenlerine karşı toleransını sağlar.

Ciddi organ tutulumlarıyla seyreden JDM'nin temel klinik özellikleri ve tedaviye yanıtları ile ilgili bilgiler giderek çoğalmaktadır. Ancak bütün bu gelişmelere rağmen halen etiyojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmanın amacı, JDM hastalarının kas biyopsilerindeki inflamatuvar ortamda bulunan hücrelerin tanımlanması, yardımcı T hücre grupları ve diğer hücreler arasındaki dengelerin hastalık patogeneziindeki rolünün araştırılmasıdır. Bunun için, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Patoloji Ünitesi'nde kas biyopsisi ile JDM tanısı alan hastaların dondurulmuş doku örneklerinden alınan kesitlerde hücre alt tipleri için immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Bu boyamalarla elde edilen biyopsi skorlarının, klinik bulgular ile ilişkilendirilmesi planlanmıştır. Sonuçlarımızın bu hastalığa daha özgül tedavide de yol gösterici olacağını ummaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım ve Sınıflama

Jüvenil dermatomyozit karakteristik cilt bulguları, kas güçsüzlüğü ve çeşitli organ tutulumlarıyla seyreden, çocukluk çağının en sık inflamatuvar miyopatisidir. Çocukluk çağında kronik inflamatuvar miyopatiler çok heterojen olmakla birlikte, jüvenil dermatomyozitli çocuklar hastalığın tipik cilt ve kas bulgularına sahiptir (13-18).

Daha nadir olmakla beraber, çocukluk çağında JDM dışındaki diğer inflamatuvar miyopatiler de görülmektedir. Polimiyozit, inklüzyon cisimcikli miyozit, fokal miyozit, orbital miyozit, eozinofilik miyozit ve diğer bağ doku hastalıkları ile beraber görülen '*overlap* sendrom' bunlara örnektir (19).

2.2. Epidemiyoloji

Çeşitli ülkelerde dermatomyozitin görülme sıklığı açısından birbirinden farklı rakamlar bildirilmiş olsa da erişkindeki prevalansı yaklaşık olarak 10/1.000.000, çocuklarda ise bu oran 3,2/1.000.000'dur (20-22).

JDM kızlarda erkeklere oranla 2,3 kat daha sık görülür (15, 21). Küçük yaşlarda ise kız ve erkeklerde hastalığın görülme sıklığının benzer olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur (23). JDM'nin ortalama görülme yaşı 7 yaş civarı olmakla beraber, yakın zamanda yayınlanan 286 hastalık bir çalışmada, hastaların %25'inin 4 yaşından küçük olduğu görülmüştür (24).

2.3. Etiyoloji

JDM'nin etiyojisi halen tam olarak bilinmemektedir fakat multifaktöriyel olduğu hakkında görüş birliği bulunmaktadır. Birçok çalışmada hastalığa sebep olduğu düşünülen çevresel, genetik ve immünolojik etkenler tanımlanmıştır.

2.3.1. Çevresel Etkenler

JDM'nin başlangıcıyla ilgili çevresel faktörler sıkça araştırılmıştır. Geniş bir kohortta ve başka bir vaka-kontrol çalışmasında, hastalığın başlangıcından birkaç ay öncesinde hastalarda yüksek oranda enfeksiyon bulguları varlığı gösterilmiştir (24, 25). Özellikle Hispanik ırkta, p155/140 otoantikoru pozitif, HLA-DBB1*0301 alleleline sahip hastaların doğdukları mevsimlerin benzer olması (sonbahar), perinatal çevresel faktörlerin de hastalığın etiolojisinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür (26). Bunun yanında çeşitli ilaçlara, biyolojik ajanlara, aşılarla ve ultraviyole ışığa bağlı hastalığın geliştiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (27).

2.3.2. Genetik ve İmmünolojik Etkenler

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla otoimmün hastalıkların genetik temelleri hakkındaki bilgiler önemli ölçüde artmıştır. Bunlar kompleks poligenik hastalıklar oldukları için, birden fazla genetik lokus hastalığa yatkınlığa sebep olabilmektedir. Özellikle '*Major Histocompatibility Complex*' (MHC) içindeki 'insan lökosit antijeni' (HLA) bölgesi insan genomunun en polimorfik bölgelerinden olup, JDM de dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalık gelişiminin riskini artırdığı gösterilmiştir. HLA-B*08, DRB1*0301, DQA1*0301, DQA1*0501 ve DPB1*0101 allelleri hem çocuk hem erişkinlerde dermatomyozit için artmış riskle ilişkilirken, oto-reaktif T hücrelerinin timusta eliminasyonundan sorumlu olduğu düşünülen DQA1*0201, DQA1*0101 ve DQA1*0102 allelleri dermatomyozit hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha az saptanmıştır (22, 28-32).

İnflamatuvar yolak ile ilgili başka genetik lokuslar da saptanmıştır. Pro-inflamatuvar sitokin genlerinden Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF- α), İnterlökin-1 α (IL-1 α) ve IL-1 β , lenfosit sinyal yolağı ile ilgili PTPN22 (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) ve immünglobulin ağır zincir genlerinin JDM için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. TNF308A ve IL-1 polimorfizminin kalsinoz gelişimini artırdığı görülmüştür (33-36).

2.3.3. Etnik ve Coğrafi Etkenler

Dermatomyozit dünya genelinde geniş bir dağılıma sahiptir. Erişkinlerde yapılan bir araştırmada 55-64 yaş arası siyah kadınlarda dermatomyozit görülme sıklığının aynı yaş beyaz kadınlara göre 10 kat daha fazla olduğu gösterilmiş fakat çocuklarda beyaz ve siyah ırk arasında belirgin bir fark saptanmamıştır (21).

2.4. Patogenez

JDM patogenezini ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu, hastalığın otoimmün bir vaskülopati olduğunu göstermektedir. Her ne kadar patogenezde erken evrelerde neyin daha baskın olduğu tam olarak kanıtlanamamışsa da, kasta kapiller endoteline karşı immün yanıt, plazmositoid dendritik hücre infiltrasyonu ve buna bağlı tip I interferon cevabı ile miyofibrillerin yüzeyinde '*MHC class I*' artışının patogenezde esas rolü oynadığı düşünülmektedir (22, 37, 38).

2.4.1. Vaskülopati

Whitaker ve Engel tarafından inflamatuvar miyopatilerde iskelet kaslarının damar duvarında kompleman ürünleri ve immünglobulinlerin gösterilmesi, immün kompleks aracılı vaskülopatinin hastalığı başlatan faktörlerden biri olduğunu ortaya koymuştur (39). Başka çalışmalarda da DM'de damar duvarlarında IgG, IgM, C3 ve membran atak kompleksinin depolandığının gösterilmesi, bu hipotezi desteklemektedir (39-41). Membran atak kompleksi depolanması ve kapiller kaybın hastalığın başlangıcında hatta histolojik değişikliklerden daha önce olduğu düşünülmektedir (42, 43). Kapiller kayıp ve mononükleer hücre infiltrasyonu ile uyumlu olacak şekilde, JDM kaslarında anjiyojenik yanıtın olmaması ve anjiyostatik kemokinlerin yüksek oranda ifade edilmesi de vaskülopati olasılığını güçlendirmektedir (44). Neovaskülarizasyon daha sonra gerçekleşmeye başlar. JDM hastalarının kaslarında hem anjiyojenik hem de antianjiyojenik genler ifade edilir ve bunların içinde hem lökosit trafiğini düzenleyen hem de anjiyojenik bir madde olan lökosit adezyon molekülleri önemli yer tutar (45). *Intercellular Adhesion Molecule-1*

(ICAM-1) de JDM hastalarının kaslarında, kapillerler ve perimisyal büyük damarlarda selektif olarak fazla oranda bulunmaktadır (46). Bununla birlikte faktör 8 ilişkili antijen, fibrinopeptit-A ve C3'ün plazmada artmasının endotel hasarına, potent bir antianjiyogenik faktör olan trombospondin-1 artışının ise vasküler tromboza neden olabileceği gösterilmiştir (47, 48).

2.4.2. MHC-1 Ekspresyonunda Artma

JDM patogenezinin erken dönemlerinde gerçekleşen bir diğer önemli olay da kas liflerinin özellikle sarkolemmasında MHC-1 ekspresyonunun artmasıdır. Bu olay inflamatuvar hücre infiltrasyonundan önce gerçekleşmektedir (4, 49-51). Normal kas hücreleri MHC-1 eksprese etmezken JDM'de bu antijenler oldukça yüksek miktarlarda eksprese edilirler. Miyofibrillerdeki MHC-1 aşırı ekspresyonu katlanmamış veya yanlış katlanmış protein cevabı ile birlikte endoplazmik retikulum stresine yol açar. Bu olay daha sonra Nükleer faktör kappa B (NF-κB) yolağının aktivasyonuna ve kas hasarına neden olur (49). Transgenik bir fare modelinde, artmış MHC-1 ekspresyonu, tek başına, makrofaj infiltrasyonunun ön planda olduğu polimiyozite neden olmuştur (52). Yine genç farelerde yapılan bir çalışmada MHC-1 aşırı ekspresyonunun daha hızlı ve ciddi patolojik bulgular ve kas zayıflığına sebep olduğu görülmüştür. Endoplazmik retikulum stres cevabında görevli genlerde belirgin ve hızlı bir artış, kas yapısıyla ilgili genlerde ise azalma saptanmıştır (53).

2.4.3. Otoantikolar

Otoantikolar JDM'de sıklıkla pozitifdir. Hastalıkla ilgili otoantikolar temel olarak iki alt grupta incelenir: Miyozit spesifik antikolar (MSA) ve miyozit asosiye antikolar (MAA) (Tablo 2.1). MSA'lar genel olarak protein sentezine veya nükleer transkripsiyona katılan sitoplazmik veya nükleer yapılara karşı gelişir (örn. Aminoasil-tRNA sentetaz) ve bu otoantikolar miyozite veya hastalık alt gruplarına özgüdür. MAA'lar ise daha ziyade diğer otoimmün hastalıklarda veya 'overlap' sendromlarda görülen otoantikolardır. Eğer serolojik testler uygulanırsa, farklı etnik kökenlerde görülme sıklıkları değişmekle beraber, JDM hastalarının yaklaşık

%70'inde bir veya daha fazla MSA veya MAA saptanabilir (32, 35, 54). Otoantikörlerin klinik korelasyonlarının bir çoğu erişkin dermatomyozit hastalarıyla paralellik gösterir. Örneğin anti-PM-Scl skleroderma benzeri bulgularla, anti-Jo-1 interstisyel akciğer hastalığıyla ve diğer kas dışı bulgularla, anti-SRP ağır polimiyozitle ve anti-Mi-2 klasik JDM döküntüsü ve daha hafif seyirli bir hastalıkla ilişkilidir (27, 32, 55). Yapılan çalışmalarda hem erişkinlerde hem de çocuklarda çeşitli risk allellerinin bazı otoantikörlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin HLA-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 haplotipinin anti-PM-Scl ile, HLA-DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03 haplotipinin anti-U1-RNP ile, HLAB*08-DRB1*0301-DQA10501-DPB1*0101 haplotipinin ise anti-Jo-1 ile ilişkili olduğu görülmüştür (22, 28, 29, 32).

Tablo 2.1. Jüvenil dermatomyozit ile ilişkili otoantikörler

MSA (Miyozit spesifik antikorlar)	MAA (Miyozit asosiyе antikorlar)
Anti Jo-1	Anti U1-RNP
Anti PL-12	Anti U3-RNP
Anti PL-7	Anti PM-Scl
Anti EJ	Anti Ro
Anti OJ	Anti La
Anti KS	Anti Ku
Anti Ha	Anti Topo
Anti Zo	Yeni tanımlanmış
Anti Mi-2	Anti p155/140 (TIF-1gama)
Anti SRP	Anti p140 (NXP2)
Anti HMGCR	Anti MDA-5

Bunların dışında hastalığın patogenezi ile ilişkili yakın zamanda birçok yeni otoantikör tanımlanmıştır. 155kDa protein ya da TIF-1 (*transcriptional intermediary factor*) gama proteine karşı gelişen anti-p155/140 veya anti-TIF-1gama, JDM hastalarının %23-29'unda saptanmış, daha ciddi cilt tutulumu ve lipodistrofi ile seyreden hastalığa neden olan bir otoantikördür. Erişkinlerde kanser ilişkili dermatomyozitle ilişkisi gösterilse de, çocuklarda benzer bir birliktelik yoktur (56-

58). Nükleer matriks proteinine karşı oluşan anti-p140 veya anti-NXP2 daha yüksek kalsinoz riskine neden olan yeni tanımlanmış bir otoantikordur (56). Son olarak hastaların yaklaşık %7'sinde saptanan anti-MDA-5 otoantikörünün histolojik ve klinik olarak daha hafif kas tutulumu olmasına rağmen daha ciddi cilt ülserleri, oral ülserler ve interstisyel akciğer hastalığı ile birliktelik gösterdiği görülmüştür (59).

2.4.4. İnflamasyon

Vaskülopati ve artmış MHC-1 ekspresyonu sonrası JDM kaslarında özellikle perimisyal ve perivasküler alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu meydana gelmektedir. Bu inflamasyonda plazmositoid dendritik hücreler baskın olmakla birlikte CD4 (+) T lenfositler, Th17 hücreler, B hücreleri ve makrofajlar bulunmaktadır (60). Bu lezyonlarda aktif plazmositoid dendritik hücrelerin baskın olması, hastalığın karakteristik özelliği olan tip-1 interferon yanıtına ve buna bağlı büyük miktarda interferon ilişkili gen ifadesine ve kemokin üretimine neden olur (61, 62). Tip-1 interferon ile indüklenebilen gen ürünleri periferik kanda da artar ve bunların miktarı özellikle hastalığın kas tutulumuyla korelasyon göstermektedir (62). Tip-1 interferon yanıtı, miyofibrillerde daha fazla MHC-1 ekspresyonu, T hücre yaşamının uzaması, proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin [*monokine induced by gamma-interferon/ Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (MIG/CXCL9), Interferon-inducible T-cell α chemoattractant (I-TAC)/CXCL11, makrofaj inflamatuvar protein (MIP), monosit kemoatraktan protein (MCP)-1 ve MCP-2]* indüklenmesi, lenfositlerin inflamasyon sahasına göçüne sebep olması ve anjiyostaz yaratması nedeniyle hastalık progresyonunu devam ettirir (60, 62). TNF- α , IL-1 α ve IL-1 β gibi diğer pro-inflamatuvar sitokin ve kemokinler de kası infiltre eden inflamatuvar hücreler, miyofibriller ve endotel hücreleri tarafından üretilerek mevcut inflamasyona katkıda bulunurlar (9, 63).

T hücreleri; B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücreler tarafından sunulan antijenleri tanıyan, antijene karşı uygun yanıtın verilmesi ve düzenlenmesinden sorumlu olan, kazanılmış bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Antijen sunumu MHC molekülleri aracılığı ile olur. MHC-I tarafından sunulan hücre içi antijenler veya proteinler sitotoksik CD8 (+) T hücreleri tarafından

tanınır. Hücre tarafından endozomlarda işlenmiş hücre dışı patojenler veya hücreye ait peptitler MHC-II tarafından CD4 (+) T hücrelerine sunulur. Yardımcı T hücreleri sitokin sentez profiline ve bazı transkripsiyon faktör ekspresyonuna göre Th1, Th2, Th17, Th9 ve düzenleyici T hücreleri (*Treg*) olmak üzere beş kategoride incelenmektedir (64).

Th1 hücreleri temel olarak interferon- γ (IFN- γ) salgılar, antijen sunan hücreler tarafından sunulan antijenler ve hücre içi patojenlerin temizlenmesinden sorumludur. Bu hücrelerden farklı olarak Th2 hücreleri temelde IL-4, IL-5 ve IL-13 salgılar. Bunlar ise hücre dışı patojenler ve parazitlerle mücadele eder. IL-12, Th1 ve IL-4, Th2 farklılaşmasından sorumludur (11). İnsanlarda ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalardan, Th1 hücrelerinin hücre aracılıklı otoimmün olaylarda (multipl skleroz, Crohn hastalığı, romatoid artrit, kresentik glomerulonefrit) ön planda olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca Th2 hücrelerinin allerjik olaylardan esas görevli hücreler olduğu düşünülmektedir (10, 11). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda fonksiyonel Th1 yanıtı oluşturamayan hayvan modellerinde yine de otoimmün hastalıklar geliştirilebilmesi klasik düşüncenin aksine otoimmüniteden yalnızca Th1'in sorumlu olmadığını düşündürmüştür. Bu gözlemden sonra yapılan araştırmalarda Th17'nin de otoimmünitede önemli rolü olduğu öne sürülmüştür (12, 65). Th17 hücreler ve *Treg* hücreler inflamatuvar ortama göre değişken rol alabilirler. IL-6 ve TGF- β varlığında denge Th17 tarafına kayıp inflamasyona yatkınlık getirirken sadece TGF- β varlığında denge *Treg* tarafına kayar ve inflamasyonun önüne geçilir (66). Th17'nin stabil kalmasını sağlayan IL-23'tür. IL-23 yokken IL-6 ve TGF- β naiv T hücreden Th17 dönüşümünü sağlayabilir fakat Th17 hücrelerin görevlerini yerine getirebilmeleri, çoğalmaları ve patojenik rollerini yapabilmeleri için IL-23 gereklidir (64, 67). IL-23'ün p19 alt ünitesinin olmadığı hayvan modellerinde Th17 yanıtının azaldığı ancak Th1 yanıtının normal olduğu saptanmıştır. Bu hayvan modellerinin otoimmün ensefalit, multipl skleroz veya romatoid artrit gelişimine karşı dirençli oldukları bulunmuştur. Bu gözlem otoimmünitenin gelişiminde Th17 aksının, Th1'den daha önemli olduğu sonucunu doğurmuştur (67). Başka bir çalışmada IL-23 ortamda yokken Th17 hücrelerin IL-12 ile muamele edildiğinde Th1 hücrelerin ana sitokini olan IFN- γ 'yı üretmeye başladığı gösterilmiş bu da Th17 hücrelerin plastisitesi hakkında çok önemli

ipuçlarını ortaya koymuştur (68). Th17 hücreleri, IL-17 üretimiyle IL-6, IL-1 ve TNF gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin, CXCL1, GCP-2 ve IL-8 gibi pro-inflamatuvar kemokinlerin salınımına yol açarlar. Bu inflamasyon araçları başta nötrofiller olmak üzere farklı lökosit alt tiplerinin ortamda çoğalmasına yol açarak hedef organ hasarını başlatırlar (69). Th17 hücrelerinin miyozitlerdeki önemi ilk kez 2003'te yapılan bir çalışmaya dayanmaktadır. İnsan miyeloblastlarının ve kas örneklerinin tek başına IL-17 ve IL-17 ile IL-1 β kombinasyonu ile uyarıldıklarında oluşan IL-6 ve CCL20/MIP3a üretiminin karşılaştırıldığı çalışmada, IL-17 ve IL-1 β kombinasyonunun daha fazla üretim ve sonuçta daha fazla hasara yol açtığı gösterilmiştir (70).

Yardımcı T hücre ailesinin bir diğer üyesi de düzenleyici T hücreleridir (*Treg*). Efektör T hücreleri inflamasyona yol açarken, *Treg* hücreleri inflamasyonu kontrol altına almakla sorumludur. *Treg* hücreleri bir transkripsiyon faktörü olan Foxp3 ekspresyonu ile ayırt edilirler. Timusta üretilen doğal *Treg* hücrelerinin dışında, naiv T hücrelerinden periferde TGF- β uyarısıyla dönüşen, indüklenebilir *Treg* hücreleri de mevcuttur. Gen ekspresyon paternleri arasında farklar olsa da, bu iki hücre alt popülasyonu arasında fonksiyonel fark bulunmamaktadır (64). *Treg* hücreleri '*self-tolerans*'ı sağlaması ve oto-reaktif efektör T hücrelerini baskılaması nedeniyle otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Foxp3 eksik farelerde yapılan bir çalışmada çoklu organ tutulumuyla giden ve aşırı efektör CD4(+) T hücreleri ve pro-inflamatuvar sitokinlerin eşlik ettiği bir otoimmün inflamasyon olduğu gösterilmiştir (71). İnsanlarda da Foxp3 mutasyonunun IPEX (İmmün fonksiyon bozukluğu, Poliendokrinopati, Enteropati, X'e bağlı kalıtım) sendromu olarak adlandırılan çoklu organ tutulumu ile seyreden otoimmün bir hastalığa sebep olduğu gösterilmiştir (72). *Treg* hücrelerinin tüm bu etkileri göz önüne alındığında ideal bir tedavi hedefi olabileceği düşünülmüştür fakat yapılan çalışmalarda *Treg* hücrelerinin de ortama bağlı olarak plastisite gösterdikleri, IL-6 ve TGF- β varlığında IL-17 üretmeye başladığı hatta bazı durumlarda efektör T hücreleri gibi IFN- γ ürettiği gösterilmiştir (73, 74). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, aktif JDM hastalarının periferik kanından ayrılan Foxp3+ *Treg* hücrelerinin *in vitro* şartlarda efektör T hücrelerini baskılama kabiliyetlerinin remisyondaki JDM hastalarına göre daha az olduğu gösterilmiş, aktif hastalık durumunda *Treg*

hücrelerinde fonksiyon kaybı yaşandığı belirtilmiştir (75). Bu çalışmalar *Treg* hücrelerinin hiç de stabil olmayan bir fizyolojisi olduğunu göstermiş ve tedavi hedefi olmaları konusundaki heyecanı azaltmıştır.

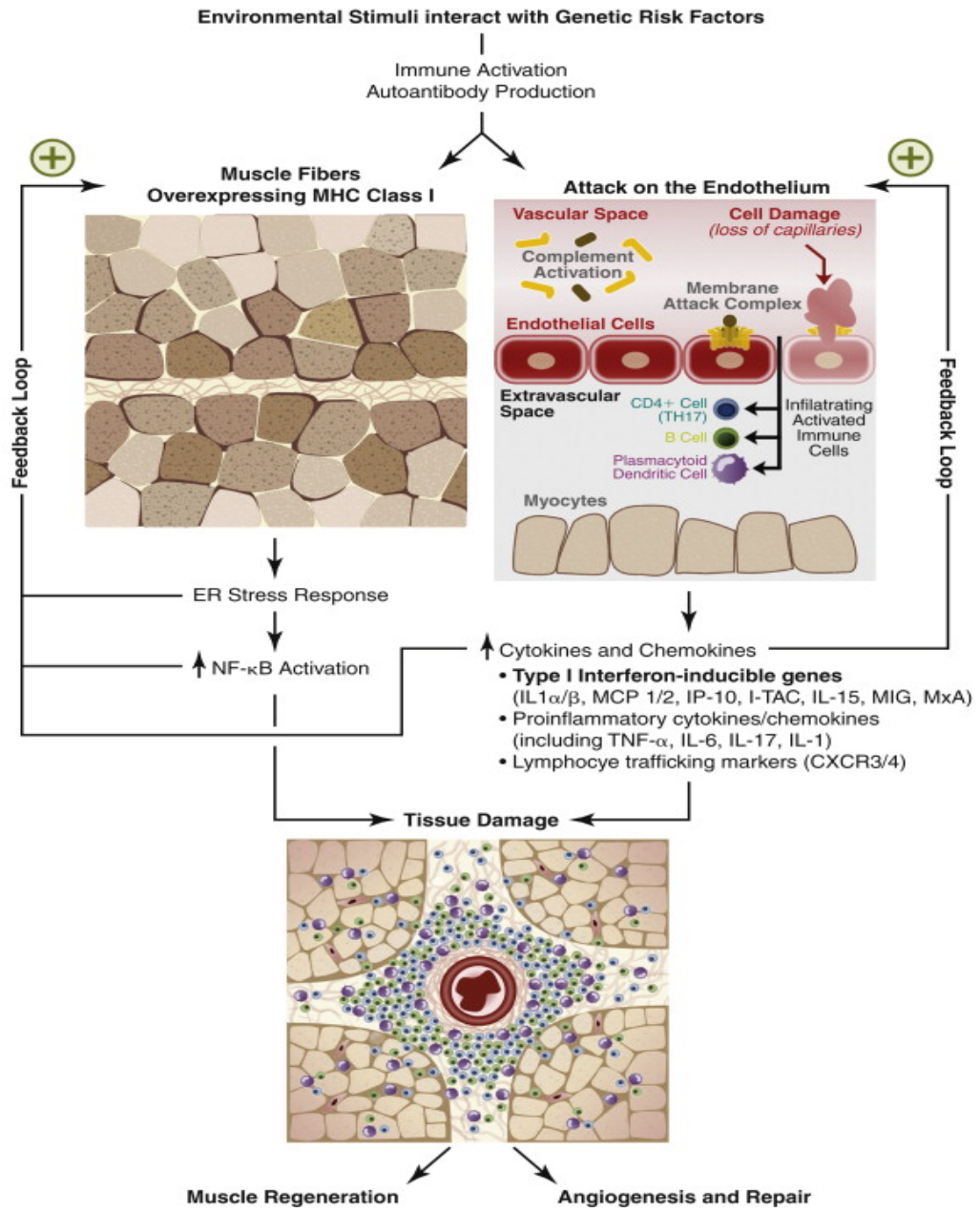
2.4.5. Diğer Faktörler

Miyofibrillerin apoptozunun regülasyonunda bozulma da patogeneze öne sürülen mekanizmalardandır. JDM hastalarının kas biyopsilerinde Bcl2 proteininin aşırı eksprese edildiğinin gösterilmesi, apoptoz yolağının belirteçleri olan TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling*) pozitif kas çekirdeklerinin ve kaspaz 3'ün gösterilmesi bu mekanizmanın en önemli kanıtlarındandır (76, 77).

Mikrokimerizm hastalık patogenezinde tartışılan bir diğer mekanizmadır. JDM hastalarının periferik kanında ve kas örneklerinde sadece hastanın değil aynı zamanda maternal kaynaklı inflamatuvar hücrelerin de gösterilmesi bu durumu desteklemektedir. Mikrokimerik hücrelerin JDM hastalarında sağlıklı kardeşlerine göre daha fazla miktarda olduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerin '*graft versus host*' benzeri bir etkiyle çeşitli otoimmün hastalıklara yol açabileceği düşünülmektedir (75, 78).

JDM patogenezi ile ilgili başlıca mekanizmalar Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

Şekil 2.1. Jüvenil dermatomyozitin patogenezi



Şekil 19 nolu kaynaktan aktarılmıştır.

2.5. Klinik Bulgular

Klasik JDM tanıdan 3-6 ay önce halsizlik, yorgunluk, kas güçsüzlüğü, ateş ve döküntünün saptandığı sinsi başlangıçlı bir hastalıktır. Bulguların ortaya çıkış hızı

değişken olmakla birlikte, hastaların yaklaşık üçte birinde ilerleyici kas güçsüzlüğü ve ağrı daha ani başlar (19) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Jüvenil dermatomyozitin klinik bulguları

Bulgular	Görülme sıklığı (%)
Çabuk yorulma	80-100
Malar döküntü	42-98
İlerleyici proksimal kas güçsüzlüğü	82-96
Klasik döküntü (heliotrop veya Gottron papülü)	35-91
Periungal tırnak yatağı kapiller değişiklikleri	80-91
Kas ağrısı ve hassasiyeti	25-73
Lenfadenopati	8-75
Artralji	25-66
Ateş	16-65
Artrit	10-65
Disfaji, disfoni	17-44
Dispne	5-43
Gastrointestinal bulgular	5-37
Ödem	11-32
Kas kontraktürleri	9-27
Kalsinoz	3-23
Cilt ülserleri	6-23
Hepatomegali	3-20
Anoreksi	18
Splenomegali	10-15
Özgün olmayan döküntü	10-15
Gingivitis	6

Tablo 19 nolu kaynaktan uyarlanmıştır.

2.5.1. Konstitüsyonel Belirti ve Bulgular

Hastalığın başlangıcında genellikle 38°C-40°C ateş görülür. Hasta çocukta çabuk yorulma ve muhtemelen kas güçsüzlüğü erken dönemde ortaya çıkar. Arkasından halsizlik, iştahsızlık ve kilo kaybı görülebilir. Aileler sıklıkla hastanın huzursuz olduğunu, kaba motor becerilerde bozulma, motor gelişim basamaklarında gerileme olduğunu fark ettiklerini belirtirler (19).

2.5.2. Kas-iskelet Sistemi Bulguları

Kas güçsüzlüğü simetrik ve proksimal başlangıçlıdır. Hastalar omuz-pelvik kuşağı kaslarındaki zayıflığa bağlı olarak elbise giymekte, saçlarını taramakta, oturup kalkmakta ve merdiven çıkmakta zorlanırlar. Fizik muayenede omuz ve kalça bölgesindeki proksimal kaslarda, boyun fleksörlerinde ve karın kaslarında zayıflık saptanır (79). Etkilenen kas hassastır, kasın üzerindeki ciltte ödem görülebilir. Fonksiyonel kas muayenesinde hasta oturduğu yerden kendi üzerine tırmanarak kalkar (Gowers bulgusu). İlerleyen dönemlerde distal kaslar da etkilenebilir. Dramatik güçsüzlüğe rağmen derin tendon refleksi genellikle korunmuştur. Farengial ve palatal kas tutulumuna bağlı yutma fonksiyon bozukluğu, disfoni, aspirasyon riski mevcuttur (80). Hastalığın takibi ve tedavi yanıtı değerlendirilirken kas enzimlerinin serum düzeyleri yeterli olamamaktadır, dolayısıyla her kontrolde kas kuvveti muayenesinin standart olarak aynı ölçütlerle değerlendirilmesi çok önemlidir. Boyun fleksörleri, omuz abdükörleri, bilek fleksör ve ekstansörleri, kalça fleksör, ekstansör, abdükör ve addükörleri, diz fleksör ve ekstansörleri, ayak bileği plantar fleksörleri değerlendirilmesi gereken kas gruplarıdır. Hastalığın standart olarak değerlendirilebilmesi için geliştirilmiş, geçerliliği ve hastalık aktivitesi ile korelasyonu ispatlanmış ölçeklere şunlar örnek verilebilir: CMAS (*Childhood Myositis Assessment Scale*), MMT8 (*Manual Muscle Testing*), DAS (*Disease Activity Scale*) ve CHAQ (*Childhood Health Assessment Questionnaire*) (81-85).

Bazı JDM hastalarında artralji veya geçici, hasar bırakmayan hafif artrit görülebilir. Tse ve ark. 80 JDM hastasının %61'inde artrit saptamış, bu vakaların %67'si oligoartikülerken %33'ünde poliartiküler tutulumun ön planda olduğunu

göstermiştir (86). Erken dönemde saptanan fleksiyon kontraktürlerinin sinovitten çok miyofasiyal inflamasyonun sekeli olacağı düşünülmelidir. Persistan artrit görülmesi durumunda ayırıcı tanıda mikst bağ dokusu hastalıkları gibi 'overlap' sendromlar akla gelmelidir.

2.5.3. Cilt Bulguları

Hastalığın en tipik cilt bulguları üst göz kapağında heliotrop renk değişikliği, el eklemleri üzerindeki Gottron papülleri ve diğer bölgelerdeki Gottron bulgusu, periungal eritem ve tırnak yatağı kapiller değişiklikleridir. Hastaların yaklaşık %75'inde hastalığın başlangıcında patognomonik cilt lezyonları mevcuttur (19, 87). Heliotrop döküntü pembe-mor renkte üst göz kapağını kaplayan sınırları belirsiz renk değişikliğidir. Gottron papülleri simetrik, eklemlerin ekstansör yüzlerinde parlak, eritematöz hipertrofik plaklardır. Sıklıkla proksimal interfalangeal eklemler üzerinde bulunurlar. Tırnak yatağı değişiklikleri hastaların neredeyse tamamında görülebilen, tırnak yatağı kapillerlerinin etrafında telanjiektaziler, halka halini almış damarlar, tromboz, kanama, tortiyosite ve tırnak yatağını besleyen damarlarda azalma olarak tanımlanabilir (88, 89).

Hastaların yaklaşık %50'sinde ışığa duyarlılık mevcuttur. Bu hastalarda güneş gören vücut kısımlarında malar döküntü, göğüs üst kısmında V şeklinde kızarıklık, yüzde eritem, eşarp benzeri döküntü görülebilmektedir (90). Işığa duyarlılığın hastalığın patogenezinde rol aldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (91).

Bunların dışında ciddi hastalık göstergesi olan diğer iki cilt bulgusu kalsinoz ve cilt ülserleridir. Her iki bulgu da hastalığın başlangıcında pek belirgin olmayıp ilerleyen dönemlerde ortaya çıkar. Hem kalsinoz hem de ülserasyonların belirli otoantikolarla birlikteliği olup, kötü prognozla ilişkilidir (19, 59, 92). Hastalığın cilt tutulumunu değerlendirmek için DAS ve CAT (*Cutaneous Assessment Tool*) kullanılabilir (85, 93).

2.5.4. Akciğer Tutulumu

Orta-ağır etkilenmiş hastalarda solunum kaslarındaki zayıflığa bağlı olarak restriktif tipte akciğer hastalığı görülebilmektedir. Yapılan bir çalışmada JDM hastalarının yaklaşık %50'sinde asemptomatik akciğer tutulumu olduğu gösterilmiştir (94). *Tansley ve ark.* anti-MDA-5 pozitif hastalarda interstisyel akciğer hastalığı görülme oranının diğer JDM hastalarına göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir (59).

2.5.5. Lipodistrofi

Lipodistrofi, özellikle vücudun üst yarısını ve yüzü etkileyen, cilt altı ve viseral yağ dokusunun yavaş fakat ilerleyici kaybıyla ortaya çıkan bir bulgudur. *Pope ve ark.* JDM'nin lipodistrofi ile birlikte görülen en sık sistemik otoimmün hastalık olduğunu bildirmiştir (95). Lipodistrofi hastalığın başlangıcında çok sık olmayıp ilerleyen hastalıkla birlikte görülmeye başlar. Kalsinoz, kas atrofisi, eklem kontraktürleri, yüzde döküntü, cilt tutulumu ve tırnak yatağı kapiller yoğunluğunda azalma lipodistrofi riskini artıran faktörlerdir (19, 96). *Tansley ve ark.* yeni tanımlanan anti-NXP2 pozitif hastalarda kalsinoz ve lipodistrofinin daha sık olduğunu göstermişlerdir (92).

2.6. Tanı

Hastalığın tanısı Bohan ve Peter kriterlerine göre konulmaktadır (97, 98) (Tablo 2.3). Karakteristik cilt döküntüsünün (Gottron papülü veya heliotrop döküntü) yanında iki kriterin daha olması 'olası JDM', karakteristik döküntünün yanında üç kriterin daha olması 'kesin JDM' tanısı için gereklidir. Simetrik kas güçsüzlüğü ve cilt döküntüsü neredeyse her zaman mevcutken diğer kriterler tanıya laboratuvar destek sağlarlar. Günümüzde uyluk kaslarının manyetik rezonans görüntülemesi (MRG) ile yağ baskılı T2-ağırlıklı sekanslarda simetrik kas ödeminin gösterilmesi, JDM tanısında elektromiyografinin (EMG) yerini almaya başlamıştır. Bu bulguların kas inflamasyonunu göstermedeki duyarlılığı yüksek olmakla beraber, diğer

miyopatiler ve müsküler distrofilerde de MRG'de dem görülebileceği için özgüllüğü düşüktür (99). Kas biyopsisi, özellikle cilt bulgularının olmadığı hastalarda, miyoziti göstermek için gereklidir (100).

Tablo 2.3. Jüvenil dermatomiyozit Bohan ve Peter tanı kriterleri (97,98)

1. Simetrik proksimal kas gszllğ
2. Karakteristik cilt değişiklikleri: Göz kapaklarında heliotrop döküntü, periorbital dem, eklemlerin ekstansör yüzeylerinde (metakarpofalengeal, proksimal interfalengeal eklem, diz, dirsek ve bileklerin dış yüzünde) eritematöz papüller (Gottron papülü)
3. Kas enzimlerinden bir ya da daha fazlasının serum düzeyinin yükselmesi (kreatin kinaz (CK), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), aldolaz)
4. Elektromiyografik olarak miyopati ve denervasyonun gösterilmesi
5. Kas biyopsisi (nekroz, kas lifi boyut farklılığı, perifasiküler atrofi, dejenerasyon ve rejenerasyon, özellikle perivasküler alanda olmak üzere mononükleer hücre infiltrasyonu)

2.7. JDM ve Kas Biyopsisi

Kas biyopsisi inflamatuvar miyopatilerin değerlendirilmesinde kullanılan vazgeçilmez tanı gereçlerinden biridir. Karakteristik deri döküntüsü olmayan hastalarda, hastalığın aktivitesinin değerlendirilmesinde, tedavi yanıtı alınamayan hastalarda diğer miyopatilerle ayırıcı tanı yapılmasında ve histopatolojik bulgulara göre hastalık alt tiplendirilmesinde önemli bilgiler sunar.

Wedderburn ve ark. 2007 yılında JDM hastalarının kas biyopsilerinin standart bir şekilde değerlendirilebilmesi için bir skorumu aracı ne sürmüşler, *Varsani ve ark.* da bu skorumu aracının hastalığın klinik parametreleri ile ilişkili olduğunu, hem tanı amaçlı hem de hastalığın ciddiyetini belirlemek amacıyla kullanılabileceğini göstermişlerdir (101, 102). Bu skorumu sisteminde kas biyopsisi bulguları genel anlamda dört ana başlıkta incelenmektedir.

Kas lifi bulguları

JDM hastalarında patolojik bulgular genel olarak perifasiküler alanda belirgindir. Perifasiküler alanda hem tip I hem de tip II kas liflerini etkileyen atrofi bulunmaktadır. Bu atrofi genellikle inflamasyonun eşlik etmediği kapiller hasarına bağlı oluşur. Beraberinde hem perifasiküler hem de fasikül içerisindeki alanlarda kas liflerinde bazofili, rejenerasyon, dejenerasyon, nekroz, belirgin nükleuslar saptanabilir. Normal kas liflerinde çekirdekler hücrenin periferinde bulunurken, JDM kaslarında yaklaşık olarak kas liflerinin %3'ünden fazlasında internal nükleuslar dikkati çekmektedir. Kas liflerinin çapları arasında da farklar oluşmaktadır. Etkilenen alanda immünohistokimyasal olarak neonatal miyozin pozitifliği görülebilir. Hastalığın patogenezinde de yer alan MHC-I ekspresyonunda artma immünohistokimyasal incelemede hem sarkolemmal hem de sarkoplazmik artmış boyanma şeklinde görülmektedir (101, 102).

Damar hasarı bulguları

Damar hasarına bakıldığında, JDM hastalarının kas biyopsilerinde endotelial hücrelerde şişme, lümeninde daralma veya tamamen kapanma, kas lifleri arasındaki kapillerlerde kayıp dikkati çekmektedir. Bu bulgular JDM'nin bir 'küçük damar vaskülopatisi' olduğunu doğrulamaktadır. Her ne kadar erişkin dermatomyozitinde JDM kaslarından daha sık görülse de, kas lifi grubunun infarktı da JDM skorlama aracında yerini almıştır (101, 102).

İnflamasyon ile ilgili bulgular

Kas dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu hastalığın en önemli mekanizmalarından biridir. Bu infiltrasyonlar sıklıkla perimisyal ve perivasküler alanda yoğunlaşmaktadır fakat bazı hastalarda endomisyal alanda da hücre infiltrasyonu görülebilmektedir. Skorlama aracı inflamasyon bölümünde CD3 (+) T hücreleri ve CD68 (+) makrofajların endomisyal, perimisyal ve perivasküler

infiltrasyonlarını değerlendirmektedir. Hastalığın patogenezinde önemli yer tutan B hücreleri ve plazmositik dendritik hücreler skorlama aracına dahil edilmemiştir.

Fibroz

Etkilenen kaslarda hem perimisyal alanda hem de endomisyal bölgelerde fibroz saptanmaktadır (101, 102).

Vizüel analog skala (VAS)

Skorlama aracı son olarak patoloğun kasın tamamı hakkındaki yorumunu, 0-10 puan arasında değerlendirebileceği VAS yardımıyla değerlendirmektedir. VAS skorunun hem klinik parametreler hem de histopatolojik bulgularla en kuvvetli korelasyonu gösteren değerlendirme bulgusu olması, JDM kaslarını değerlendirmede deneyimli bir patoloğun ne kadar önemli olduğu gerçeğini gözler önüne sermektedir (101, 102).

2.8. Tedavi

JDM tedavisinin temelini yüksek doz oral kortikosteroid tedavisi oluşturur. Steroid tedavisinin yan etkilerini azaltmak, hastalık aktivitesi, mortalite ve morbiditeyi en aza indirmek için gerekli durumlarda diğer immünsüpresif tedaviler de kullanılabilir (Tablo 2.4).

Hastalığın başlangıcında hızlı kontrol sağlamak için uygulanan intravenöz 10-30 mg/kg/gün metilprednizolon tedavisi sonrası oral 1-2 mg/kg/gün günlük prednizon tedavisi ve cilt altı veya oral metotreksat tedavisi ilk basamak tedavi olarak genel kabul görmüştür (22, 103, 104). Bunun yanında hızlı seyirli ve ciddi hastalık durumlarında kullanılacak ikinci basamak ilaçlar intravenöz immünglobulin (IVIG), siklosporin, azatiyoprin (22). Tedaviye yanıtı olmayan hastalarda aylık siklofosfamid tedavisinin, altı ayın sonunda kas gücü, kas enzimleri, kas dışı bulgular gibi hastalığın aktivite bulgularının tamamında düzelme veya

iyileşme sağladığı gösterilmiştir (105). Yine ritüksimab, mikofenolat mofetil ve takrolimus da tedavide faydası gösterilmiş ajanlardır (106-108).

İlaç tedavisinin yanında hastalara mutlaka fizyoterapi programı uygulanmalı, güneşten korunma ve gerektiği durumlarda güneş koruyucu kullanılması önerilmeli, steroid tedavisi ve kas zayıflığının kendisinin ortaya çıkarabileceği kemik etkilenmesinin önüne geçilebilmesi için kalsiyum ve D vitamini desteği sağlanmalıdır.

Tablo 2.4. Jüvenil dermatomyozitte tedavi seçenekleri

Birinci basamak tedaviler
Prednizon 1-2 mg/kg/gün Metilprednizolon 10-30 mg/kg/gün IV bolus Metotreksat 15 mg/m ² /hafta
Destek tedaviler
Hidroksiklorokin 3-6 mg/kg/gün Fizyoterapi Güneş ışığından korunma Cilt döküntüsü için topikal tedaviler
İkinci basamak tedaviler
IVIg 1-2 gr/kg/ay Siklosporin 2,5-7,5 mg/kg/gün Azatiyoprin 3-5 mg/kg/gün Kombinasyon tedavisi
Üçüncü basamak tedaviler
Siklofosfamid 500 mg/m ² /ay bolus Mikofenolat mofetil 30-40 mg/kg/gün Takrolimus 0,1-0,25 mg/kg/gün Ritüksimab Anti-TNF ajanlar Kombinasyon tedavisi

Tablo 22 nolu kaynaktan uyarlanmıştır.

2.9. Çalışmanın Amacı

Gelişen teknoloji ve artan ilgi ile birlikte otoimmün ve otoinflamatuar kökenli romatolojik hastalıklarda yeni hedef hücreler, proteinler, belirteç moleküller ve patogenetik yolaklar çok hızlı bir şekilde tanımlanmaya devam etmektedir. Patogenez basamakları aydınlandıkça, hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu çalışmanın amacı; juvenil dermatomyozit hastalarının kas biyopsilerindeki yardımcı T hücre alt tiplerini, bunların hastalık patogenezindeki yerini tanımlamak; hastalığın esas hedef organlarından biri olan kastaki inflamatuar ortamda bulunan hücreleri ve bunların birbirleriyle olan ilişkilerini ortaya koymak, bulguların klinik ile korelasyonunu kurmak, olası hedef hücre ve yolakları saptamaya çalışmaktır.

3. HASTALAR, GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Hastalar

Kesitsel bir araştırma olan bu çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Patoloji Ünitesi'nde 01.01.1999-01.01.2015 tarihleri arasında kas biyopsisi ve Bohan-Peter kriterleri ile juvenil dermatomyozit tanısı alan, çalışma için yeterli arşiv dokusu olan 18 yaşından küçük hastalar dahil edilmiştir. Hasta grubu için 30 hasta tespit edilmiş, dört hasta çeşitli sebeplerle (yeterli doku bulunmaması, parafin bloklama yapılması, tanı uygunsuzluğu) çalışma dışı bırakılmıştır. Toplam 26 hasta ile çalışma yürütülmüştür.

Çalışmaya dahil edilen hastaların dosyaları ve hastane kayıtları incelenerek hastaların cinsiyeti, doğum tarihi, başvuru şikayetleri, hastalık başlangıç muayene bulguları, şikayetlerin başlama tarihi, biyopsi tarihi, bulunabildiği kadarıyla biyopsi yapılan tarihteki kuadriceps femoris kas gücü (MRC skoru), Gowers belirtisi, aktif cilt lezyonu, kalsinoz, cilt ülseri varlığı, akciğer bulguları, kalp tutulumu, gastrointestinal tutulum, serum kreatin kinaz (CK) ve laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyi, eritrosit sedimentasyon hızı, hemoglobin ve beyaz küre sayısı, biyopsi öncesi tedavi durumu ve izlemde uygulanan tedaviler kaydedildi.

3.2. Histopatoloji

Hastaların kas biyopsi materyallerine ait donmuş dokuları pediatrik patoloji arşivinden bulundu. Her dokudan Thermo Shandon marka kriyostat ve Leica marka bıçak kullanılarak IsoTherm adheziv polilizinli lam üzerine, her lamda iki kesit bulunacak şekilde 5 mikrometre kalınlığında 12'şer seri kesit alındı. Seri kesitlerden birine Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması yapıldı. Seri kesitler numaralandırılarak 2 saat oda ısısında kurutuldu, sonrasında alüminyum folyo ile sarılarak kullanılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.1. İmmünohistokimyasal Boyama

Hastaların kas biyopsilerine CD3, CD20, CD138, CD68, IL-17, Foxp3, IFN- γ , IFN-alfa, IL-10 ve IL-4'e karşı geliştirilmiş primer antikorlar kullanılarak streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle immünohistokimyasal boyama yapıldı (Tablo 3.1.). Primer antikorların ideal dilüsyonlarını saptamak için pozitif kontrol olarak dondurulmuş normal tonsil dokusu kullanıldı. Tüm antikorlarla yapılan boyamalarda negatif kontrol olarak fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS) kullanıldı. Antikorlar standardize edildikten sonra JDM biyopsilerinden rastgele biri seçilerek tüm antikorlar aynı gün boyandı. Boyamaların sorunsuz olduğu kesinleştirildikten sonra diğer hastaların biyopsileri her bir antikor için toplu halde boyandı. Boyamaya her gün aynı saatte başlandı ve günde 2 antikor olmak üzere 25 lamda 50 kesit boyandı.

Alüminyum folyoda -80°C'de muhafaza edilen kesitler soğutucudan çıkarıldıktan sonra folyoları açılmadan 10 dakika boyunca çözümleri beklendi, ardından 10 dakika %100 aseton ile fikse edildi. Fiksasyon sonrası kesitlerin etrafı Dako Pen ile (Dako, Danimarka) çizildi. Kesitler 3 dakika PBS'te bekledikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 7 dakika %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi. Arkasından 3 kez 3'er dakikalık PBS ile yıkama yapıp, kesitlerin üzerini kapatacak şekilde protein bloke edici solüsyon (Superblock, Referans No: AAA125, ScyTek Laboratories, Utah, ABD) damlatılarak 20 dakika

beklenildi. Primer antikorlar antikor seyreltici solüsyonla (Normal Antibody Diluent, Referans No: ABB125, ScyTek Laboratories, Utah, ABD) daha önceden belirlenen derişimlerde karıştırılarak seyreltildi. Vorteks karıştırıcıda primer antikor ve seyreltici solüsyonun birbiriyle homojen karışması sağlandı. Protein bloke edici antikor yıkamadan silkilerek dokuyu kapatmaya yetecek kadar primer antikor (yaklaşık 35-40 µL) damlatıldı. Oda ısısında nemli ortamda 1.5 saat bekletildi.

Bu sürenin sonunda tüm preparatlar PBS ile 15 dakika yıkandı. Ardından geniş spektrumlu ikincil antikor (UltraTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody, Referans No: ABN125, ScyTek Laboratories, Utah, ABD) solüsyonu dokuların üzerini kapatacak şekilde damlatılarak oda sıcaklığında ve nemli ortamda 15 dakika bekletildi. Daha sonra HRP-Streptavidin (UltraTek HRP, Referans No: ABL125, ScyTek Laboratories, Utah, ABD) solüsyonu preparatların üzerine damlatılarak oda sıcaklığında ve nemli ortamda 15 dakika daha bekletildikten sonra PBS içine alınarak 15 dakika tutuldu.

DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kromojen (DAB Chromogen, Katalog No: TA-012-HDC, Thermo Scientific, Fremont, ABD) DAB substrat çözeltisiyle (DAB Substrate Buffer, Katalog No: TA-125-HDS, Thermo Scientific, Fremont, ABD) 1 damla:1 ml olacak şekilde seyreltildikten sonra tüm preparatların üzerine dokuları kapatacak şekilde damlatıldı ve 2 dakika sonunda preparatlar musluk suyunda yıkandı. Zemin boyaması için hematoksilen kullanıldı. Preparatlar hematoksilen içinde 20 saniye tutulduktan sonra musluk suyuyla yıkanıp asit alkol içinde 5 saniye bekletildi, tekrar musluk suyunda yıkamayı takiben dehidrasyon için %96'lık mutlak alkolde iki dakika tutuldu. Alkolü uzaklaştırmak için preparatlar 2 dakika ksilol içinde bekletilip Dako Pen izi silindikten sonra yapıştırıcı (DPX Mounting Medium, Katalog kodu: RRSP29/B, Atom Scientific, Manchester, UK) kullanılarak lamelle kapatıldı.

Tablo 3.1. Kullanılan primer antikorlar

Antikor adı	Katalog no	Üretici firma	Antikor tipi	Dilüsyon oranı	Pozitif kontrol
CD3	UCHT1	Novacastra, UK	Fare, monoklonal, IgG1	1:100	Tonsil
CD20	18-0088 Clone L26	Invitrogen, Camarillo, ABD	Fare, monoklonal, IgG2, kappa	1:200	Tonsil
CD68	M 0814, Clone KP1	Dako, Danimarka	Fare, monoklonal, IgG1, kappa	1:500	Tonsil
CD138	IR642, Clone MI15	Dako, Danimarka	Fare, monoklonal, IgG1, kappa	1:200	Tonsil
IL-17	ab79056	Abcam Inc., Cambridge, ABD	Tavşan, poliklonal, IgG	1:250	Tonsil
Foxp3	ab20034	Abcam Inc., Cambridge, ABD	Fare, monoklonal, IgG1	1:100	Tonsil
IFN- γ	ab25101	Abcam Inc., Cambridge, ABD	Tavşan, poliklonal, IgG	1:200	Tonsil
IL-10	ab34843	Abcam Inc., Cambridge, ABD	Tavşan, poliklonal, IgG	1:750	Tonsil
IFN- α 2	sc-73305	Santa Cruz Biotechnology Inc. California, ABD	Fare, monoklonal, IgG1	1:10	Tonsil
IL-4	NB100- 64799 MP4-25D2	Novus Biologicals, Colorado, ABD	Sıçan, monoklonal, IgG1	1:100	Tonsil

3.2.2. Mikroskopik Değerlendirme

Hastaların H&E, Gomori-trikrom, sitokrom-C-oksidad (COX), süksinik dehidrojenaz (SDH), MHC-I, neonatal myozin ve CD31 boyalı arşiv preperatları incelendi. Hastaların biyopsileri skorlama aracındaki parametreler kullanılarak inflamasyon bölümü, vasküler bölüm, kas lifi bölümü ve bağ dokusu bölümü ayrı ayrı skorlandı, her biyopsi skorlandıktan sonra patolog tarafından VAS ile değerlendirildi (Şekil 3.1).

İmmünohitokimyasal incelemede CD20, CD138, IL-17, Foxp3, IFN- γ , IFN-alfa, IL10 ve IL-4 için skorlama aracının inflamasyon bölümünde uygulanan kriterlerle aynı şekilde skorlama yapıldı. Buna göre perimisyal, endomisyal ve perivasküler bölgeler ayrı ayrı değerlendirildi. Her bölgede x20 büyütmede boyanmanın en fazla olduğu alanda 0-4 hücrede pozitif boyanma '0' puan; 4-20 hücrede pozitif boyanma veya 1 adet hücre kümesi (yaklaşık 10 hücre veya daha fazla) '1' puan; 20'den fazla hücrede ve biyopsi genelinde yoğun pozitif boyanma veya 2 ve daha fazla hücre kümesi '2' puan olarak değerlendirildi. Daha sonra her bir belirteç için perimisyal, endomisyal ve perivasküler alanların puanı toplandı.

Elde edilen puanlar ile skorlama aracının alt birimlerinin skorları (inflamasyon bölümü 0-12 puan, vasküler bölüm 0-3 puan, kas lifi bölümü 0-10 puan, bağ dokusu bölümü 0-2 puan, VAS 0-10 puan ve total biyopsi skoru 0-27 puan) ve klinik parametreler arasında korelasyon analizi yapıldı.

Tüm mikroskopik değerlendirmeler Olympus BX51 marka ışık mikroskobu kullanılarak klinik bilgileri bilinmeksizin iki ayrı araştırmacı tarafından değerlendirildi.

Şekil 3.1. Jüvenil dermatomyozit kas biyopsisi skorlama aracı

DOMAIN	Score	Definitions and Instructions
INFLAMMATORY DOMAIN		
CD3+ endomysial infiltration	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> For each of endomysial, perimysial, perivascular distributions, score for CD3+ infiltrating cells as follows: if none, or <4 cells in ×20 field = score 0; if >4 cells in a ×20 field and/or 1 cluster (where a cluster is approx 10 cells or more) = score 1; if >2 clusters in whole biopsy, and/or diffusely infiltrating cells (i.e., >20 cells in a ×20 field) = score 2
CD3+ perimysial infiltration	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> For each of endomysial, perimysial, perivascular distributions, score for CD3+ infiltrating cells as follows: if none, or <4 cells in ×20 field = score 0; if >4 cells in a ×20 field and/or 1 cluster (where a cluster is approx 10 cells or more) = score 1; if >2 clusters in whole biopsy, and/or diffusely infiltrating cells (i.e., >20 cells in a ×20 field) = score 2
CD3+ perivascular infiltration	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> For each of endomysial, perimysial, perivascular distributions, score for CD3+ infiltrating cells as follows: if none, or <4 cells in ×20 field = score 0; if >4 cells in a ×20 field and/or 1 cluster (where a cluster is approx 10 cells or more) = score 1; if >2 clusters in whole biopsy, and/or diffusely infiltrating cells (i.e., >20 cells in a ×20 field) = score 2
CD68+ endomysial infiltration	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> For each of endomysial, perimysial, perivascular distributions, score for CD68+ infiltrating cells as follows: if none, or <4 cells in ×20 field = score 0; if >4 cells in a ×20 field and/or 1 cluster (where a cluster is approx 10 cells or more) = score 1; if >2 clusters in whole biopsy, and/or diffusely infiltrating cells (i.e., >20 cells in a ×20 field) = score 2
CD68+ perimysial infiltration	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> For each of endomysial, perimysial, perivascular distributions, score for CD68+ infiltrating cells as follows: if none, or <4 cells in ×20 field = score 0; if >4 cells in a ×20 field and/or 1 cluster (where a cluster is approx 10 cells or more) = score 1; if >2 clusters in whole biopsy, and/or diffusely infiltrating cells (i.e., >20 cells in a ×20 field) = score 2
CD68+ perivascular infiltration	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> For each of endomysial, perimysial, perivascular distributions, score for CD68+ infiltrating cells as follows: if none, or <4 cells in ×20 field = score 0; if >4 cells in a ×20 field and/or 1 cluster (where a cluster is approx 10 cells or more) = score 1; if >2 clusters in whole biopsy, and/or diffusely infiltrating cells (i.e., >20 cells in a ×20 field) = score 2
VASCULAR DOMAIN		
Capillary dropout (Using stain for CD31)	N or Y	<input type="checkbox"/> Obvious and marked decrease in the density of capillary network, not restricted to areas of perifascicular atrophy. Absence = N, presence = Y
Arterial abnormality	N or Y	<input type="checkbox"/> Mural thickening and/or endothelial swelling and/or transmural inflammation in arteries/arterioles. Absence = N, presence = Y
Infarction	N or Y	<input type="checkbox"/> Well demarcated regional loss of muscle fiber nuclei and loss of normal cytoarchitecture. Absence = N, presence = Y
MUSCLE FIBER DOMAIN		
MHC Class I over- expression	N or Y	<input type="checkbox"/> Presence of MHC class I staining on or in muscle fibers. Absence = N, presence = Y
Perifascicular atrophy	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> Affecting >6 fibers out of 10 along one edge of a fasciculus, not exclusive to type IIb fibers. Absent = score 0. Present in one or 2 fascicles = score 1. Present in 3 or more fascicles = score 2
Neonatal myosin (using stain for neonatal myosin)	0 or 1	<input type="checkbox"/> Less than 6 positive fibers in a ×20 field = score 0; >6 positive fibers in a ×20 field = score 1
Fiber atrophy: non perifascicular	N or Y	<input type="checkbox"/> Fiber atrophy: non-perifascicular (outside normal variation for age). Absence = N, presence = Y.
Regeneration/ Degeneration /Necrosis: peri-fascicular	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> Includes: focal basophilia within a fiber, vacuolation, myofibrillar rarefaction, and/or pallor, myophagocytosis, acid phosphatase positive fibers.
Regeneration/ Degeneration /Necrosis: non-peri-fascicular	0, 1, 2	<input type="checkbox"/> For each of perifascicular and non-perifascicular, score as follows. None = score 0. If any of the features in 1 or 2 fasciculi = score 1. If any of the features in 3 or more fasciculi = score 2.
Internal myonuclei in non-basophilic otherwise normal fibers	0 or 1	<input type="checkbox"/> Internal myonuclei in non-basophilic cells (in otherwise normal fibers) in 1 or more fasciculi excluding myotendinous junctions. If <3% fibers = score 0. If >3% fibers = score 1
CONNECTIVE TISSUE DOMAIN		
Any endomysial fibrosis	N or Y	<input type="checkbox"/> For fibrosis in each of endomysial and perimysial distributions, score as follows: Absence = score N. Presence of any = score Y
Any perimysial fibrosis	N or Y	<input type="checkbox"/> For fibrosis in each of endomysial and perimysial distributions, score as follows: Absence = score N. Presence of any = score Y
VISUAL ANALOG SCALE FOR OVERALL IMPRESSION OF ABNORMALITY 0 10 no abnormality much abnormality		

Şekil 101 nolu kaynaktan aynen alınmıştır.

3.3. İstatistiksel Yöntemler

Verilerin analiz edilmesinde GraphPAD 6.0 kullanıldı. Hastaların demografik özellikleri için ki kare, laboratuvar parametreleri ve hastalık sürelerini analiz etmek

için Mann-Whitney U testi ve Student's t-Testi kullanıldı. İmmünohistokimyasal skorlama sonuçlarının korelasyonunu incelemek için Spearman korelasyon analizi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

3.4. Etik Kurul Onayı

Çalışma için etik kurul onayı Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 24.12.2013 tarih ve GO 13/582-30 numaralı karar yazısıyla verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Özellikler

Çalışmaya 26 JDM hastası dahil edildi. Hastalardan 13'ü (%50) kız, 13'ü (%50) erkekti. Hastaların şikayetlerinin başlama yaşı ortalama $7,67 \pm 3,92$ yıl (aralık; 5 ay-16 yıl), biyopsi anındaki ortalama yaşı $8,72 \pm 3,96$ yıldır (aralık; 1 yıl-16 yıl). Şikayetlerin başlangıcından biyopsi yapılmasına kadar geçen süre ortanca 4 aydır (IQR 2-21, aralık; 0 ay-85 ay). Kızlarla erkekler arasında şikayetlerin ortalama başlangıç yaşı (kız: $8,00 \pm 1,15$; erkek: $7,30 \pm 1,09$; $p=0,66$), biyopsi anındaki yaş (kız: $9,60 \pm 1,07$; erkek: $7,83 \pm 1,10$ $p=0,26$) ve şikayetlerin başlangıcından biyopsiye kadar geçen ortalama süre (kız: 5 ay; erkek: 4 ay; $p=0,59$) açısından fark yoktu.

4.2. Klinik ve Laboratuvar Bulguları

Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları için biyopsi yapılacağı günün öncesi ve sonrasındaki 15 günü içine alacak şekilde biyopsi tarihine en yakın değerlendirme dikkate alındı.

26 hastanın 19'inin hastanemizde takip edilen hastalar olduğu, 7'sinin başka merkezlerde takipli olduğu, ünitemize sadece kas biyopsilerinin değerlendirilmek üzere gönderildiği tespit edildi.

Hastaların 15'inin kas güçsüzlüğü ve kas ağrısı, 8'inin cilt döküntüsü, 2'sinin yutma fonksiyon bozukluğu ve birinin de parmak ucunda yürüme şikayetiyle doktora başvurduğu öğrenildi.

Biyopsi anında 22 hastada aktif cilt tutulumu varken sadece bir hastada hiç bir cilt bulgusu yoktu. Cilt bulgusu olan hastalardan dokuzunda Gottron papülü veya bulgusu, dokuz hastada heliotrop döküntü, beş hastada malar döküntü, iki hastada livedo retikularis, bir hastada Reynaud fenomeni, üç hastada periorbital ödem mevcuttu. İzlemde hastalardan beşinde kalsinoz ve ikisinde cilt ülserleri gelişmiş olduğu tespit edildi.

Dosyasında kaydı bulunan 16 hastadan 15'inde *Gowers* belirtisi pozitif. Hastaların kas gücü, kuadriseps femoris kasından *Medical Research Council* (MRC) skoruna göre beş üzerinden değerlendirilmiş olup biyopsi anındaki ortalama kas gücü $3,64 \pm 1,20$ (aralık, 1-5) olarak tespit edildi. Erkekler (ort. $3,42 \pm 0,48$ puan) ve kızlar (ort. $3,75 \pm 0,31$ puan) arasında kas gücü açısından fark yoktu ($p=0,57$).

Pulmoner değerlendirilmesi yapılmış 14 hastadan ikisinde restriktif akciğer hastalığı saptandı.

Kardiyak değerlendirilmesi yapılmış 15 hastadan bir hastada mitral kapak prolapsusu, bir hastada patent foramen ovale, bir hastada eser mitral yetmezlik ve bir hastada interventriküler septumda hipertrofi ve ventriküler ekstrasistol olduğu görüldü.

Gastrointestinal değerlendirilmesi yapılan 12 hastadan ikisinde yutma fonksiyon bozukluğu ve birinde hepatomegali mevcuttu.

Hastaların biyopsi anındaki temel laboratuvar bulguları Tablo 4.1'de verilmiştir. Hastaların laboratuvar bulguları açısından kızlar ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Tablo 4.1. Hastaların biyopsi anındaki temel laboratuvar değerleri

Kreatin kinaz (CK; <171 U/l)	517,5 (IQR 307,2-3356)
Laktat dehidrogenaz (LDH; 240-480 U/l)	808,5 (IQR 667,5-1644)
Sedimentasyon hızı (ESR; 0-20 mm/saat)	19 (IQR 13,5-25,5)
C-reaktif protein (CRP; 0-0,8 mg/dl)	0,29 (IQR 0,13-0,3)
Hemoglobin (g/dl)	12,0 (IQR 11,4-13,4)
Beyaz küre (/mm³)	7450 (IQR 6275-8400)
IQR: Çeyreklikler arası mesafe (<i>Interquartile range</i>)	

Biyopsi öncesinde 13 hastaya EMG yapılmıştı. Sekiz hastada miyopatik bulgular, bir hastada miyotoni, bir hastada periferik sinir ve kası etkileyen patoloji, bir hastada proksimal kası etkileyen akut denervasyon bulguları olduğu görüldü. İki hastada normal elektrofizyolojik bulgulara rastlandı.

Hastalardan sadece birinde MAA ve MSA bakılmış, bu hastada ANA, anti-RNP ve anti-Sm otoantikorunun pozitif olduğu saptanmıştı. ANA bakılan diğer dokuz hastadan beşinin ANA otoantikoru pozitifliği.

Biyopsi öncesindeki tedavi verisine ulaşılan 16 hastadan birinin steroid olmayan anti inflamatuvar ilaç, ikisinin sadece steroid, birinin sadece IVIG, birinin steroid ve IVIG, birinin steroid, metotreksat ve siklosporin, birinin steroid, metotreksat, hidroklorokin, takrolimus, IVIG ve siklosporin tedavisi aldığı, dokuzunun hiç tedavi almadığı görüldü.

Tedavi verilerine ulaşılan 17 hastanın hepsinde steroid tedavisi kullanılmış, 13 hastada metotreksat, sekiz hastada IVIG, beş hastada siklosporin A, üç hastada hidroklorokin, iki hastada kolşisin, dört hastada azatiyoprin, iki hastada abatasept ve birer hastada takrolimus, infliksimab, etanersept, adalimumab, siklofosfamid, rituksimab, risendronat, pamidronat tedavisi uygulanmıştı.

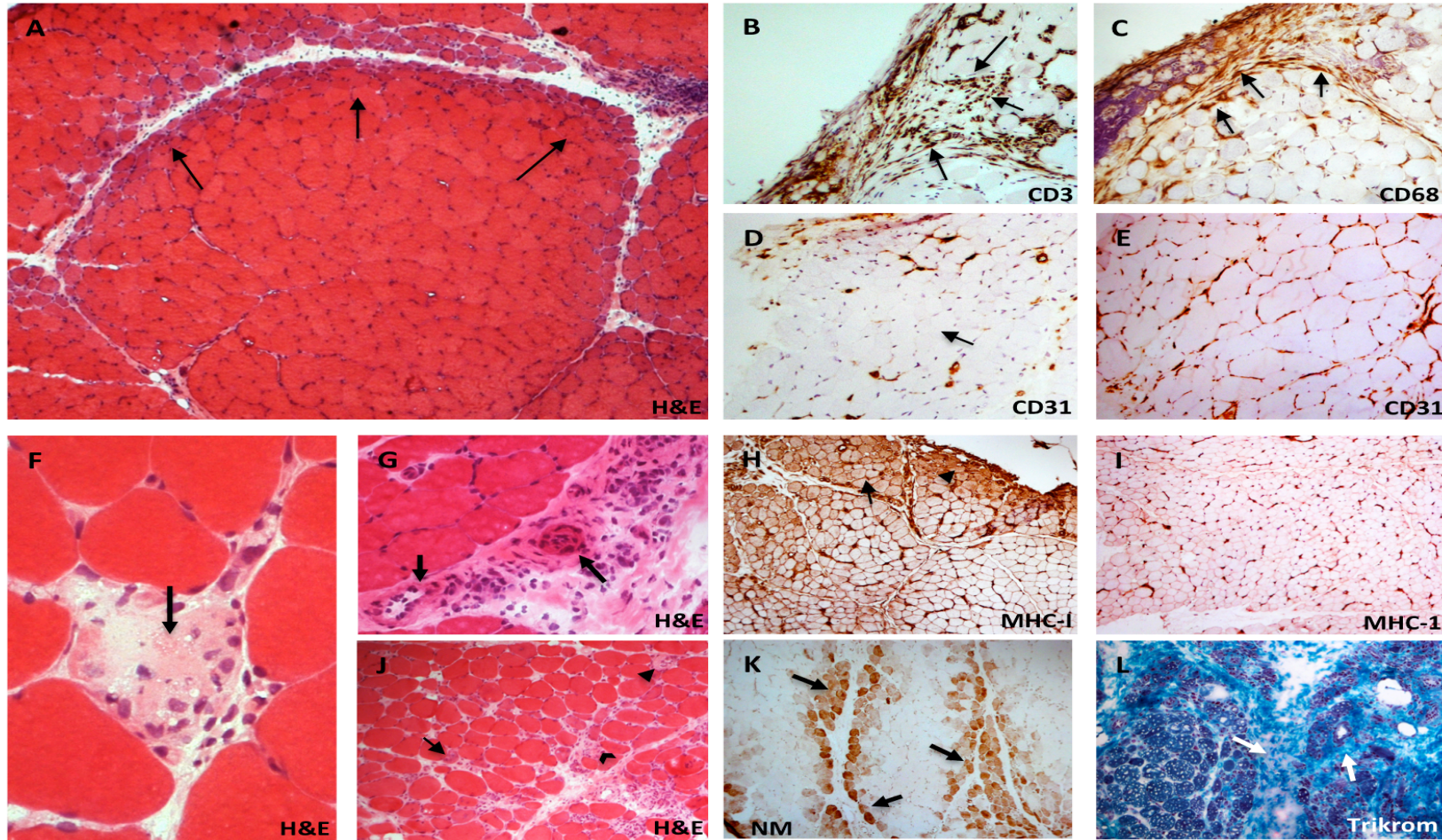
4.3. Histopatolojik Bulgular

Hastaların kas biyopsileri skorlama aracına göre skorlandığında biyopsilerin ortalama skoru $17,6 \pm 6,0$ (aralık; 5-25; skorlama aracı tepe skoru: 27), ortalama VAS skoru $6,1 \pm 2,3$ (aralık; 1,5-9) olarak bulundu.

Hastaların biyopsileri incelenirken bazı hastalarda dejenerasyon, rejenerasyon ve nekroz gibi kas lifi parametrelerinde şiddetli etkilenme varken inflamasyonun hafif olduğu, tersine inflamasyonun belirgin olduğu bazı hastalarda ise dejenerasyon, rejenerasyon ve nekrozun daha az olduğu gözlemlendi.

Skorlama aracının alt bölümlerinin (inflamasyon bölümü, vasküler bölüm, kas lifi bölümü, bağ dokusu bölümü, VAS ve total biyopsi skoru) kendi aralarındaki korelasyonlar değerlendirildiğinde vasküler bölüm skorlarının, sadece VAS ve total biyopsi skorları ile ilişkili olduğu, başka hiçbir parametre ile korelasyon göstermediği görüldü. Diğer bölüm skorlarının birbirleriyle ve VAS ile ilişkili olduğu saptandı. Patoloğun VAS değerlendirmesi tüm parametrelerle korelasyon gösteriyordu. Hastaların biyopsilerini skorlamak için kullanılan biyopsi skorlama aracındaki parametrelere ait mikroskopik örnekler Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

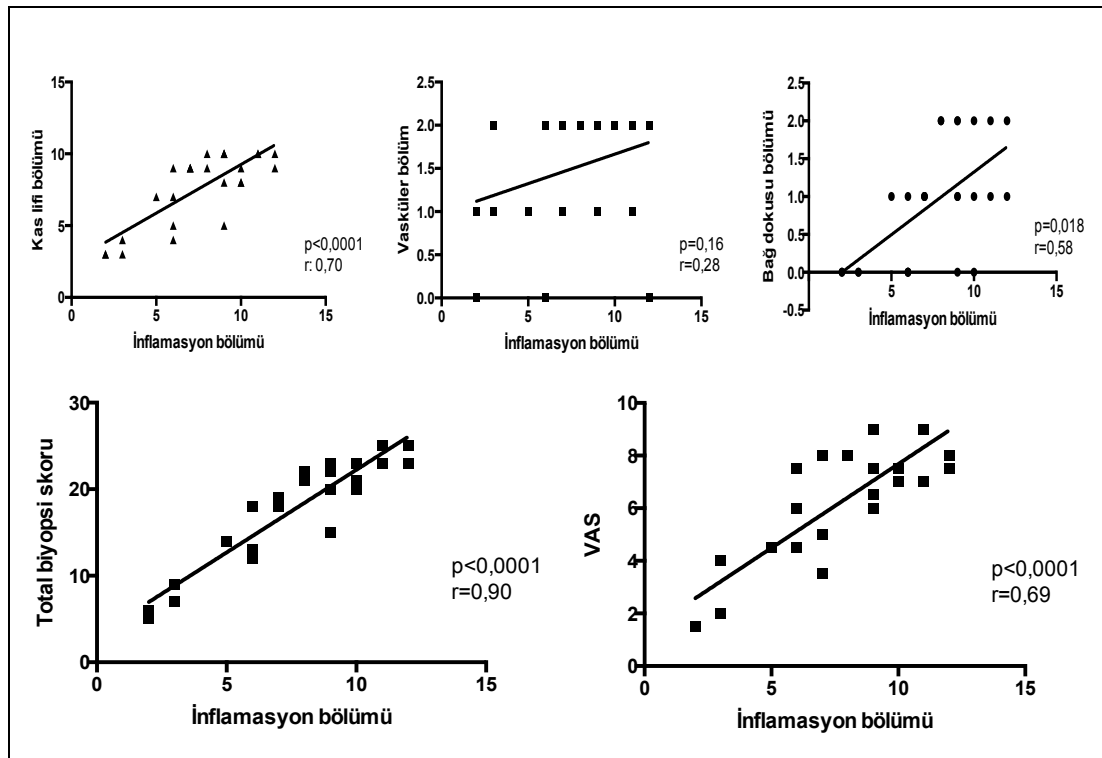
Şekil 4.1. Biyopsi skorlama aracı parametreleri



Şekil 4.1. Açıklama: **A.** Perifasiküler atrofi (oklar), **B.** CD3 (+) T hücreleri (oklar), **C.** CD68 (+) makrofajlar (oklar), **D.** CD31 ile kapiller yoğunlukta azalma (ok) ve **E.** Normal kapiller yoğunluk, **F.** Nekrotik lif (ok), **G.** Damar anormallikleri, endotelde şişme ve lümenin kapanması (oklar) **H.** MHC-I ile hem sarkolemma (ok) hem de sarkoplazmada (ok ucu) kontrole göre **(I)** artmış boyanma, **J.** Dejenere (çentikli ok), rejenere (ok), ve nekrotik lifler (ok ucu), **K.** Neonatal miyozin ile pozitif boyanma (oklar), **L.** Perimisyal ve endomisyal fibroz (oklar). **H&E:** hematoxilen eozin, **CD3:** T hücre, **CD68:** Makrofaj, **CD31:** kapiller belirteci, **NM:** neonatal miyozin, **MHC-I:** Major histocompatibility complex-I, **Trikrom:** Gomori-trikrom **Büyütme:** **A:** 4x, **F** ve **G:** 20x, diğer şekiller 10x

İnflamasyon bölümü skorlarının vasküler bölüm hariç diğer tüm bölüm skorları ve VAS ile korele olduğu görüldü (Şekil 4.2., Tablo 4.2.).

Şekil 4.2. İnflamasyon bölümü skorlarının diğer bölüm skorlarıyla ilişkisi



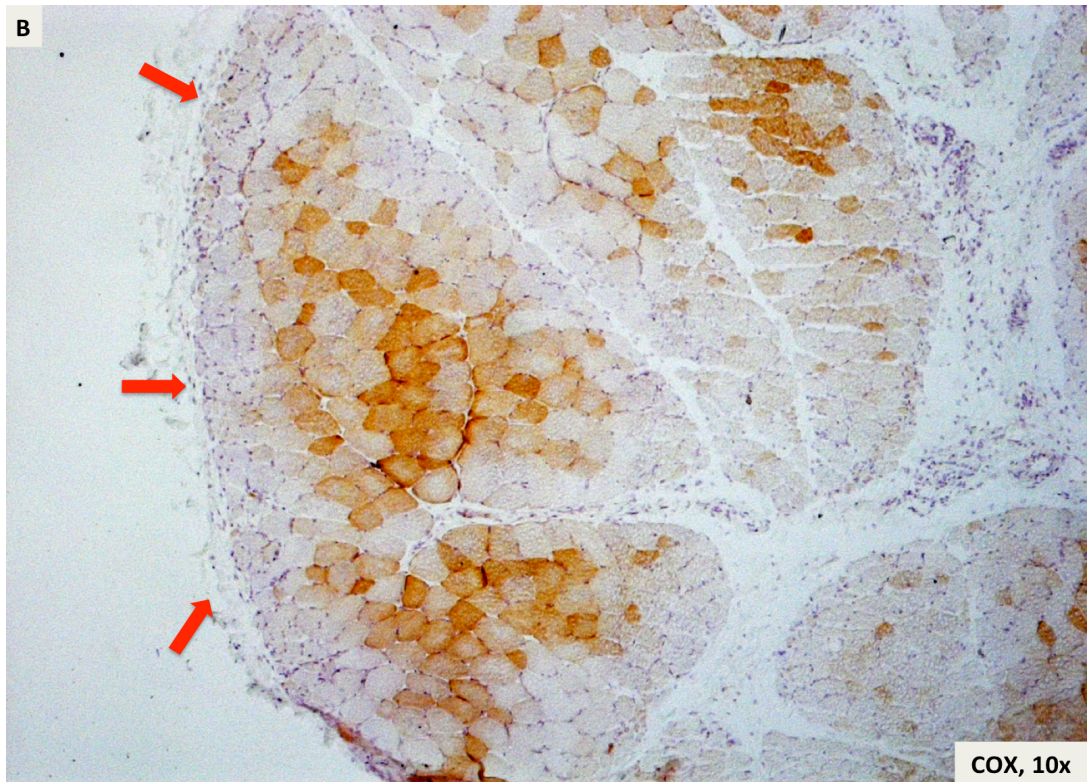
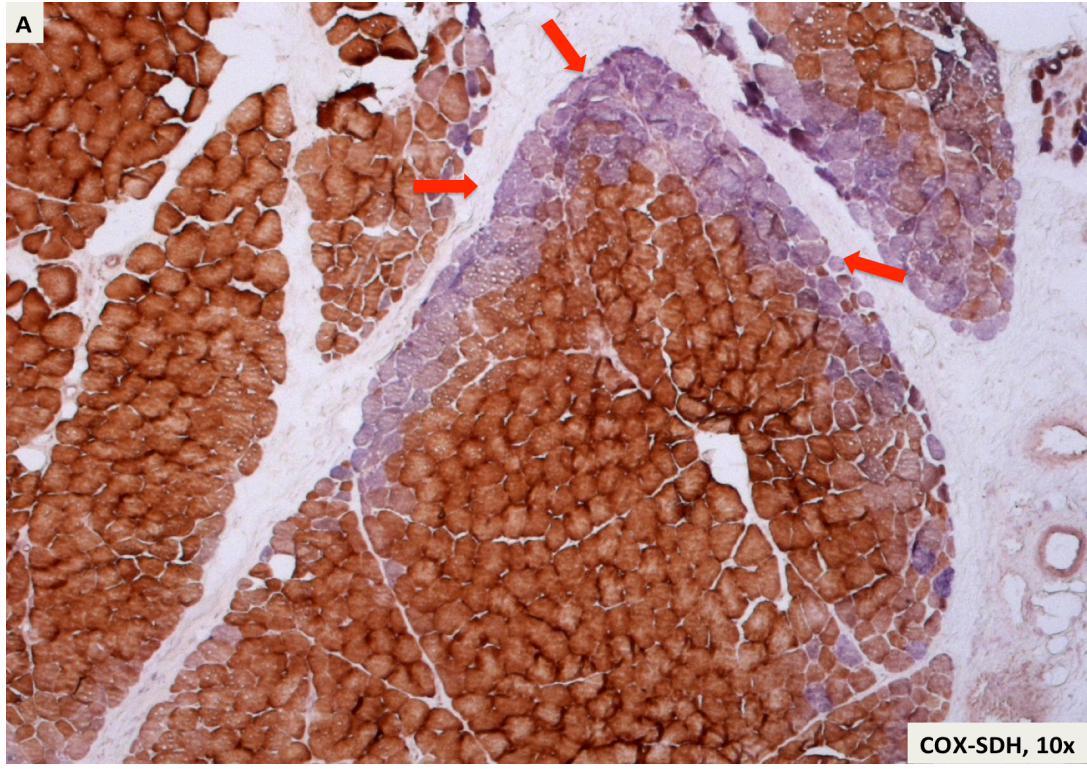
Tablo 4.2. Kas biyopsilerinde skorlama aracının alt bölümleri arasındaki korelasyon

	İnflamasyon bölümü	Vasküler bölüm	Kas lifi bölümü	Bağ dokusu bölümü	Total biyopsi skoru	VAS
İnflamasyon bölümü		r=0,28 p=0,16	r= 0,70 p<0,0001	r= 0,58 p=0,002	r=0,91 p<0,0001	r=0,69 p<0,0001
Vasküler bölüm	r= 0,28 p= 0,16		r=0,34 p=0,09	r= 0,28 p=0,16	r=0,43 p=0,27	r=0,55 p=0,003
Kas lifi bölümü	r= 0,70 p< 0,0001	r= 0,34 p= 0,09		r=0,80 p<0,0001	r=0,94 p<0,0001	r=0,81 p<0,0001
Bağ dokusu bölümü	r=0,58 p= 0,002	r= 0,28 p=0,16	r= 0,80 p<0,0001		r=0,80 p<0,0001	r=0,72 p<0,0001
Total biyopsi skoru	r=0,91 p<0,0001	r= 0,43 p= 0,27	r=0,94 p<0,0001	r=0,80 p<0,0001		r=0,90 p<0,0001
VAS	r=0,69 p<0,0001	r=0,55 p=0,003	r=0,81 p<0,0001	r=0,72 p<0,0001	r=0,90 p<0,0001	

Hastaların arşiv preparatlarının yanısıra yeni alınan kesitler incelendiğinde bazı biyopsilerde başlangıçta biyopside kas lifleri ve inflamasyona ait bulguların çok hafif ve fokal olduğu, ancak sonradan alınan yeni kesitlerde hastalığın tipik histopatolojik bulgularının (perifasiküler atrofi, dejenerasyon, rejenerasyon ve nekroz) belirginleştiği görüldü.

Hastaların arşiv preparatlarından COX ve SDH boyamaları değerlendirildiğinde, etkilenen bölgelerde özellikle perifasiküler lifler COX ile soluk veya negatif boyanırken, SDH ile daha koyu boyanmaktaydı (Şekil 4.3.). Üç hastada perifasiküler liflerde değil, fasiküllerde mozaik paternde negatif boyanma vardı, üç hastada tüm lifler COX pozitif.

Şekil 4.3. JDM kas biyopsisinde COX eksikliği



Şekil 4.3. Açıklama: A. COX-SDH boyamasında perifasiküler lifler COX negatif

(lacivert renkli) (oklar), diğer lifler COX pozitif. **B.** COX boyamasında perifasiküler alandaki liflerde (ok) COX ile boyanma yok

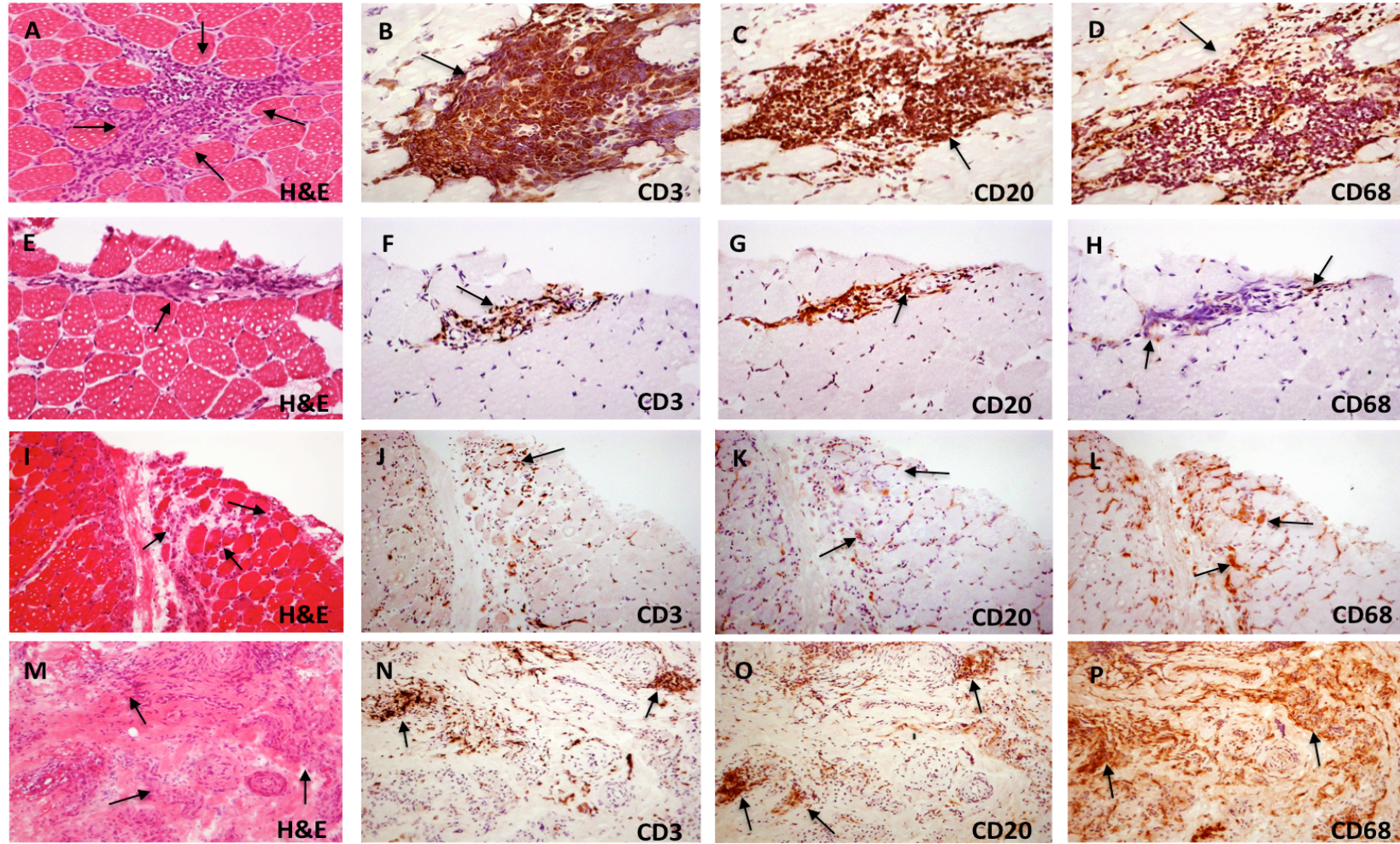
4.3.1. İnflamatuvar Hücreler ve Sitokinler

Hastaların kas biyopsilerindeki inflamatuvar hücreleri göstermek amacıyla T hücreleri için anti-CD3, B hücreleri için anti-CD20, plazma hücreleri için anti-CD138, makrofajlar için anti-CD68 primer antikoları kullanıldı. Biyopsilerin %73'ünde CD3 (+) T hücreleri, %88'inde CD20 (+) B hücreleri, %57'sinde CD138 (+) plazma hücreleri ve hepsinde CD68 (+) makrofajlar mevcuttu.

İnflamatuvar hücrelerin üç farklı infiltrasyon paterni sergiledikleri görüldü. (Şekil 4.4.). İki hastada hücrelerin folikül benzeri büyük kümeler oluşturduğu, bu kümelerin etrafında CD3 (+) T hücreleri ve CD68 (+) makrofajlar, merkezinde ise yoğun CD20 (+) B hücreleri olduğu saptandı. Bir grup hastada hücrelerin çok daha küçük gruplar halinde perimisyal ve perivasküler alanlarda dokuyu infiltre ettiği görüldü. Diğer bir grup hastada ise hücrelerin endomisyumda dağınık bir şekilde infiltrasyon yaptığı görüldü. Bir hastada ise hiç normal doku bırakmayacak derecede kas lifi harabiyeti olduğu görüldü

T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlar çoğunlukla birlikte bulunurken, plazma hücreleri bu hücre gruplarına çok nadir eşlik etmekteydi.

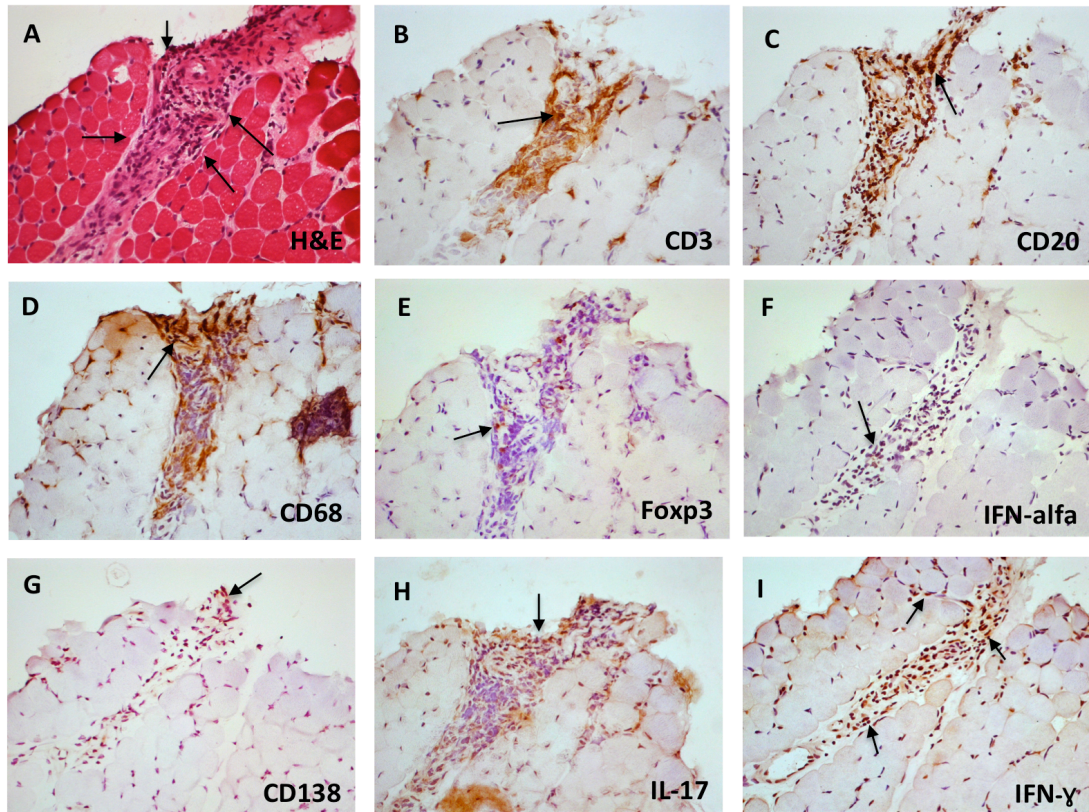
Şekil 4.4. İnflamatuvar hücrelerin çeşitli infiltrasyon tipleri



Şekil 4.4. Açıklama: A-D. Yoğun folikül benzeri tutulum, E-H. Küçük hücre kümeleri, I-L. Endomisyum ve perimisyumda dağınmık şekilde inflamatuvar hücreler, M-P. Tüm kas dokusunu harap eden inflamasyon **H&E:** Hematoksilen eozin, **CD3:** T hücre, **CD20:** B hücre, **CD68:** Makrofaj. Büyütme: 20x

Inflamatuvar ortamın bileşenleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

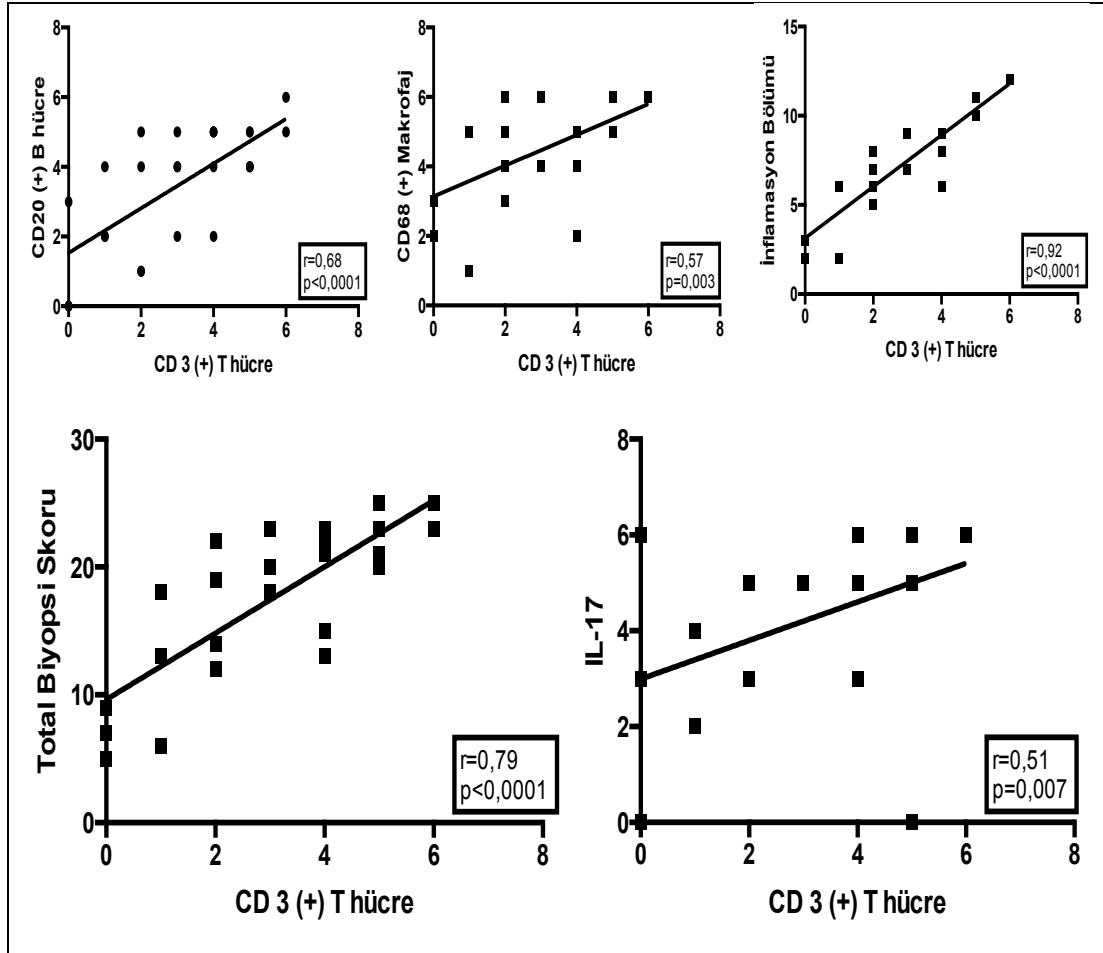
Şekil 4.5. Kas biyopsilerindeki inflamatuvar ortamın bileşenleri



Şekil 4.5. Açıklama: **H&E:** Hematoksilen eozin, **CD3:** T hücre, **CD20:** B hücre, **CD68:** Makrofaj. **Foxp3:** *Treg* belirteci, **CD138:** Plazma hücresi, Büyütme: 20x

CD3 (+) T hücre skorlarının diğer hücrelerle korelasyonu Şekil 4.6.'da gösterilmektedir. T hücre skorlarının, B hücre ($r=0,68$; $p<0,0001$), makrofaj ($r=0,57$; $p=0,003$), IL-17 ($r=0,51$; $p=0,007$), skrolama aracının inflamasyon bölümü ($r=0,92$; $p<0,0001$) ve total biyopsi skorlarıyla ($r=0,79$; $p<0,0001$) ilişkili iken plazma hücre, Foxp3, IFN-alfa, IFN- γ , IL-4 skorlarıyla ilişkili olmadığı saptandı.

Şekil 4.6. T hücre skorlarının B hücre, makrofaj, IL-17, inflamasyon bölümü ve total biyopsi skorlarıyla ilişkisi



Diğer inflamatuvar hücrelerin birbirleriyle olan ilişkisi Tablo 4.3.'te verilmiştir. Buna göre B hücreleri, makrofajlar, skorlama aracının inflamasyon bölümü ve total biyopsi skorları kendi aralarında korelasyon gösterirken plazma hücrelerinin, inflamasyonun hiçbir bileşeni ile ilişkili olmadığı görüldü.

Hastalardan sadece ikisinde, birkaç hücrede IFN-alfa boyanması saptandı (Şekil 4.7.). Bu iki hastanın da biyopsi bulguları ağır, total biyopsi skoru 23'tü. Hastalardan birinin 6 aylık tedavi sonrası ilaçla remisyonda olduğu diğerinin klinik takibinin olmadığı görüldü.

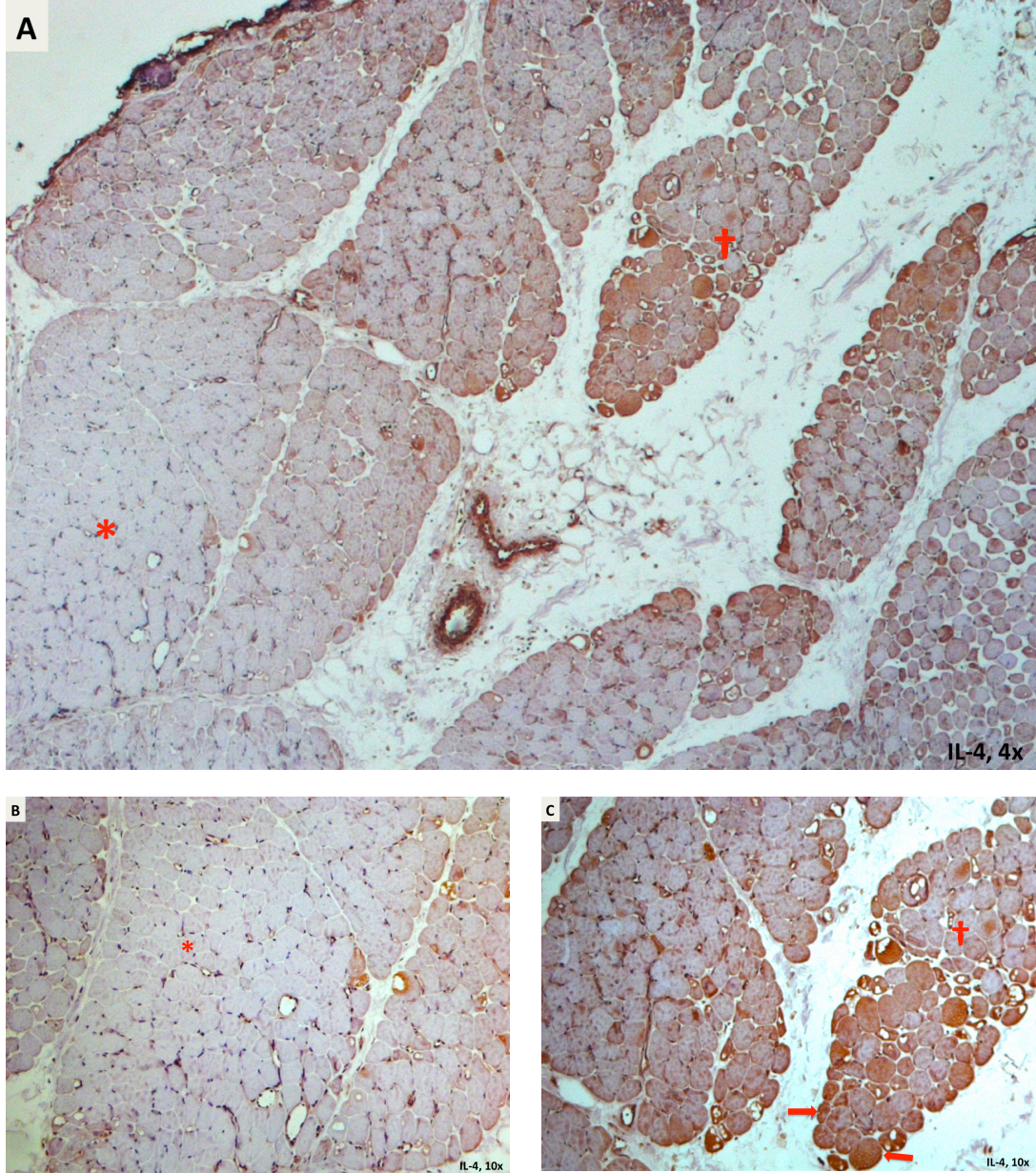
Tablo 4.3. İnflamasyon bileşenlerinin birbirleriyle ilişkisi

	CD20(+) B hücresi	CD68(+) Makrofaj	CD138(+) Plazma hücresi	İnflamasyon bölümü skoru	Total biyopsi skoru
CD20(+) B hücresi		r=0,69 p<0,0001	r= 0,20 p=0,32	r= 0,78 p<0,0001	r=0,73 p<0,0001
CD68(+) Makrofaj	r= 0,69 p<0,0001		r=0,02 p=0,92	r= 0,82 p<0,0001	r=0,83 p<0,0001
CD138 (+) Plazma hücresi	r= 0,20 p=0,32	r= 0,02 p= 0,92		r=0,13 p=0,54	r=0,12 p=0,58
İnflamasyon bölümü skoru	r=0,78 p<0,0001	r= 0,82 p<0,0001	r= 0,13 p=0,54		r=0,91 p<0,0001
Total biyopsi skoru	r=0,73 p<0,0001	r= 0,83 p<0,0001	r=0,12 p=0,58	r=0,91 p<0,0001	

Şekil 4.7. İnflamatuvar hücrelerde IFN-alfa ile pozitif boyanma

Hastaların biyopsilerinin hiçbirinde inflamatuvar hücrelerde IL-4 boyanması saptanmadı, ancak biyopsilerin etkilenmiş bölgelerindeki rejenere kas liflerinde IL-4 ile pozitif boyanma olduğu görüldü. (Şekil 4.8.)

Şekil 4.8. Kas liflerinde IL-4 ile pozitif boyanma

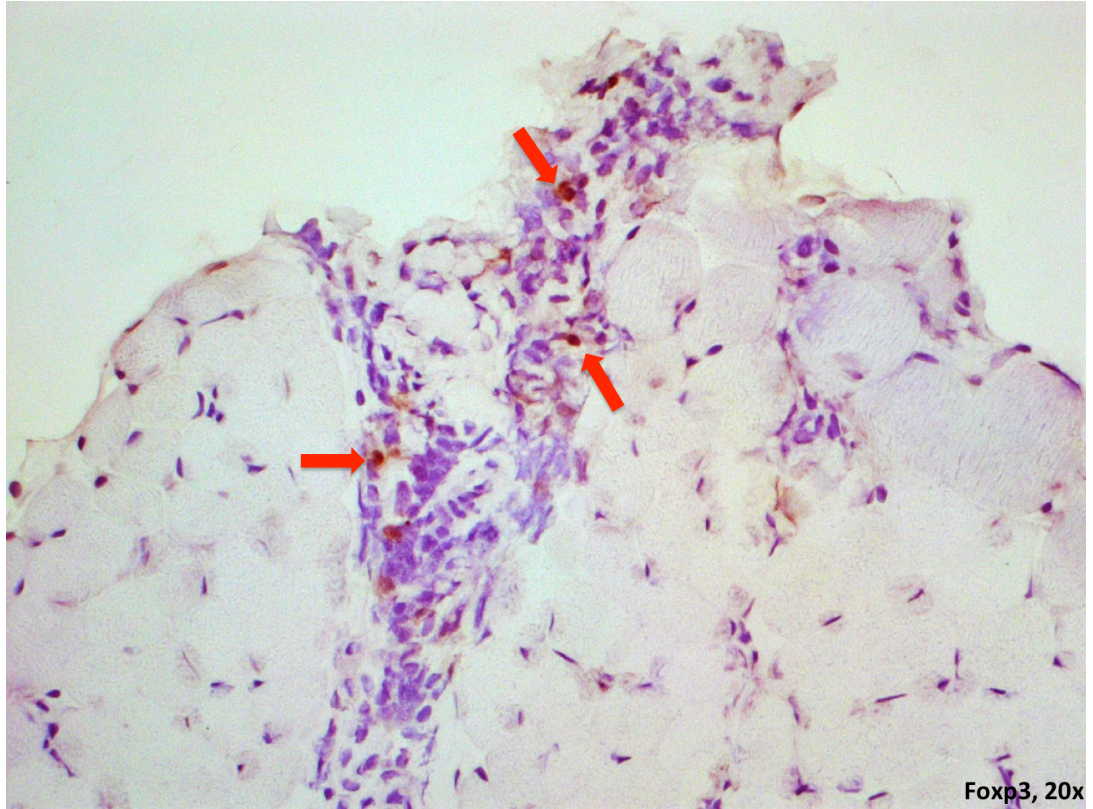


Şekil 4.8. Açıklama: A. Etkilenen (†) ve etkilenmeyen (*) alanlarda IL-4 ile farklı boyanma, B. etkilenmemiş alanda IL-4 negatif, C. etkilenen alanda kas lifi IL-4 ile pozitif boyanma gösteriyor (oklar)

IL-10 ile denenen tüm derişimlere ve farklı yöntemlere rağmen özgün boyanma elde edilemediği için IL-10 değerlendirmeye alınmadı.

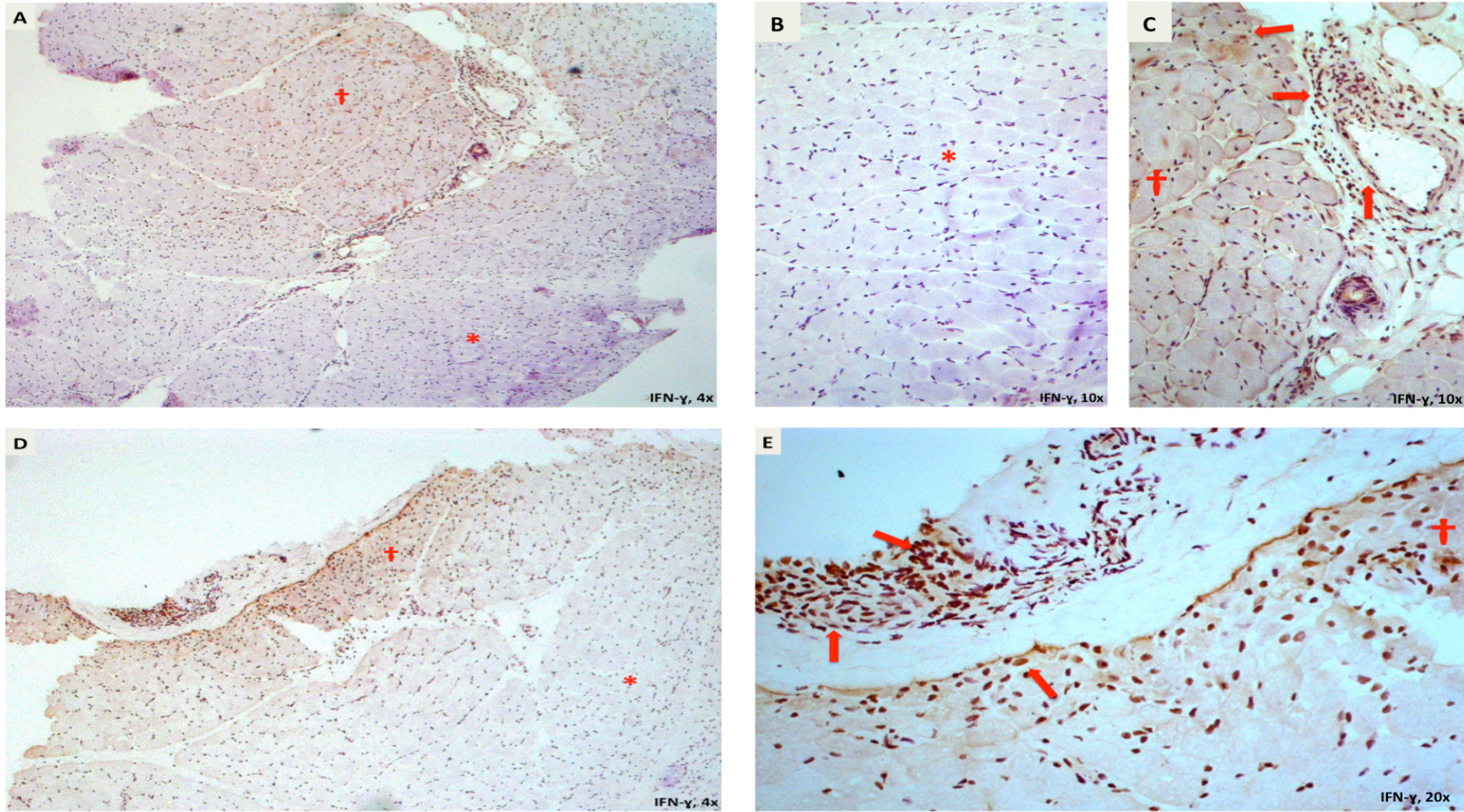
Hastaların %30'unda kas biyopsisinde Foxp3 pozitif hücreler saptandı (Şekil 4.9.). Foxp3 pozitif olan ve olmayan hastaların ortanca total biyopsi skorları (sırasıyla 21,5 ve 18; $p=0,11$), ortanca CK düzeyi (sırasıyla 517,0 ve 903,0; $p=0,33$) ve ortanca kas gücü MRC puanları (sırasıyla 3 ve 4; $p=0,87$) arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktu. Foxp3 skorlarının diğer hücre ve sitokinlerin skorlarıyla ilişkili olmadığı görüldü. Hasta dosyalarından prognoz, tedavi cevabı gibi bilgiler elde edilemediği için iki grup klinik olarak karşılaştırılmadı.

Şekil 4.9. İnflamatuvar hücrelerde Foxp3 ile pozitif boyanma



Hastaların %80'inde IFN- γ ile pozitif boyanma saptandı. IFN- γ boyanmasının yama şeklinde olduğu, kas dokusunun etkilenmiş kısımlarında hem inflamatuvar hücrelerin, hem kas liflerinin, hem de endotel hücrelerinin yoğun bir şekilde pozitif boyandığı, daha az etkilenmiş alanlarda ise boyanma olmadığı görüldü (Şekil 4.10.). IFN- γ skorlarının diğer hücre ve sitokinlerin skorlarıyla ilişkili olmadığı görüldü. Hastaların büyük kısmında IL-17 ve IFN- γ 'nın aynı alanlarda pozitif olduğu gözlemlendi.

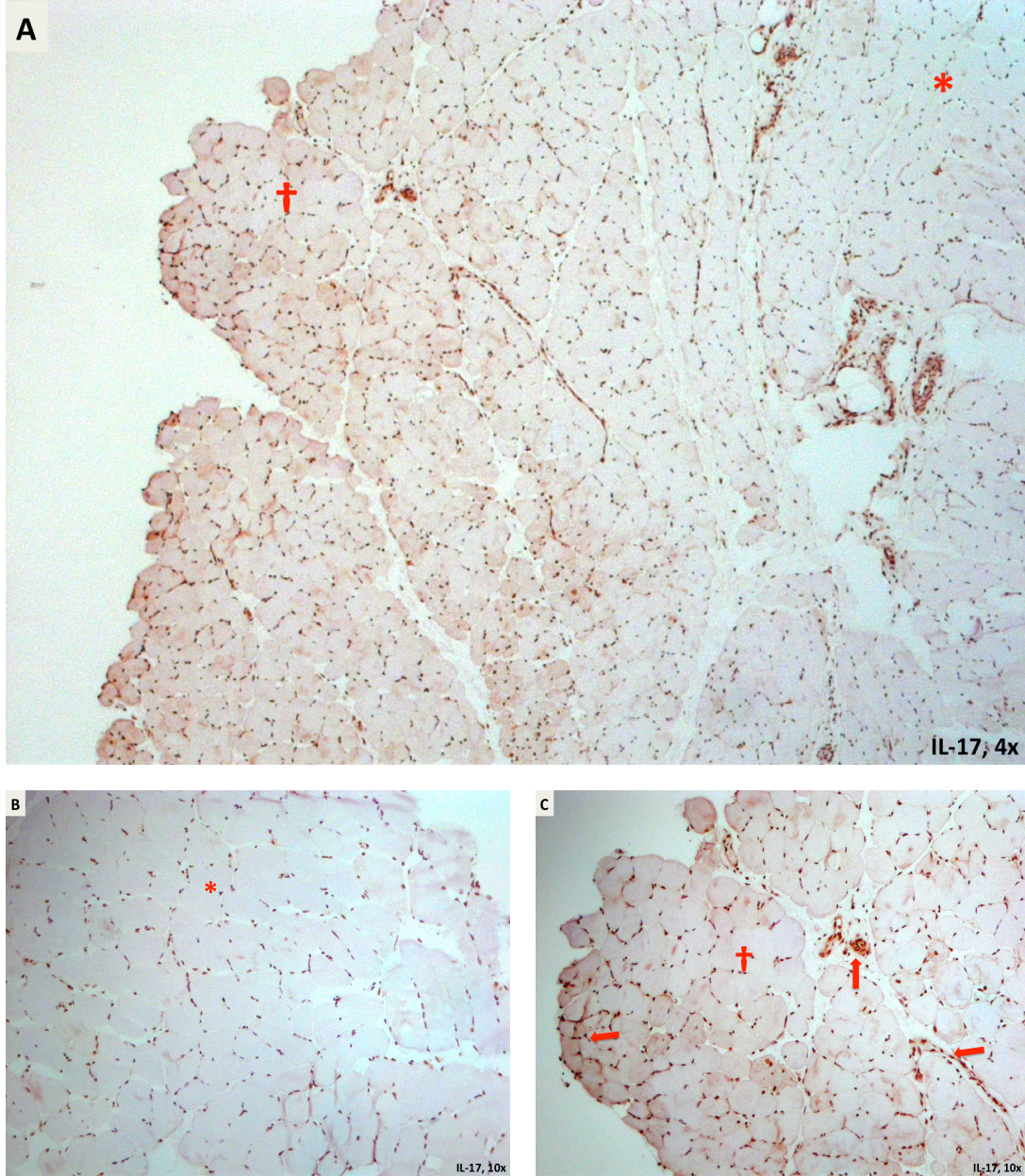
Şekil 4.10. Kas biyopsilerinde etkilenen alanlarda IFN- γ ile yama şeklinde pozitif boyanma



Şekil 4.10. Açıklama: **A,D.** Etkilenen (†) ve etkilenmeyen (*) alanlarda IFN- γ boyanma farkı, **B.** etkilenmemiş alanda IFN- γ negatif, **C,E.** etkilenen alanda inflamatuvar hücreler, endotel ve kas liflerinde IFN- γ pozitif boyanma (oklar)

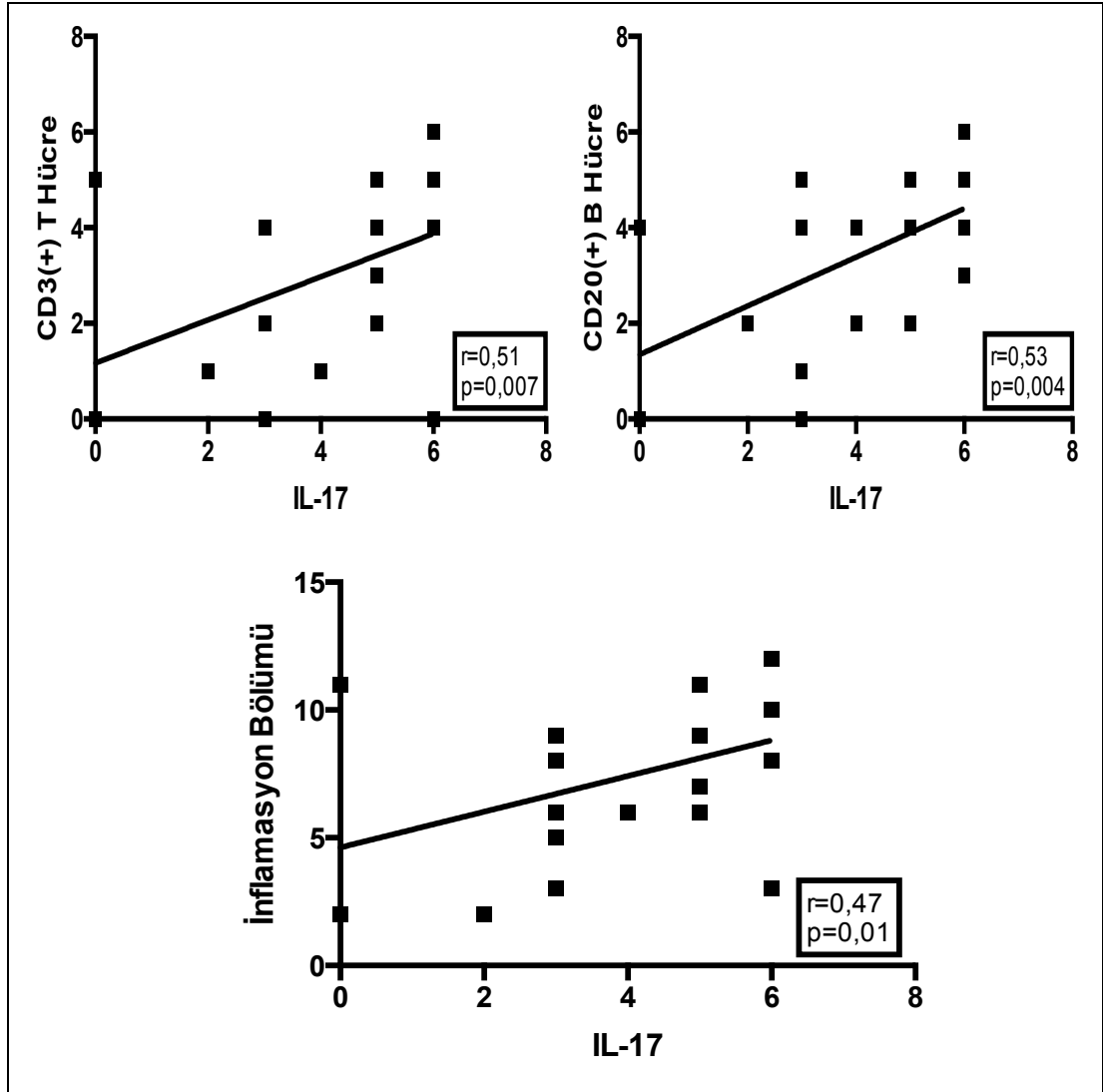
Hastaların %92'sinde IL-17 ile pozitif boyanma saptandı. IL-17'nin boyanma paterninin IFN- γ ile benzer şekilde yama tarzında olduğu, biyopsinin etkilenmiş kısımlarında hem inflamatuvar hücrelerin, hem kas liflerinin, hem de endotel hücrelerinin yoğun bir şekilde pozitif boyandığı, daha az etkilenmiş alanlarda ise boyanma olmadığı görüldü (Şekil 4.11). IL-17'nin negatif olduğu iki hastanın ayırt edici klinik veya histopatolojik bulgusu yoktu. IL-17 skorlarının T hücresi, B hücresi ve skorlama aracının inflamasyon bölümü skorlarıyla korelasyon gösterdiği, diğer parametrelerle ilişkili olmadığı görüldü (Şekil 4.12.).

Şekil 4.11. Kas biyopsilerinde etkilenen alanlarda IL-17 ile yama şeklinde pozitif boyanma



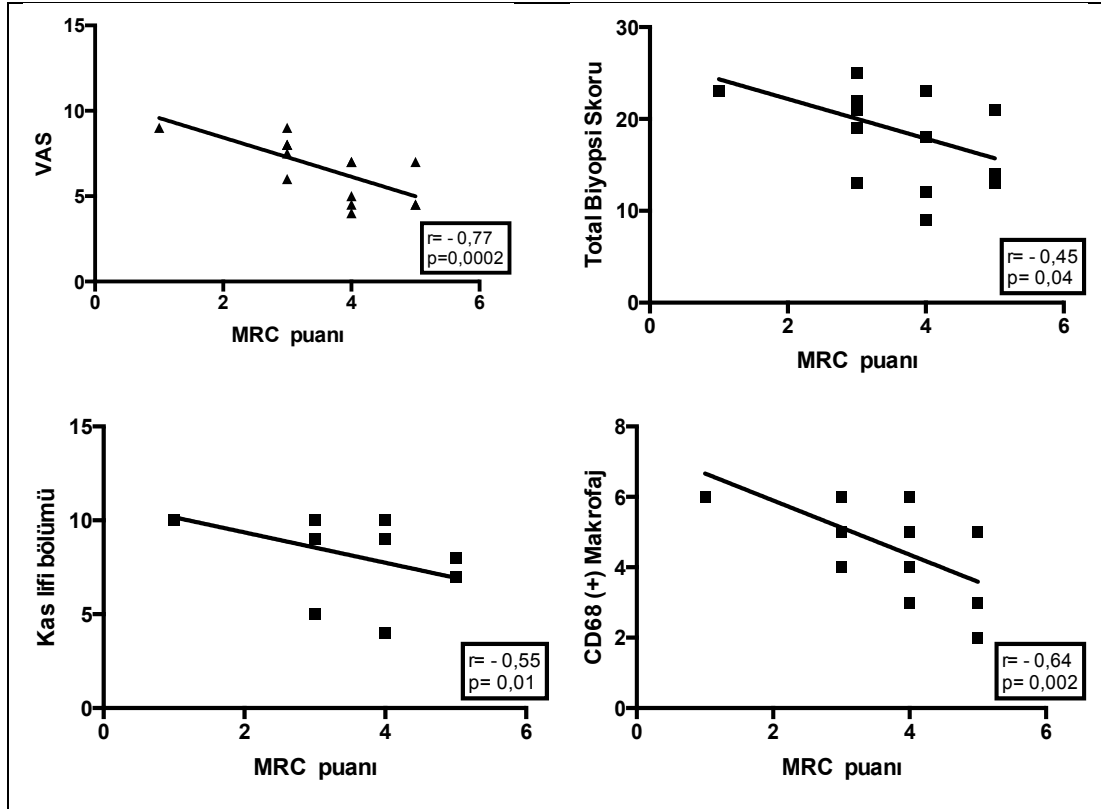
Şekil 4.11. Açıklama: A. Etkilenen (†) ve etkilenmeyen (*) alanlarda IL-17 ile boyanma farkı, B. etkilenmemiş alanda IL-17 negatif, C. etkilenen alanda IL-17 pozitif inflamatuvar hücreler, endotel ve kas lifleri (oklar)

Şekil 4.12. IL-17 skorlarının T hücre, B hücre ve inflamasyon bölümü skorlarıyla ilişkisi



Hastaların klinik parametreleriyle biyopsi bulguları karşılaştırıldığında biyopsi anındaki serum CK düzeyleri ile biyopsi parametrelerinin hiçbiri arasında korelasyon yoktu. Biyopsi anındaki kas gücü değerlendirmeleri (MRC skoru) skorlama aracının kas lifi bölümü, total biyopsi skoru, VAS ve CD68 (+) hücre skorları ile negatif ilişkiliyken CD3, CD20, IL-17, Foxp3, IFN- γ ve inflamasyon bölümü skorları ile ilişkili değildi (Şekil 4.13.).

Şekil 4.13. MRC skorlarının histolojik parametrelerle ilişkisi



5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Patoloji Ünitesi'nde kas biyopsisi ile tanı almış 26 juvenil dermatomyozit hastasının kas biyopsilerdeki T hücre alt grupları sitokinler ve yüzey belirteçleri ile tanımlanmış, inflamasyon ortamındaki diğer hücreler immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Bu seri, şimdiye kadar Türkiye'den bildirilmiş en geniş juvenil dermatomyozit histopatoloji çalışmasıdır .

5.1. Hastaların özellikleri

Çalışmaya ünitemizde kas biyopsisi ile JDM tanısı konulmuş hastalar dahil edilmiştir. Ünitemiz .ocukluk çağı kas biyopsileri konusunda önemli bir referans merkezi olarak görev almaktadır. Buna rağmen 15 yıllık süre içerisinde sadece 30 hastaya kas biyopsisi ile JDM tanısı konulduğu görülmüştür. Bu da JDM hastalığının

nadir görülen hastalıklardan biri olduğunu göstermektedir. Dört hasta çeşitli sebeplerle dışlanarak 26 hasta ile çalışmaya devam edilmiştir. 26 hastanın 19'unun hastanemizde takip edilen hastalar olduğu, 7'sinin başka merkezlerde takipli olduğu ve ünitemize sadece kas biyopsilerinin değerlendirilmek üzere gönderildiği tespit edilmiştir.

Hastaların ortalama tanı yaşı literatürle uyumlu bir şekilde 7,5 yaş civarındadır (15). Literatürde hastalığın kızlarda yaklaşık 2 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir ancak bizim çalışmamızda kız ve erkek hasta sayısı eşit bulunmuştur (15). Hastaların şikayetlerinin başlamasından tanı anına kadar geçen sürenin ortanca 4 ay olması her ne kadar uzun bir süre olarak düşünülse de, nadir görülen bir hastalık tanısı için umut vericidir ve hekimlerde JDM konusunda farkındalık arttıkça bu sürenin kısalacağı düşünülmektedir. Kız ve erkek hastalar arasında hem klinik hem de histopatolojik özellikler açısından fark olmaması hastalığın seyrinde cinsiyetin önemli bir faktör olmadığına işaret etmektedir. Hastaların yarısının EMG incelemesinin olması fakat sadece ikisinin kas MRG'sinin olması tanı için EMG'nin önemli bir başvuru kaynağı olduğunu göstermektedir. EMG'nin özellikle çocuklarda uygulanması zor bir teknik olması ve yakın zamanda MRG ile hastalık aktivitesi arasında kuvvetli bir ilişkinin gösterilmesi, çoğu merkezde JDM'nin tanı ve takibinde MRG'nin EMG'ye tercih edilmesine yol açmıştır (109). Merkezimizde de yakın zamanda MRG'nin daha aktif kullanılmaya başlandığı gözlenmiştir. Hastaların 21'inde aktif cilt tutulumu mevcuttur. Akciğer, kardiyak ve gastrointestinal tutulum ile ilgili değerlendirmenin özellikle daha eski yıllarda her hastaya yapılmadığı görülmüştür. Bu da hastalığın asıl tutulum yeri olan kas ve deri dışındaki diğer tutulum alanlarının belirti olmadıkça akla gelmediğini, araştırılmadığını düşündürmektedir. Ancak yine yakın zamanda hastaların daha detaylı sistematik değerlendirmesinin yapılmaya başlandığı gözlemlenmektedir. Hastaların biri hariç hiçbirinin MSA veya MAA açısından değerlendirilmediği saptanmıştır. Literatürde özellikle yeni tanımlanan otoantikolar ile hastalığın belirli özelliklerinin ilişkili olduğu, seyir ve tutulum açısından önemli bilgiler sağladığı gösterilmiştir (59, 92). Merkezimizde de yeni tanı alan hastalar otoantikolar açısından değerlendirilmeye başlanmıştır.

JDM tedavisinin esas bileşeni steroid tedavisidir. Steroidin yan etkilerinden korunabilmek ve dozunu azaltabilmek için en sık kullanılan destek tedavisi metotreksattır (22). Bizim hastalarımızın hepsi steroid tedavisi alırken %76'sı ek olarak metotreksat ve %48'i IVIG almıştır. Tedavi yanıtı olmayan hastalarda daha farklı immünsüpresif ilaçların denendiği görülmüştür.

Bu çalışmanın asıl kapsamı detaylı bir klinik bir araştırma olmamakla birlikte, kas biyopsisi bulguları ile özellikle klinik bulgular ve seyirle ilişki kurmak istendiğinde hastane dosyaları veya kayıtlarından çoğu zaman yeterli bilgiye ulaşılamamıştır. Ayrıca 26 hastanın 9'unun başka merkezlerde takip edilip sadece kas biyopsilerinin değerlendirilmek üzere merkezimize gönderilmiş olması da bu hastaların seyri ve klinik bulgularına ulaşılmasını engellemiştir.

5.2. Histopatolojik özellikler

5.2.1 Genel bakış

Günümüzde gelişen MRG teknolojisi, yeni MAA ve MSA'lar ve diğer tanı gereçlerine rağmen kas biyopsisi hala önemini korumakta, bu tetkiklerin hiçbiri kas biyopsisinin sağladığı bilgileri sağlayamamaktadır. Biyopsi, hastalığın patogenezinde asıl etkili mekanizma hakkında ipuçları verir, hastalığın şiddeti, otoantikör bilgileriyle beraber hastalığın alt tipi ve seyri konusunda bilgi verir ve hedefe yönelik tedavi fırsatı sağlar.

Wedderburn ve ark. tarafından geliştirilen JDM biyopsi skorlama aracı, hem klinikle uyumlu bilgiler sunması hem de araştırmacıların aynı dili konuşmasını sağlaması açısından JDM değerlendirmesinde önemli bir gelişme olmuştur (101). Bu araç kullanılarak yapılan bir çalışmada histopatoloğun vizüel analog skorunun (VAS) tüm klinik ve histopatolojik bulgularla uyumlu olması biyopsi değerlendiren kişinin bu konuda deneyimli olmasının ne kadar önemli olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır (102). Buna göre, sadece patoloğun kas biyopsisi hakkındaki genel görüşü bile o hastanın hastalığının seyrini tahmin etmeye olanak sağlayabilir. Bizim çalışmamızda da VAS'ın hem skorlama aracının alt bölümleriyle hem de kas tutulumunu gösteren MRC kas gücü skoru ile uyumlu olduğu görülmüştür. Yeterli veri olmadığı için hastalığın seyri hakkında korelasyon analizi yapılamamıştır, fakat tedaviye dirençli olan ve kötü seyrettiği bilinen 6 hastanın ortalama VAS puanının 7,5 olduğu ve ilaçsız remisyonda izlenen 2 hastanın VAS puanlarının ise 2 olduğu görülmüştür.

Biyopsi skorlama aracına göre hastalarımızın total biyopsi skorları ortalamasının 17,5 ve ortalama VAS puanının 6,1 olması, hastalarımızın biyopsi anında orta-ciddi kas tutulumuna sahip olduğunu göstermektedir. Histopatolojik değerlendirmede bazı hastalarda dejenerasyon, rejenerasyon ve nekroz daha belirginken inflamasyonun daha hafif olduğu, tersine inflamasyonun belirgin olduğu bazı hastalarda ise dejenerasyon, rejenerasyon ve nekrozun daha hafif olduğu gözlenmiştir. Ancak skorlama sisteminde kas lifi skorları ve inflamasyon bölümü skorlarının pozitif yönde korelasyon göstermesi bu gözlemin rastlantısal olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda vasküler bölüm hariç diğer bölümlerin skorları ve VAS birbirleriyle ilişkili bulunmuştur. Bu, kas dokusunda etkilenmenin tek başına inflamasyon, kas lifi hasarı veya fibroz ile değil hepsinin bir bütün halinde sürece katılmasıyla olduğuna işaret etmektedir.

Hastaların arşiv preparatlarının yanısıra yeni alınan kesitler incelendiğinde bazı biyopsilerde başlangıçta biyopside kas lifleri ve inflamasyona ait bulguların çok hafif ve fokal olduğu, ancak sonradan alınan yeni kesitlerde hastalığın tipik histopatolojik bulgularının (perifasiküler atrofi, dejenerasyon, rejenerasyon ve nekroz) belirginleştiği görülmüştür. Hastalığın yama benzeri tutulum sergilemesi kas biyopsisinin yanlışlıkla normal olarak değerlendirilmesine neden olabileceği için, kliniği JDM ile uyumlu olan hastalarda örneklenen kasta etkilenme olmaması dikkatli yorumlanmalı, yeterli kesitin incelemeye alındığından emin olunmalıdır. Bu hastalarda histopatolojik değerlendirmeye mutlaka MHC-I boyaması da eklenmelidir (51).

Biyopsiler değerlendirilirken sık görülen bir diğer histopatolojik bulgu da COX eksikliği olmuştur. İyi bir klinik değerlendirme yapılmadığında, patoloğa yeterli klinik bilgi verilmemişse veya patolog deneyimsizse, biyopsideki COX eksikliği mitokondriyal miyopati gibi yorumlanabilir.

5.2.2 Yardımcı T hücreleri ve sitokinleri

Bu çalışmada JDM biyopsilerinde yardımcı T hücre profillerini doku düzeyinde gösterebilmek amacıyla Th1 için IFN- γ , Th2 için IL-4 ve IL-10, *Treg* için Foxp3, Th17 için IL-17 ve patogeneze önemli bir yeri olduğu düşünülen tip-I IFN (IFN-alfa) antikoru ile immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Bu antikordan IL-10 ile özgün boyanma saptanamamıştır.

Hastalığın patogenezinde en çok üzerinde durulan patogenetik mekanizmalardan biri IFN yolağı ve ona bağlı oluşan IFN ile indüklenen proteinlerin yaptığı etkilerdir (62). Hastalarımızın sadece ikisinde IFN-alfa ile pozitif boyanma saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda IFN-alfa doku düzeyinde doğrudan gösterilememiş, fakat IFN-alfa tarafından uyarılan protein düzeylerinin JDM ve erişkin dermatomyozit hastalarının periferik kan, cilt ve kaslarından elde edilen

hücre kültürlerinde arttığı gösterilmiş ve bu artışın hastalık aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır (3, 61). İmmünohistokimyasal olarak IFN-alfa tarafından uyarılan proteinlerin, MxA ve ISG15'in (*IFN-stimulated gene 15*), dermatomyozit hastalarının biyopsilerinde, özellikle de perifasiküler atrofinin belirgin olduğu kısımlarda pozitif boyandığı, ayrıca normal iskelet kası hücre kültürleri tip-I IFN ile muamele edildiğinde bu proteinlerin kültür ortamında da arttığı gösterilmiştir (110). Bu bulgular tip-I IFN ve onun uyardığı proteinlerin patogenezdaki rolünü tekrar ortaya koymaktadır. IFN-alfa'nın esas kaynağının ise T hücrelerinden ziyade plazmositik dendritik hücreler olduğu düşünülmektedir (3).

JDM'de IFN- γ 'nin patogenezdaki rolünün olup olmadığı hala tartışma konusudur. *Lundberg ve ark.* inceledikleri beş hastadan ikisinde kas biyopsisinde IFN- γ 'nin pozitif olduğunu bildirmişlerdir (9). Sonrasında yapılan çalışmalar sadece tip-I IFN değil IFN- γ 'nin de patogenezdaki önemli rolü olduğunu düşündürmüştür. *Chinoy ve ark.* IFN- γ genindeki bazı allelik belirteçlerin dermatomyozit ile ilişkili olduğunu göstermiş, aynı ilişkinin IL-4 gen bölgesinde olmadığını raporlamıştır (111). Çalışmamızda biyopsilerin %80'inde IFN- γ ile pozitif boyanma saptanmıştır. IFN- γ boyanmasının yama şeklinde olduğu, biyopsinin etkilenmiş kısımlarında hem inflamatuvar hücrelerin, hem kas liflerinin, hem de endotel hücrelerinin yoğun bir şekilde pozitif boyandığı, daha az etkilenmiş veya normal alanlarda ise boyanmanın olmadığı görülmüştür. IFN- γ skorlarının diğer hücre ve sitokinlerin skorlarıyla ilişkili olmadığı saptanmıştır. Biyopsilerin büyük bir kısmında IL-17 ve IFN- γ 'nin beraber aynı alanlarda pozitif boyandığı gözlemlenmiştir ancak IL-17 ve IFN- γ skorları birbirleriyle ilişkili bulunmamıştır. Normalde IFN- γ doğal öldürücü (NK) hücreler ve Th1 hücreler tarafından salgılanan bir sitokinken etkilenen kas bölgelerinde inflamatuvar hücrelerin yanısıra kas liflerinin ve endotelin de IFN- γ ile pozitif boyanma göstermesi, doku hasarına bağlı IFN- γ artışının hastalık patogenezinde önemli bir basamak olabileceğini akla getirmiştir. Bu görüşü destekleyen çalışmalardan birinde miyoblast hücre kültürleri ayrı ayrı tip-I IFN ve IFN- γ ile uyarıldıktan sonra, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve IL-6 artışının sadece tip-I IFN uyarısı ile değil IFN- γ uyarısıyla da gerçekleştiği kanıtlanmıştır (112).

JDM otoimmün bir hastalık olması nedeniyle temel olarak Th1 aracılı bir hastalık olduğu düşünülmüş fakat Th2 hücrelerin etkisinin olup olmadığı her zaman bir merak konusu olmuştur. Bu çalışmada, Th2 profilini gösterebilmek için IL-10 ve IL-4 ile pozitif boyanan hücrelerin incelenmesi planlanmıştır. Ancak çeşitli derişim ve yöntem denemelerine rağmen IL-10 ile özgün boyanma elde edilememiştir. Biyopsilerin hiç birinde inflamatuvar hücrelerde pozitif IL-4 boyanması saptanmamıştır. Bu bulgu *Lundberg ve ark.* ile *Chinoy ve ark.*'nın bulguları ile uyumludur (9, 111). Bugüne kadar hastalığın patogeneğinde Th2 hücrelerin belirgin bir katkısı gösterilememiştir. Çalışmamızda IL-4 pozitif inflamatuvar hücre görülmemesine rağmen etkilenmiş alanlarda rejenere liflerin belirgin olduğu bölgelerde kas liflerinin kendisinin IL-4 ile pozitif boyanması dikkati çekmiştir. *Fujiyama ve ark.* dermatomiyozit hastalarının kaslarından elde edilen hücrelerde IFN- γ ve IL-4 ekspresyonunu araştırmışlar, IL-4'ün IFN- γ ekspresyonu, hastanın serum CK ve LDH düzeyi ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir (113). *Horsley ve ark.* IL-4'ün miyoblastların miyotübül oluşturmasını sağlayan faktörlerden biri olduğunu ve kas rejenerasyonunda liflerde IL-4 düzeyinin arttığını göstermiştir (114). Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde Th2 hücrelerin IFN aracılı hasarı kontrol etmek için IL-4 salgıladığı düşünülebilirse de çalışmamızda inflamatuvar hücrelerden ziyade kas liflerinde IL-4 boyanması göstermemiz artışın daha çok kas rejenerasyonu ile ilgili olduğunu düşündürmektedir.

Treg hücrelerinin esas görevi diğer T hücreleri tarafından oluşturulan inflamatuvar yanıtı baskılayıp kontrol etmektir. Ortamdaki sitokinlere göre fenotip değiştirip Th17'ye dönüşerek pro-inflamatuvar yanıt da oluşturabilirler (66). *Treg*'ler Foxp3 pozitifliği ile dokuda saptanabilmektedir. Çalışmamızdaki hastaların biyopsilerinin %30'unda Foxp3 ile pozitif boyanma saptanmıştır. Bu hastalarla Foxp3 negatif hastalar arasında total biyopsi skoru, kas gücü ve serum CK düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. *Vercoulen ve ark.* JDM hastaları ile Duchenne müsküler distrofi hastalarının kas biyopsilerinde Foxp3(+) T hücrelerinin tüm T hücrelerine oranları konusunda fark olmadığını, fakat JDM hastalarının kas biyopsilerinde hem CD3 (+) T hücrelerinin hem de Foxp3 (+) *Treg*'lerin daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada aktif JDM hastalarındaki *Treg* hücrelerinin inflamasyon baskılayıcı özelliklerinin remisyonadaki JDM hastaları ve

sağlıklı kontrollerdeki *Treg* hücrelerine göre belirgin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca steroid tedavisi alan JDM hastalarında Foxp3 (+) T hücre oranlarının arttığı bulunmuştur (75). Tüm bu bulgular birlikte yorumlandığında denilebilir ki, *Treg* hücreleri JDM hastalarının kas biyopsilerinde mevcuttur fakat inflamasyon baskılayıcı işlevlerini yerine getirememektedir. Steroid tedavisi sonrası miktarlarının artması da bu hücrelerin tedavi açısından önemli bir hedef olabileceğine işaret etmektedir. Fakat bu hücrelerin belirli uyarılar altında pro-inflamatuvar tarafa kayarak IL-17 ve IFN- γ salgılamaya başlaması bu konudaki umutları azaltmaktadır.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarla birlikte Th17 hücrelerin otoimmün hastalıklardaki önemi belirgin derecede artmıştır. Eskiden otoimmün hastalıkların temelinde sadece Th1 hücre yanıtının olduğu düşünülürken, Th1 hücrelerin baskılandığı otoimmün ensefalit modellerinde patogeneze den Th17'lerin sorumlu olduğu gösterilmiştir (67, 69). Çalışmamızdaki hastaların kas biyopsilerinin %92'sinde pozitif IL-17 boyanması saptanmıştır. IL-17 skorlarının T hücre, B hücre ve inflamasyon bölümü skorlarıyla ilişkili olduğu görülmüştür. Hastaların büyük çoğunluğunda IL-17 boyanma paterni IFN- γ 'ya benzer bulunmuş, etkilenmenin fazla olduğu kısımlarda hem inflamatuvar hücrelerin, hem kas liflerinin, hem de endotel hücrelerinin yoğun bir şekilde pozitif boyandığı, daha az etkilenmiş alanlarda ise boyanmanın olmadığı görülmüştür. Bulgularımızla uyumlu şekilde *Bilgic ve ark.* serum IL-17 düzeyinin IFN gen imzası ve IFN ilişkili proteinlerle birlikte dermatomyozit hastalarında arttığını, bu artışın hastalık aktivitesi ile uyumlu olduğunu göstermişlerdir (62). İnflamatuvar hücrelerin dışında endotel hücreleri ve kas liflerinde de IL-17 artışının olmasının temelindeki etkenler ortaya konulamamış, ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Biyopsilerin %88'inde B hücreleri, %57'sinde plazma hücrelerinin olması hastalığın patogenezinde B hücrelerinin de önemli olduğunu bir kez daha göstermiştir. B hücrelerinin genellikle T hücreleriyle bir arada bulunduğu, iki hastada folikül benzeri yapı oluşturduğu saptanmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada kas biyopsilerinde lenf nodu benzeri yapıların olduğu hastalarda, kas tutulumunun daha ağır, tedaviye yanıtın daha az olduğu gösterilmiştir (5). *Aggarwal ve ark.* ise B hücrelerini hedef alan ritüksimab tedavisine yanıtın en iyi olduğu grubun anti-sentetaz antikörları, anti-Mi-2 pozitifliği, juvenil başlangıçlı dermatomyozit ve

düşük hastalık tutulumu olan grup olduğunu göstermiştir (106). Çalışmamızdaki hastaların sadece bir tanesinde ritüksimab tedavisi uygulanmıştır. Bu hastanın biyopsisinde hem B hücrelerinin hem plazma hücrelerinin olduğu görülmüş, hastada kalsinoz ve restriktif akciğer hastalığının eşlik ettiği ağır bir klinik tablonun hakim olduğu saptanmış fakat hastanın tedavi yanıtlarına ilişkin veriye ulaşılamamıştır. B hücreleri dermatomyozit patogenezinde son zamanlarda üzerinde sıkça durulan mekanizmalardan olup, ritüksimab gibi B hücreleri üzerinden etki gösteren tedaviler umut verici sonuçlarıyla bu alandaki araştırmaların daha da yoğunlaşmasını sağlamıştır (106). Kas biyopsileri değerlendirilirken inflamatuvar hücre tiplerinin de araştırılması, B hücre varlığının bilinmesi, özellikle tedaviye dirençli vakalarda ilaç seçimi konusunda yönlendirici olabilir.

Çalışmamızda ortaya konan bulgular, T hücreleri açısından bakıldığında JDM'nin doku düzeyinde Th1 ve Th17 ilişkili bir hastalık olduğunu, Th2 etkisinin gösterilemediğini, *Treg* hücrelerinin de ortamda bulunduğunu fakat fonksiyonel bir fark yaratamadıklarını göstermektedir. Bu sonuçlarla Th1 ve Th17 hücrelerinin tedavi hedefi olarak kullanılabilir ana yollar olduğu düşünülebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ulaşılan sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

Klinik Özellikler

- Çalışmamızda 26 JDM hastası incelenmiştir.
- Çalışmadaki hastalarda kız-erkek oranı literatürden farklı olarak 1:1'dir.
- Hastaların biyopsi anında ortalama yaşları 8,7 yıl, şikayetlerin başlamasından biyopsi yapılmasına kadar geçen ortalama süre 4 aydır.
- Kızlar ve erkekler arasında klinik, demografik ve histopatolojik özellikler açısından fark bulunmamaktadır.
- Hastalar en sık kas güçsüzlüğü ve ağrısıyla başvurmaktadır, bunun yanında cilt döküntüsü, yutma fonksiyon bozukluğu ve parmak ucunda yürüme diğer başvuru şikayetleridir.
- Başvuru sırasında hastaların yaklaşık hepsinde aktif cilt tutulumu ve kas

güçsüzlüğü mevcuttur.

- Hastaların yaklaşık yarısında solunum sistemi, dolaşım sistemi ve gastrointestinal sistem değerlendirilmesi yapılmadığı, yarısına EMG incelemesi yapıldığı, sadece bir hastada MAA ve MSA bakıldığı görülmüştür. İki hastada restriktif akciğer hastalığı, iki hastada yutma fonksiyon bozukluğu, bir hastada hepatomegali, üç hastada kardiyak etkilenme saptandığı görülmüştür.
- Mevcut dosya kayıtlarından 17 hastanın tedavi notlarına ulaşılabilmektedir. Hastalığın prognozuna ve hastaların takibine ilişkin verilere büyük çoğunlukla ulaşılamamıştır. Verilerine ulaşılabilen 17 hastanın hepsinin steroid tedavisi aldığı ek olarak en sık metotreksat (n=13) tedavisi verildiği görülmüştür.

Histopatolojik özellikler

- JDM biyopsi skorumu aracına göre hastaların biyopsilerinin ortalama skoru 17,6 ve ortalama VAS skoru 6,1'dir. Bu sonuç, çalışmadaki hastaların orta-ağır kas tutulumu olduğunu göstermektedir.
- Skorumu aracındaki bölümlerden vasküler bölüm skorları hariç diğer bütün bölümlerin skorlarının (inflamatuvar bölüm, vasküler bölüm, kas lifi bölümü, bağ dokusu bölümü ve total biyopsi skoru) birbirleriyle ve patoloğun vizüel analog skoru ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.
- Hematoksin-eozin incelemede her zaman tipik bulgular görülmemekle birlikte bazı hastalarda inflamasyonun, bazı hastalarda liflerde dejenerasyon, rejenerasyon ve nekrozun daha belirgin olduğu, bazı hastalarda ise yama tarzında tutulum olduğu görülmüştür.
- İnflamatuvar hücrelerin, biyopsilerden ikisinde lenfoid dokuya benzer foliküller şeklinde büyük küme oluşturduğu, bir hastada neredeyse tüm kas liflerini ortadan kaldıracak şekilde yoğun olarak tüm alanlara yayılmış olduğu, diğer hastalarda ise ya perivasküler ve perimisyal alanda küçük kümeler halinde ya da endomisyumda dağılmış tekli hücreler halinde olduğu saptanmıştır.
- İnflamatuvar ortamın bileşenlerine bakıldığında T hücreleri (%73), B

hücreleri (%88) ve makrofajların (%100) genelde birlikte bulunduğu, bunlara daha nadir olarak plazma hücrelerinin (%57) eşlik ettiği görülmüştür.

- T hücre alt gruplarından Th2'nin biyopsilerdeki inflamatuvar ortamda olmadığı tespit edilmiştir. Th1 için IFN-alfa boyamasının yerine IFN ile uyarılan proteinlerin dokuda gösterilmesinin daha anlamlı olacağı düşünülmüştür. Treg hücreler %30 hastada, Th17 hücreler %92 hastada pozitifdir.
- Biyopsilerin %80'inde IFN- γ , %92'sinde IL-17 mevcuttur. Bu iki sitokin yama benzeri tutulumla biyopsinin etkilenen bölgelerinde daha belirgin olup, bu alanlarda hem inflamatuvar hücrelerde, hem endotelde, hem de kas liflerinde pozitifdir. IL-4 ile inflamatuvar hücrelerde boyanma saptanmazken rejenerasyon kas liflerinde belirgin artmış boyanma olduğu gözlenmiştir.
- Klinik parametrelerden serum CK düzeyinin hiçbir parametre ile ilişkili olmadığı, kas gücünü değerlendirmek için kullanılan MRC skorunun skorlama aracının kas lifi bölümü, VAS ve makrofaj skorlarıyla ilişkili olduğu görülmüştür.
- VAS'ın hem klinik hem de histopatolojik parametrelerle kuvvetli korelasyonu, kas biyopsisinin ve biyopsiyi değerlendiren patoloğun deneyiminin ne kadar önemli olduğunu tekrar gözler önüne sermektedir.
- Yaklaşık 15 yıllık süreçte 26 hastanın kas biyopsilerine ulaşmak ve bozulmadan saklanmış bu dokularla araştırma yapmaya olanak sağlamak ancak itinalı bir arşiv sistemi ile mümkündür. Özellikle JDM gibi karmaşık ve çok faktörlü temele sahip bir hastalığın patogenezi açıklanmada bu kas biyopsilerinin yeri ve önemi tartışılmazdır. Bu da Çocuk Patoloji Ünitesi'ndeki arşiv sisteminin değerini bir kez daha vurgulamaktadır.
- Patolojik arşivleme kadar klinik ve medikal kayıt tutma da patolojik bulguların kliniğe yansımalarını gösterebilmek için hayati öneme sahiptir. Çalışmamızdaki hastaların medikal bilgilerinin çoğuna ulaşamadığımızdır. Bu da çalışmamızın klinik yansımalarını görebilmek konusunda önümüzde büyük bir engel oluşturmuştur.
- Hastalığın asıl tutulumu kas ve cilt olması nedeniyle bu iki tutulum açısından klinik farkındalık konusunda bir sorun olmamakla beraber hastaların sadece

yarısının, hem mortalite hem de morbidite açısından çok önemli olan, solunum sistemi, dolaşım sistemi ve gastrointestinal sistem değerlendirmesi olması oldukça düşündürücüdür. Bu hastaların değerlendirilmesinde standart protokoller belirlenmelidir. Her hastanın ayrıntılı kas gücü, cilt tutulumu, solunum, dolaşım, gastrointestinal ve diğer sistem tutulumları ile ilgili bulgular, daha önce prognozla uyumu kanıtlanmış ölçekler kullanılarak her muayenede kaydedilmeli, otoantikorlar, akut faz reaktanları ve serum kas enzimleri gibi laboratuvar testleri en az bir kez fakat gerekli görüldüğü her anda ileri incelemede kullanılmalıdır. Merkezimizde yakın zamanda yeni tanı alan hastalara bu incelemelerin yapılmaya başlanması hastalığın daha iyi yönetilmesine olanak sağlamıştır.

- Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak JDM'nin, T hücre bazında bakıldığında Th1 ve Th17 aracılı bir hastalık olduğu, Th2'nin patogeneze katılmadığı, *Treg* hücrelerin inflamasyonda yer aldığı fakat fonksiyonlarının yeterli olmadığı söylenebilir. Beraberinde B hücrelerinin de varlığı göz önüne alınırsa B hücreleri, Th1 ve Th17 hücreleri hedef alan tedaviler üzerine ileriki yıllarda araştırmalar sürdürülebilir.

KAYNAKLAR

1. Unverricht H. Dermatomyositis acuta. Deutsche medizinische Wochenschrift. 1891;17:41-4.
2. Robinson AB, Reed AM. Clinical features, pathogenesis and treatment of juvenile and adult dermatomyositis. Nature reviews Rheumatology. 2011;7(11):664-75.
3. Baechler EC, Bilgic H, Reed AM. Type I interferon pathway in adult and juvenile dermatomyositis. Arthritis research & therapy. 2011;13(6):249.
4. Li CK, Varsani H, Holton JL, Gao B, Woo P, Wedderburn LR, et al. MHC Class I overexpression on muscles in early juvenile dermatomyositis. The Journal of rheumatology. 2004;31(3):605-9.
5. Lopez De Padilla CM, Vallejo AN, Lacomis D, McNallan K, Reed AM. Extranodal lymphoid microstructures in inflamed muscle and disease severity of new-onset juvenile dermatomyositis. Arthritis and rheumatism. 2009;60(4):1160-72.
6. Lopez de Padilla CM, Vallejo AN, McNallan KT, Vehe R, Smith SA, Dietz AB, et al. Plasmacytoid dendritic cells in inflamed muscle of patients with juvenile dermatomyositis. Arthritis and rheumatism. 2007;56(5):1658-68.
7. Kao L, Chung L, Fiorentino DF. Pathogenesis of dermatomyositis: role of cytokines and interferon. Current rheumatology reports. 2011;13(3):225-32.
8. Salomonsson S, Lundberg IE. Cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. Autoimmunity. 2006;39(3):177-90.
9. Lundberg I, Ulfgren AK, Nyberg P, Andersson U, Klareskog L. Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. Arthritis and rheumatism. 1997;40(5):865-74.

10. Akdis M. The cellular orchestra in skin allergy; are differences to lung and nose relevant? *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2010;10(5):443-51.
11. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787-93.
12. Steinman L. Mixed results with modulation of TH-17 cells in human autoimmune diseases. *Nature immunology*. 2010;11(1):41-4.
13. Constantin T, Ponyi A, Orban I, Molnar K, Derfalvi B, Dicsó F, et al. National registry of patients with juvenile idiopathic inflammatory myopathies in Hungary--clinical characteristics and disease course of 44 patients with juvenile dermatomyositis. *Autoimmunity*. 2006;39(3):223-32.
14. Kobayashi S, Higuchi K, Tamaki H, Wada Y, Wada N, Kubo M, et al. Characteristics of juvenile dermatomyositis in Japan. *Acta paediatrica Japonica; Overseas edition*. 1997;39(2):257-62.
15. McCann LJ, Juggins AD, Maillard SM, Wedderburn LR, Davidson JE, Murray KJ, et al. The Juvenile Dermatomyositis National Registry and Repository (UK and Ireland)--clinical characteristics of children recruited within the first 5 yr. *Rheumatology*. 2006;45(10):1255-60.
16. Pachman LM, Hayford JR, Chung A, Daugherty CA, Pallansch MA, Fink CW, et al. Juvenile dermatomyositis at diagnosis: clinical characteristics of 79 children. *The Journal of rheumatology*. 1998;25(6):1198-204.
17. Ramanan AV, Feldman BM. Clinical features and outcomes of juvenile dermatomyositis and other childhood onset myositis syndromes. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2002;28(4):833-57.

18. Sallum AM, Kiss MH, Sachetti S, Resende MB, Moutinho KC, Carvalho Mde S, et al. Juvenile dermatomyositis: clinical, laboratorial, histological, therapeutical and evolutive parameters of 35 patients. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2002;60(4):889-99.
19. Rider LG, Lindsley CB, Cassidy JT. Juvenile Dermatomyositis. In: Cassidy JT, editor. *Textbook of Pediatric Rheumatology*. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 375-413.
20. Symmons DP, Sills JA, Davis SM. The incidence of juvenile dermatomyositis: results from a nation-wide study. *British journal of rheumatology*. 1995;34(8):732-6.
21. Mendez EP, Lipton R, Ramsey-Goldman R, Roettcher P, Bowyer S, Dyer A, et al. US incidence of juvenile dermatomyositis, 1995-1998: results from the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Registry. *Arthritis and rheumatism*. 2003;49(3):300-5.
22. Wedderburn LR, Rider LG. Juvenile dermatomyositis: new developments in pathogenesis, assessment and treatment. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2009;23(5):665-78.
23. Wedderburn LR, Li CK. Paediatric idiopathic inflammatory muscle disease. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2004;18(3):345-58.
24. Pachman LM, Lipton R, Ramsey-Goldman R, Shamiyeh E, Abbott K, Mendez EP, et al. History of infection before the onset of juvenile dermatomyositis: results from the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Research Registry. *Arthritis and rheumatism*. 2005;53(2):166-72.

25. Manlhiot C, Liang L, Tran D, Bitnun A, Tyrrell PN, Feldman BM. Assessment of an infectious disease history preceding juvenile dermatomyositis symptom onset. *Rheumatology*. 2008;47(4):526-9.
26. Vegosen LJ, Weinberg CR, O'Hanlon TP, Targoff IN, Miller FW, Rider LG. Seasonal birth patterns in myositis subgroups suggest an etiologic role of early environmental exposures. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(8):2719-28.
27. Rider LG, Miller FW. Classification and treatment of the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 1997;23(3):619-55.
28. Chinoy H, Payne D, Poulton KV, Fertig N, Betteridge Z, Gunawardena H, et al. HLA-DPB1 associations differ between DRB1*03 positive anti-Jo-1 and anti-PM-Scl antibody positive idiopathic inflammatory myopathy. *Rheumatology*. 2009;48(10):1213-7.
29. Mamyrova G, O'Hanlon TP, Monroe JB, Carrick DM, Malley JD, Adams S, et al. Immunogenetic risk and protective factors for juvenile dermatomyositis in Caucasians. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(12):3979-87.
30. Pachman LM, Jonasson O, Cannon RA, Friedman JM. Increased frequency of HLA-B8 in juvenile dermatomyositis. *Lancet*. 1977;2(8050):1238.
31. Reed AM, Pachman L, Ober C. Molecular genetic studies of major histocompatibility complex genes in children with juvenile dermatomyositis: increased risk associated with HLA-DQA1 *0501. *Human immunology*. 1991;32(4):235-40.
32. Wedderburn LR, McHugh NJ, Chinoy H, Cooper RG, Salway F, Ollier WE, et al. HLA class II haplotype and autoantibody associations in children with juvenile

dermatomyositis and juvenile dermatomyositis-scleroderma overlap. *Rheumatology*. 2007;46(12):1786-91.

33. Chinoy H, Platt H, Lamb JA, Betteridge Z, Gunawardena H, Fertig N, et al. The protein tyrosine phosphatase N22 gene is associated with juvenile and adult idiopathic inflammatory myopathy independent of the HLA 8.1 haplotype in British Caucasian patients. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(10):3247-54.

34. Mamyrova G, O'Hanlon TP, Sillers L, Malley K, James-Newton L, Parks CG, et al. Cytokine gene polymorphisms as risk and severity factors for juvenile dermatomyositis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(12):3941-50.

35. O'Hanlon TP, Rider LG, Schiffenbauer A, Targoff IN, Malley K, Pandey JP, et al. Immunoglobulin gene polymorphisms are susceptibility factors in clinical and autoantibody subgroups of the idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(10):3239-46.

36. Pachman LM, Liotta-Davis MR, Hong DK, Kinsella TR, Mendez EP, Kinder JM, et al. TNFalpha-308A allele in juvenile dermatomyositis: association with increased production of tumor necrosis factor alpha, disease duration, and pathologic calcifications. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(10):2368-77.

37. Rider LG, Miller FW. Idiopathic Inflammatory Myopathies, Pathology and Pathogenesis. In: Klippel J, editor. *Primer on the Rheumatic Diseases*. 13. ed. New York: Springer, Arthritis Foundation; 2007. p. 368-74.

38. Greenberg SA. Proposed immunologic models of the inflammatory myopathies and potential therapeutic implications. *Neurology*. 2007;69(21):2008-19.

39. Whitaker JN, Engel WK. Vascular deposits of immunoglobulin and complement in idiopathic inflammatory myopathy. *The New England journal of medicine*. 1972;286(7):333-8.
40. Kissel JT, Mendell JR, Rammohan KW. Microvascular deposition of complement membrane attack complex in dermatomyositis. *The New England journal of medicine*. 1986;314(6):329-34.
41. Goncalves FG, Chimelli L, Sallum AM, Marie SK, Kiss MH, Ferriani VP. Immunohistological analysis of CD59 and membrane attack complex of complement in muscle in juvenile dermatomyositis. *The Journal of rheumatology*. 2002;29(6):1301-7.
42. Emslie-Smith AM, Engel AG. Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. *Annals of neurology*. 1990;27(4):343-56.
43. De Visser M, Emslie-Smith AM, Engel AG. Early ultrastructural alterations in adult dermatomyositis. Capillary abnormalities precede other structural changes in muscle. *Journal of the neurological sciences*. 1989;94(1-3):181-92.
44. Fall N, Bove KE, Stringer K, Lovell DJ, Brunner HI, Weiss J, et al. Association between lack of angiogenic response in muscle tissue and high expression of angiostatic ELR-negative CXC chemokines in patients with juvenile dermatomyositis: possible link to vasculopathy. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(10):3175-80.
45. Nagaraju K, Rider LG, Fan C, Chen YW, Mitsak M, Rawat R, et al. Endothelial cell activation and neovascularization are prominent in dermatomyositis. *Journal of autoimmune diseases*. 2006;3:2.

46. Sallum AM, Marie SK, Wakamatsu A, Sachetti S, Vianna MA, Silva CA, et al. Immunohistochemical analysis of adhesion molecule expression on muscle biopsy specimens from patients with juvenile dermatomyositis. *The Journal of rheumatology*. 2004;31(4):801-7.
47. Guzman J, Petty RE, Malleson PN. Monitoring disease activity in juvenile dermatomyositis: the role of von Willebrand factor and muscle enzymes. *The Journal of rheumatology*. 1994;21(4):739-43.
48. Lutz J, Huwiler KG, Fedczyna T, Lechman TS, Crawford S, Kinsella TR, et al. Increased plasma thrombospondin-1 (TSP-1) levels are associated with the TNF alpha-308A allele in children with juvenile dermatomyositis. *Clinical immunology*. 2002;103(3 Pt 1):260-3.
49. Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Lundberg I, Rawat R, Cutting S, Thapliyal R, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(6):1824-35.
50. Sallum AM, Kiss MH, Silva CA, Wakamatsu A, Sachetti S, Lotufo S, et al. MHC class I and II expression in juvenile dermatomyositis skeletal muscle. *Clinical and experimental rheumatology*. 2009;27(3):519-26.
51. Topaloglu H, Muntoni F, Dubowitz V, Sewry C. Expression of HLA class I antigens in skeletal muscle is a diagnostic marker in juvenile dermatomyositis. *Journal of child neurology*. 1997;12(1):60-3.
52. Katsumata Y, Ridgway WM, Oriss T, Gu X, Chin D, Wu Y, et al. Species-specific immune responses generated by histidyl-tRNA synthetase immunization are

associated with muscle and lung inflammation. *Journal of autoimmunity*. 2007;29(2-3):174-86.

53. Nagaraju K, Raben N, Loeffler L, Parker T, Rochon PJ, Lee E, et al. Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(16):9209-14.

54. Gunawardena H, Betteridge ZE, McHugh NJ. Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression. *Rheumatology*. 2009;48(6):607-12.

55. Feldman BM, Reichlin M, Laxer RM, Targoff IN, Stein LD, Silverman ED. Clinical significance of specific autoantibodies in juvenile dermatomyositis. *The Journal of rheumatology*. 1996;23(10):1794-7.

56. Gunawardena H, Wedderburn LR, Chinoy H, Betteridge ZE, North J, Ollier WE, et al. Autoantibodies to a 140-kd protein in juvenile dermatomyositis are associated with calcinosis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(6):1807-14.

57. Targoff IN, Mamyrova G, Trieu EP, Perurena O, Koneru B, O'Hanlon TP, et al. A novel autoantibody to a 155-kd protein is associated with dermatomyositis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(11):3682-9.

58. Gunawardena H, Wedderburn LR, North J, Betteridge Z, Dunphy J, Chinoy H, et al. Clinical associations of autoantibodies to a p155/140 kDa doublet protein in juvenile dermatomyositis. *Rheumatology*. 2008;47(3):324-8.

59. Tansley SL, Betteridge ZE, Gunawardena H, Jacques TS, Owens CM, Pilkington C, et al. Anti-MDA5 autoantibodies in juvenile dermatomyositis identify

a distinct clinical phenotype: a prospective cohort study. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(4):R138.

60. Reed A, Griffin T. The inflammatory milieu: cells and cytokines. In: Kagen LJ, editor. *The inflammatory myopathies*. New York: Humana Press; 2009. p. 29-53.

61. Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, Ortmann WA, Espe KJ, Novitzke J, et al. An interferon signature in the peripheral blood of dermatomyositis patients is associated with disease activity. *Molecular medicine*. 2007;13(1-2):59-68.

62. Bilgic H, Ytterberg SR, Amin S, McNallan KT, Wilson JC, Koeuth T, et al. Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(11):3436-46.

63. Fedczyna TO, Lutz J, Pachman LM. Expression of TNFalpha by muscle fibers in biopsies from children with untreated juvenile dermatomyositis: association with the TNFalpha-308A allele. *Clinical immunology*. 2001;100(2):236-9.

64. Jager A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian journal of immunology*. 2010;72(3):173-84.

65. Palmer MT, Weaver CT. Autoimmunity: increasing suspects in the CD4+ T cell lineup. *Nature immunology*. 2010;11(1):36-40.

66. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-8.

67. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421(6924):744-8.

68. Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of immunology*. 2009;183(11):7169-77.
69. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008;453(7198):1051-7.
70. Chevrel G, Page G, Granet C, Streichenberger N, Varennes A, Miossec P. Interleukin-17 increases the effects of IL-1 beta on muscle cells: arguments for the role of T cells in the pathogenesis of myositis. *Journal of neuroimmunology*. 2003;137(1-2):125-33.
71. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics*. 2001;27(1):68-73.
72. Bennett CL, Ochs HD. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Current opinion in pediatrics*. 2001;13(6):533-8.
73. Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(12):4793-8.
74. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez-Llordella M, Ashby M, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature immunology*. 2009;10(9):1000-7.

75. Vercoulen Y, Bellutti Enders F, Meerding J, Plantinga M, Elst EF, Varsani H, et al. Increased presence of FOXP3+ regulatory T cells in inflamed muscle of patients with active juvenile dermatomyositis compared to peripheral blood. *PloS one*. 2014;9(8):e105353.
76. Zhao Y, Fedczyna TO, McVicker V, Caliendo J, Li H, Pachman LM. Apoptosis in the skeletal muscle of untreated children with juvenile dermatomyositis: impact of duration of untreated disease. *Clinical immunology*. 2007;125(2):165-72.
77. Falcini F, Calzolari A, Generini S, Pignone A, Simonini G, Zulian F, et al. Bcl-2, p53 and c-myc expression in juvenile dermatomyositis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2000;18(5):643-6.
78. Reed AM, McNallan K, Wettstein P, Vehe R, Ober C. Does HLA-dependent chimerism underlie the pathogenesis of juvenile dermatomyositis? *Journal of immunology*. 2004;172(8):5041-6.
79. Harris-Love MO, Shrader JA, Koziol D, Pahlajani N, Jain M, Smith M, et al. Distribution and severity of weakness among patients with polymyositis, dermatomyositis and juvenile dermatomyositis. *Rheumatology*. 2009;48(2):134-9.
80. McCann LJ, Garay SM, Ryan MM, Harris R, Riley P, Pilkington CA. Oropharyngeal dysphagia in juvenile dermatomyositis (JDM): an evaluation of videofluoroscopy swallow study (VFSS) changes in relation to clinical symptoms and objective muscle scores. *Rheumatology*. 2007;46(8):1363-6.
81. Rider LG, Koziol D, Giannini EH, Jain MS, Smith MR, Whitney-Mahoney K, et al. Validation of manual muscle testing and a subset of eight muscles for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis care & research*. 2010;62(4):465-72.

82. Huber AM, Hicks JE, Lachenbruch PA, Perez MD, Zemel LS, Rennebohm RM, et al. Validation of the Childhood Health Assessment Questionnaire in the juvenile idiopathic myopathies. Juvenile Dermatomyositis Disease Activity Collaborative Study Group. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(5):1106-11.
83. Huber AM, Feldman BM, Rennebohm RM, Hicks JE, Lindsley CB, Perez MD, et al. Validation and clinical significance of the Childhood Myositis Assessment Scale for assessment of muscle function in the juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(5):1595-603.
84. van der Net J, Kamphuis SS, Helders PJ. The Childhood Myositis Assessment Scale to assess muscle function in a patient with juvenile dermatomyositis. *Arthritis and rheumatism*. 2002;47(6):694-5.
85. Bode RK, Klein-Gitelman MS, Miller ML, Lechman TS, Pachman LM. Disease activity score for children with juvenile dermatomyositis: reliability and validity evidence. *Arthritis and rheumatism*. 2003;49(1):7-15.
86. Tse S, Lubelsky S, Gordon M, Al Mayouf SM, Babyn PS, Laxer RM, et al. The arthritis of inflammatory childhood myositis syndromes. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(1):192-7.
87. Smith RL, Sundberg J, Shamiyah E, Dyer A, Pachman LM. Skin involvement in juvenile dermatomyositis is associated with loss of end row nailfold capillary loops. *The Journal of rheumatology*. 2004;31(8):1644-9.
88. Christen-Zaech S, Seshadri R, Sundberg J, Paller AS, Pachman LM. Persistent association of nailfold capillaroscopy changes and skin involvement over thirty-six months with duration of untreated disease in patients with juvenile dermatomyositis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(2):571-6.

89. Spencer-Green G, Schlesinger M, Bove KE, Levinson JE, Schaller JG, Hanson V, et al. Nailfold capillary abnormalities in childhood rheumatic diseases. *The Journal of pediatrics*. 1983;102(3):341-6.
90. Woo TR, Rasmussen J, Callen JP. Recurrent photosensitive dermatitis preceding juvenile dermatomyositis. *Pediatric dermatology*. 1985;2(3):207-12.
91. Love LA, Weinberg CR, McConnaughey DR, Oddis CV, Medsger TA, Jr., Reveille JD, et al. Ultraviolet radiation intensity predicts the relative distribution of dermatomyositis and anti-Mi-2 autoantibodies in women. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(8):2499-504.
92. Tansley SL, Betteridge ZE, Shaddick G, Gunawardena H, Arnold K, Wedderburn LR, et al. Calcinosis in juvenile dermatomyositis is influenced by both anti-NXP2 autoantibody status and age at disease onset. *Rheumatology*. 2014;53(12): p. 2204-8.
93. Huber AM, Dugan EM, Lachenbruch PA, Feldman BM, Perez MD, Zemel LS, et al. The Cutaneous Assessment Tool: development and reliability in juvenile idiopathic inflammatory myopathy. *Rheumatology*. 2007;46(10):1606-11.
94. Trapani S, Camiciottoli G, Vierucci A, Pistoiesi M, Falcini F. Pulmonary involvement in juvenile dermatomyositis: a two-year longitudinal study. *Rheumatology*. 2001;40(2):216-20.
95. Pope E, Janson A, Khambalia A, Feldman B. Childhood acquired lipodystrophy: a retrospective study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006;55(6):947-50.

96. Bingham A, Mamyrova G, Rother KI, Oral E, Cochran E, Premkumar A, et al. Predictors of acquired lipodystrophy in juvenile-onset dermatomyositis and a gradient of severity. *Medicine*. 2008;87(2):70-86.
97. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *The New England journal of medicine*. 1975;292(7):344-7.
98. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *The New England journal of medicine*. 1975;292(8):403-7.
99. Brown VE, Pilkington CA, Feldman BM, Davidson JE, Network for Juvenile Dermatomyositis PRES. An international consensus survey of the diagnostic criteria for juvenile dermatomyositis (JDM). *Rheumatology*. 2006;45(8):990-3.
100. Oddis CV, Rider LG, Reed AM, Ruperto N, Brunner HI, Koneru B, et al. International consensus guidelines for trials of therapies in the idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(9):2607-15.
101. Wedderburn LR, Varsani H, Li CK, Newton KR, Amato AA, Banwell B, et al. International consensus on a proposed score system for muscle biopsy evaluation in patients with juvenile dermatomyositis: a tool for potential use in clinical trials. *Arthritis and rheumatism*. 2007;57(7):1192-201.
102. Varsani H, Charman SC, Li CK, Marie SK, Amato AA, Banwell B, et al. Validation of a score tool for measurement of histological severity in juvenile dermatomyositis and association with clinical severity of disease. *Ann Rheum Dis*, 2015; 74(1): 204-10.
103. Pilkington CA, Wedderburn LR. Paediatric idiopathic inflammatory muscle disease: recognition and management. *Drugs*. 2005;65(10):1355-65.

104. Kim S, El-Hallak M, Dedeoglu F, Zurakowski D, Fuhlbrigge RC, Sundel RP. Complete and sustained remission of juvenile dermatomyositis resulting from aggressive treatment. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(6):1825-30.
105. Riley P, Maillard SM, Wedderburn LR, Woo P, Murray KJ, Pilkington CA. Intravenous cyclophosphamide pulse therapy in juvenile dermatomyositis. A review of efficacy and safety. *Rheumatology*. 2004;43(4):491-6.
106. Aggarwal R, Bandos A, Reed AM, Ascherman DP, Barohn RJ, Feldman BM, et al. Predictors of clinical improvement in rituximab-treated refractory adult and juvenile dermatomyositis and adult polymyositis. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(3):740-9.
107. Majithia V, Harisdangkul V. Mycophenolate mofetil (CellCept): an alternative therapy for autoimmune inflammatory myopathy. *Rheumatology*. 2005;44(3):386-9.
108. Hassan J, van der Net JJ, van Royen-Kerkhof A. Treatment of refractory juvenile dermatomyositis with tacrolimus. *Clinical rheumatology*. 2008;27(11):1469-71.
109. Malattia C, Damasio MB, Madeo A, Pistorio A, Providenti A, Pederzoli S, et al. Whole-body MRI in the assessment of disease activity in juvenile dermatomyositis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(6):1083-90.
110. Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, Walsh RJ, Liao A, Nazareno R, et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy. *Annals of neurology*. 2010;67(1):53-63.

111. Chinoy H, Salway F, John S, Fertig N, Tait BD, Oddis CV, et al. Interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms in Caucasian idiopathic inflammatory myopathy patients in UK. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(7):970-3.
112. De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, de Waal Malefyt R, Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *International immunology*. 2000;12(9):1329-35.
113. Fujiyama T, Ito T, Ogawa N, Suda T, Tokura Y, Hashizume H. Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4+ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis. *Clinical and experimental immunology*. 2014;177(1):110-20.
114. Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell*. 2003;113(4):483-94.