

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**ASETİLKOLİN RESEPTÖR ANTİKORU POZİTİF MYASTENİA
GRAVİS HASTALARININ TİMEKTOMİ MATERYALLERİNDE
TH17 HÜCRE İNFİLTRASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Lala MEHDİKHANOVA

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2014**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**ASETİLKOLİN RESEPTÖR ANTİKORU POZİTİF MYASTENİA GRAVİS
HASTALARININ TİMEKTOMİ MATERYALLERİNDE TH17 HÜCRE
İN FİLTRASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Lala MEHDİKHANOVA**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sevim ERDEM ÖZDAMAR**

**ANKARA
2014**

TEŞEKKÜR

Uzman olarak yetişmeme büyük katkısı olan, bilgi ve tecrübesiyle beni herdaim zenginleştiren, ayrıca uzmanlık tez konusunun seçiminde, tezin yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında ilgi, destek ve sabrını esirgemeyen, hayatım boyunca saygıyla hatırlayıp örnek alacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Sevim Erdem Özdamar'a;

Tezin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte bilimsel katkılarıyla tezin şekillenmesinde büyük emeği geçen, her zaman sıcak tebessümünü yüzünden eksik etmeyen, değerli hocam Doç. Dr. Aslı Tuncer'e;

Tez çalışması süresince birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve bundan büyük keyif aldığım, yoğun iş yüküne rağmen değerli vaktini esirgemeyen, mikroskop başında güler yüzü ve esprileriyle beni motive eden Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sevgen Çelik Önder'e;

Tez konusunun seçimi ve çalışmanın yürütülmesi sürecinde bana yol gösteren, yardım ve desteğini esirgemeyen Temel Onkoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Güneş Esendağlı'ya;

İstatistik verilerle ilgili katkılarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Erdem Karabulut'a;

Çalışmada yer alan immünohistokimya boyamalarının yapılmasına değerli vaktini ayırarak sabırla yardımcı olan, başta Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı teknisyeni Ziya Birinci olmak üzere, gösterdikleri hoşgörü ve güleryüzlülüklerinden dolayı tüm laboratuvar çalışanlarına;

İyi eğitilmiş ve her konuda donanımlı bir nörolog olarak yetişmemizi sağlayan, nöroloji heyecanını ve sevgisini bizlere aşıl原因an, engin bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, her fırsatta nöroloji'yi onlardan öğrendiğim için ne kadar şanslı olduğumu düşündürdüren tüm değerli Hacettepe Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Yine hem tez çalışması süresince, hem de asistanlık faaliyetim boyunca yanımda olan, başta Dr. Şefik Evren Erdener, Güliz Sayat, ve Uz. Dr. Can Ebru Kurt olmak üzere, kendilerini tanımaktan memnun olduğum ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma;

Son olarak; maddi-manevi konularda beni destekleyen, sonsuz sevgi ve ilgisini esirgemeyen, fedakârlıklarını asla ödeyemeyeceğim canım aileme ve her zaman motivasyonumu sağlayan sevgili kuzenim Aynur Mehdikhanlı'ya

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Mehdikhanova, L. Asetilkolin reseptör antikoru pozitif myastenia gravis hastalarının timektomi materyallerinde Th17 hücre infiltrasyonunun değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2014. Th17 hücrelerinin myastenia gravis (MG) patogeneziindeki rolü ile ilişkili bilgiler sınırlıdır. Asetilkolin reseptör (AChR) antikoru pozitif MG hastalarının serumundaki Th17 hücre sayısının timusun patolojik alt tipleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak, MG hastalığının patogeneziinde önemli rol alan timus dokusunda bu hücrelere özgül belirteçlere bakılmamıştır. Çalışmamızda, AChR antikoru pozitif ve timektomi yapılmış MG hastalarının timus bezi doku örneklerinde Th17 hücrelerine özgül IL-21R, IL-23R ve ROR γ belirteçlerini araştırmayı hedefledik.

Bu amaçla 2000-2010 yılları arasında kliniğimize başvurarak MG tanısı alan ve tedavi amaçlı timektomi uygulanmış hastalar retrospektif olarak incelendi. Çalışma AChR antikoru pozitif 37 MG hastası ve 24 hastadan oluşan kontrol grubu timus dokusu üzerinde gerçekleştirildi. Hasta grubunun timus doku materyalleri histopatolojik olarak 3 alt grup; timoma (n=15), folliküler hiperplazi (FH) (n=9) ve normal timus dokusu (n=13) şeklinde ele alındı. Her 3 antikor (IL-21R, IL-23R ve ROR γ) ile boyanmada timomalı MG grubunun diğer 3 gruba (FH, normal timus ve kontrol) kıyasla anlamlı olarak daha az boyandığı görüldü ($p<0.05$). Timoma alt grubunda IL-21R ile IL-23R ve IL-23R ile ROR γ boyanması arasında korelasyon olduğu gözlemlendi ($\rho=0.574$, $p<0.05$). Hasta alt gruplarında her 3 antikor ile boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasında korelasyon görülmedi ($p>0.05$).

Bulgularımız Th17 hücrelerinin timoma dokusunda daha az olduğuna işaret etmektedir ve daha önce serumda yapılmış çalışmalardaki Th17 hücre artışı ile çelişkili gibi görünmektedir. Bunun sebebi otoreaktif Th17 hücrelerinin timomadan ayrılarak periferik dolaşıma geçmesi olabilir. Çalışmamız timomalı MG hastalarında hastalık patogenezinin farklı olduğu fikrini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Myastenia gravis, Asetilkolin reseptör antikoru, Th17 hücreleri, IL-21R, IL-23R ve ROR γ , timoma

Bu çalışma HÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Mehdikhanova, L. Evaluation of Th17 cell infiltration in thymectomy materials of acetylcholine receptor antibody-positive myasthenia gravis patients. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Neurology, Speciality Thesis, Ankara, 2014. There is limited information on the role of Th17 cells in myasthenia gravis (MG) pathogenesis. Amount of Th17 cells in sera of acetylcholine receptor (AChR) antibody positive MG patients was believed to be associated with pathological subtypes of thymus. However, specific markers for those cells in thymus tissue, which is highly relevant to MG pathogenesis, have not been previously studied. In our study, we aimed to investigate the IL-21R, IL-23R and ROR γ markers that are specific for Th17 cells, in thymus tissues of thymectomized AChR antibody positive MG patients.

For this purpose, MG patients who applied to our clinic between 2000-2010 and underwent therapeutic thymectomy were retrospectively evaluated. The thymus tissues of 37 AChR antibody-positive MG patients and 24 control patients were selected. Thymus tissues of the patients were classified into three subgroups: thymoma (n=15), follicular hyperplasia (FH) (n=9) and normal thymus tissue (n=13).

Immunohistochemical studies using each three antibodies (IL-21R, IL-23R and ROR γ) revealed significantly less amount of staining in thymoma tissues of MG patients compared to other groups (FH, normal thymus and control) ($p < 0.05$). In thymoma subgroup, a correlation between IL-21R and IL23R, as well as IL-23R and ROR γ stainings were detected ($\rho = 0.574$, $p < 0.05$). In MG patients, no correlation was found between staining intensity with each three antibodies and AChR antibody titers ($p > 0.05$).

These findings suggest that Th17 cells are relatively sparse in thymoma tissue and this contrasts with previously reported Th17 cell increase detected in sera of patients. Detachment of autoreactive Th17 cells from thymoma tissue and their transport to the peripheral circulation may account for these findings. Our study supports the idea that the pathogenic process may be different in MG patients with thymoma.

Keywords: Myasthenia gravis, Acetylcholine receptor antibody, Th17 cells, IL-21R, IL-23R and ROR γ , thymoma

This work is supported by HU Scientific Research Projects Coordination Unit.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nöromusküler Kavşak ve Hastalıkları	4
2.1.1. NMK Anatomisi	4
2.1.2. NMK Fizyolojisi	4
2.1.3. NMK Hastalıklarının Patogenezi	5
2.1.4. NMK Hastalıklarının Sınıflaması	5
2.2. Myastenia Gravis Hastalığı	7
2.2.1. Terminoloji ve Tanımı	7
2.2.2. Epidemiyoloji	7
2.2.3. Klinik Özellikleri	7
2.2.4. MG Alt Tipleri	8
2.2.5. MG'de Tanı	17
2.2.6. MG'de Tedavi	21
2.2.7. Myastenik Kriz	23
2.3. Timus	24
2.3.1 Timus Anatomisi ve Histolojisi	24
2.3.2. Timus İmmünogenezi	25
2.3.3. MG Hastalığının Patogenezi ve Timusun Patogenezdeki Rolü	26
2.3.4. MG'de Timusta Otoimmün Yanıt	29
2.4. Otoimmün Hastalıklarda CD4+ T Hücre Alt Tipleri ve Sitokinlerin Rolü	32
2.4.1. Th1 Hücrelerinin MG ve EAMG İmmünopatogenezindeki Rolü	34
2.4.2. Treg Hücrelerinin MG ve EAMG İmmünopatogenezindeki Rolü	35

2.4.3. Th17 Hücrelerinin MG, EAMG ve Diğer Otoimmün Hastalıkların İmmünopatogenezindeki Rolü	36
2.4.4. Th17 Hücre Belirteçlerinin Rolü	37
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	40
3.1. Hasta Seçimi	40
3.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Oluşturulması	40
3.3. Timus Doku Örneklerinin Hazırlanması	41
3.4. İmmünohistokimyasal Boyama	41
3.5. Dokuların Değerlendirilmesi	42
3.6. İstatiksel Yöntemler	42
4. BULGULAR	44
4.1. Demografik Özellikler	44
4.2. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	46
4.3. Boyanma Yoğunluklarının Karşılaştırılması	55
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	67

SİMGELER KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AChR	Asetilkolin reseptör
AIRE	“Autoimmune regulator” / otoimmünite düzenleyici
BKAP	Bileşik kas aksiyon potansiyeli
CCL21	C-C motifi kemokin ligand 21
CD	“Cluster of differentiation”
CIA	“Collagen-induced arthritis” / kollajen ile indüklenen artrit
CXCL13	C-X-C motifi kemokin ligand 13
Dok-7	“Docking protein 7”
EAMG	“Experimental autoimmune myasthenia gravis” / deneysel otoimmün myastenia gravis
EGF	Epidermal büyüme (“growth”) faktörü
ELISA	“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”
FH	Foliküler hiperplazi
Foxp3	“Forkhead box p3”
GM	Germinal merkez
IFN	İnterferon
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin
KCNA4	“Potassium voltage-gated channel subfamily A member 4”
LRP4	“Low-density lipoprotein receptor-related protein 4” / düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein 4
MAC	“Membrane attack complex” / membran atak kompleksi
MG	Myastenia gravis
MIR	“Main immunogenic region” / temel immünojenik bölge
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
mTEH	Medüller timik epitelyal hücreler
MuSK	“Muscle-specific kinase” / kas spesifik kinaz
NİG	Negatif inspiratuvar güc
NK	“Natural killer” / doğal öldürücü

NMK	Nöromusküler kavşak
PCR	“Polymerase chain reaction” / Polimeraz zincir reaksiyonu
ROR γ	“RAR-related orphan receptor gamma”
SDF-1	“Stromal cell derived factor-1”
SPP	Son plak potansiyeli
TEH	Timik epitelyal hücreler
TGF- β	“Transforming growth factor beta” / dönüştürücü büyüme faktörü beta
Th	“T-helper”
TLEMG	Tek-lif elektromiyografi
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
Treg	T regülatör
WHO	“World Health Organization” / Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Nöromüsküler kavşağın bileşenleri	4
Şekil 2.2. Anti-AChR antikollarının etki mekanizmaları	12
Şekil 2.3. Düşük frekanslı sinir uyarımı ile tipik patolojik dekrement yanıtı	19
Şekil 2.4. Normal jitter	20
Şekil 2.5. Artmış jitter	20
Şekil 2.6. Timus lobülleri	25
Şekil 2.7. Timus dokusunda T lenfositlerin gelişimi	26
Şekil 2.8. T hücre alt tiplerinin farklılaşması	33
Şekil 2.10. MG patogenezinde CD4+ T hücre alt tiplerinin rolü	36
Şekil 2.11. Th17 hücrelerinin farklılaşması	39
Şekil 4.1. Tüm gruplarda IL-21R antikoru ile boyanma yoğunluğunun dağılımı	49
Şekil 4.2. Tüm gruplarda IL-23R antikoru ile boyanma yoğunluğunun dağılımı	49
Şekil 4.3. Tüm gruplarda ROR γ antikolları ile boyanma yoğunluğunun dağılımı	50
Şekil 4.4. Hasta ve kontrol grubu timus dokularının hemotoksilen eozin boyaları	51
Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubu timus dokularında IL-21R antikoru ile boyanma örnekleri	52
Şekil 4.6. Hasta ve kontrol grubu timus dokularında IL-23R antikoru ile boyanma örnekleri	53
Şekil 4.7. Hasta ve kontrol grubu timus dokularında ROR γ antikoru ile boyanma örnekleri	54

TABLOLAR

Tablo 2.1. NMK hastalıklarının sınıflaması	6
Tablo 2.2. MG'nin klinik alt tipleri	8
Tablo 2.3. MG tanısında yapılan testler	18
Tablo 2.4. Kanıta dayalı sınıflama ve çeşitli immünoterapi önerileri	22
Tablo 2.5. Timik epitelyal tümörlerin WHO sınıflaması	28
Tablo 3.1. Kullanılan primer antikolar ve inkübasyon süreleri	42
Tablo 4.1. AChR antikoru pozitif MG hasta grubunun demografik özellikleri ve timus doku histopatolojileri	44
Tablo 4.2. MG hastalığı olmayan kontrol grubunun demografik özellikleri ve tiroid ve/veya paratiroid doku histopatolojileri	45
Tablo 4.3. MG hastalarının AChR antikor düzeyi ve timus doku örneklerinin IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanma özellikleri	47
Tablo 4.4. Kontrol grubu timus doku örneklerinin IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanma özellikleri	48
Tablo 4.5. Hasta ve kontrol grubunun IL-21R, IL-23R ve ROR γ antikoları ile boyanma yoğunluğu açısından karşılaştırılması	55
Tablo 4.6. Tüm grupların IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanma yoğunluğu açısından karşılaştırılması	56
Tablo 4.7. IL-21 antikoru ile boyanma açısından grupların ikili karşılaştırması	56
Tablo 4.8. IL-23 antikoru ile boyanma açısından grupların ikili karşılaştırması	56
Tablo 4.9. ROR γ antikoru ile boyanma açısından grupların ikili karşılaştırması	57
Tablo 4.10. Hasta alt gruplarının IL-21R, IL-23R ve ROR γ antikoları ile boyanma yoğunluğunun birbiri ile korelasyonu	58
Tablo 4.11. Hasta grubunun IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanmasında boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasındaki ilişki	59
Tablo 4.12. Hasta alt gruplarının IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanmasında boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasındaki ilişki	59

1. GİRİŞ

Myastenia gravis (MG) anti-AChR antikoru aracılı, CD4+ T hücre bağımlı otoimmün hastalığın bir prototipidir. Jeneralize MG genellikle 40 yaş altında kadınları, 40 yaş üstünde ise erkekleri etkileyerek, oküler, bulbar ve jeneralize güçsüzlüğe neden olur. Hastaların %80-85'inde kas-sinir kavşağında yer alan nikotinik AChR'lerine karşı antikor tespit edilir. Bu antikorlar iskelet kaslarında AChR'lerini hedef alarak nöromüsküler kavşağı etkiler ve kas güçsüzlüğüne neden olur. Timus bezi MG patogenezinde tam olarak anlaşılmayan, ancak çok önemli role sahiptir. Timus bezinin puberte ile birlikte fonksiyonunu kaybetmesi ve involusyona gitmesi beklenirken AChR antikoru pozitif jeneralize MG hastalarının önemli bir kısmında bu durumun gerçekleşmediği ve bu hastalarda timik patoloji olduğu bilinmektedir. Bu patoloji erken başlangıçlı jeneralize AChR antikoru pozitif MG hastalarının %80'inden fazlasında timik hiperplazi, yaştan bağımsız olarak %10-15'inde ise timik epitelyal tümör-timoma şeklindedir (1) . Hiperplazik timus bezleri T hücre, B hücre ve plazma hücreleri yanı sıra, AChR ifade eden miyoid hücreler içerir (2) . Timomada neoplastik epitel hücreleri ise AChR, titin ve ryanodin reseptörü benzeri epitoplara dahil olmak üzere çok sayıda "self" benzeri antijenler ifade eder (3) . MG ilişkili timoma, hiperplazi ile karşılaştırıldığında otoreaktif T hücrelerden daha zengindir. Bu otoreaktif T hücreleri pozitif olarak seçilir ve perifere gönderilir ve orada otoantikor üreten B hücrelere yardım sağlamak için aktive olurlar (4,5) . Bu veriler timomalı MG patogenezinin timik hiperplazili MG'den farklı olduğunu düşündürür.

MG patogenezinde AChR spesifik CD4+ T helper (Th) hücreleri AChR antikoru üretimi için gereklidir (1) . Th hücreleri 4 büyük alt gruba ayrılır: Th1, Th2, T regülatör (Treg) ve Th17 hücreleri. Th17 hücreleri insanlarda dönüştürücü büyüme faktörü beta ["transforming growth factor beta" (TGF- β)] ve IL-1 β varlığında naif CD4+ T hücrelerinden farklılaşır (6,7) . Ayrıca, TGF- β Treg hücre ilişkili transkripsiyon faktörü olan Foxp3'ün ("forkhead box P3") ifadesini indükleyerek Treg hücre gelişimine neden olur (8) . İndüklenebilir Treg hücreleri ve Th17 hücreleri farklılaşma sırasında karşılıklı olarak

düzenlenmektedir ve TGF- β bu yolda ortak bir indükleyici olarak rol almaktadır (9) .

Aktive Th17 hücreleri IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) salgılar, bu yolla diğer proinflamatuvar mediatörlerin indüksiyonuna ve lökositlerin, özellikle de nötrofillerin inflamasyon bölgesine alımı ile doku inflamasyonuna neden olur (6,7) . Th17 hücreleri insanlarda çeşitli inflamatuvar hastalıklarda inflamasyon bölgesinde bulunmakta ve inflamatuvar barsak hastalıkları, romatoid artrit ve multipl skleroz gibi birçok otoimmün inflamatuvar hastalığın patogenezinde katılmaktadır (10,11) .

Daha önce yapılan çalışmalarda, Th1/Th2 dengesizliği ve Treg hücre sayısı değişikliğinin MG patogenezinde rol aldığı kanıtlanmıştır (12,13) . Timomalı MG hastalarının timus dokusunda Treg hücre sayısının folliküler hiperplazili (FH) MG hastalarına kıyasla az olduğu gösterilmiştir (14) .

Th17 hücrelerinin MG patogenezindeki rolü ile ilgili ise literatürde çok sınırlı bilgi mevcuttur. Bu bilgilere sıklıkla periferde pro/antiinflamatuvar sitokinlerin protein ya da mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeylerini araştıran çalışmalar ile ulaşılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, IL-23 mRNA ifadesinin timomalı grupta sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Yine benzer şekilde, MG serumunda ELISA yöntemi ile çalışılan IL-23 seviyesinin timomalı grupta sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, MG hastalarının serumunda Th17 hücre dağılımını belirlemek amacı ile standart akım sitometri yöntemi kullanarak CD4+ T hücreleri arasındaki Th17 hücre sayısı incelenmiştir. Th17 hücre sayısının timomalı MG grubunda diğer gruplara (timik hiperplazi, normal ve sağlıklı kontrol) kıyasla anlamlı derecede artmış olduğu gösterilmiştir. MG hastalarında periferik Th17 hücre sıklığı ile AChR antikor konsantrasyonu arasında korelasyon olduğu doğrulanmış, fakat AChR konsantrasyonu ile timusun patolojik alt tipleri arasında ilişki gözlenmemiştir (15) . Bu bilgiler MG'de ortaya çıkan otoimmün davranışın kökenini aydınlatmaya yararlı olsa da yeterli değildir.

MG hastalarının serumundaki Th17 hücre sayısının timusun patolojik alt tipleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (15) . Ancak, MG hastalığının

patogenezinde önemli rol alan timus dokusunda bu hücelere özgül belirteçlere bakılmamıştır. Bizim bu tez çalışmasındaki amacımız, tedavi amaçlı timektomi uygulanmış AChR antikor pozitif MG hastalarının timus bezi doku örneklerinde Th17 hücre yolağının farklı bileşenleri olan IL-21R, IL-23R ve ROR γ sitokin reseptörlerinin varlığını incelemektir. Bu sitokin reseptörlerinin varlığı durumunda, Th17 hücelere özgül belirteçler ile patolojik alt grupların birbiri ile karşılaştırılması ve aynı zamanda boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasındaki ilişkiye bakılması planlanmıştır.

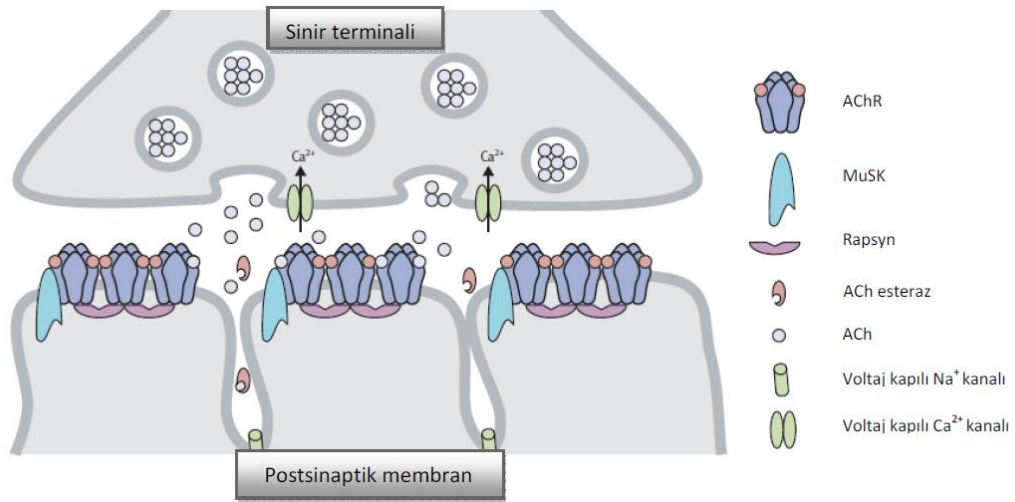
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöromüsküler Kavşak ve Hastalıkları

Nöromüsküler kavşak (NMK) miyelinli motor sinirler ile iskelet kası arasında bağlantı sağlar (16) . Motor sinir terminali ile çizgili kas lifi membranında impulslar bir elektrik akımı şeklinde iletilse de sinir kas geçiş noktası olan sinapsta iletim kimyasal temele dayanır. Bu kavşağın herhangi bir bölgesindeki işlev bozukluğu NMK hastalığına neden olur (17) .

2.1.1. NMK Anatomisi

NMK'nın 3 temel bileşeni vardır: 1. Asetilkolin (ACh) sentezlenen, depolanan ve salınan presinaptik motor sinir terminali; 2. Hem sinir hem de kasa ait ortak bir bazal lamina ve asetilkolinesterazın (AChE) da aralarında bulunduğu bazal laminaya bağlı molekülleri taşıyan sinaptik yarık; 3. AChR içeren postsinaptik kas membranı (Şekil 2.1) (1)



Şekil 2.1. Nöromüsküler kavşağın bileşenleri (1)

2.1.2. NMK Fiziyojisi

Nöromüsküler iletim sinir aksiyon potansiyelinin sinir terminaline girmesi ve ACh salınımını tetiklemesi ile başlar. ACh içeren sinaptik veziküllerin ekzositozu için depolarize olmuş sinir terminalinde yer alan voltaj

bağımlı Ca^{2+} kanallarından kalsiyumun içeri girmesi gereklidir. Salınan ACh sinaptik yarık boyunca yayılarak postsinaptik kas membranında yer alan AChR'leri ile etkileşime girer ve lokal depolarizasyona, son plak potansiyelinin (SPP) oluşumuna neden olur. ACh postsinaptik membran üzerinde AChE tarafından yıkılır (1) .

2.1.3. NMK Hastalıklarının Patogenezi

NMK hastalığı NMK'nın 3 temel bileşeninden herhangi birisinde ortaya çıkan anormallikten kaynaklanmaktadır:

Presinaptik NMK hastalığı kalsiyumun presinaptik sinir terminaline girişindeki bozukluğa bağlı normal kuantum salınımının azalması, sinaptik veziküller içerisinde ACh'in defektif sentezi ve paketlenmesi veya azalmış ACh salınımı ile ilişkili olabilir.

Sinaptik NMK hastalığı öncelikli olarak AChE eksikliği veya fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir. Bu farmakolojik yolla (ilaçlar) veya konjenital MG'de olduğu gibi AChE'da genetik bozukluk nedeni ile olabilir. Bu hastalıklarda güçsüzlük AChR kanalının sürekli depolarizasyonu veya desensitizasyonu ile ortaya çıkmaktadır.

Postsinaptik NMK hastalığı ise reseptör sayısı veya reaktivitesinde azalma sonucu ortaya çıkar. İlki, MG'de reseptör bölgelerinin kompleman aracılı yıkımından kaynaklanabilir. İkincisi ise, kalıtsal AChR alt ünite mutasyonuna bağlı olabilir, bu kanal açma ve kapama işlevini etkilemektedir (17) .

2.1.4. NMK Hastalıklarının Sınıflaması

NMK hastalıkları Tablo 2.1'de gösterildiği gibi presinaptik, sinaptik ve postsinaptik olmak üzere 3 gruba ayrılabilir (17) .

Tablo 2.1. NMK hastalıklarının sınıflaması (17)

I.	Presinaptik
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lambert-Eaton myastenik sendrom (LEMS) 2. Botulizm ve botulinum toksini 3. Kene paralizi (Avustralya) 4. Konjenital myastenia gravis 5. Kolin asetiltransferaz eksikliği 6. Sinaptik veziküllerde azalma ve yetersiz kuantal salınım 7. İlaç ve toksinler <ol style="list-style-type: none"> a. Hipermagnezemi b. Isırılarak veya sokularak zehirlenme c. Aminoglikozidler ve diğer antibiyotikler d. Kalsiyum kanal blokörleri (minör) e. Aminopiridinler f. Kortikosteroidler g. Hemikolinium-3
II.	Sinaptik
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Konjenital myastenik sendromlar- son plak asetilkolinesteraz eksikliği 2. İlaç ve toksinler <ol style="list-style-type: none"> a. Kolinesteraz inhibitörleri- edrofonyum, piridostigmin, neostigmin b. Organofosfatlar
III.	Postsinaptik
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Myastenia gravis <ol style="list-style-type: none"> a. Geçici neonatal myasteni 2. İlaça bağlı myastenia gravis <ol style="list-style-type: none"> a. Penisilamin b. Alfa-interferon 3. Konjenital myastenik sendromlar <ol style="list-style-type: none"> a. Primer kinetik defektler-yavaş ve hızlı kanal sendromları b. Primer AChR eksikliği c. Rapsyn eksikliği d. Sodyum kanalı mutasyonu e. Plektin eksikliği f. MuSK mutasyonları g. Dok-7 4. İlaç ve toksinler <ol style="list-style-type: none"> a. D-tübokürarin, vekuronium ve diğer nondepolarizan bloke edici ajanlar b. Süksinilkolin, dekametonyum ve diğer depolarizan bloke edici ajanlar c. Tetrasiklinler, linkomisin ve diğer antibiyotikler d. Kobra, konus deniz salyangozu vs tarafından ısırılma

2.2. Myastenia Gravis Hastalığı

2.2.1. Terminoloji ve Tanımı

MG hastalığı ile ilgili ilk açıklamalar 1879 yılında Erb tarafından üç vaka bildirimini ile, 1893 yılında ise Goldflam tarafından daha kapsamlı bir şekilde verilmiştir. Bu durum bazen Erb-Goldflam hastalığı olarak da adlandırılmaktadır. Hastalığın mevcut terimi ise, ilk kez 1895 yılında, Jolly tarafından “myastenia gravis psödo-paralitika” şeklinde kullanılmıştır. Ancak hastalık ile ilgili ilk tanımlamanın Erb'den önce verildiği sonradan ortaya çıkmıştır. Şöyle ki, Thomas Willis 1672 yılında yazmış olduğu “De Anima Brutorum” kitabında MG hastalığını tanımlamıştır (18) .

2.2.2. Epidemiyoloji

MG oküler, bulbar ve jeneralize güçsüzlükle seyreden, NMK'nın en sık rastlanan hastalığıdır. Yıllık insidansı 30/1,000,000 civarındadır, prevalansı ise 25-142/1,000,000 arasında değişmektedir (19) . MG oluşumu yaş ve cinsiyetten etkilenmektedir. Erken erişkin dönem (<40 yaş) kadınlarda erkeklerden 3 kat daha sık gözlenmektedir. Ergenlik dönemi ve 40 yaş üzerinde ise hastalığın görülme sıklığı her iki cinste eşit iken, 50 yaştan sonra erkeklerde insidans yükselir (20) . Aile öyküsü nadir bildirilmesine rağmen, birinci derece akrabalarda diğer otoimmün hastalıkların görülme insidansı yüksektir (21) .

2.2.3. Klinik Özellikleri

MG NMK'yı etkileyen antikor aracılı otoimmün hastalığın bir prototipidir (22) . Klinik özelliği spesifik kas gruplarını içeren güçsüzlüktür. Hastalarda farklı derecelerde pitoz, diplopi, dizartri, disfaji, dispne, fasiyal güçsüzlük, ekstremit ve aksiyal güçsüzlük görülebilir. Genellikle hastalar güçsüzlüğün gün içerisinde değişkenlik gösterdiğini, aktivite ile arttığını, dinlenme ile azaldığını belirtirler. Pitoz veya diplopi ile prezente olan oküler güçsüzlük MG'de en sık ortaya çıkan ilk bulgudur (20) . Hastalığın jeneralize güçsüzlük şeklinde ilerlemesi genellikle ilk iki yıl içerisinde ortaya çıkar. Fasiyal

güçsüzlük oldukça yaygın izlenmektedir. Ağrısız disfaji ile seyreden bulbar güçsüzlük, dizartri ve çiğneme güçlüğü hastaların yaklaşık %15'inde ilk belirtidir (23) . Solunum kaslarını kapsayan güçsüzlük hastalıkta nadir görülmekle birlikte, hayati tehdit edici durum olması nedeni ile acil tedavi gerektirir. Nadiren de olsa, önemli derecede kavşak tipi veya tek kas gruplarını içeren fokal güçsüzlük olabilir (24,25) . MG seyri değişkendir. Bir çok hastada semptomlar özellikle hastalığın ilk yılı içerisinde enfeksiyon, emosyonel stres, cerrahi veya ilaçlar ile tetiklenen aralıklı kötüleşme gösterirler. Maksimum şiddetine ilerleme genellikle hastalığın ilk 2 yılı içerisinde ortaya çıkar. Uzun süreli spontan remisyonlar nadir olmakla birlikte hastaların %10-20'sinde bildirilmiştir (20) .

2.2.4. MG Alt Tipleri

Klinik özellikleri, başlangıç yaşı, otoantikör profili ve timik patoloji farklılıklarına dayanarak MG çok çeşitli şekillerde sınıflanmaktadır (Tablo 2.2) (1) .

Tablo 2.2. MG'nin klinik alt tipleri (1)

	Başlangıç yaşı	Timus histolojisi	Kas otoantikörleri	HLA birlikteliği	Yorumlar
Erken başlangıç	<40	Hiperplazi	AChR	DR3- B8, DR9 (Asyalılarda)	Erkek: kadın oranı - 1:3
Geç başlangıç	>40	Normal	AChR, titin, ryanodin reseptör	DR2-B7	Anti-titin ve ryanodin reseptör antikörleri şiddetli hastalık ile ilişkili
Timoma	40-60 (genellikle)	Neoplazi	AChR, titin, ryanodin reseptör, KCNA4	Tanımlanmamış	Diğer paraneoplastik hastalıklarla ilişkili olabilir
MuSK	<40 (çoğu hastada)	Normal	MuSK	DR14-DQ5	K>E, bazı hastalarda selektif orofaringeal, fasiyal ve solunum kaslarında güçsüzlük
Seronegatif (jeneralize)	Değişken	Hiperplazi (bazılarında)	%66'sında kümelenmiş AChR'e karşı antikörler	Tanımlanmamış	Düşük afiniteli antikörleri olmayanlarda tanımlanamayan otoantijen?
Oküler	Erişkin ABD ve Avrupa'da; Çocukluk Asya'da	Bilinmeyen	%50'sinde AChR	Bw46 (Çin hastalarda)	Düşük afiniteli AChR antikörleri?

2.2.4.1. MG'nin Klinik Alt Tipleri

Yukarıda belirtildiği gibi, MG'nin en sık (2/3) başlangıç semptomu eksternal oküler kasların tutulumudur. Oküler kaslara sınırlı kalan myastenik güçsüzlük oküler MG olarak adlandırılır. Çoğu hastada ise zamanla bulbar ve ekstremitelerde güçsüzlüğü eklenir. Bu hastalar jeneralize MG olarak kabul edilir (17) .

2.2.4.1.1. Oküler MG

Oküler MG beyaz ırkta, MG hastalarının %17'sinde gözlenmektedir (20) . Asya toplumlarında oküler MG'nin daha sık (tüm MG hastalarının %58 kadarı) görüldüğü ve çocukların daha yatkın olduğu bildirilmiştir (26,27) . Eğer güçsüzlük 2 yıl sonrasında da oküler kaslarla sınırlıysa, bu hastalığın %90 olasılıkla jeneralize olmayacağı anlamına gelir (20) . Oküler MG hastalarının %50 kadarında anti-AChR antikoru vardır ve yüksek antikor titreleri hastalığın jeneralize olacağı anlamına gelmez (28) . Oküler MG'de anti-MuSK ["muscle-specific kinase" (kas spesifik kinaz)] antikoru nadiren bulunur (29-31) .

Oküler MG immünopatogenezinin jeneralize MG'ye benzer olma olasılığı yüksektir. Ekstraoküler kasların MG'ye artmış duyarlılığı NMK morfolojisi ve fizyolojisindeki farklılıklardan dolayı olabilir. Ekstraoküler kaslarda sinaptik kıvrımlar daha az belirgindir, daha az postsinaptik AChR'ler ve daha küçük motor üniteler vardır ve yüksek ateşleme frekansına sahiptir (32) . Muhtemelen diğer bir ilişkili faktör, ekstraoküler kaslarda kompleman düzenleyicilerinin daha düşük ifadesidir, bu da onların kompleman aracılı hasara daha savunmasız kalmasına neden olabilir (33,34) .

2.2.4.1.2. Jeneralize MG

Jeneralize MG hastaları erken ve geç başlangıçlı olmak üzere ikiye ayrılabilir (1) . Erken başlangıçlı MG'in genellikle 40 yaşından önce ortaya çıkmaktadır (35) . Bu hastalar sıklıkla kadındır ve anti-AChR antikoru ve büyümüş hiperplazik timus bezlerine sahiptirler. Anti-AChR antikoru ek olarak diğer organ spesifik antikoru mevcut olabilen bu hastalar diğer

otoimmün hastalıklardan, sıklıkla otoimmün tiroid hastalığından etkilenmiş olabilir (36,37) . AChR'ü dışındaki kas bileşenlerine karşı antikolar erken başlangıçlı MG'de tipik olarak görülmez (38) .

Kırk yaşından sonra başlayan hastalık sıklıkla erkeklerde görülür ve bu hastalarda timus histolojisi genellikle normal veya atrofiktir. Bununla birlikte, 50 yaş üzeri hastalarda timoma görülmediği sürece timektomi nadiren yapıldığı için bu yaş grubunda histolojik çalışmalar nispeten azdır. Geç başlangıçlı MG hastaları oküler veya jeneralize güçsüzlükle prezente olabilir, ancak erken başlangıçlı MG ile karşılaştırıldığında genellikle daha ağır seyreder ve spontan remisyon nadirdir (39) . Anti-AChR antikolarına ek olarak bu hastalarda titin ve ryanodin reseptörleri gibi çizgili kas proteinlerine karşı antikolar da vardır (40) . Bu anti-kas antikolarının, özellikle de anti-ryanodin reseptör antikolarının varlığı daha ağır, jeneralize, ağırlıklı olarak orofaringeal güçsüzlük ve sıklıkla myastenik kriz ile ilişkilendirilmiştir (41,42)

2.2.4.2. Antikor Tipine Göre MG Alt Tipleri

2.2.4.2.1. Anti-AChR Antikoru Pozitif MG

MG'de anti-AChR antikolarının patojenik rolü birçok çalışma ile açıkça gösterilmiştir (43) . MG hayvan modeli MG'li hastaların serumundan elde edilen monoklonal reseptör antikolarının farelere enjekte edilmesi ile oluşturulmuştur. Bu farelerde hem klinik, hem de elektrofizyolojik olarak hastalık oluştuğu gözlenmiştir. Klinik olarak yaygın güçsüzlük, elektromiyografik olarak ise minyatür SPP amplitüdünde düşüş izlenmiştir. Ayrıca repetitif sinir uyarımı ile dekrement yanıtı elde edilmiştir (44-46) . MG'li hastaların dolaşımındaki antikoların plazma değişimi ile ortadan kaldırılmasının klinik takipte genellikle dramatik bir iyileşme ile sonuçlandığı gösterilmiştir (47) .

AChR antikoları genellikle IgG1 veya IgG3 izotipine ait olup, komplemanı aktive etme yeteneğine sahiptir. Bu antikolar AChR'ünün α alt ünitesinin (alfa 67-76) konformasyon bağımlı temel immünojenik bölgesine ["main immunogenic region" (MIR)] bağlanır (48) . AChR antikoları kas son

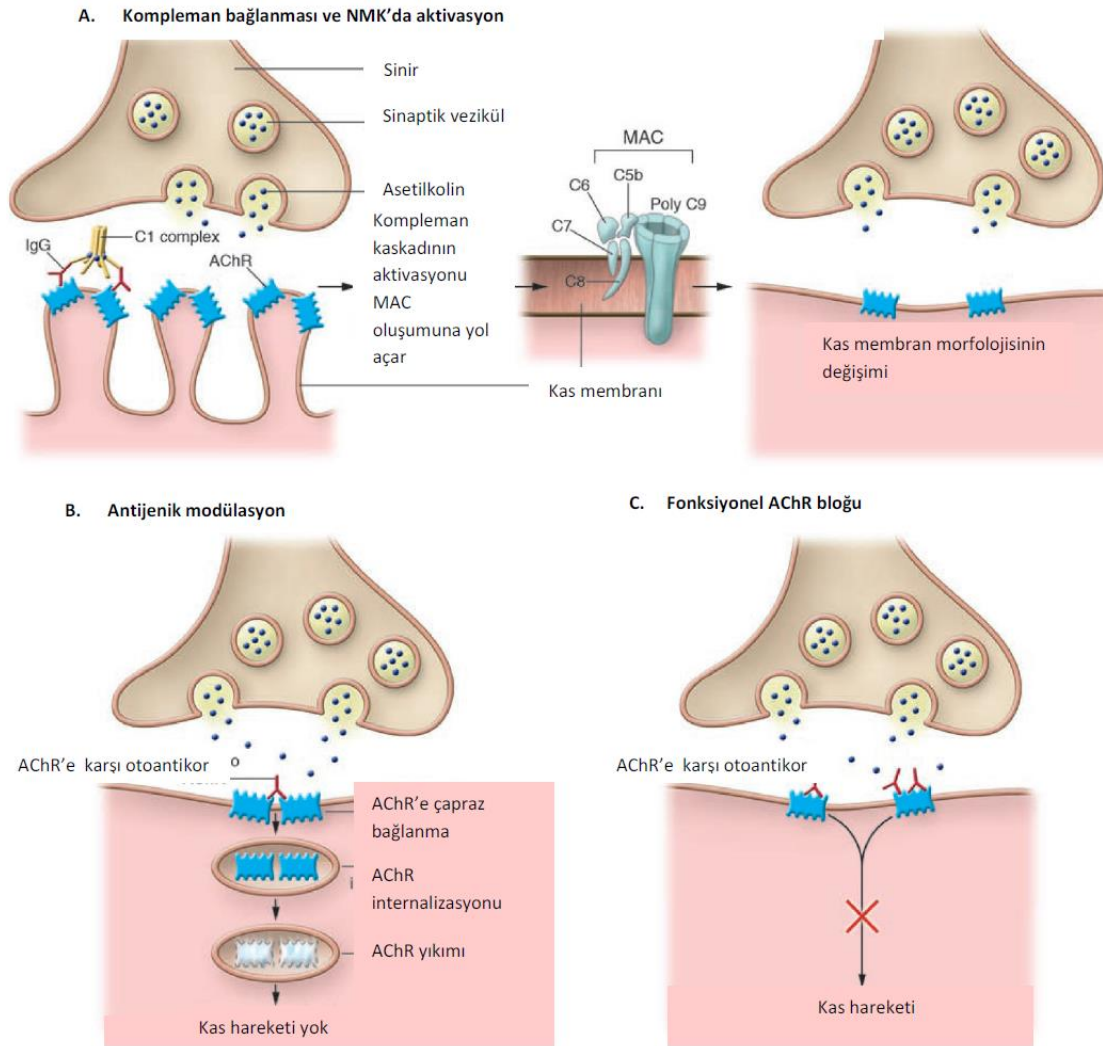
plağında doğrudan hasara neden olsa da, yüksek afiniteli, son derece mutasyona uğramış doğası ile anti-AChR IgG'ler otoantikor yanıtın T hücre bağımlı olduğunu göstermektedir ve CD4+ T hücreleri patolojik antikor üretiminde B hücrelerine yardımcı olmaktadır (49-51) .

Şekil 2.2'de gösterildiği gibi fonksiyonel AChR'lerin kaybının temelinde 3 ana mekanizma vardır (52) :

1. Bu 3 mekanizma arasında muhtemelen en önemlisi, son plağın kompleman aracılı parçalanmasıdır. Bu postsinaptik kas membranında morfolojik hasara neden olur (53) . Postsinaptik membranda kıvrımlı yapının düzleşmesi hem sinaptik aralığın genişlemesine böylece, presinaptik terminalden salınan asetilkolininin asetilkolinesteraza maruz kalmadan postsinaptik membrana ulaşmasının zorlaşmasına, hem de postsinaptik membranda voltaj bağımlı Na⁺ kanal sayısının azalmasına neden olur, bu da kas lifi aksiyon potansiyeli eşliğini artırır (54) .

2. Her bir AChR'ünde 2 adet α alt ünitesi dolayısı ile 2 adet MIR vardır. İki komşu reseptördeki MIR bölgelerinin yerleşimi tek antikorun iki reseptöre bağlanması için elverişli bir açıdadır. Bu bağlanma sonucu hızlanmış internalizasyon ve yıkım AChR sayısının azalması ile sonuçlanır (55) .

3. Son olarak, antikorların AChR'lerine bağlanması ile AChR'lerinin doğrudan blokajı bazı hastalarda önemli olabilir (56) .



Şekil 2.2. Anti-AChR antikorlarının etki mekanizmaları (57) . MAC: membran atak kompleksi

2.2.4.2.2. Anti-MuSK Antikoru Pozitif MG

Jeneralize MG hastalarının yaklaşık %15'inde mevcut test yöntemleri ile anti-AChR antikorları saptanamamaktadır. Bu hastaların yaklaşık %40'ında diğer bir postsinaptik NMK proteini olan MuSK'a karşı antikorlar bulunur (58) . MuSK transmembran son plak polipeptidi olup, NMK'nın normal fonksiyonel bütünlüğünü sağlayan sinyal yolağında yer alır (59) . Son kanıtlar anti-MuSK antikorlarının son plakta AChR kümelenmesini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Bu fonksiyonel AChR sayılarının

azalmasına neden olur (60,61) . MuSK antikoru anti-AChR antikorumun aksine, ağırlıklı olarak IgG4'tür (IgG1 veya IgG3 değil) ve komplemanı aktive etmezler (58) . Anti-MuSK antikoru hastalar anti-AChR antikoru pozitif MG ile benzer bulgulara sahip olabilseler de, bazı farklı klinik özellikler gösterirler. Bu grup hastalarda seçici olarak fasiyal, bulbar, boyun ve solunum kas güçsüzlüğü ve zaman zaman oküler kasların göreceli olarak korunduğu belirgin kas atrofisi izlenir (62,63) . Solunum krizleri jeneralize anti-AChR antikoru pozitif MG hastalarına kıyasla daha sık görülür. Güçsüzlük MG'de genellikle semptomatik olmayan paraspinal ve üst özefageal kasları içerebilir (64) . Antikolinesteraz ajanlara cevap olarak artmış duyarlılık, yanıtsızlık ve hatta kötüleşme bildirilmiştir (65) . Anti-MuSK MG hastalarında hastalığın başlama yaşı erken olma eğilimindedir ve hastalar ağırlıklı olarak kadındır (63) . Timus histolojisi ise genellikle normaldir (66) .

2.2.4.2.3. Seronegatif MG

Anti-AChR ve anti-MuSK antikoru saptanmayan MG hastaları seronegatif hastalar olarak adlandırılır ve klinik olarak heterojendir. Sadece oküler, hafif jeneralize veya ağır jeneralize hastalık şeklinde ortaya çıkabilirler. Seronegatif MG'nin gerçek prevalansı oldukça düşük olabilir. Çünkü seronegatif MG hastalarının %66'sında transfekte edilen hücre yüzeylerinde, tercihen kümelenmiş AChR'lere bağlanan düşük afiniteli IgG antikoru tespit edilmiştir (67) ve bu antikoru şu an rutin kullanımda olan testlerle tespit edilememektedir. Bu düşük afiniteli antikoru genellikle IgG1 alt sınıfına ait olup komplemanı etkinleştirme kapasitesine sahiptir ve bu durum onların patojenik rolünü desteklemektedir (1) . Doğal olarak, bu hastalar ile anti-AChR antikoru pozitif MG hastaları klinik özellikler, farmakolojik tedaviye yanıt ve timik anormallikler açısından birbirinden ayırt edilemez niteliktedir (68) . Seronegatif MG hastaları immünsüpresif tedavi, plazma değişimi ve hatta timektomiden faydalanırlar (69) . Ayrıca, bu hastalarda kas biyopsisi AChR kaybını göstermektedir (60) . Timus histolojisinde ise anti-AChR antikoru pozitif MG'ye benzer şekilde hiperplazi ve germinal merkezler görülmektedir (28,66) .

2.2.4.2.4. Anti-LRP4 Antikoru Pozitif MG

Son yıllarda seronegatif MG hastalarında yeni bir antikör olan düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein 4 [“low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4)] antikoru tespit edilmiştir. LRP4 düşük dansiteli lipoprotein reseptör ailesinin üyesi olup, multipl epidermal büyüme faktörü [“epidermal growth factor” (EGF)] ve düşük dansiteli lipoprotein reseptör tekrarına sahip büyük bir hücre dışı N terminal bölge, transmembran domaini ve katalitik motifi olmayan kısa bir C terminal bölge içermektedir (70) . LRP4 agrin reseptörüdür (71,72) . Agrin motor sinir terminalinden salınarak LRP4 ve MuSK’a bağlanır. Bu bağlanma MuSK’ın aktivasyonunu sağlar ve MuSK hücre içi Dok-7 (“docking protein-7”) proteini ile etkileşerek postsinaptik membran üzerinde yer alan AChR’lerinin kümelenmesine neden olur (73) . Bu güne kadar 3 ayrı grup tarafından seronegatif MG hastalarında LRP4 antikoru tespit edilebilmiştir. Higuchi ve ark. Japon seronegatif MG hastalarının %2’sinde (74) , Pevzner ve ark. seronegatif hastaların yaklaşık %50’sinde (75) ve Zhang ve ark. ise bu grup hastaların %9.2’sinde (70) LRP4 otoantikörleri tespit etmiştir. Bu 3 çalışmanın sonuçları arasındaki farkın nedeni bilinmemekle birlikte, hastaların farklı ülke ve etnik kökenlere sahip olması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (70) . LRP4’ün büyük hücre dışı domaini göz önüne alınırsa LRP4 antikörlerinin patojenik mekanizmaları büyük olasılıkla kompleks olabilir. Örneğin, LRP4 agrine ek olarak ayrıca MuSK ile etkileşir. Bu nedenle anti-LRP4 antikörleri LRP4’ün MuSK ile etkileşimini engelleyebilir. LRP4 antikörleri AChR antikörlerine benzer şekilde IgG1 alt sınıfına ait olup, komplemanı aktive etme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle de komplemanın LRP4 antikoru pozitif MG hastalarının patogenezinde rolü olabileceği düşünülmektedir (70, 76) .

2.2.4.3. Timus Patolojisine Göre MG Alt Tipleri

MG'de otoimmün bozukluğa yol açan tetikleyici faktör bilinmemekle birlikte, bu süreçte timus bezinin rol aldığına dair kanıtlar bildirilmiştir (1) . AChR antikoru pozitif jeneralize MG hastalarının %80'den fazlasında timusta patolojik değişiklikler tespit edilmiştir. Timik değişiklikler folliküler hiperplazi (FH) , diffüz hiperplazi, timus involüsyonu ve timomadan oluşmaktadır. Erken başlangıçlı MG hastalarında hiperplazi en sık görülen değişiklik olduğu halde, geç başlangıçlı MG'de timoma veya karışık timus histolojisi (timoma ve timik hiperplazi birlikteliği) hakimdir (77) . MuSK pozitif olguların timus dokusu ise minimal histolojik değişikliklere sahip olup, genellikle yaş ile uyumlu kontrollere benzemektedir (66,78) .

2.2.4.3.1. MG ve Hiperplazik Timus

Erken başlangıçlı anti-AChR pozitif hastaların %80'den fazlasında timik hiperplazi vardır (79) . Seronegatif vakalarda ise değişken oranda (%35-75) hiperplazik değişiklikler saptanır (66,78) . Hiperplazik timus dokusunda lenfosit infiltrasyonu ve lenf nodlarına benzer şekilde germinal merkezler (GM) vardır. Hiperplazik timus bezleri T hücre, B hücre ve plazma hücreleri yanı sıra, AChR ifade eden miyoid hücreler içerir (2) . Nitekim, bu hücreler AChR'e karşı immün yanıt için gerekli olan tüm bileşenleri içerir ve timosit kültüründe spontan olarak anti-AChR antikoları üretir (80) . Bu bulgular intratimik patogenezi kavramını desteklemektedir. Ayrıca, hiperplazik timusun erken başlangıçlı MG'de AChR'e karşı immün yanıtın başlatılmasında rolü olduğunu göstermektedir (1) .

2.2.4.3.2. MG ve Timoma

MG hastalarının yaklaşık %10-15'inde timik epitelyal tümör-timoma vardır. Timomalar genellikle otoimmünite, muhtemelen lenfosit seçimi ve neoplastik hücreler tarafından ifade edilen öz antijen sunumunun bozulması ile ilişkilidir. Neoplastik epitel hücreleri AChR, titin ve ryanodin reseptörü benzeri epitoplara dahil olmak üzere çok sayıda "self" benzeri antijenler ifade eder (3) . İlişkisiz gibi görünen bu otoantijenlere karşı hedeflenen, potansiyel

olarak çapraz reaksiyon gösteren proteinlerin hastalığın oluşumunda rol alabileceği düşünülmüştür (81). MG ilişkili timomalar otoreaktif T hücrelerden zengindir (5). Timoma ile ilişkili otoimmünitenin immünopatogenezi potansiyel olarak otoreaktif T hücrelerin pozitif olarak seçilmesi, perifere gönderilmesi ve orada otoantikor üreten B hücrelerine yardımcı olmak üzere etkinleşmesidir. Timomada potansiyel reaktif T hücrelerin negatif seçimi ve düzenlenmesi otoimmün regülatör gen ifadesi eksikliği ve Treg hücrelerin selektif kaybına bağlı olarak bozulmuş olabilir (4,82) .

Timoma ilişkili MG erkek ve kadınlarda eşit sıklıkta görülür, herhangi bir yaşta başlayabilir, genellikle başlangıcı 50 yaşta tepe noktasına ulaşır (83,84) . Bu hastaların kliniği timoması olmayan, ilerleyici jeneralize ve orofaringeal güçsüzlük ile giden erken başlangıçlı MG hastalarına kıyasla daha ağırdır. Bununla birlikte, uzun dönem prognozu geç başlangıçlı timoması olmayan MG'ye benzerdir (85-87) . Nadir istisnalar dışında, (88) timomalı MG hastalarında yüksek titrede anti-AChR antikorları saptanır ve bu hastalarda genellikle titine karşı antikorlar da mevcuttur (83) . Timomalı MG'de paraneoplazi ile ilişkili antikorlar: anti-voltaj kapılı K^+ ve Ca^{2+} kanal, anti-Hu, antidihidropirimidinaz ilişkili protein 5 ve anti-glutamik asit dekarboksilaz antikorları ortaya çıkabilir (89) . Voltaj bağımlı K^+ kanalı, KCNA4'e ("potassium voltage-gated channel subfamily A member 4") karşı otoantikorlar yakın zamanda ağır MG, timoma ve eşlik eden miyokardit veya miyoziti olan Japon hastalarda bildirilmiştir (90) . Timomalı hastalarda yapılan timektomi ameliyatı ile tümör tam ve kalıcı olarak çıkarılmasına rağmen, MG belirtileri genellikle devam eder ve kronik immünoterapi gerektirir (1) .

Geç başlangıçlı timoması olmayan MG hastalarında AChR'e karşı otosensitizasyon mekanizması açık değildir. Tipik olarak bu hastalarda timik anormallik gözlenmemektedir. Benzer klinik tablo ve otoantikor profiline sahip geç başlangıçlı bazı MG hastalarında ise otoimmün yanıt ile baskı altına alındığı düşünülen gizli timoma olasılığı da vardır (1) .

2.2.4.3.3. MG ve Timus İnvölüsyonu

AChR pozitif MG vakalarının %10-20'sinde genellikle adipoz dokudan oluşan atrofik timus vardır. Atrofi en sık olarak 40 yaş üzeri hastalarda ortaya çıkar, bazı olgularda ise kortikosteroid tedavisine bağlı olabilir. Atrofik timus ile aynı yaşta kontrol grubu timusu adipoz doku ve epitelyal alan miktarı açısından çok benzerdir. Ancak MG'li hastalarda rezidü parankim adacıklarında çok sayıda, bazen GM oluşturan infiltratif B hücreleri vardır ve plazma hücreleri doku boyunca dağılmıştır. Bunlar hiperplazi ve immün aktivasyon belirtileridir (77) .

2.2.5. MG'de Tanı

MG tanısını klinik olarak teyit etmek için Tensilon, prostigmin veya buz testi gibi yatak başı yapılan testler, elektrofizyolojik ve immünolojik testler kullanılabilir (Tablo 2.3) (1) .

Tablo 2.3. MG tanısında yapılan testler

	Ayrıntılar
Yatakbaşı	
Tensilon (Edrofonyum klorür) testi	Pitoz/ekstraoküler güçsüzlüğü olan hastalarda güvenilir bir testtir
Prostigmin testi	Jeneralize proksimal kas güçsüzlüğü olan hastalarda tercih edilir
Buz testi	Pitoz düzelmesini değerlendirmede kullanılır
Elektrofizyoloji	
Repetitif sinir uyarımı	Jeneralize MG %75, oküler MG <%50
Tek lif elektromiyografi	Sensitivitesi yüksek (%95-99), ancak spesifik değil
İmmünolojik testler (antikorlar)	
Anti-AChR	Jeneralize MG %85, oküler MG %50
Anti-MuSK	AChR negatif jeneralize MG %40
Düşük afiniteli anti-AChR	AChR ve MuSK negatif jeneralize MG %66
Anti-LRP4	Seronegatif hastalarda tespit edilmiştir
Çizgili kas antikorları	
Anti-titin	Timomalı MG %95, geç başlangıçlı timoması olmayan MG %50
Anti-ryanodin reseptör	Timomalı MG %70 (daha şiddetli hastalık)
Diğer	
Toraks BT veya MRG	MG tanısı onaylandıktan sonra tüm hastalardan elde edilir
Tiroid fonksiyon testleri	Hiper, yada hipotiroidi görülebilir

BT- bilgisayarlı tomografi; MRG- manyetik rezonans görüntüleme

2.2.5.1. Yatak Başı Testler

Tensilon (Edrofonyum klorür) kısa etkili bir antikolinesteraz inhibitördür. NMK'da asetilkolinin etki süresini uzatmakla SPP'nin amplitüd ve süresinin artmasına neden olur (1) . Edrofonyum testinde önce 2 mg test dozu intravenöz olarak enjekte edilir ve 60 saniye yanıt izlenir. Daha sonra 3 ve 5 mg dozlar enjekte edilir, herhangi bir dozda 60 saniye içinde düzelme izlenirse test pozitif olarak değerlendirilir (91) . Düzelme olarak kas gücünün iyileşmesi kabul edilmektedir. En objektif ve güvenilir yorumlama ise göz kapağı pitozunda düzelme veya tek paretik ekstraoküler kas gücünde iyileşme gözlemlendiğinde olabilir (92) . Yayınlanan çalışmalarda jeneralize MG için testin %72-95 duyarlılıkta olduğu gösterilmektedir (92) . Bradikardi ve senkop gibi ciddi komplikasyonlar nadir görülmekle birlikte (93) , işlem sırasında kardiyak monitorizasyon bazıları tarafından önerilmektedir (92) .

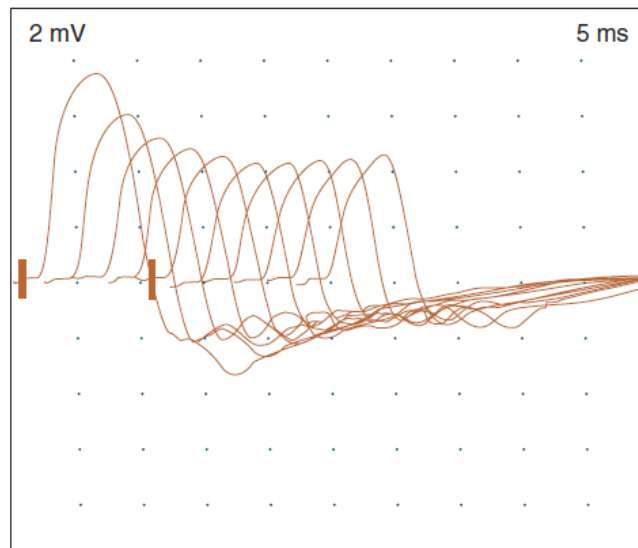
Prostigmin (Neostigmin metilsulfat) testi intravenöz edrofonyuma yanıt vermeyen bazı hastalara daha uzun etki süresi olan neostigmin

metilsulfat 1.5 mg'lık dozda intramüsküler olarak enjekte edilir. İntramüsküler enjeksiyondan sonra etki 5-15 dakikada başlar, 20 dakikada en üst düzeye erişir ve yaklaşık 1 saat kadar sürer. Tensilon testinde olduğu gibi prostigmin testinde de atropin sulfat hazır bulundurulur. Yanıt değerlendirilmesi tensilon testinde olduğu gibidir (91) .

Buz testi non-farmakolojik, morbiditeye neden olmayan, pitozu olan hastalarda kullanılan bir testtir. Göz üzerine 2-5 dakika süresince buz paketi koyularak yapılır ve pitozda düzelme ile değerlendirilir. Pitozu olan hastalarda edrofonyum testi yapılamadığı zaman bu testin kullanılması kabul edilmiştir (94) .

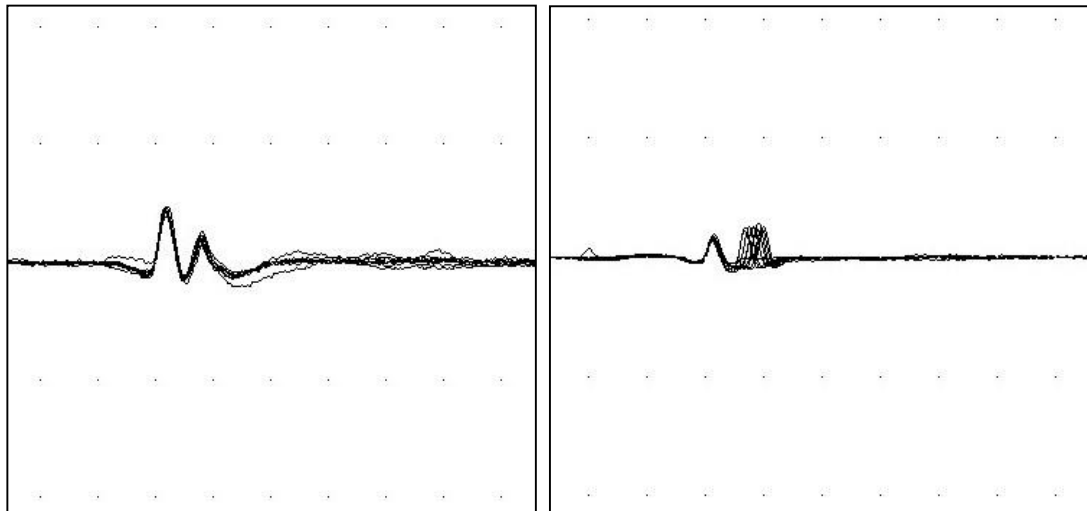
2.2.5.2. Elektrofizyolojik Testler

Repetitif sinir uyarımı nöromüsküler iletimde en yaygın olarak kullanılan elektrofizyolojik testtir. NMK hastalıklarında düşük frekansta sinir uyarımı (2-5 Hz) bileşik kas aksiyon potansiyeli amplitüdünde ilerleyici düşüş veya dekremente neden olur (Şekil 2.3) . Jeneralize MG hastalarının yaklaşık %75'inde (oküler MG hastalarının %<50'sinde) repetitif sinir uyarımı testi sonucu anormaldir ve bu olasılık proksimal veya fasiyal kaslarda daha yüksektir (95) .



Şekil 2.3. Düşük frekanslı sinir uyarımı ile tipik patolojik dekrement yanıtı

Tek Lif EMG nöromusküler ileti için en duyarlı klinik testtir ve MG'li hastaların hemen hepsi bazı kaslarında artmış jitter gösterirler. Nöromusküler jitter aynı motor ünite tarafından innerve edilen iki kas lifinin aksiyon potansiyelleri arasındaki zaman farkının değişkenliğidir (96) ve tek-lif elektromiyografi (TLEMg) ile tespit edilebilir (Şekil 2.4). İncelenen kas kuvvetsiz ise TLEMg %95-99 MG hastasında jitter artışını ortaya çıkarır (97,98) (Şekil 2.5).



Şekil 2.4. Normal jitter

Şekil 2.5. Artmış jitter

2.2.5.3. İmmünolojik Testler

MG tanısı için en yaygın olarak kullanılan immünolojik test kas AChR'lerine bağlanan serum antikor miktarını ölçmektir. Bu işlem radyoaktif işaretli kolinerjik antagonist olan α -bungaratoksin ile yapılır (99) . Testin duyarlılığı jeneralize MG için yaklaşık %85, oküler MG için ise %50'dir (99,100) . Anti-AChR antikor düzeyi her zaman hastalık şiddeti ile korele değildir. Yanlış seronegatif sonuç immünosupresyon alan hastalarda veya test hastalığın erken döneminde yapıldığında görülebilir (101) .

Kas sitoplazma proteinlerini (titin, miyozin, aktin ve ryanodin reseptörleri) tanıyan çizgili kas antikorları timomalı MG hastalarının %75-85'inde ve MG tanısı olmayan timoma vakalarının ise bazılarında tespit edilir (40,102) . Erken başlangıçlı MG'de bu antikorların varlığı timoma şüphesini uyandırmaktadır, ancak 50 yaş üzeri hastalarda timoma belirteci

olarak daha az yararlıdır. Titin ve diğer çizgili kas antikoru timomasi olmayan geç başlangıçlı MG hastalarının %50 kadarında bulunmaktadır (40,103) . Eşzamanlı miyokardit/miyoziti olan timomali hastaları belirlemede anti-KCNA4 antikor varlığının yararlı belirteç olabileceği son çalışmalarda gösterilmiştir, ancak teyit edilmesi gerekmektedir (90) .

Anti-AChR negatif jeneralize MG hastaları anti-MuSK antikoru açısından test edilmelidir. Anti-MuSK antikoru bu gruba dahil hastaların yaklaşık %40 kadarında bulunur (58) .

Daha önce de belirtildiği gibi, kümelenmiş AChR'lere bağlanan düşük afiniteli anti-AChR antikoru seronegatif jeneralize MG hastalarının %66'sında tespit edilebilmektedir (67) . Kümelenmiş AChR'lere bağlanan düşük afiniteli anti-AChR antikor varlığı seronegatif oküler MG hastalarının yaklaşık %50'sinde bildirilmiştir (104) .

MG tanısı konulduktan sonra tüm hastalara olası timoma açısından tarama amaçlı toraks bilgisayarlı tomografisi çekilmesi gerekmektedir (105) .

2.2.6. MG'de Tedavi

MG'de medikal tedavi üç gruba ayrılabilir: antikolinesteraz ilaçlar, immünsupresif tedavi ve kısa dönem immünoterapi (plazmaferez ve immunoglobulin)(22,106,107) . MG'de tedavi seçenekleri Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Kanıta dayalı sınıflama ve çeşitli immünoterapi önerileri (108)

İlaç/Tedavi	Kanıt sınıfı*	Öneriler
AChEİ'leri	Sınıf IV	Semptomatik tedavi
Steroidler	Sınıf II	Birinci basamak immünoterapi. Kısa süreli kullanım içindir. İlaç dozu azaltılarak , yan etkiler önemsiz denecek seviyeye kadar düşürülebilirse uzun süre kullanılır.
Azatioprin	Sınıf I	İkinci basamak immünoterapi. Uzun süreli kullanım içindir. Steroid dozunu azaltmak amacı ile; steroide yanıtız veya tolere edemeyen hastalarda kullanılabilir.
Mikofenolat mofetil	Sınıf IV	Üçüncü basamak immünoterapi. Uzun süreli kullanım içindir. Herhangi bir uzun süreli immünsupresif tedaviye ek olarak kullanılabilir.
Siklosporin	Sınıf I	Dördüncü basamak immünoterapi. Uzun süreli kullanım içindir. Steroid veya azatioprine yanıtız veya tolere edemeyen hastalarda kullanılır.
Takrolimus	Sınıf I	Dördüncü basamak immünoterapi. Steroid, azatioprin veya siklosporine yanıtız veya tolere edemeyen hastalarda kullanılır.
Siklofosamid	Sınıf II	Uzun süreli immünoterapi için son seçim ajandır. Steroid, azatioprin, siklosporin veya takrolimusa yanıtız veya tolere edemeyen hastalarda kullanılır.
Plazmaferez	Sınıf III	Ağır MG, akut alevlenme ve myastenik krizde endikedir. IVIg'e yanıtız veya tolere edemeyen hastalarda kullanılır.
IVIg	Sınıf I	Ağır MG ve akut alevlenmede endikedir ve takviye immünoterapi ajanı olarak iyileşme durumunu korumak için kullanılır. Plazmafereze yanıtız veya tolere edemeyen hastalarda kullanılır.
Timektomi	Sınıf II	60 yaş altı, ameliyatı tolere edebilecek, özellikle AChR antikoru pozitif olan jeneralize MG hastalarına yapılır.

*Kanıt sınıfı I: randomize kontrollü çalışmalar mevcuttur; sınıf II: randomize olmayan kontrollü çalışmalar veya küçük hasta sayısı ile randomize çalışma; sınıf III: kontrolsüz çalışmalar; sınıf IV: vaka serileri. AChEİ-Asetilkolinesteraz inhibitörleri, IVIg- intravenöz immunoglobulin.

Antikolinesterazlar MG tedavisinde ilk tercih edilen ilaç olup, NMK'da kolinesteraz aktivitesini inhibe etmekle nöromüsküler iletimin artmasına neden olur. Antikolinesterazlar altta yatan otoimmün süreç üzerine herhangi

bir etki etmediklerinden MG'nin doğal sürecini değiştirmemektedir (38) . Hastaların çoğu, antikolinesterazlar ile kas gücünde iyileşme olduğunu belirtir, ancak belirtilerde azalma genellikle tam ve kalıcı değildir. Bu nedenle, bir çok hastaya immünsupresif ilaçlar gerekli olur (106,107,109) . İmmünsupresif tedavi ve timektomi sıklıkla tamamlayıcı bir şekilde kullanılır (106) .

Timus bezinin MG ile ilişkili olabileceği ilk kez 1899 yılında Oppenheim tarafından MG hastalığından ölen bir hastanın timus kalıntısında "mandalina büyüklüğünde" tümörün tespit edilmesi ile düşünölmüştür. Bundan iki yıl sonra, Carl Weigert başka bir MG hastasının ön mediasten bölgesinde timik orijinli invaziv lenfoid tümörün varlığını tarif etmiştir. 1913 yılında Ernst Ferdinand ilk kez beraberinde hipertiroidi belirtileri olan 20 yaşında bir MG hastasını ameliyat ederek tiroid bezi yanı sıra timus bezini de çıkarmıştır. Ameliyat sonrası dönemde hastanın MG belirtilerinde hipertiroidi bulgularına kıyasla daha fazla iyileşme olduğu dikkati çekmiştir (110) . Bu tarihten sonra MG hastalarına timektomi uygulanmasına başlanmıştır. MG hastalarına timektomi yapılmasının amacı remisyona neden olmak veya immünsupresif ilaçların dozunu azaltmaktır (111) . Timoma varlığı timektomi için tek mutlak endikasyon olmakla birlikte, 50 yaş altında başlayan AChR antikoru pozitif jeneralize MG hastalarına timektomi yapılması rutin uygulama haline gelmiştir (1) . Ergenlik ile 60 yaş arası timoması olmayan tüm jeneralize MG hastalarının timektomiden yarar gördüğüne dair görüşler vardır (109) . Anti-MuSK MG'de timektominin rolü belli değildir (63,112) .

2.2.7. Myastenik Kriz

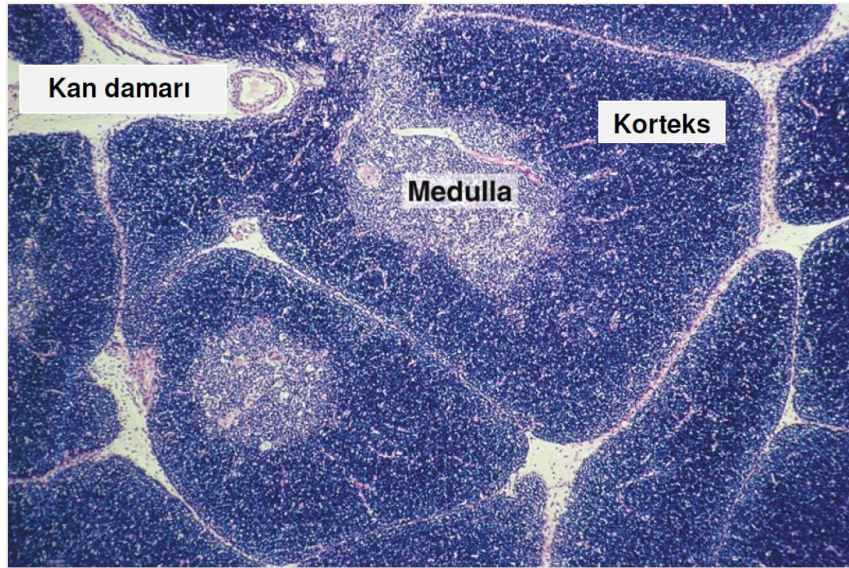
Myastenik kriz, myastenik güçsüzlükle oluşan solunum yetmezliğidir. Sistemik hastalık, enfeksiyon, aspirasyon, cerrahi girişim ve bazı ilaçların kullanımı gibi kolaylaştırıcı nedenler myastenik krize yol açabilir (91) . MG hastalarının yaklaşık %15-20'sinde hastalık sürecinin herhangi bir döneminde myastenik kriz ortaya çıkmaktadır (113,114) . Ancak, myastenik kriz hastaların beşte birinde MG'nin ilk belirtisi olabilir (115,116) . MG

başlangıcından ilk myastenik krize kadar geçen medyan süre 8-12 aydır (115,117) . Myastenik krizin önlenmesi ve tedavisi için genellikle hastanın yoğun bakıma yatırılarak yakın izleme alınması gerekir (118) . MG'de solunum fonksiyonunda kötüleşmeyi belirlemek en iyi negatif inspiratuvar gücün (NİG) ölçümü ile sağlanır. NİG -20 cm H₂O'dan az, tidal volüm 4-5 mL/kg'dan az ve maksimal solunum kapasitesi tidal volümün 3 katından az veya zorlu vital kapasite 15mL/kg'dan az olduğu zaman solunum desteği gerekir. PCO₂ 50 mmHg'dan fazla olan hastalarda düşük basınçlı, yüksek uyumlu balonu olan endotrakeal tüple trakeal entübasyon yapılmalıdır (91) . Uygun tıbbi bakımda gecikme solunum arrestine ve sonuçta ölüme yol açabilir. Kriz ortaya çıktığında destekleyici tedaviye ek olarak dolaşımdaki antikörlerin azaltılması önerilir. Bu durumda hastalara plazmaferez, intravenöz immunoglobulin veya kortikosteroid uygulanmaktadır (118) .

2.3. Timus

2.3.1 Timus Anatomisi ve Histolojisi

Timus ön mediastende yer alan çift loblu lenfoepitelyal bir organdır. Her lob fibröz septalarla çok sayıda lobüllere ayrılmıştır. Her bir lobülde dış bölgede korteks, iç bölgede ise medulla yer alır (119) . Korteks T lenfositlerden zengin içerikte iken, medullada lenfositler daha seyrek görülmektedir. Timusta yaygın olarak lenfoid olmayan epitel hücreleri de vardır. Bu hücreler büyük sitoplazmaya sahiptir. Ayrıca, timus kemik iliği orijinli makrofajlar ve dendritik hücreler de içerir. Medullada ise Hassal cisimcikleri olarak adlandırılan, epitel hücrelerinin sıkıca paketlenmiş kıvrımlarından oluşan yapılar vardır (120) . (Şekil 2.6)

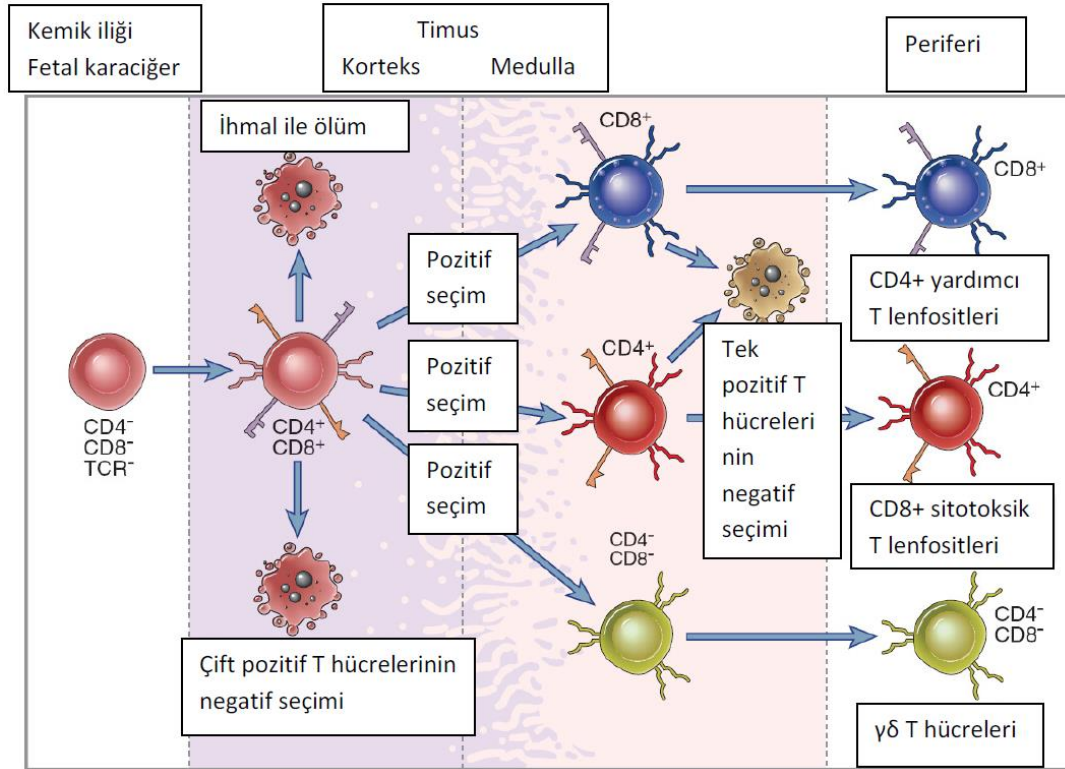


Şekil 2.6. Timus lobülleri (119)

2.3.2. Timus İmmünogenezi

Timus, T lenfosit gelişiminde çok önemli bir role sahiptir. Prekürsör T lenfositleri kemik iliğinden timusa göç eder. T lenfosit prekürsörleri olan CD4-CD8- hücreleri timik kortekse yerleşir. Bu çift negatif CD4-CD8- hücreleri timusun korteks ve medulla bölgelerinde öz antijenleri tanımayı öğrenir ve yüzey belirteçleri düzeyinde değişime uğrarlar. Timik kortekste öz antijenlerine yönelik çok güçlü afinite gösteren T lenfositler ile çok zayıf afinite gösteren T lenfositlerin seçime uğradıkları ve apoptozis ile yok edildikleri bilinmektedir. Bu mekanizma “self” tolerans gelişiminin en önemli bileşenlerinden biridir ve bu olay negatif seçim şeklinde tanımlanmaktadır. Çift negatif CD4-CD8- hücreleri kortekste çift pozitif yani, CD4+CD8+ timosit haline dönüşürler. Ardından, medullada CD4+ veya CD8+ tek pozitif T lenfositleri şekli olarak periferik dolaşıma girmek üzere timustan ayrılırlar (Şekil 2.7) .

Ergenlikten sonra, timik epitel hücre hacminde azalma nedeni ile timus boyutu giderek küçülür ve timopoez azalır. Bu durum yeni gelişen T lenfositlerin çıkışında ve dolayısı ile, periferik kanda naif T lenfosit sayısında azalmaya neden olur. Histolojik olarak ise, timik korteks hacminde belirgin azalma izlenmekte iken, medulla boyutunda hafif azalma görülür (121) .



Şekil 2.7. Timus dokusunda T lenfositlerin gelişimi

(<http://wenliang.myweb.uga.edu/mystudy/immunology/ScienceOfImmunology/StagesofTlymphocytesmaturation.htm> sitesinden değiştirilerek alınmıştır)

2.3.3. MG Hastalığının Patogenezi ve Timusun Patogenezdeki Rolü

MG'de otoimmün disfonksiyonun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak AChR antikor pozitif MG hastalarında timus anormalliklerinin, immün sistemin düzenlemesindeki kusurların ve cinsiyet hormonlarının önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, hastalığın ortaya çıkmasında genetik yatkınlığın da etkileyici olduğu düşünülmektedir. MG hastalarının büyük çoğunluğunda timus yapısal ve fonksiyonel değişimler sergiler. Bu değişimler tümör oluşumuna (timoma) veya çok sayıda B hücreleri içeren GM'lerin gelişimine (folliküler hiperplazi) neden olur (122) .

2.3.3.1. Folliküler ve Diffüz Hiperplazi

Folliküler hiperplazide medullada B lenfosit infiltrasyonu içeren genişlemiş perivasküler alanlar görülür. Bunlardan bazıları ektopik B lenfosit GM'leri halinde düzenlenmiştir ve diğer hücreler (özellikle folliküler dendritik hücreler) ile birlikte follikülleri oluşturur. B lenfositler timik medulla boyunca dağılır ve çoğu zaman Hassal cisimcikleri etrafında yoğunlaşır. Diffüz hiperplazi FH'ye benzer, ancak GM'ler daha az görülür (123) .

MG'li timusta izlenen GM ile periferik lenfatik organlarda gözlenen lenfoid folliküller arasında fark yoktur (124) . Ancak, MG'de timus yerleşimli GM'ler plazma hücreleri veya AChR ifade eden kas benzeri miyoid hücreler ile çevrilidir (2,125,126) .

MG'de GM oluşumu anjiogenez ve lenfoanjiogenez ile ilişkilidir. Anjiogenez ve lenfoanjiogenez sırasında endotelleri yüzey kemokinleri ile etkileşen endotelial venüller ve lenf damarları oluşmaktadır (127) . İnflamasyon sırasında doku içerisine B hücre göçünden sorumlu temel kemokinler CXCL13 (C-X-C motifi kemokin ligand 13), CCL21 (C-C motifi kemokin ligand 21) ve SDF-1'dir ("Stromal cell derived factor-1"). Bu kemokinler fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında B lenfositlerin çekimini sağlayarak GM oluşumuna neden olur (127,128) . Bu kemokinlerin seviyesi klinik iyileşmeye neden olan kortikosteroid tedavisinden sonra normale döner. Aynı zamanda, GM sayısında da azalma gözlenir (127,129) .

Benzer GM'ler diğer otoimmün hastalığı olan hastaların inflamasyonlu dokularında da tarif edilmiştir. Sjögren hastalığı olan hastaların tükürük bezlerinde, romatoid artritli hastaların eklemlerinde ve sekonder progresif multipl skleroz hastalarının ise meninkslerinde GM'lerin olduğu gösterilmiştir (130,131) . Bu durumda, AChR pozitif MG hastalarındaki timusun da inflame doku olduğu varsayılabilir (128) .

2.3.3.2. Timoma

Timoma yavaş büyüyen, lokal ve invaziv epitelyal hücre kökenli bir tümördür. Olgunlaşan poliklonal T lenfositlerle çevrili transforme epitel hücrelerinden oluşur (132) . Dünya Sağlık Örgütü ["World Health

Organization” (WHO)] tarafından yapılan timoma sınıflaması Tablo 2.4’te gösterilmiştir. Bu sınıflamaya göre timomalar epitel hücre morfolojisi ve lenfosit-epitel hücre oranı gibi özelliklerine dayanarak birkaç tipe ayrılmıştır (133) .

Tablo 2.5. Timik epitelyal tümörlerin WHO sınıflaması (1999) (133)

Timoma tipi	Histolojik kriterleri
Tip A	Homojen neoplastik epitel hücre popülasyonundan oluşan tümörde iğsi/oval şekilli, nükleer atipinin eşlik etmediği çekirdekler. Neoplastik olmayan lenfositler yok veya az
Tip AB	Tip A’ya benzer, ama arada lenfositten zengin alanlar var
Tip B1	Normal fonksiyonel timusa benzer şekilde timik korteksten ayırd edilemeyen geniş alanlar ve arada timik medullaya benzer alanlar var
Tip B2	Neoplastik epitelial hücreleri, belirgin ve veziküler çekirdekli şiş hücreler ve arada çok sayıda lenfositler var. Perivasküler alanlar sık
Tip B3	Tümör öncelikle yuvarlak veya poligonal şekilli, orta derecede atipisi olan epitelial hücrelerden oluşur. Lenfositler az, skuamöz metaplazi alanları ve perivasküler alanlar sık
Tip C	Timik karsinom

MG ile en çok ilişkili olan tip B2 timomadır. Bunu tip AB ve B1 timomalar izler (132,134,135) . Tip A ve AB timomada epitel hücreleri iğ morfolojisine sahip olup, genellikle medüller yerleşimlidir ve fokal çok sayıda (AB) veya nadir (A) timositler içerir. Tip B1 ve B2 ise gelişmekte olan çok sayıda CD4+CD8+ T lenfositleri ile birlikte poliklonal epitel hücreleri içerir ve morfolojik olarak timik kortekse benzer.

AChR antikoru pozitif jeneralize MG hastalarının yaklaşık %10-20’sinde timoma vardır. Bu hastalar genellikle 40 yaşın üzerindedir. Timoma gelişimi ile otoimmün mekanizmalar arasında güçlü bağlantı vardır (122) . Yapılan bir çalışmada timomalı hastaların %55’inde MG, %39’unda ise diğer otoimmün sendromların geliştiği gösterilmiştir (136) . Timomada medüller alan genellikle sınırlıdır. Timik medulla negatif seçim bölgesi olduğu için, etkili bir şekilde apoptoza uğramayan otoreaktif T hücrelerin timomadan ayrılarak periferik dolaşıma geçtiği düşünülmektedir. Buna ek olarak, “self” tolerans

için önemli olan bazı moleküler bileşenlerin timomada eksik olduğu gözlenmiştir. Bu bileşenlere otoimmünite düzenleyici [“outoimmune regulator” (AIRE)] faktörü, Treg hücre fonksiyonu için master gen (Foxp3) ve majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II antijenleri dahildir (137) . “Self” reaktivitedeki artışın timomalı hastaların serumunda sık rastlanan titin, ryanodin ve sitokinlere karşı oluşan antikorların varlığından sorumlu olduğu gösterilmiştir (137,138) . Timomalı hastalarda anti-interferon (IFN) tip I antikorlarının da varlığı tespit edilmiştir (138) .

Timomalı hastaların yaklaşık %20’sinde geriye kalan neoplastik olmayan dokuda hiperplazi vardır. Diğer vakalar ise timik atrofiye sahiptir (139) . Bu rezidü hiperplazik dokunun timomalı hastalarda otoimmün yanıtta rolü olup olmadığı belli değildir (77) .

2.3.3.3. Timus İnvölüsyonu

Yukarıda belirtildiği gibi, MG hastalarındaki atrofik timus ile yaş olarak eşleştirilmiş kontrol grubu timusu adipoz doku ve epitelyal alan miktarı açısından çok benzerdir. Ancak atrofik MG timusunda rezidü parankim adacıklarında çok sayıda, bazen GM oluşturan infiltratif B lenfositler vardır. Plazma hücreleri ise doku boyunca dağılmıştır. Bu belirtiler hiperplazi ve immün aktivasyonu göstermektedir ve MG immünopatogenezinde rol oynamaktadır (77) .

2.3.4. MG’de Timusta Otoimmün Yanıt

AChR antikor pozitif MG hastalarının timusunda aktif otoimmün yanıtı başlatmak ve sürdürürebilmek için gerekli olan tüm bileşenlerin varlığı çalışmalarda gösterilmiştir. Otoantijen ifade eden kas benzeri miyoid hücreler (2,125,126) ve timik epitelyal hücreler (TEH’ler) (140) ; profesyonel antijen sunan hücreler (141) ; AChR spesifik otoreaktif T hücreleri (142,143) ve anti-AChR antikorları üreten B hücreleri (144) myastenik hastaların timusunda bulunur.

2.3.4.1. Otoimmün Süreçte Kas Benzeri Miyoid Hücrelerin Rolü

Timik miyoid hücreleri, AChR'ünün tüm alt ünitelerini ifade etmesi, fonksiyonel AChR'lere sahip olması (2,125,126) ve iskelet kas hücreleri için karakteristik olan diğer antijenleri ifade etmesi (145) nedeni ile T hücre duyarlılığının sürdürülmesinden sorumlu tutulmaktadır (2,125,126) . Bu hücreler ağırlıklı olarak AChR'ünün fetal izoformunu (γ alt ünitesi) ifade eder ve timik hiperplazili MG hastalarında bu izoforma karşı spesifik otoantikolar sıklıkla mevcuttur (48) . Proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak ise, miyoid hücrelerde AChR bileşenlerinin, özellikle de MIR içeren α alt ünitesinin ifadesinde artış gözlenmiştir (48) .

Yukarıda belirtilen özelliklerine rağmen, timik miyoid hücreleri MHC sınıf II molekülleri ifade etmez ve bu nedenle T lenfositlere antijen sunumu mümkün olmaz. Dolayısıyla, AChR parçalarının timik miyoid hücreler tarafından serbest bırakıldığı, dendritik hücreler tarafından alındığı ve sonra AChR spesifik T hücrelerine sunulduğu ileri sürülmüştür (146) . Bu süreç çapraz sunum olarak bilinmektedir (147) . Timik hiperplazide miyoid ve dendritik hücrelerin sıklıkla birlikte kümelenmesi gözlemi de bu fikri desteklemektedir (141) . Ayrıca, GM'lere yakın bölgede yer alan miyoid hücrelere karşı erken ve sürekli kompleman saldırı belirtileri bildirilmiştir (79) . Miyoid hücrelere karşı olan bu atak ve hücrelerin kompleman aracılı hasarı dendritik hücrelerde mevcut otoantijen seviyesindeki artıştan, GM oluşumu ve antikor çeşitlendirme eylemlerinden sorumlu olabilir. Bu durum da kendi kendini sürdürebilen AChR spesifik otoimmün yanıtın kurulması için önemli olabilir (77) .

Timomalarda ise miyoid hücreler nadirdir ve genellikle komşu timus dokusunda görülmektedir (148) . Özellikle de, tip A ve AB timomada AChR ϵ alt ünitesi ifadesinin MG ile ilişkili olduğu ve otosensitizasyonda belirgin rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Ancak bu alt ünite timik miyoid hücrelerinden ziyade tümör epitel hücreleri tarafından ifade edilmektedir (149)

2.3.4.2. Otoimmün Süreçte TEH'lerin Rolü

TEH'ler normal veya MG'li timus dokusunda AChR'ünün tamamını değil, sadece α , β ve ϵ alt ünitelerini ifade eder (140) . Miyoid hücrelerde olduğu gibi, TEH'ler de inflamatuvar uyarılara AChR alt ünite transkripsiyonu ve protein üretimi düzenlenmesi ile yanıt verirler (150) .

Medüller timik epitelyal hücrelerde (mTEH'ler) öz antijen ifadesinden sorumlu temel faktör AIRE transkripsiyon faktörüdür. Ancak timomalarda AIRE normal timus dokusuna göre çok daha düşük düzeylerde ifade edilir ve nadir görülür. Bunun nedeni timomaların ağırlıklı olarak korteks benzeri epitel hücreleri içermesidir (bu hücreler ise AIRE eksprese etmez) (82) . Bu nedenle, AIRE eksikliği, otoreaktif T hücrelerin gelişimini, dolayısıyla timoma ilişkili MG oluşumunu kolaylaştırır (82) .

2.3.4.3. T Hücrelerin İntratimik Otosensitizasyonu

Sağlıklı bireylerde AChR dahil olmak üzere çeşitli antijenlere karşı otoreaktif halde olan T hücrelerin sistemik dolaşımında bulunduğu bilinmektedir. Ancak bu hücreler periferik tolerans mekanizmaları tarafından kontrol altında tutulabilmektedir (151,152) . MG hastalarında ise AChR spesifik CD4+ T hücreleri hem serum , hem de timus doku örneklerinde saptanabilmektedir (153) . Doku içindeki varlıkları T hücre otosensitizasyonunun timusta gerçekleştiği fikrini destekleyebilir (142,143) . CD4+ T hücrelerine yönelik anti-CD4 antikolları ile tedavinin MG belirtilerini iyileştirdiği de tespit edilmiştir. Bu durum CD4+ T hücrelerin MG'de humoral otoimmün yanıtın düzenlenmesinde rolü olabileceğini düşündürmektedir (154) .

Sisely ve ark., MG'li hastaların periferik kanından elde edilen T hücrelerin AChR ile kültüre edildiği zaman çoğaldığını göstermiştir (155) . AChR alt ünitelerinde T hücre sensitizasyonu için çok sayıda epitoplarda bulunmaktadır ve T hücre yanıtı farklı epitoplara karşı olabilmektedir (49) . En kuvvetli yanıt ise α alt ünite epitopu ile elde edilmiştir (49,156) .

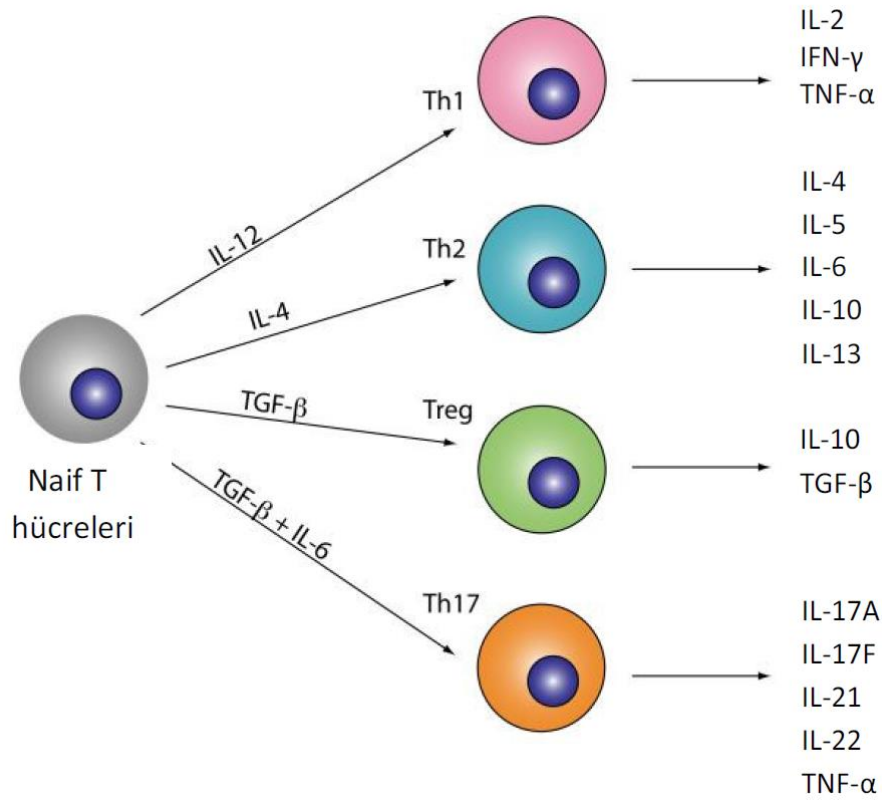
2.3.4.4. B Hücrelerin İntratimik Aktivasyonu ve Otoantikor Üretimi

Sıklıkla GM'lere lokalize B hücre lenfoid infiltrasyonları (123,139) , bir çok otoimmün hastalıkta kronik inflamatuvar doku içerisinde tespit edilmiştir (157-159) . Buna FH'li MG timus dokusu da dahildir. 1978 yılında Vincent ve ark. tarafından, MG hastalarından elde edilen timus dokusunun spontan olarak AChR'üne karşı antikor ürettiği kanıtlanmıştır (80,160) .

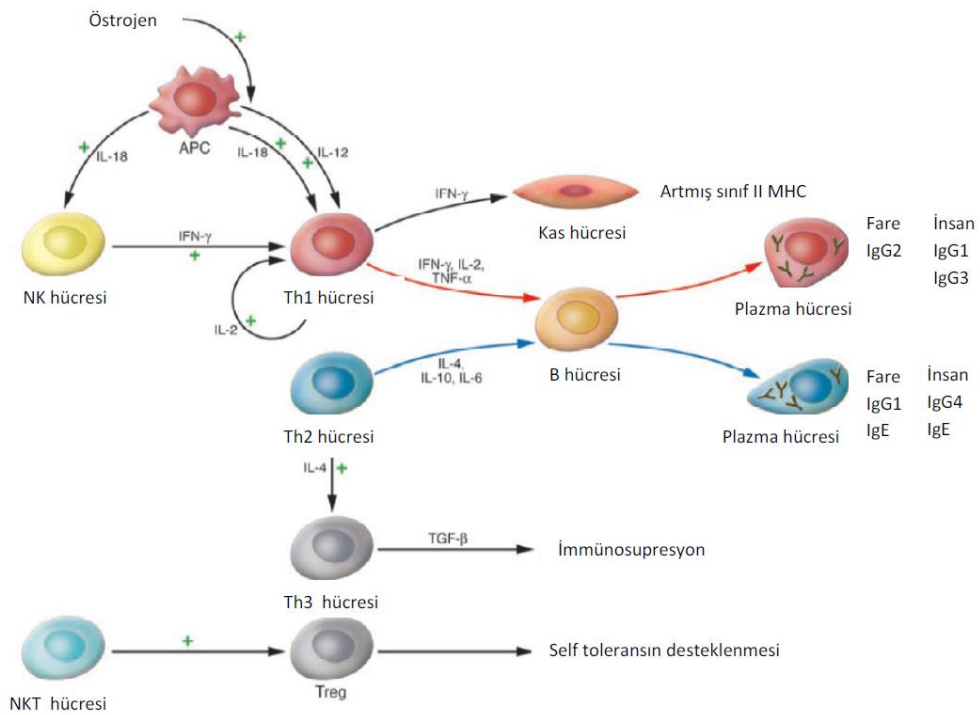
Diğer çalışmalarda, MG hastalarından elde edilerek kültüre edilen periferik kan lenfositleri ve timik lenfositler tarafından AChR antikor üretimi ile in vivo AChR antikor titresi ve timik histopatolojik anormallikler arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir. Hiperplazik timustan elde edilen lenfosit kültürlerinde üretilen otoantikor miktarı involüsyona uğramış veya timomalı timusa kıyasla daha fazladır (161,162) . Hiperplazik timuslardan elde edilen saflaştırılmış B hücrelerin analizleri, bu hücrelerin aktivasyon belirteçleri (CD71, 4F2, CD23, B8.7) ifade etme, büyüme faktörlerine (B hücre büyüme faktörü ve rekombinant IL-2) yanıt olarak çoğalma ve spontan olarak anti-AChR antikor salgılama gibi özellikleri olduğunu ortaya çıkarmıştır (163) .

2.4. Otoimmün Hastalıklarda CD4+ T Hücre Alt Tipleri ve Sitokinlerin Rolü

Farklılaşmış CD4+ T hücreleri salgıladıkları sitokinlere dayanarak 4 büyük alt gruba ayrılır: Th1, Th2, Th17 ve Treg hücreleri (15) (Şekil 2.8). Bu alt gruplar içerisinde, Th1 ve Th2 hücrelerinin birbirinden farklı fonksiyonları vardır (164) (Şekil 2.9).



Şekil 2.8. T hücre alt tiplerinin farklılaşması (165)



Şekil 2.9. MG patogenezi ve immünoregülasyonunda rol alan sitokinler ve hücreler (57)

2.4.1. Th1 Hücrelerinin MG ve EAMG İmmünopatogenezindeki Rolü

Th1 hücreleri IL-2, IFN- γ ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler salgılar. Bu sitokinler hücre aracılı immün yanıtta önemli bir role sahiptir. Th2 hücreleri ise humoral immün yanıtın önemli indükleyicileri olan IL-4, IL-6 ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinler salgılamaktadır. Hem Th1, hem de Th2 hücrelerinin sitokinleri antikör üretimini indükleyebilir. Ancak, farklı immunoglobulin (Ig) alt gruplarının üretimini desteklemektedir. Th1 hücreleri farelerde (ve muhtemelen insanlarda) IgG alt sınıflarını indükleyerek komplemanın etkili bir biçimde bağlanmasına ve etkinleşmesine neden olur. Oysa, Th2 hücreleri diğer Ig izotiplerini ve IgG alt sınıflarını indüklemesine rağmen, komplemanın zayıf bağlanmasına veya hiç bağlanmamasına neden olur (166) .

MG hastalarının serum örneklerinde farklı AChR epitoplarını tanıyan bol miktarda anti-AChR Th1 hücreleri vardır (152) . Fareler bu hücreler ile (aynı hastadan elde edilmiş B hücre ve makrofajlarla beraber) aşılandığı zaman patojenik anti-AChR antikörleri üretilir (167) . Proinflamatuvar Th1 sitokinleri kasta MHC sınıf II moleküllerinin ifadesini indükler. Dolayısıyla, kas AChR epitoplarının sunumunu kolaylaştırarak aktif anti-AChR CD4+ T hücrelerinin daha da etkinleşmesine neden olur (168) .

Bunun yanısıra, MG hastalarının timus dokusunda inflamasyon bulguları tespit edilmiştir. Bu bulgular arasında IFN- γ tarafından indüklenmiş genlerin artmış ifadesi de vardır. IFN- γ AChR alt ünitelerinin özellikle, AChR'ünün MIR içeren α alt ünitesinin güçlü bir indükleyicisidir. Bu bulguların kas dokusunda görülmemiş olması AChR'üne karşı otoimmün sensitizasyonun timus içerisinde gerçekleştiği hipotezini desteklemektedir (150,169) .

Özetle, AChR'leri, periferde veya timusta yer alan antijen sunan hücreler aracılığı ile CD4+ T hücrelerine sunulmaktadır. Bu, ortak uyarıcı moleküller aracılığıyla IL-4 ve IL-6 gibi sitokinlerin düzeyinde artışa neden olur. Salınan sitokinler ise B hücrelerini uyarak anti-AChR antikörlerinin

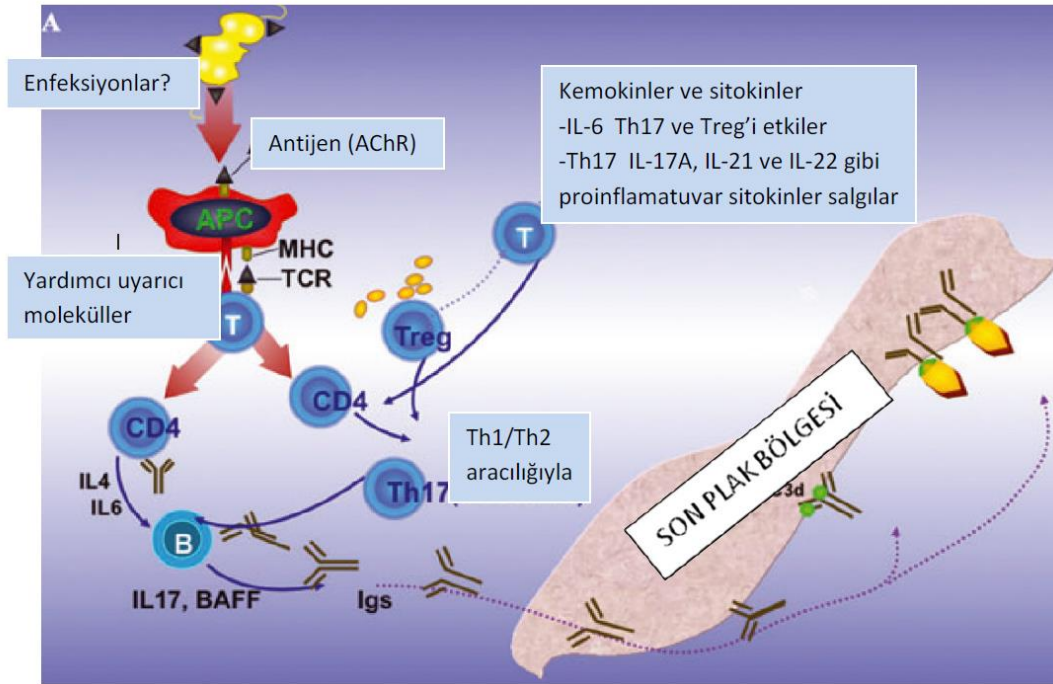
üretimine ve son plak bölgesinde kompleman tespitine neden olarak AChR'lerinin yıkımına yol açar.

2.4.2. Treg Hücrelerinin MG ve EAMG İmmünopatogenezindeki Rolü

CD25 markeri ve Foxp3 transkripsiyon faktörü ifade eden CD4+ T hücreleri Treg hücreleri olarak bilinmektedir ve “self” toleransın sürdürülmesinde önemli role sahiptir. Ayrıca, Treg hücreleri inflamasyonu ve diğer T hücrelerinin yanıtını baskılayabilmektedir (Şekil 2.10). Dönüştürücü büyüme faktörü beta [“transforming growth factor beta” (TGF- β)], Treg hücre ilişkili transkripsiyon faktörü olan Foxp3'ün ifadesini indükleyerek Treg hücre gelişimine neden olur (8) . Bettelli ve ark. tarafından TGF- β 'nın Foxp3 ifadesini indüklediği, IL-6'nın ise bu yolağı inhibe ettiği gösterilmiştir (170) . IL-6, Treg hücrelerinin patojenik Th1 hücrelerine indüklenmesini etkilemektedir. Bu olay, MG hastalarında IL-17A, IL-21 ve IL-22 gibi proinflamatuvar sitokinlerin düzeyinde regülasyona neden olarak immün sürecin gelişmesine ve immün dengesizliğin sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır (171,172) .

Daha önce MG hastalarında yapılan çalışmalarda, Th1/Th2 dengesizliği ve Treg hücre sayısı değişikliğinin MG patogenezinde rol aldığı kanıtlanmıştır (12,13) . Timoması olan MG hastalarında hem Treg hücre sayısı, hem de timustan periferik kana göç eden Treg hücre oranının timoması olmayan MG hastalarından daha az olduğu gösterilmiştir (4,14) .

MG hastalarında Treg hücrelerinin fonksiyonu bozulabilir (13) . Buna ek olarak, timektomi sonrası dolaşımdaki Treg hücre sayısında artış gözlenmiştir ve bu artış semptomların iyileşmesi ile korele bulunmuştur (173) .



Şekil 2.10. MG patogenezinde CD4+ T hücre alt tiplerinin rolü (174)

2.4.3. Th17 Hücrelerinin MG, EAMG ve Diğer Otoimmün Hastalıkların İmmünopatogenezindeki Rolü

Th17 hücreleri, farelerde TGF- β ve IL-6 tarafından sinerjik etki ile güçlü bir şekilde indüklenir (170,175,176) . TNF ve IL-1'in, TGF- β ve IL-6 varlığında Th17 hücrelerinin sonraki farklılaşmasında rol aldığı gösterilmiştir (175) . Ayrıca, IL-6 ve TGF- β birlikteliği aktive T hücreleri tarafından optimal şekilde IL-17 ifadesine neden olmaktadır. Treg hücreleri ve Th17 hücreleri farklılaşma sırasında karşılıklı olarak düzenlenmektedir ve TGF- β bu yolda ortak bir indükleyici olarak rol almaktadır (9) . Bu hücreler, Th1/Th2 sitokin dengesi üzerinden antikor üretimini etkilemektedir (174) (Şekil 2.10).

Th17 hücreleri insanlarda çeşitli inflamatuvar hastalıklarda inflamasyon bölgesinde bulunur ve inflamatuvar barsak hastalıkları, romatoid artrit ve multipl skleroz gibi birçok otoimmün inflamatuvar hastalığın patogenezinde katılır (10,11) .

Multipl skleroz hastalarında yapılan bir çalışmada immünomodulator tedavi (IFN- β 1) alan hastaların serumları Th17 ilişkili sitokinler (IL-17, IL-23

ve IL-26) ve reseptörleri (IL-17R ve IL-23R) açısından değerlendirilmiştir. IFN- β 1 tedavisi ile IL-17 ve IL-17R hücrelerinde azalma gözlenmiştir (177) .

Deneysel otoimmün MG [“experimental autoimmune myasthenia gravis” (EAMG)], MG'nin farelerde yapılan hayvan modelidir. EAMG modelinde Th17 hücre oranında özellikle hastalığın ilerlemesi ile IL-17 düzeyine eşlik edecek şekilde artış gözlenmiştir. Ayrıca, IL-17 ile uyarıldığı zaman AChR peptidine özgü T hücrelerinin çoğalma yeteneğinde ve anti-AChR antikor salgılayan hücre sayısında artış olduğu izlenmiştir. Bu bulgular, Th17 hücrelerinin IL-17 sitokini salgılayarak otoimmün yanıtı neden olduğunu düşündürmektedir (178) .

Yapılan bir çalışmada AChR antikor pozitif jeneralize MG hastalarında da serum IL-17 düzeyinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir (179) .

Wang ve ark. ise MG hastaları (timoma, timik hiperplazi ve normal timus dokusuna sahip) ve sağlıklı bireylerden alınan serum örneklerini standart akım sitometri yöntemi ile çalışarak total CD4+ hücreleri arasından Th17 hücrelerini sayısal olarak değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda timomalı MG'de Th17 hücre popülasyonunda artış, Treg hücre popülasyonunda ise azalma olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, timomalı MG'de Th17 ile ilişkili sitokinler olan IL17, IL1 β ve IL23 ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir. Th17 hücreleri ve onlarla ilişkili sitokinlerdeki artış timomalı MG hastalarında hastalığın şiddeti ile korele bulunmuş, timomasız (timik hiperplazi, normal timus) MG hastalarında ve sağlıklı bireylerde ise buna rastlanmamıştır. MG hastalarında periferik Th17 hücre sıklığı ile AChR antikor düzeyi arasında korelasyon olduğu doğrulanmış, fakat AChR düzeyi ile timusun patolojik alt tipleri arasında ilişki gözlenmemiştir. Bu bulgularla Th17/Treg dengesizliği ve Th17 ilişkili sitokinlerin özellikle timomalı MG'de patogenez sürecine katıldığı gösterilmiştir (15) .

2.4.4. Th17 Hücre Belirteçlerinin Rolü

IL-21, Th17 hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Bununla birlikte IL-21'in Th17 hücre farklılaşmasında rol aldığı in vitro ve in vivo olarak

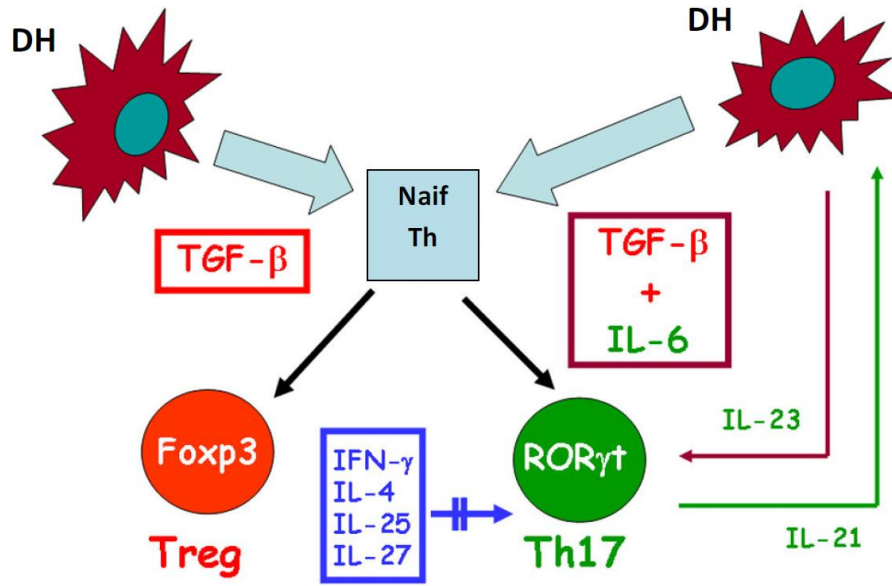
gösterilmiştir (180-182) . IL-6 tarafından indüksiyonundan sonra IL-21 ve TGF- β sinerjik etki ile farelerde Th17 hücre farklılaşmasına neden olur (180-182) (Şekil 2.8 ve 2.11). IL-21'in veya IL-21R ifadesi kaybınının Th17 hücrelerinde kusurlu farklılaşmaya neden olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (180-182) . Bu bilgiler, IL-21'in Th17 hücre farklılaşmasında önemli bir rolü olduğunu ve IL-6-IL-21 linear sitokin yolağının bu süreçte yer aldığını göstermektedir (9) .

IL-23, IL-12 sitokin ailesinin bir üyesi olup, aktive miyeloid hücreler, dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından ifade edilir (183) . IL-23'ün Th17 hücre gelişimindeki rolü IL-12 ve IL-23 eksikliği olan farelerin incelenmesi ile olmuştur. IL-23 eksikliği olan farelerde deneysel otoimmün ensefalit ["experimental autoimmune encephalomyelitis" (EAE)] ve kollajen ile indüklenen artrit ["collagen-induced arthritis" (CIA)] gelişiminin kusurlu olduğu gösterilmiştir (184,185) . IL-23 ve IL-6 sinerjik etki ile Th17 hücre farklılaşmasını indüklemektedir (186) (Şekil 2.11). IL-23R'ünün aktive edilmiş T hücreleri üzerinde aşırı ifadesi ise Th17 hücrelerinin IL-23 bağımlı farklılaşmasına yol açmaktadır (182). Aynı zamanda, IL-23 primer yanıt sonrası Th17 hücrelerinin hayatta kalması ve çoğalması için aracı olabilir (9) .

ROR γ ("RAR-related orphan receptor gamma") insanlarda RORC geni tarafından kodlanan proteindir (187) . ROR γ transkripsiyon faktörleri nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. Aynı RORC geninden büyük olasılıkla alternatif promoterlerin seçimi ile iki izoform üretilmektedir (188-190) :

1. ROR γ - 1-11 ekzonları içermektedir (191) . ROR γ timus, akciğer, karaciğer, böbrek, kas ve kahverengi yağ dokusu dahil olmak üzere bir çok dokuda ifade edilmektedir (187,192,193) .
2. ROR γ t de ROR γ 'ya özdeş olarak mRNA'dan üretilir, ancak 5'- büyük ekzonları genin alt kısmında konumlanmış alternatif ekzon ile yer değiştirmiştir. Bu ise farklı, daha kısa N-terminale neden olur (189) . ROR γ t'nin doku dağılımı timusa sınırlı görünmektedir (189) ve sadece olgunlaşmamış CD4+CD8+ timositlerde, ayrıca lenfoid doku indükleyici hücrelerde ifade edilmektedir (194-196) .

Günümüzde, ROR- γ 'nin Th17 hücrelerinin farklılaşması için gerekli olduğu bilinmektedir. ROR γ t ifadesi TGF β veya IL-6 tarafından indüklenmektedir (Şekil 2.11). ROR γ t timopoezde önemli bir düzenleyici rol oynar. ROR γ t'nin aşırı ifadesi Th1 ve Th2 hücre farklılaşması bloke olduğu zaman Th17 hücre farklılaşmasını desteklemektedir (9) . Ayrıca, ROR γ t farklılaşmamış T hücrelerin apoptozunun engellenmesinde ve onların Th17 hücrelerine farklılaşmasının sağlanmasında rol oynamaktadır (188) .



Şekil 2.11. Th17 hücrelerinin farklılaşması (197) . DH: dendritik hücre

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışması, GO 13/34-32 karar numarası ile Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan onay sonrası, araştırma protokolümüze uygun şekilde Nisan 2013- Ocak 2014 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışma için, 2000-2010 yılları arasında merkezimize başvurmuş, klinik ve laboratuvar tanı yöntemleri ile MG tanısı almış ve Nöromüsküler Hastalıkları Araştırma Laboratuvarı Veritabanı'na kaydedilmiş tüm MG hastaları tarandı. Bu hastalar içerisinde, AChR antikoru pozitif olan ve tedavi amaçlı timektomi uygulanmış MG hastaları seçildi. Timektomi uygulanmış hastaların timus doku materyallerinin yeterliliği kontrol edildikten sonra 37 MG hastası çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu olarak yine 2000-2010 yılları arasında tiroid veya paratiroid hastalığı nedeni ile opere edilirken timus dokuları da çıkarılmış olan ve normal histopatolojik bulguları olan hastaların doku örnekleri kullanıldı. Bu vakalara ise Hacettepe Üniversitesi Bilgi İşlem Daire Başkanlığı'nın patoloji rapor taraması ile ulaşıldı.

3.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Oluşturulması

Planlanan immünohistokimyasal çalışmalar için tedavi amaçlı timektomi uygulanmış olan 37 AChR antikoru pozitif MG vakasından hasta grubu oluşturuldu. Bu hastaların timus doku materyalleri histopatolojik olarak 3 grup şeklinde ele alındı:

1. Histopatolojisi **timoma** ile uyumlu olan 15 timus doku materyalleri,
2. Histopatolojisi **foliküler hiperplazi veya timik hiperplazi** ile uyumlu olan 9 timus doku materyalleri,
3. Histopatolojisi **normal** timus dokusu ile uyumlu olan 13 timus doku materyalleri

Tiroid veya paratiroid hastalığı nedeni ile opere olmuş toplam 24 hastadan ise kontrol grubu oluşturuldu.

3.3. Timus Doku Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmada, ameliyat sırasında çıkarılmış ve patolojik olarak incelenmesi için merkezimizin Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiş ve orada arşiv materyali olarak saklanmakta olan timus bezi doku örnekleri kullanıldı. Toplam 61 hastaya ait formalin tespitli parafine gömülü timus doku preparatları yeniden değerlendirilerek her vaka için en tanısal tek blok seçildi. Seçilen blokların hematoksil-eozin kesitleri tekrar incelenerek tanıları yeniden gözden geçirildi. İmmünohistokimyasal çalışmalar için her vakaya ait timus doku bloklarından üçer kesit olmak üzere 4 mikrometre kalınlığında kesitler alındı.

3.4. İmmünohistokimyasal Boyama

Kesitler Tablo 3.1'de özellikleri belirtilen antikolar ile belirtilen süre ve dilasyonlarda boyandı. Bu amaçla Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarı'nda bulunan Leica BOND-MAX otoboyama cihazı kullanıldı. Boyamalar üretici firmanın önerdiği protokole uygun şekilde yapıldı. Sekonder antikor olarak Leica polimer kiti kullanıldı.

IL-21R, IL-23R ve ROR γ ifadeleri ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak IL-21R antikoruna için insandan elde edilen timus, IL-23R antikoruna için dalak, nükleer reseptör olan ROR γ antikoruna için ise testis doku kesitleri kullanıldı.

Tablo 3.1. Kullanılan primer antikolar ve inkübasyon süreleri

Antikor	Sağlayıcı	Klon/Katalog numarası	Primer antikolarla inkübasyon süresi	Dilüsyon	Antijen açığa çıkarma
IL-21R	Thermo Scientific	PA5-19982	15 dakika	1/300	ER2 (EDTA)
IL-23R	LSBio	LS-C724	100 dakika	1/200	ER2 (EDTA)
RORγ*	LSBio	LS-B1797	100 dakika	1/200	ER2 (EDTA)

* Çalışmamızda kullanılmış olan RORγ/RORC antikoru RORC'nin her iki izoformunu (RORγ ve RORγt) boyama özelliğine sahiptir. ER: Epitep Retrival-2 numaralı solüsyonu

3.5. Dokuların Değerlendirilmesi

Dokular ışık mikroskopunda (Olympus BH-2), X40'lık büyütmede, birbirlerinden bağımsız olarak iki araştırmacı (Dr. Lala Mehdikhanova, Doç. Dr. Sevgen Çelik Önder) tarafından değerlendirildi. IL-21R, IL-23R ve RORγ antikoları ile yapılan immünohistokimyasal boyamada timus dokusunda mevcut olan lenfoid hücrelerin membranöz ve sitoplazmik boyanması pozitif olarak kabul edildi.

IL-21R, IL-23R ve RORγ antikoları ile boyanan her vakaya ait timus dokuları boyanma yoğunluğu (intensite) açısından değerlendirildi. Bunun için her dokuya ait en yoğun boyanan 3 alan seçildi. Boyama yoğunluğu açısından 0, 1, 2, 3 olarak skorlandı. Buna göre 0, boyanma yok; 3, en yoğun boyanma; 1, az sayıda hücre boyanması olarak değerlendirildi. 1 ve 3 olarak skorlanan iki grup arasındaki her türlü boyanma yoğunluğunun skoru ise 2 olarak kabul edildi.

3.6. İstatiksel Yöntemler

İstatistiksel analizler IBM SPSS 21 yazılımı ile gerçekleştirildi. Verilerde tanımlayıcı istatistikler olarak nitel değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortanca (min-max) verildi. Yaş açısından 2 grup (hasta ve kontrol) arasındaki farklılık bağımsız gruplarda T testi ile, 4 grup arasındaki farklılık ise tek yönlü ANOVA testi ile yapıldı. Gruplar arası cinsiyetin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. İki grup arasındaki

farklılık Mann-Whitney U testiyle, 4 grup arasındaki farklılık ise Kruskal Wallis testiyle incelendi. Kruskal Wallis testinde farklılık önemli bulunduğunda ikili karşılaştırmalar Dunn testi ile gerçekleştirildi. Değişkenler arasındaki ilişki Spearman korelasyon katsayısı ile incelendi. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Özellikler

AChR antikoru pozitif MG hastalarından seçilen hasta grubunun demografik özellikleri ve timus doku histopatolojileri Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. AChR antikoru pozitif MG hasta grubunun demografik özellikleri ve timus doku histopatolojileri

Hasta no	Yaş	Cinsiyet	Timus doku histopatolojisi
1	34	K	Normal
2	41	E	Normal
3	40	K	Normal
4	40	E	Normal
5	29	E	Normal
6	42	E	Normal
7	15	K	Normal
8	27	K	Normal
9	23	K	Normal
10	53	K	Normal
11	40	K	Normal
12	22	K	Normal
13	28	K	Normal
14	56	E	Timoma AB
15	71	E	Timoma AB
16	43	E	Timoma AB
17	28	K	Timoma AB+FH
18	41	K	Timoma B2
19	22	K	Timoma B2
20	42	K	Timoma B2
21	59	K	Timoma B2,B3+TH
22	56	K	Timoma B2,B3+FH
23	24	E	Timoma B3
24	74	K	Timoma B3
25	42	K	Timoma B3
26	50	K	Timoma kistik+FH
27	45	K	Timoma sklerozan
28	47	E	Timoma sklerozan
29	35	K	FH
30	23	K	FH
31	25	K	FH
32	25	E	FH
33	52	E	FH
34	31	K	FH
35	40	K	FH
36	19	K	FH
37	20	K	FH

K-kadın; E-erkek; FH-foliküler hiperplazi; TH-timik hiperplazi

MG hastalığı olmayan ve timus histopatolojisi normal olan hastalardan seçilen kontrol grubunun demografik özellikleri ve tiroid ve/veya paratiroid doku histopatolojileri Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. MG hastalığı olmayan kontrol grubunun demografik özellikleri ve tiroid ve/veya paratiroid doku histopatolojileri

Kontrol no	Yaş	Cinsiyet	Tiroid/paratiroid doku histopatolojisi
1	32	K	diffüz hiperplazi, Graves
2	32	K	Hashimoto tiroiditi
3	44	K	Hashimoto tiroiditi
4	66	E	koloidal guatr
5	46	K	multinodüler guatr
6	42	E	multinodüler guatr
7	44	K	multinodüler guatr
8	44	E	multinodüler guatr
9	65	E	multinodüler kistik guatr
10	49	K	nodüler guatr, kronik lenfositik tiroidit
11	38	K	paratiroid adenom
12	42	K	paratiroid adenom
13	42	K	paratiroid adenom
14	48	K	paratiroid adenom
15	55	K	paratiroid adenom
16	51	K	paratiroid adenom
17	52	K	paratiroid adenom
18	55	K	paratiroid adenom
19	50	K	paratiroid adenom
20	41	E	paratiroid adenom
21	59	K	paratiroid adenom, nodüler guatr
22	51	K	paratiroid adenom, multinodüler guatr
23	39	E	paratiroid adenomu
24	20	K	paratiroid adenomu, kronik lenfositik tiroidit

K-kadın; E-erkek

Normal timus histopatolojisine sahip MG hastalarının yaş ortalaması 33.39 ± 10.5 ; timomalı hastaların yaş ortalaması 46.67 ± 15.2 ; FH'li hastaların yaş ortalaması 30.0 ± 10.8 ; kontrol grubu hastalarının yaş ortalaması ise 46.13 ± 10.4 'tü. Buna göre FH'li ve normal timus histopatolojisine sahip hastaların yaşı diğer iki gruba göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.05$).

FH'li hastalarla normal timus histopatolojisine sahip hastaların ve timomalı hastalarla kontrol grubu hastalarının yaş ortalamaları arasında belirgin bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Gruplar cinsiyet açısından karşılaştırıldığında normal timus histopatolojisine sahip MG hastalarının 9'u (% 69.2) kadın, 4'ü (%30.8) erkek; timomalı hastaların 10'u (%66.7) kadın , 5'i (%33.3) erkek; FH'li hastaların 7'si (%77.8) kadın , 2'si (%22.2) erkek; kontrol grubu hastalarının 18'i (%75) kadın ve 6'sı (%25) erkekti. Buna göre tüm gruplarda kadın hakimiyeti mevcuttu. Ancak gruplar arasında cinsiyet bakımından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

4.2. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

AChR antikor pozitif MG hastalarının antikor düzeyleri ve timus doku örneklerinin IL-21R, IL-23R ve ROR- γ ile boyanma değerlendirmeleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.1-4.3'te özetlenmiştir.

Tablo 4.3. MG hastalarının AChR antikor düzeyi ve timus doku örneklerinin IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanma özellikleri

Hasta No	AChR antikor düzeyi (nmol/L)	Timus doku histopatolojisi	IL-21R	IL-23R	ROR γ
1	*	Normal	2	2	2
2	5.0	Normal	0	0	0
3	0.6	Normal	2	1	1
4	5.2	Normal	1	3	2
5	1.2	Normal	2	2	2
6	1.6	Normal	1	1	2
7	1600.0	Normal	3	3	2
8	175.0	Normal	2	2	2
9	15.0	Normal	1	2	1
10	70.0	Normal	1	2	2
11	1.3	Normal	3	3	2
12	4.1	Normal	2	2	2
13	70.0	Normal	2	2	2
14	35.0	Timoma AB	0	0	1
15	20.0	Timoma AB	1	1	1
16	42.0	Timoma AB	1	0	0
17	45.0	Timoma AB+FH	0	0	0
18	60.0	Timoma B2	2	2	0
19	75.0	Timoma B2	1	1	0
20	50.0	Timoma B2	1	1	1
21	38.0	Timoma B2,B3+TH	1	0	0
22	2.0	Timoma B2,B3+FH	0	0	0
23	42.0	Timoma B3	1	0	0
24	395.0	Timoma B3	1	0	0
25	10.0	Timoma B3	1	0	0
26	5.0	Timoma kistik+FH	0	0	0
27	8.0	Timoma sklerozan	1	2	1
28	20.0	Timoma sklerozan	1	2	1
29	150.0	FH	1	1	2
30	640.0	FH	2	2	2
31	4.4	FH	2	2	2
32	140.0	FH	3	2	2
33	2.0	FH	1	3	2
34	50.0	FH	2	1	2
35	392.0	FH	1	2	2
36	*	FH	2	2	2
37	*	FH	2	2	2

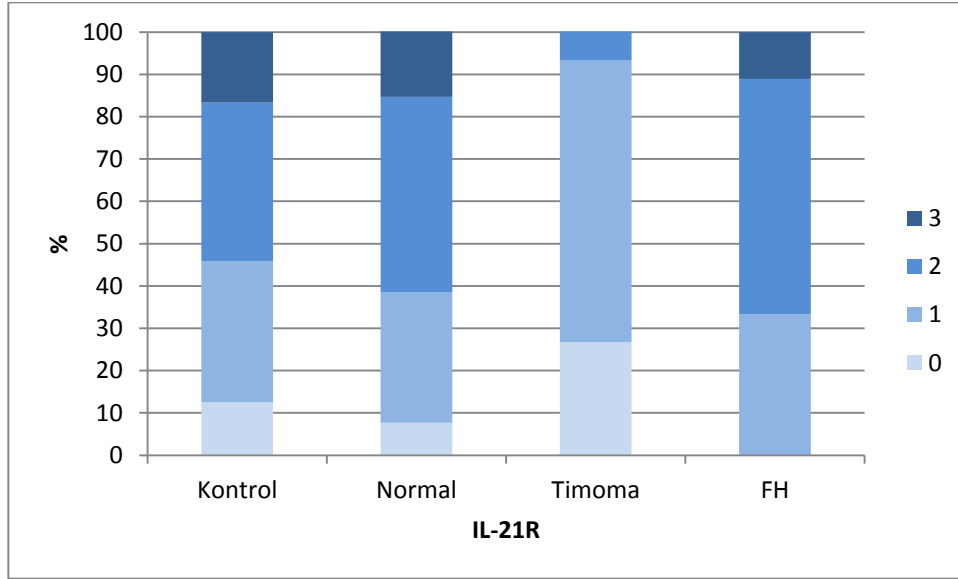
*Antikor düzeyi pozitif olarak rapor edilmiş, ancak titre bilinmiyor, düzey >0.05 nmol/L pozitif olarak kabul edilmiştir. FH-foliküler hiperplazi; TH-timik hiperplazi; 0-boyanma yok; 1-az sayıda hücre boyanması; 2- 1 ve 3 olarak skorlanan iki grup arasındaki her türlü boyanma; 3-en yoğun boyanma.

Kontrol grubu timus doku örneklerinin IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanma değerlendirmeleri Tablo 4.4 ve Şekil 4.1-4.3'te özetlenmiştir.

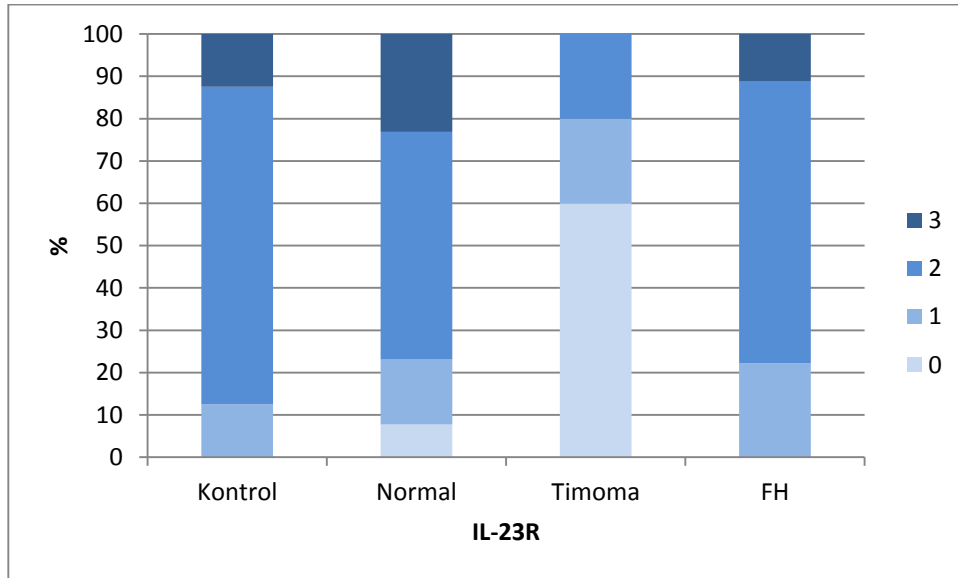
Tablo 4.4. Kontrol grubu timus doku örneklerinin IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanma özellikleri

Kontrol No	Timus doku histopatolojisi	IL-21R	IL-23R	ROR γ
1	Normal	3	2	2
2	Normal	2	2	2
3	Normal	2	2	2
4	Normal	1	2	3
5	Normal	1	1	1
6	Normal	1	2	2
7	Normal	0	2	2
8	Normal	3	3	2
9	Normal	0	3	2
10	Normal	1	1	1
11	Normal	2	2	2
12	Normal	2	2	1
13	Normal	3	2	2
14	Normal	2	2	1
15	Normal	0	2	1
16	Normal	2	2	2
17	Normal	2	2	2
18	Normal	1	2	2
19	Normal	3	2	2
20	Normal	2	3	2
21	Normal	2	2	3
22	Normal	1	1	1
23	Normal	1	2	2
24	Normal	1	2	1

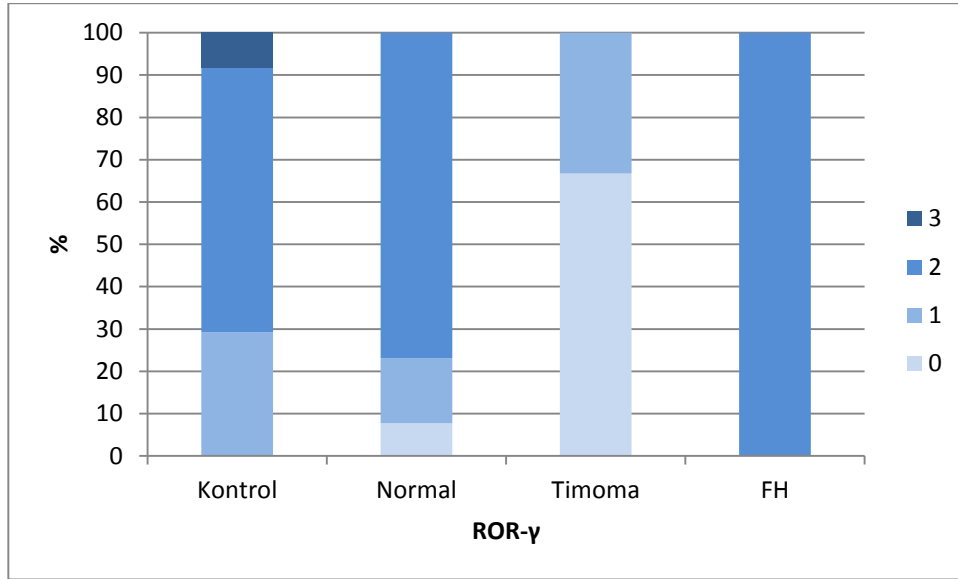
0-boyanma yok; 1- az sayıda hücre boyanması; 2- 1 ve 3 olarak skorlanan iki grup arasındaki her türlü boyanma; 3- en yoğun boyanma.



Şekil 4.1. Tüm gruplarda IL-21R antikoru ile boyanma yoğunluğunun dağılımı



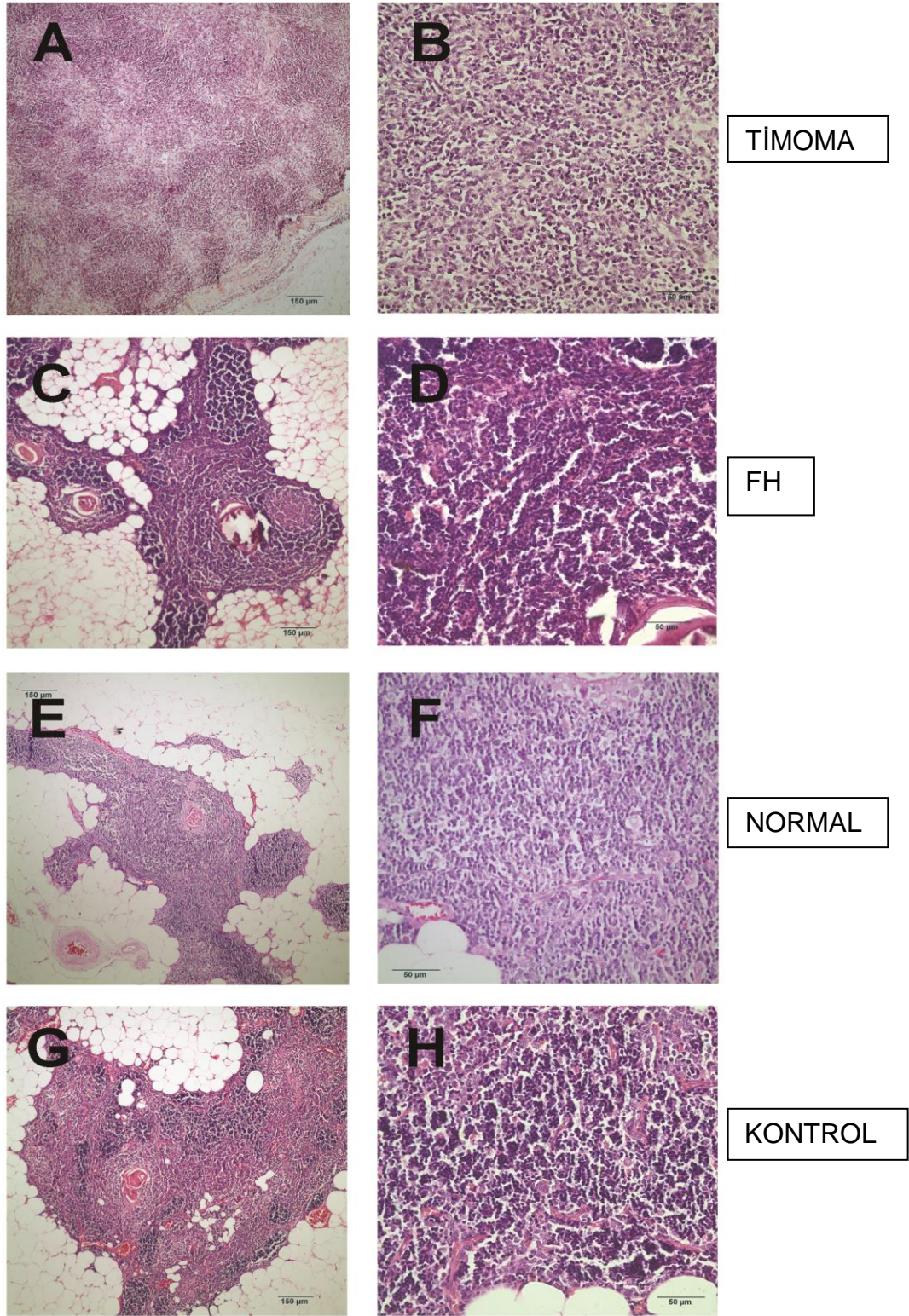
Şekil 4.2. Tüm gruplarda IL-23R antikoru ile boyanma yoğunluğunun dağılımı



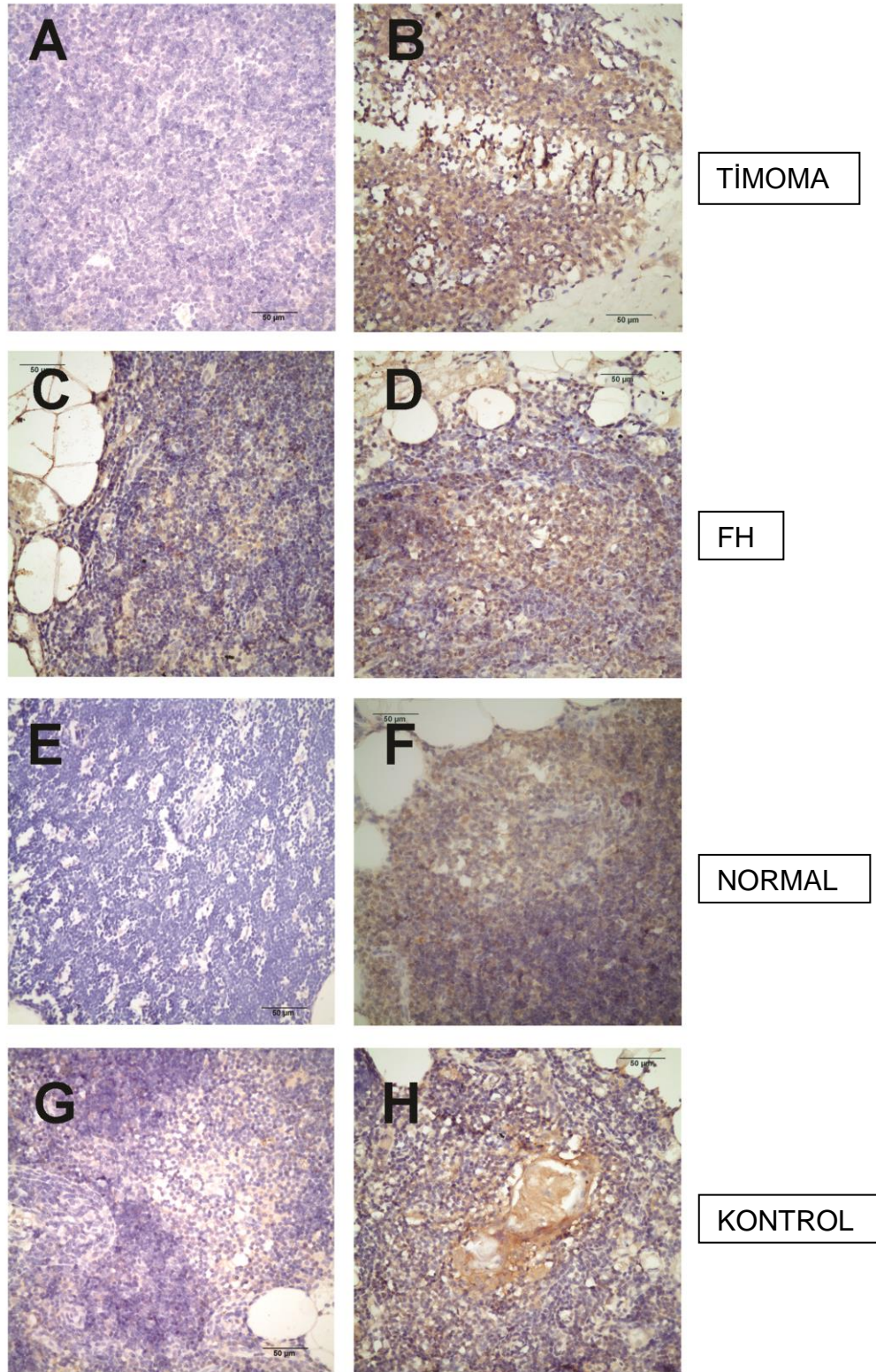
Şekil 4.3. Tüm gruplarda ROR γ antikoru ile boyanma yoğunluğunun dağılımı

Hasta ve kontrol grubundan birer hastanın timus dokularının hemotoksilen eozin boyamaları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

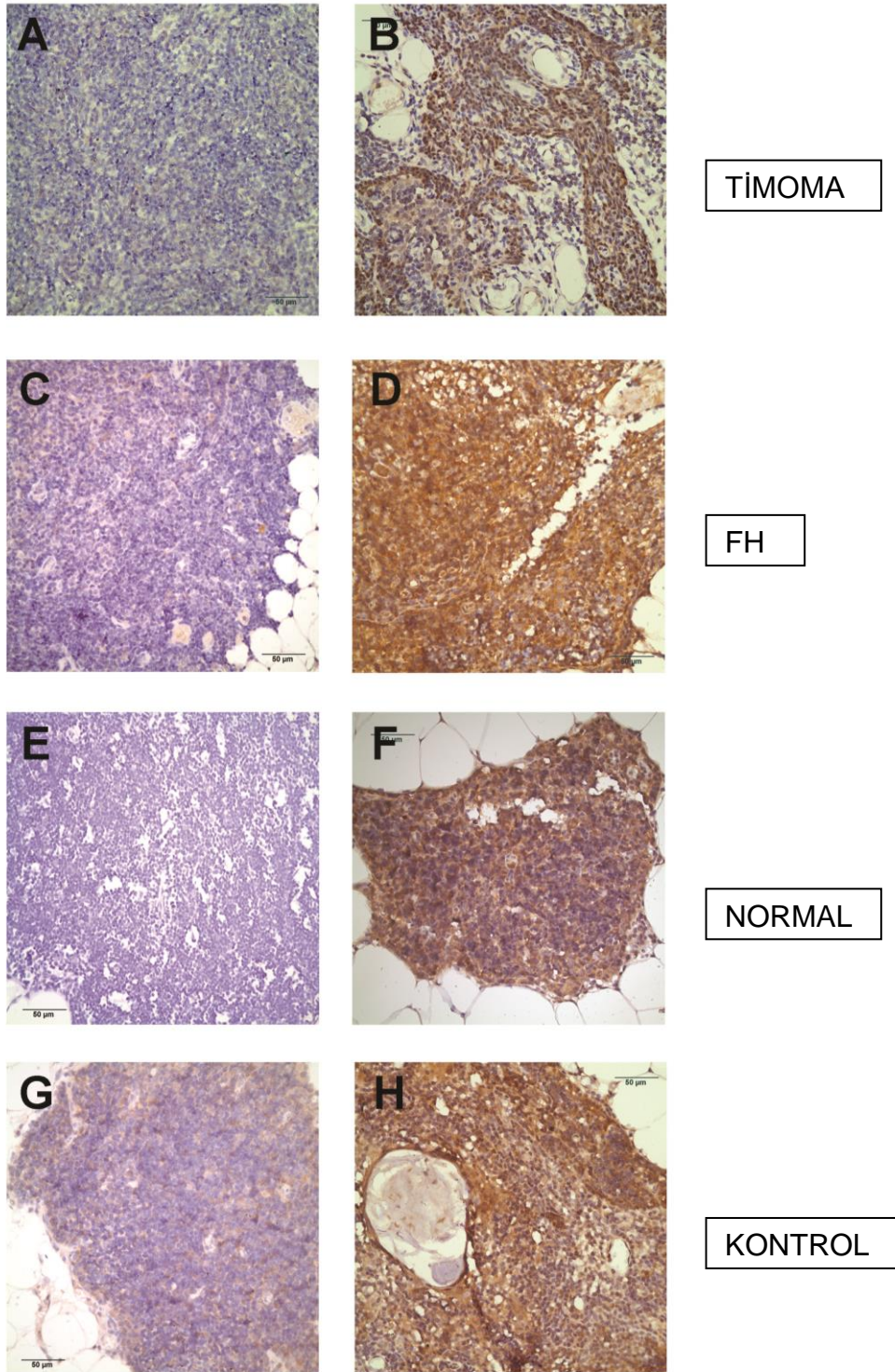
Hasta ve kontrol grubu timus dokularının IL-21R, IL-23R ve ROR γ antikoru ile en az ve en yoğun boyanmalarına ait örnekler Şekil 4.5-4.7'de gösterilmiştir.



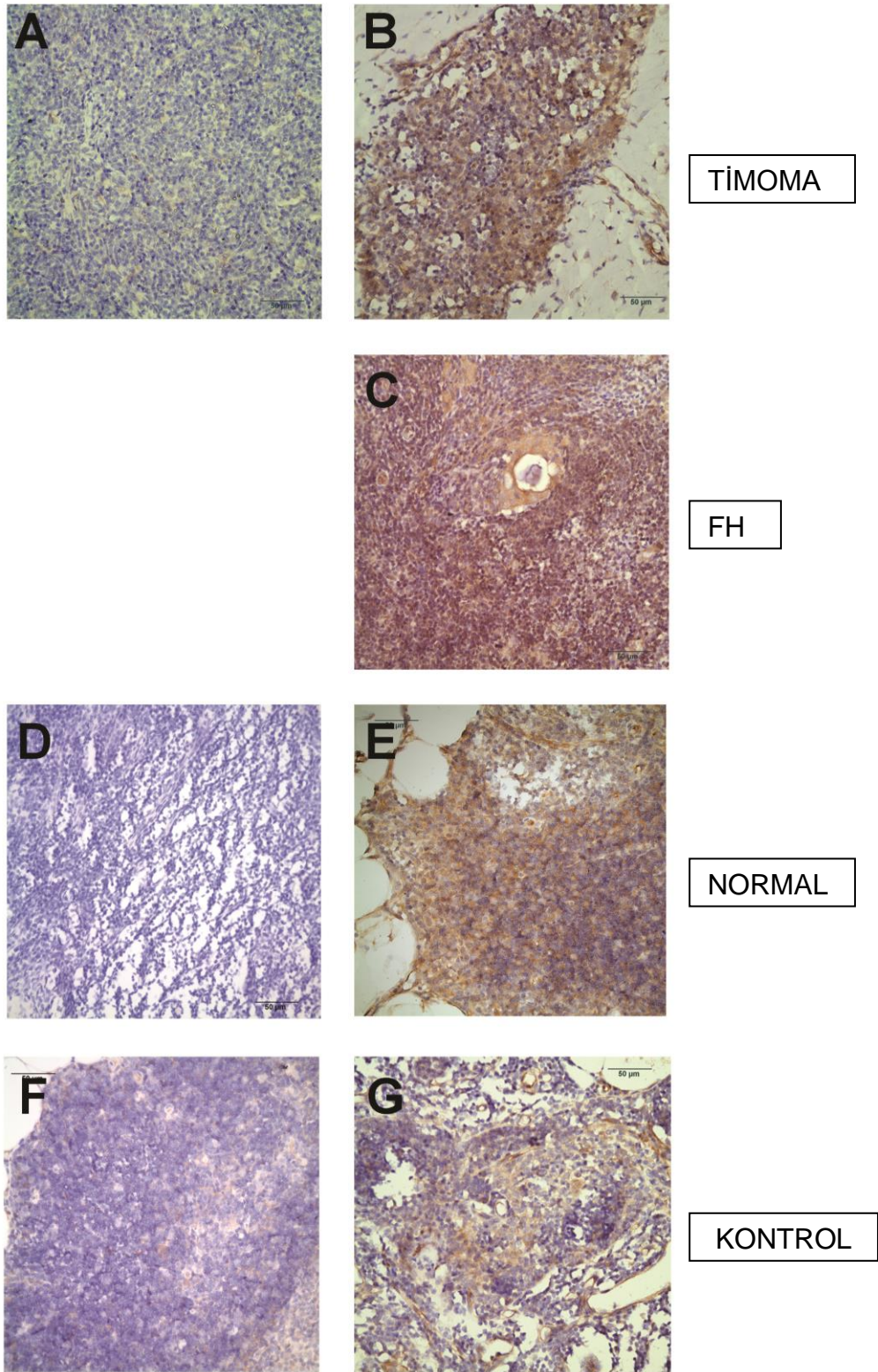
Şekil 4.4. Hasta ve kontrol grubu timus dokularının hemotoksilen eozin boyaları (A, C, E, G X10 büyütme, B, D, F, H X40 büyütme)



Şekil 4.5. Hasta ve kontrol grubu timus dokularında IL-21R antikoruna ile boyanma örnekleri. Boyanma yoğunluğu skoru: A-0, B-1, C-1, D-3, E-0, F-3, G-1, H-3.



Şekil 4.6. Hasta ve kontrol grubu timus dokularında IL-23R antikoru ile boyanma örnekleri. Boyanma yoğunluğu skoru: A-0, B-2, C-1, D-3, E-0, F-3, G-1, H-3.



Şekil 4.7. Hasta ve kontrol grubu timus dokularında ROR γ antikoruna ile boyanma örnekleri. Boyanma yoğunluğu skoru: A-0, B-1, C-2, D-0, E-2, F-1, G-2.

4.3. Boyanma Yoğunluklarının Karşılaştırılması

Hasta grubu ile kontrol grubunun timus doku örnekleri IL-21R, IL-23R ve ROR γ antikoru ile boyanma yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında hasta grubunun IL-23R ve ROR γ antikoru ile kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha az boyandığı gözlemlendi ($p < 0.05$). IL-21R antikoru ile ise, her iki grup arasında farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Hasta ve kontrol grubunun IL-21R, IL-23R ve ROR γ antikoru ile boyanma yoğunluğu açısından karşılaştırılması

Antikorlar	Gruplar	Ortalama	Standart sapma	min	max	p değeri
IL-21R	Hasta	1.35	0.82	0.0	3.0	0.304
	Kontrol	1.58	0.93	0.0	3.0	
IL-23R	Hasta	1.38	1.01	0.0	3.0	0.013*
	Kontrol	2.00	0.51	1.0	3.0	
ROR γ	Hasta	1.22	0.89	0.0	2.0	0.018*
	Kontrol	1.79	0.59	1.0	3.0	

* $p < 0.05$

Dört grup birbirleri her 3 antikor (IL-21R, IL-23R ve ROR γ) ile boyanma yoğunluğu açısından Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı, gruplar arası farklılık gözlemlendi ($p < 0.05$) (Tablo 4.6). Bu farklılığın hangi alt gruptan kaynaklandığını göstermek amacı ile ikili karşılaştırmalar Dunn testi ile gerçekleştirildi. Sadece timoma grubunun IL-21R, IL-23R ve ROR γ boyanmasının kontrol, folliküler hiperplazi ve normal timus gruplarına göre anlamlı olarak daha az olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Tablo 4.7-4.9).

Tablo 4.6. Tüm grupların IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanma yoğunluğu açısından karşılaştırılması

Boyalar	Gruplar	Ortalama	Standart sapma	min	max	p değeri
IL-21	Normal	1.69 ^a	0.85	0.0	3.0	0.007*
	Timoma	0.80 ^b	0.56	0.0	2.0	
	FH	1.78 ^a	0.67	1.0	3.0	
	Kontrol	1.58 ^a	0.93	0.0	3.0	
IL-23	Normal	1.92 ^a	0.86	0.0	3.0	<0.001*
	Timoma	0.60 ^b	0.83	0.0	2.0	
	FH	1.89 ^a	0.60	1.0	3.0	
	Kontrol	2.00 ^a	0.51	1.0	3.0	
ROR γ	Normal	1.69 ^a	0.63	0.0	2.0	<0.001*
	Timoma	0.33 ^b	0.49	0.0	1.0	
	FH	2.00 ^a	0.00	2.0	2.0	
	Kontrol	1.79 ^a	0.59	1.0	3.0	

*p<0.05, b ile a arasında anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi

Tablo 4.7. IL-21 antikoruna ile boyanma açısından grupların ikili karşılaştırması (Dunn testi)

İkili karşılaştırma	Standart test istatistiği	p değeri	Düzeltilmiş p değeri
Timoma-Kontrol	2.834	0.005	0.028
Timoma-Normal	2.826	0.005	0.028
Timoma-FH	-2.803	0.005	0.030
Kontrol-Normal	-0.401	0.688	1.000
Kontrol-FH	-0.637	0.524	1.000
Normal-FH	-0.255	0.799	1.000

Tablo 4.8. IL-23 antikoruna ile boyanma açısından grupların ikili karşılaştırması (Dunn testi)

İkili karşılaştırma	Standart test istatistiği	p değeri	Düzeltilmiş p değeri
Timoma-Kontrol	-3.103	0.002	0.012
Timoma-Normal	3.698	0.000	0.001
Timoma-FH	4.434	0.000	0.000
Kontrol-Normal	0.215	0.830	1.000
Kontrol-FH	0.386	0.699	1.000
Normal-FH	0.168	0.867	1.000

Tablo 4.9. ROR γ antikoruna ile boyanma açısından grupların ikili karşılaştırması (Dunn testi)

İkili karşılaştırma	Standart test istatistiği	p değeri	Düzeltilmiş p değeri
Timoma-Kontrol	4.269	0.000	0.000
Timoma-Normal	5.105	0.000	0.000
Timoma-FH	-4.802	0.000	0.000
Kontrol-Normal	0.182	0.856	1.000
Kontrol-FH	-0.939	0.348	1.000
Normal-FH	-0.881	0.378	1.000

Hasta alt gruplarının her biri için (normal, timoma ve FH) her 3 antikor (IL-21R, IL-23R, ROR γ) ile boyanma yoğunluğunun birbiri ile korelasyonuna bakıldı.

Normal timus dokusunda IL-23R ile ROR γ boyanması arasında korelasyon olduğu gözlemlendi ($\rho=0.588$, $p<0.05$). IL-21R ile ROR γ ve IL-21R ile IL-23R boyanmaları arasında korelasyon izlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.10).

Timoma alt grubunda IL-21R ile IL-23R ve IL-23R ile ROR γ boyanması arasında korelasyon olduğu saptandı (sırası ile $\rho=0.574$, $p<0.05$; $\rho=0.559$, $p<0.05$), ancak IL-21R ve ROR γ arasında korelasyon gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.10).

FH'li timus dokusunda ise IL-21R ve IL-23R boyanması arasında korelasyon gözlenmedi ($p>0.05$). Tüm FH'li timus dokuları ROR γ ile boyanma yoğunluğu açısından aynı skorlandığı için IL-21 ve IL-23 ile ROR γ arasındaki ilişki değerlendirilemedi (Tablo 4.10).

Kontrol grubu timus doku örneklerinin her 3 antikor (IL-21R, IL-23R, ROR γ) ile boyanmasında boyanma yoğunlukları arasında korelasyon saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.10. Hasta alt gruplarının IL-21R, IL-23R ve ROR γ antikoru ile boyanma yoğunluğunun birbiri ile korelasyonu

Gruplar	Antikorlar		IL-21R	IL-23R	ROR γ
Normal	IL-21R	Korelasyon katsayısı	1.000	0.532	0.454
		p değeri		0.062	0.119
		N	13	13	13
	IL-23R	Korelasyon katsayısı	0.532	1.000	0,588*
		p değeri	.062		.035
		N	13	13	13
	ROR γ	Korelasyon katsayısı	0.454	0,588*	1.000
		p değeri	0.119	0.035	
		N	13	13	13
Timoma	IL-21R	Korelasyon katsayısı	1.000	0,574*	0.020
		p değeri		0.025	0.944
		N	15	15	15
	IL-23R	Korelasyon katsayısı	0,574*	1.000	0,559*
		p değeri	0.025		0.030
		N	15	15	15
	ROR γ	Korelasyon katsayısı	0.020	0,559*	1.000
		p değeri	0.944	0.030	
		N	15	15	15
FH	IL-21R	Korelasyon katsayısı	1.000	-0.056	
		p değeri		0.887	
		N	9	9	9
	IL-23R	Korelasyon katsayısı	-0.056	1.000	
		p değeri	0.887		
		N	9	9	9
	ROR γ	Korelasyon katsayısı			
		p değeri			
		N	9	9	9

*korelasyonun mevcut olduğu gruplar

AChR antikor düzeyi ile boyanma yoğunluğu arasındaki korelasyona bakıldığında her 3 antikor (IL-21R, IL-23, ROR γ) ile boyanma yoğunluğu ve AChR antikor düzeyi arasında korelasyon saptanmadı ($p>0.05$)(Tablo 4.11 ve 4.12).

Tablo 4.11. Hasta grubunun IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanmasında boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasındaki ilişki

		IL-21R	IL-23R	ROR γ
AChR antikor düzeyi	Korelasyon katsayısı	0.150	0.021	0.054
	p değeri	0.396	0.908	0.760
	N	34	34	34

N-hasta sayısı

Tablo 4.12. Hasta alt gruplarının IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanmasında boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasındaki ilişki

Gruplar	AChR antikor düzeyi		IL-21R	IL-23R	ROR γ
Normal	AChR antikor düzeyi	Korelasyon katsayısı	-0.006	0.347	0.235
		p değeri	0.986	0.268	0.462
		N	12	12	12
Timoma	AChR antikor düzeyi	Korelasyon katsayısı	0.451	0.092	-0.230
		p değeri	0.092	0.745	0.411
		N	15	15	15
FH	AChR antikor düzeyi	Korelasyon katsayısı	0.000	-0.299	
		p değeri	1.000	0.515	
		N	7	7	7

N-hasta sayısı

Hasta alt gruplarında boyanma yoğunluğu ile yaş arasındaki ilişkiye (>40 yaş ve \leq 40 yaş) her bir alt grupta karşılaştırma için yaş açısından yeterli hasta sayısı olmadığından bakılmadı.

Merkezimizde AChR antikor pozitif saptanan MG hastalarına anti-MuSK ve çizgili kas antikorları rutin olarak bakılmamaktadır. Bu testler sadece klinik takibinde kötü gidişle sahip hastalara yapılmaktadır. Çalışmamıza dahil edilen bu durumda bir hastada (1.hasta, Tablo 4.1 ve 4.3) anti-AChR antikor pozitifliğine ek olarak anti-MuSK antikor pozitifliği; diğer bir hastada (19. hasta, tablo 4.1 ve 4.3) ise anti-titin antikor pozitifliği saptanmıştır. Çalışma kapsamı dışında tutulmakla birlikte timektomi yapılmış olan 3 AChR antikor negatif, MuSK antikor pozitif olan MG hastasının timus doku örneklerinin IL-21R, IL-23R ve ROR γ ile boyanması da yapılmıştır. Bu hastalardan 2'sinde normal timus doku histopatolojisi, birinde ise FH saptanmıştır. MuSK antikor pozitif olan bu 3 hastanın timus doku örneklerinde de her 3 antikor ile hafif veya orta derecede boyanma olduğunu saptadık.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, AChR antikoru pozitif ve timektomi yapılmış MG hastalarının timus bezi doku örneklerinde Th17 hücrelerine özgül IL-21R, IL-23R ve ROR γ belirteçlerini araştırmayı hedeflemiştik. Bu amaçla 37 MG tanılı hastanın timektomi materyalleri ile farklı nedenlerle opere edilmiş ve biyopsi materyallerinde timus dokusu izlenen 24 hastanın biyopsi materyalleri karşılaştırıldı.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, her 3 antikor (IL-21R, IL-23R ve ROR γ) ile boyanmada sadece timomalı MG grubunun diğer 3 gruba (FH, normal timus ve kontrol) kıyasla anlamlı olarak daha az boyandığı görüldü ($p < 0.05$). FH'li MG hastaları, normal timus histopatolojisine sahip MG hastaları ve kontrol grubu arasındaki ikili karşılaştırmalarda boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Hasta alt gruplarının her birinde (normal, timoma ve FH) her 3 antikor (IL-21R, IL-23R, ROR γ) ile boyanma yoğunluğunun birbiri ile korelasyonuna bakıldığında normal timus dokusunda IL-23R ile ROR γ boyanması arasında korelasyon olduğu gözlemlendi ($\rho = 0.588$, $p < 0.05$). Aynı alt grupta IL-21R ile ROR γ ve IL-21R ile IL-23R boyanmaları arasında korelasyon izlenmedi ($p > 0.05$). Timoma alt grubunda IL-21R ile IL-23R ve IL-23R ile ROR γ boyanması arasında korelasyon olduğu halde (sırası ile $\rho = 0.574$, $p < 0.05$; $\rho = 0.559$, $p < 0.05$), IL-21R ile ROR γ arasında korelasyon gözlenmedi ($p > 0.05$). FH'li timus dokusunda ise IL-21R ve IL-23R boyanması arasında korelasyon gözlenmedi ($p > 0.05$). Aynı grupta IL-21 ve IL-23 ile ROR γ arasındaki ilişki sonuçlarda belirtilen nedenlerle değerlendirilemedi. Hasta alt gruplarında her 3 antikor ile boyanmada boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasında korelasyon görülmedi ($p > 0.05$).

Th17 hücrelerinin insanda MG üzerindeki rolü ile ilişkili bilgiler sınırlıdır. Literatürde günümüze dek MG immünolojisi konusundaki bilgilere sıklıkla serumda pro/antiinflamatuvar sitokinlerin protein ya da mRNA düzeylerini araştıran çalışmalar ile ulaşılmıştır. Bu bilgiler MG'de ortaya çıkan otoimmün davranışın kökenini aydınlatmaya yararlı olsa da yeterli değildir. Yapılan bir çalışmada, kantitatif PCR ("polymerase chain reaction") yöntemi

kullanılarak bakılan IL-23 mRNA ifadesinin timomalı grupta sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Yine benzer şekilde, MG serumunda ELISA yöntemi ile çalışılan IL-23 seviyesinin timomalı grupta sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (15) . MG hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde Th17 hücrelerinin farklılaşmasında önemli role sahip ROR γ t mRNA gen ifadesinin görece miktarının sağlıklı kişiler ile benzer olduğu saptanmıştır (172) . MG hastalarının serumunda Th17 hücre dağılımını belirlemek amacı ile yapılan diğer bir çalışmada ise, standart akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda CD4+ T hücreleri arasındaki Th17 hücre sayısının timomalı MG grubunda diğer gruplara (timik hiperplazi, normal ve sağlıklı kontrol) göre anlamlı derecede artmış olduğu gösterilmiştir. Timik hiperplazili MG hastaları, normal timus dokusuna sahip MG hastaları ve sağlıklı bireylerin serumunda ise Th17 hücre sayısı açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (15) . Bu bulgular, timomalı MG hasta grubunda IL-23 üreten hücre sayısının fazla olduğunu veya bu hücrelerin oldukça aktif olduklarını göstermektedir. Ancak, olayın ana kaynağı olan timus hakkında bilgi vermemektedir. Çalışmamızın farkı, bu otoimmün sürecin timus dokusunda araştırılması ve sitokinlerin reseptörlerinin değerlendirilmesidir. IL-21R, IL-23R ve ROR γ reseptörlerine ait immünohistokimyasal bu değerlendirme bize Th17 ağırlıklı olarak bu immün yanıtta katılan hücre grubu hakkında bilgi verecektir.

Literatürde timus dokusunda Th17 ilişkili otoimmün yolları araştıran sınırlı sayıda araştırma vardır. Cordiglieri ve ark., timus dokusunda real-time PCR yöntemi ile Th17 ilişkili bazı sitokinlerin (IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-17C ve TGF- β 1) gen ifadesini çalışmış ve IL-17A ve IL-17F mRNA ifadesinin hiperplazik timusta yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, hiperplazik timusta adı geçen proinflamatuvar sitokinlerin aşırı ifadesine Treg gelişiminde önemli olan iki belirleyicinin TGF- β 1 ve Foxp3'ün mRNA düzeyinin azalması eşlik etmiştir. Bu bulguyu destekler şekilde yapılan çalışmalarda Treg hücrelerinin sayısı bazı myastenik timus dokularında azalmış bulunurken, diğerlerinde sayı azalmaksızın belirgin Treg fonksiyon kaybının olduğu

gösterilmiştir (14,198) . Bu durum Th17/Treg dengesinin myastenik timus ortamında bozulması ve bu dengenin Th17'ye yönelimi ile bu mikroçevrede kontrolsüz bir inflamasyonu desteklemektedir. Biz de çalışmamızda FH'li MG grubu hastalarında timusun Th17 hücre belirteçleri olan IL-21R, IL-23R ve ROR γ antikorları ile boyandığını tespit ettik. Ancak, MG hastalığı olmayan kontrol bireylerin timus dokularının da her 3 antikor ile benzer yoğunlukta boyandığını gördük. Bu iki grup arasında boyanma açısından belirgin bir farkın olmaması MG hastalarının timektomi öncesinde immünosupresif tedavi almaları ile ilişkili olabilir.

Çalışmamızda, saptadığımız önemli diğer bir bulgu ise her 3 antikor (IL-21R, IL-23R ve ROR γ) ile boyanmada timomalı MG grubunun diğer 3 gruba (FH, normal timus ve kontrol) kıyasla anlamlı olarak daha az boyanması idi. Bu bulgu Th17 hücrelerinin timoma dokusunda daha az olduğuna işaret etmektedir ve serumda yapılmış olan çalışmalardaki Th17 hücre artışı ile çelişkili gibi görünmektedir. Ancak timomada medüller alan genellikle sınırlıdır. Timik medulla negatif seçim bölgesi olduğu için, etkili bir şekilde apoptoza uğramayan otoreaktif T hücrelerinin timomadan ayrılarak periferik dolaşıma geçtiği düşünülmektedir. Buna ek olarak, "self" tolerans için önemli olan AIRE, Foxp3 ve sınıf II MHC gibi bazı molekülerin timomada eksik olduğu gözlenmiştir (137) . Bu hipotez, periferik kanda Th17 sayısı artarken bizim çalışmamızda bulduğumuz timus dokusundaki Th17 hücre belirteçlerinin azalmasını da açıklayabilir.

Çalışmamızda timoma grubu hastalarının yaş ortalamasının diğer hasta gruplarına (FH ve normal) kıyasla daha yüksek olduğu dikkat çekicidir. Ancak kontrol grubu hastalarının da yaş itibari ile timoma grubuna benzer olması timomadaki boyanma azlığının yaştan bağımsız olduğunu göstermektedir.

MG hastalarının timus dokusunda Th17 hücre infiltrasyonunu değerlendirirken çalışmanın güvenilirliğini artırmak amacı ile aynı yolağın farklı bileşenlerini (IL-21R, IL-23R ve ROR γ) inceledik. İncelediğimiz bu 3 belirteç farklı hücreler üzerinde ifade edilmekte ve farklı görevler sergilemektedir. Bu belirteçler içerisinde ROR γ t lenfoid doku indükleyici

hücrelerde ifade edilmektedir (194) . IL-21R'ünün özellikle T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü ["natural killer" (NK)] hücreler üzerinde ifade edildiği bilinmektedir. IL-23R ise bellek T hücreleri, NK hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve monositler üzerinde yüksek düzeyde tespit edilmiştir (199) . IL-21R, IL-23R ve ROR γ ifade eden tüm tanımlanmış hücreler çeşitli dokularda bulunmakla birlikte timus dokusunda da mevcuttur. Bu bilgiler ışığında, hasta alt gruplarının her birinde (normal, timoma ve FH) her 3 antikor (IL-21R, IL-23R, ROR γ) ile boyanma yoğunluğunun birbiri ile korelasyonuna bakıldı. Timoma alt grubunda IL-21R ile IL-23R ve IL-23R ile ROR γ boyanması arasında korelasyon olduğu saptandı (sırası ile rho=0.574, p<0.05; rho=0.559, p<0.05), ancak IL-21R ve ROR γ arasında korelasyon görülmedi (p>0.05). Timoma grubunda gözlenen antikörler arasındaki bu pozitif korelasyon bulgularımızın güvenilirliğini desteklemektedir.

Çalışmamızda Th17 hücre belirteçleri ile AChR antikor düzeyleri arasındaki ilişkiyi de inceledik, ancak bir korelasyon tespit edemedik. Literatürde bizim kullandığımız belirteçler ile antikor düzeyleri arasında bir korelasyon çalışması mevcut değildir. Ancak bir başka Th17 hücre belirteci olan IL-17 düzeyinin serum seviyesi ile serum AChR antikor düzeyleri arasında korelasyon gösterilmiştir. Adı geçen bu çalışmada serum IL-17 düzeyinin timustaki patolojik değişiklikler ile ilişkisine yetersiz hasta sayısı nedeni ile bakılamamıştır (179) . Wang ve ark. tarafından ise hiç tedavi almamış MG hastalarında periferik Th17 hücre sıklığı ile AChR antikor düzeyi arasında korelasyon olduğu saptanmıştır (15) . Bizim timus dokusundaki çalışmamız, bu bulguları desteklememiştir. MG'li timus dokularının (timoma, FH ve normal timus) her 3 antikor (IL-21R, IL-23, ROR γ) ile boyanmasında boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasında korelasyon saptamadık. Ayrıca AChR antikoru düzeyi ile timus patolojisi arasında da ilişki gözlemedik. Hastalarımızın serum antikor ölçümü ile timektomi arasındaki sürede immüno-supresif tedavi almalarının bu sonuca yol açmış olabileceğide göz ardı edilmemelidir.

Bu çalışma Th17 hücrelerinin timus dokusunda farklı timik patolojilerde çalışılmış olması nedeni ile önemlidir. Ancak hastaların timektomi öncesi immüsupresif tedavi almış olmaları çalışmanın en önemli kısıtlılığıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Her 3 antikor (IL-21R, IL-23R ve ROR γ) ile boyanmada timomalı MG grubunun diğeri 3 gruba (FH, normal timus ve kontrol) kıyasla anlamlı olarak daha az boyandığı görüldü. Bu bulgu Th17 hücrelerinin timoma dokusunda daha az olduğuna işaret etmektedir.
2. FH'li MG hastaları, normal timus histopatolojisine sahip MG hastaları ve kontrol grubu arasındaki ikili karşılaştırmalarda boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir fark saptanmadı.
3. Timomalı MG grubu hastalarının yaş ortalaması 40'ın üzerindedir ve bu grubun timus dokusundaki boyanma azlığı yaşla ilişkili değildir.
4. Timoma alt grubunda IL-21R ile IL-23R ve IL-23R ile ROR γ boyanmaları arasında korelasyon olduğu görüldü. Timoma grubunda gözlenen bu pozitif korelasyon bulgularımızın güvenilirliğini desteklemektedir.
5. Hasta alt gruplarında her 3 antikor ile boyanmada boyanma yoğunluğu ile AChR antikor düzeyi arasında korelasyon görülmedi.
6. Yeni tanı almış MG hastalarında timektomi sırasında elde edilen timus dokusu ile eşzamanlı olarak alınan serumda Th17 hücre veya belirteçlerini karşılaştırmalı olarak incelemek için ileri çalışmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Meriglioli, M.N., Sanders, D.B. (2009) Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol*, 8 (5), 475-490.
2. Schlupe, M., Willcox, N., Vincent, A., Dhoot, G.K., Newsom-Davis, J. (1987) Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study. *Ann Neurol*, 22 (2), 212-222.
3. Morgenthaler, T.I., Brown, L.R., Colby, T.V., Harper, C.M., Jr., Coles, D.T. (1993) Thymoma. *Mayo Clin Proc*, 68 (11), 1110-1123.
4. Strobel, P., Rosenwald, A., Beyersdorf, N., Kerkau, T., Elert, O., Murumagi, A. ve diğerleri. (2004) Selective loss of regulatory T cells in thymomas. *Ann Neurol*, 56 (6), 901-904.
5. Kadota, Y., Okumura, M., Miyoshi, S., Kitagawa-Sakakida, S., Inoue, M., Shiono, H. ve diğerleri. (2000) Altered T cell development in human thymoma is related to impairment of MHC class II transactivator expression induced by interferon-gamma (IFN-gamma). *Clin Exp Immunol*, 121 (1), 59-68.
6. Ouyang, W., Kolls, J.K., Zheng, Y. (2008) The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 28 (4), 454-467.
7. Dong, C. (2008) Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev*, 226, 80-86.
8. Wing, K., Fehervari, Z., Sakaguchi, S. (2006) Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol*, 18 (7), 991-1000.
9. Dong, C. (2008) TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*, 8 (5), 337-348.
10. Pene, J., Chevalier, S., Preisser, L., Venereau, E., Guilleux, M.H., Ghannam, S. ve diğerleri. (2008) Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol*, 180 (11), 7423-7430.
11. Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J. ve diğerleri. (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314 (5804), 1461-1463.

12. Wang, H.B., Shi, F.D., Li, H., van der Meide, P.H., Ljunggren, H.G., Link, H. (2000) Role for interferon-gamma in rat strains with different susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis. *Clin Immunol*, 95 (2), 156-162.
13. Balandina, A., Lecart, S., Dartevelle, P., Saoudi, A., Berrih-Aknin, S. (2005) Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*, 105 (2), 735-741.
14. Luther, C., Poeschel, S., Varga, M., Melms, A., Tolosa, E. (2005) Decreased frequency of intrathymic regulatory T cells in patients with myasthenia-associated thymoma. *J Neuroimmunol*, 164 (1-2), 124-128.
15. Wang, Z., Wang, W., Chen, Y., Wei, D. (2012) T helper type 17 cells expand in patients with myasthenia-associated thymoma. *Scand J Immunol*, 76 (1), 54-61.
16. Hirsch, N.P. (2007) Neuromuscular junction in health and disease. *Br J Anaesth*, 99 (1), 132-138.
17. Amato, A.A., Russell, J.A. (2008). Disorders of Neuromuscular Transmission. *Neuromuscular Disorders* (s. 457-528). United States of America: McGraw-Hill Companies
18. Turner, J.W. (1974) President's address. Myasthenia gravis. *Proc R Soc Med*, 67 (8), 763-769.
19. McGrogan, A., Sneddon, S., de Vries, C.S. (2010) The incidence of myasthenia gravis: a systematic literature review. *Neuroepidemiology*, 34 (3), 171-183.
20. Grob, D., Brunner, N., Namba, T., Pagala, M. (2008) Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 37 (2), 141-149.
21. Pourmand, R. (1997) Myasthenia gravis. *Dis Mon*, 43 (2), 65-109.
22. Drachman, D.B. (1994) Myasthenia gravis. *N Engl J Med*, 330 (25), 1797-1810.
23. Grob, D. (1953) Course and management of myasthenia gravis. *J Am Med Assoc*, 153 (6), 529-532.
24. Rodolico, C., Toscano, A., Autunno, M., Messina, S., Nicolosi, C., Aguenouz, M. ve diğerleri. (2002) Limb-girdle myasthenia: clinical, electrophysiological and morphological features in familial and autoimmune cases. *Neuromuscul Disord*, 12 (10), 964-969.

25. Nations, S.P., Wolfe, G.I., Amato, A.A., Jackson, C.E., Bryan, W.W., Barohn, R.J. (1999) Distal myasthenia gravis. *Neurology*, 52 (3), 632-634.
26. Zhang, X., Yang, M., Xu, J., Zhang, M., Lang, B., Wang, W. ve diğerleri. (2007) Clinical and serological study of myasthenia gravis in HuBei Province, China. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78 (4), 386-390.
27. Chiu, H.C., Vincent, A., Newsom-Davis, J., Hsieh, K.H., Hung, T. (1987) Myasthenia gravis: population differences in disease expression and acetylcholine receptor antibody titers between Chinese and Caucasians. *Neurology*, 37 (12), 1854-1857.
28. Kupersmith, M.J., Latkany, R., Homel, P. (2003) Development of generalized disease at 2 years in patients with ocular myasthenia gravis. *Arch Neurol*, 60 (2), 243-248.
29. Bennett, D.L., Mills, K.R., Riordan-Eva, P., Barnes, P.R., Rose, M.R. (2006) Anti-MuSK antibodies in a case of ocular myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77 (4), 564-565.
30. Caress, J.B., Hunt, C.H., Batish, S.D. (2005) Anti-MuSK myasthenia gravis presenting with purely ocular findings. *Arch Neurol*, 62 (6), 1002-1003.
31. Chan, J.W., Orrison, W.W. (2007) Ocular myasthenia: a rare presentation with MuSK antibody and bilateral extraocular muscle atrophy. *Br J Ophthalmol*, 91 (6), 842-843.
32. Luchanok, U., Kaminski, H.J. (2008) Ocular myasthenia: diagnostic and treatment recommendations and the evidence base. *Curr Opin Neurol*, 21 (1), 8-15.
33. Kaminski, H.J., Li, Z., Richmonds, C., Lin, F., Medof, M.E. (2004) Complement regulators in extraocular muscle and experimental autoimmune myasthenia gravis. *Exp Neurol*, 189 (2), 333-342.
34. Soltys, J., Gong, B., Kaminski, H.J., Zhou, Y., Kusner, L.L. (2008) Extraocular muscle susceptibility to myasthenia gravis: unique immunological environment? *Ann N Y Acad Sci*, 1132, 220-224.
35. Compston, D.A., Vincent, A., Newsom-Davis, J., Batchelor, J.R. (1980) Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain*, 103 (3), 579-601.
36. Christensen, P.B., Jensen, T.S., Tsiropoulos, I., Sorensen, T., Kjaer, M., Hojer-Pedersen, E. ve diğerleri. (1995) Associated autoimmune diseases in myasthenia gravis. A population-based study. *Acta Neurol Scand*, 91 (3), 192-195.

37. Tola, M.R., Caniatti, L.M., Casetta, I., Granieri, E., Conighi, C., Quatralè, R. ve diğerleri. (1994) Immunogenetic heterogeneity and associated autoimmune disorders in myasthenia gravis: a population-based survey in the province of Ferrara, northern Italy. *Acta Neurol Scand*, 90 (5), 318-323.
38. Oosterhuis, H.J. (1989) The natural course of myasthenia gravis: a long term follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 52 (10), 1121-1127.
39. Aarli, J.A. (1999) Late-onset myasthenia gravis: a changing scene. *Arch Neurol*, 56 (1), 25-27.
40. Romi, F., Skeie, G.O., Gilhus, N.E., Aarli, J.A. (2005) Striational antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance. *Arch Neurol*, 62 (3), 442-446.
41. Romi, F., Skeie, G.O., Aarli, J.A., Gilhus, N.E. (2000) The severity of myasthenia gravis correlates with the serum concentration of titin and ryanodine receptor antibodies. *Arch Neurol*, 57 (11), 1596-1600.
42. Romi, F., Aarli, J.A., Gilhus, N.E. (2007) Myasthenia gravis patients with ryanodine receptor antibodies have distinctive clinical features. *Eur J Neurol*, 14 (6), 617-620.
43. Burres, S.A., Crayton, J.W., Gomez, C.M., Richman, D.P. (1981) Myasthenia induced by monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies: clinical and electrophysiological aspects. *Ann Neurol*, 9 (6), 563-568.
44. Patrick, J., Lindstrom, J. (1973) Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science*, 180 (4088), 871-872.
45. Toyka, K.V., Drachman, D.B., Griffin, D.E., Pestronk, A., Winkelstein, J.A., Fishbeck, K.H. ve diğerleri. (1977) Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med*, 296 (3), 125-131.
46. Lennon, V.A., Lambert, E.H. (1980) Myasthenia gravis induced by monoclonal antibodies to acetylcholine receptors. *Nature*, 285 (5762), 238-240.
47. Newsom-Davis, J., Pinching, A.J., Vincent, A., Wilson, S.G. (1978) Function of circulating antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: investigation by plasma exchange. *Neurology*, 28 (3), 266-272.
48. Vincent, A., Willcox, N., Hill, M., Curnow, J., MacLennan, C., Beeson, D. (1998) Determinant spreading and immune responses to

acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Immunol Rev*, 164, 157-168.

49. Protti, M.P., Manfredi, A.A., Straub, C., Howard, J.F., Jr., Conti-Tronconi, B.M. (1990) Immunodominant regions for T helper-cell sensitization on the human nicotinic receptor alpha subunit in myasthenia gravis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (19), 7792-7796.
50. Wang, Z.Y., Okita, D.K., Howard, J., Jr., Conti-Fine, B.M. (1998) T-cell recognition of muscle acetylcholine receptor subunits in generalized and ocular myasthenia gravis. *Neurology*, 50 (4), 1045-1054.
51. Aissaoui, A., Klingel-Schmitt, I., Couderc, J., Chateau, D., Romagne, F., Jambou, F. ve diğerleri. (1999) Prevention of autoimmune attack by targeting specific T-cell receptors in a severe combined immunodeficiency mouse model of myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 46 (4), 559-567.
52. Drachman, D.B., Adams, R.N., Stanley, E.F., Pestronk, A. (1980) Mechanisms of acetylcholine receptor loss in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 43 (7), 601-610.
53. Sahashi, K., Engel, A.G., Linstrom, J.M., Lambert, E.H., Lennon, V.A. (1978) Ultrastructural localization of immune complexes (IgG and C3) at the end-plate in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 37 (2), 212-223.
54. Ruff, R.L., Lennon, V.A. (2008) How myasthenia gravis alters the safety factor for neuromuscular transmission. *J Neuroimmunol*, 201-202, 13-20.
55. Heinemann, S., Bevan, S., Kullberg, R., Lindstrom, J., Rice, J. (1977) Modulation of acetylcholine receptor by antibody against the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (7), 3090-3094.
56. Burges, J., Wray, D.W., Pizzighella, S., Hall, Z., Vincent, A. (1990) A myasthenia gravis plasma immunoglobulin reduces miniature endplate potentials at human endplates in vitro. *Muscle Nerve*, 13 (5), 407-413.
57. Conti-Fine, B.M., Milani, M., Kaminski, H.J. (2006) Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest*, 116 (11), 2843-2854.
58. McConville, J., Farrugia, M.E., Beeson, D., Kishore, U., Metcalfe, R., Newsom-Davis, J. ve diğerleri. (2004) Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 55 (4), 580-584.
59. Valenzuela, D.M., Stitt, T.N., DiStefano, P.S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D.L. ve diğerleri. (1995) Receptor tyrosine kinase specific

- for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*, 15 (3), 573-584.
60. Shiraishi, H., Motomura, M., Yoshimura, T., Fukudome, T., Fukuda, T., Nakao, Y. ve diğerleri. (2005) Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 57 (2), 289-293.
 61. Cole, R.N., Reddel, S.W., Gervasio, O.L., Phillips, W.D. (2008) Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol*, 63 (6), 782-789.
 62. Evoli, A., Tonali, P.A., Padua, L., Monaco, M.L., Scuderi, F., Batocchi, A.P. ve diğerleri. (2003) Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain*, 126 (Pt 10), 2304-2311.
 63. Sanders, D.B., El-Salem, K., Massey, J.M., McConville, J., Vincent, A. (2003) Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology*, 60 (12), 1978-1980.
 64. Sanders, D.B., Juel, V.C. (2008) MuSK-antibody positive myasthenia gravis: questions from the clinic. *J Neuroimmunol*, 201-202, 85-89.
 65. Hatanaka, Y., Hemmi, S., Morgan, M.B., Scheufele, M.L., Claussen, G.C., Wolfe, G.I. ve diğerleri. (2005) Nonresponsiveness to anticholinesterase agents in patients with MuSK-antibody-positive MG. *Neurology*, 65 (9), 1508-1509.
 66. Leite, M.I., Strobel, P., Jones, M., Micklem, K., Moritz, R., Gold, R. ve diğerleri. (2005) Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG. *Ann Neurol*, 57 (3), 444-448.
 67. Leite, M.I., Jacob, S., Viegas, S., Cossins, J., Clover, L., Morgan, B.P. ve diğerleri. (2008) IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain*, 131 (Pt 7), 1940-1952.
 68. Vincent, A., McConville, J., Farrugia, M.E., Newsom-Davis, J. (2004) Seronegative myasthenia gravis. *Semin Neurol*, 24 (1), 125-133.
 69. Mossman, S., Vincent, A., Newsom-Davis, J. (1986) Myasthenia gravis without acetylcholine-receptor antibody: a distinct disease entity. *Lancet*, 1 (8473), 116-119.
 70. Zhang, B., Tzartos, J.S., Belimezi, M., Ragheb, S., Bealmear, B., Lewis, R.A. ve diğerleri. (2012) Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol*, 69 (4), 445-451.

71. Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W.C., Mei, L. (2008) LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron*, 60 (2), 285-297.
72. Kim, N., Stiegler, A.L., Cameron, T.O., Hallock, P.T., Gomez, A.M., Huang, J.H. ve diğerleri. (2008) Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*, 135 (2), 334-342.
73. Koneczny, I., Cossins, J., Waters, P., Beeson, D., Vincent, A. (2013) MuSK Myasthenia Gravis IgG4 Disrupts the Interaction of LRP4 with MuSK but Both IgG4 and IgG1-3 Can Disperse Preformed Agrin-Independent AChR Clusters. *PLoS One*, 8 (11), e80695.
74. Higuchi, O., Hamuro, J., Motomura, M., Yamanashi, Y. (2011) Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 69 (2), 418-422.
75. Pevzner, A., Schoser, B., Peters, K., Cosma, N.C., Karakatsani, A., Schalke, B. ve diğerleri. (2012) Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol*, 259 (3), 427-435.
76. Shen, C., Lu, Y., Zhang, B., Figueiredo, D., Bean, J., Jung, J. ve diğerleri. (2013) Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 123(12), 5190-202
77. Cavalcante, P., Le Panse, R., Berrih-Aknin, S., Maggi, L., Antozzi, C., Baggi, F. ve diğerleri. (2011) The thymus in myasthenia gravis: Site of "innate autoimmunity"? *Muscle Nerve*, 44 (4), 467-484.
78. Lauriola, L., Ranelletti, F., Maggiano, N., Guerriero, M., Punzi, C., Marsili, F. ve diğerleri. (2005) Thymus changes in anti-MuSK-positive and -negative myasthenia gravis. *Neurology*, 64 (3), 536-538.
79. Leite, M.I., Jones, M., Strobel, P., Marx, A., Gold, R., Niks, E. ve diğerleri. (2007) Myasthenia gravis thymus: complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol*, 171 (3), 893-905.
80. Scadding, G.K., Vincent, A., Newsom-Davis, J., Henry, K. (1981) Acetylcholine receptor antibody synthesis by thymic lymphocytes: correlation with thymic histology. *Neurology*, 31 (8), 935-943.
81. Mygland, A., Vincent, A., Newsom-Davis, J., Kaminski, H., Zorzato, F., Agius, M. ve diğerleri. (2000) Autoantibodies in thymoma-associated myasthenia gravis with myositis or neuromyotonia. *Arch Neurol*, 57 (4), 527-531.
82. Scarpino, S., Di Napoli, A., Stoppacciaro, A., Antonelli, M., Pillozzi, E., Chiarle, R. ve diğerleri. (2007) Expression of autoimmune regulator

- gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol*, 149 (3), 504-512.
83. Skeie, G.O., Romi, F. (2008) Paraneoplastic myasthenia gravis: immunological and clinical aspects. *Eur J Neurol*, 15 (10), 1029-1033.
 84. Evoli, A., Minisci, C., Di Schino, C., Marsili, F., Punzi, C., Batocchi, A.P. ve diğerleri. (2002) Thymoma in patients with MG: characteristics and long-term outcome. *Neurology*, 59 (12), 1844-1850.
 85. Romi, F., Gilhus, N.E., Varhaug, J.E., Myking, A., Aarli, J.A. (2003) Disease severity and outcome in thymoma myasthenia gravis: a long-term observation study. *Eur J Neurol*, 10 (6), 701-706.
 86. Bril, V., Kojic, J., Dhanani, A. (1998) The long-term clinical outcome of myasthenia gravis in patients with thymoma. *Neurology*, 51 (4), 1198-1200.
 87. de Perrot, M., Liu, J., Bril, V., McRae, K., Bezjak, A., Keshavjee, S.H. (2002) Prognostic significance of thymomas in patients with myasthenia gravis. *Ann Thorac Surg*, 74 (5), 1658-1662.
 88. Maggi, L., Andretta, F., Antozzi, C., Confalonieri, P., Cornelio, F., Scaioli, V. ve diğerleri. (2008) Two cases of thymoma-associated myasthenia gravis without antibodies to the acetylcholine receptor. *Neuromuscul Disord*, 18 (8), 678-680.
 89. Vernino, S., Lennon, V.A. (2004) Autoantibody profiles and neurological correlations of thymoma. *Clin Cancer Res*, 10 (21), 7270-7275.
 90. Suzuki, S., Satoh, T., Yasuoka, H., Hamaguchi, Y., Tanaka, K., Kawakami, Y. ve diğerleri. (2005) Novel autoantibodies to a voltage-gated potassium channel Kv1.4 in a severe form of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 170 (1-2), 141-149.
 91. Sanders, D.B., Howard, J.F. (2008). Disorders of Neuromuscular Transmission. W. G. Bradley, R. B. Daroff, G. M. Fenichel & J. Jankovic (Ed.). *Neurology in Clinical Practice*, 5th edition (c. 2, s. 2382-2402). Philadelphia, PA: Butterworth Heinemann/Elsevier
 92. Pascuzzi, R.M. (2003) The edrophonium test. *Semin Neurol*, 23 (1), 83-88.
 93. Ing, E.B., Ing, S.Y., Ing, T., Ramocki, J.A. (2000) The complication rate of edrophonium testing for suspected myasthenia gravis. *Can J Ophthalmol*, 35 (3), 141-144; discussion 145.

94. Ertas, M., Arac, N., Kumral, K., Tuncbay, T. (1994) Ice test as a simple diagnostic aid for myasthenia gravis. *Acta Neurol Scand*, 89 (3), 227-229.
95. Meriggioli, M.N., Sanders, D.B. (2005) Advances in the diagnosis of neuromuscular junction disorders. *Am J Phys Med Rehabil*, 84 (8), 627-638.
96. Katarji, B. (2008). *Clinical Electrophysiology-Clinical Electromyography*. W. G. Bradley, R. B. Daroff, F. G.M & J. J. (Ed.). *Neurology in Clinical Practice*, 5th edition (c. 1, s. 507-508). Philadelphia, PA: Butterworth Heinemann/Elsevier
97. Sanders, D.B., Howard, J.F., Jr., Johns, T.R. (1979) Single-fiber electromyography in myasthenia gravis. *Neurology*, 29 (1), 68-76.
98. Oh, S.J., Kim, D.E., Kuruoglu, R., Bradley, R.J., Dwyer, D. (1992) Diagnostic sensitivity of the laboratory tests in myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 15 (6), 720-724.
99. Lindstrom, J.M., Seybold, M.E., Lennon, V.A., Whittingham, S., Duane, D.D. (1976) Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*, 26 (11), 1054-1059.
100. Vincent, A., Newsom-Davis, J. (1985) Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 48 (12), 1246-1252.
101. Chan, K.H., Lachance, D.H., Harper, C.M., Lennon, V.A. (2007) Frequency of seronegativity in adult-acquired generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 36 (5), 651-658.
102. Cikes, N., Momoi, M.Y., Williams, C.L., Howard, F.M., Jr., Hoagland, H.C., Whittingham, S. ve diğeri. (1988) Striational autoantibodies: quantitative detection by enzyme immunoassay in myasthenia gravis, thymoma, and recipients of D-penicillamine or allogeneic bone marrow. *Mayo Clin Proc*, 63 (5), 474-481.
103. Buckley, C., Newsom-Davis, J., Willcox, N., Vincent, A. (2001) Do titin and cytokine antibodies in MG patients predict thymoma or thymoma recurrence? *Neurology*, 57 (9), 1579-1582.
104. Jacob, S., Viegas, S., Leite, M.I., Webster, R., Cossins, J., Kennett, R. ve diğeri. (2012) Presence and pathogenic relevance of antibodies to clustered acetylcholine receptor in ocular and generalized myasthenia gravis. *Arch Neurol*, 69 (8), 994-1001.

105. Nicolaou, S., Muller, N.L., Li, D.K., Oger, J.J. (1996) Thymus in myasthenia gravis: comparison of CT and pathologic findings and clinical outcome after thymectomy. *Radiology*, 201 (2), 471-474.
106. Sanders, D.B., Scoppetta, C. (1994) The treatment of patients with myasthenia gravis. *Neurol Clin*, 12 (2), 343-368.
107. Richman, D.P., Agius, M.A. (1994) Myasthenia gravis: pathogenesis and treatment. *Semin Neurol*, 14 (2), 106-110.
108. Shin, J.O. (2011). Treatment and Management of Disorders of the Neuromuscular Junction. T. E. Bertorini (Ed.). *Neuromuscular Disorders: Treatment and Management* (s. 307-342). Philadelphia, PA: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
109. Lanska, D.J. (1990) Indications for thymectomy in myasthenia gravis. *Neurology*, 40 (12), 1828-1829.
110. Keeseey, J. (2008). The most vulnerable synapse: historic aspects of neuromuscular junction disorders. A. G. Engel (Ed.). *Handbook of Clinical Neurology, Neuromuscular Junction Disorders* (c. 91, s. 1-25): Elsevier
111. Urschel, J.D., Grewal, R.P. (1998) Thymectomy for myasthenia gravis. *Postgrad Med J*, 74 (869), 139-144.
112. Lavrnic, D., Losen, M., Vujic, A., De Baets, M., Hajdukovic, L.J., Stojanovic, V. ve diğeri. (2005) The features of myasthenia gravis with autoantibodies to MuSK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76 (8), 1099-1102.
113. Phillips, L.H. (2004) The epidemiology of myasthenia gravis. *Semin Neurol*, 24 (1), 17-20.
114. Kuks, J.B.M., Oosterhuis, H.J.G. (2003). Clinical presentation and epidemiology of myasthenia gravis. H. J. Kaminski (Ed.). *Current clinical neurology: myasthenia gravis and related disorders* (c. 3, s. 93-114). Totova, NJ: Humana Press Inc
115. Rabinstein, A.A., Mueller-Kronast, N. (2005) Risk of extubation failure in patients with myasthenic crisis. *Neurocrit Care*, 3 (3), 213-215.
116. O'Riordan, J.I., Miller, D.H., Mottershead, J.P., Hirsch, N.P., Howard, R.S. (1998) The management and outcome of patients with myasthenia gravis treated acutely in a neurological intensive care unit. *Eur J Neurol*, 5 (2), 137-142.
117. Thomas, C.E., Mayer, S.A., Gungor, Y., Swarup, R., Webster, E.A., Chang, I. ve diğeri. (1997) Myasthenic crisis: clinical features,

- mortality, complications, and risk factors for prolonged intubation. *Neurology*, 48 (5), 1253-1260.
118. Jani-Acsadi, A., Lisak, R.P. (2007) Myasthenic crisis: guidelines for prevention and treatment. *J Neurol Sci*, 261 (1-2), 127-133.
 119. Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2003). *The immune system and lymphoid organs. Basic histology, text and atlas*, 10th edition (s. 265-290). New York: McGraw-Hill Companies
 120. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2010). *Cells and tissues of the adaptive immune system. Cellular and molecular immunology*, 6th edition (s. 47-71). Philadelphia, PA: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
 121. Onodera, H. (2005) The role of the thymus in the pathogenesis of myasthenia gravis. *Tohoku J Exp Med*, 207 (2), 87-98.
 122. Berrih-Aknin, S., Le Panse, R. (2014) Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*.
 123. Cavalcante, P., Serafini, B., Rosicarelli, B., Maggi, L., Barberis, M., Antozzi, C. ve diğerleri. (2010) Epstein-Barr virus persistence and reactivation in myasthenia gravis thymus. *Ann Neurol*, 67 (6), 726-738.
 124. Zuckerman, N.S., Howard, W.A., Bismuth, J., Gibson, K., Edelman, H., Berrih-Aknin, S. ve diğerleri. (2010) Ectopic GC in the thymus of myasthenia gravis patients show characteristics of normal GC. *Eur J Immunol*, 40 (4), 1150-1161.
 125. Wekerle, H., Ketelsen, U.P. (1977) Intrathymic pathogenesis and dual genetic control of myasthenia gravis. *Lancet*, 1 (8013), 678-680.
 126. Wakkach, A., Poëa, S., Chastre, E., Gespach, C., Lecerf, F., De La Porte, S. ve diğerleri. (1999) Establishment of a human thymic myoid cell line. Phenotypic and functional characteristics. *Am J Pathol*, 155 (4), 1229-1240.
 127. Berrih-Aknin, S., Ruhlmann, N., Bismuth, J., Cizeron-Clairac, G., Zelman, E., Shachar, I. ve diğerleri. (2009) CCL21 overexpressed on lymphatic vessels drives thymic hyperplasia in myasthenia. *Ann Neurol*, 66 (4), 521-531.
 128. Weiss, J.M., Cufi, P., Le Panse, R., Berrih-Aknin, S. (2013) The thymus in autoimmune Myasthenia Gravis: Paradigm for a tertiary lymphoid organ. *Rev Neurol (Paris)*, 169 (8-9), 640-649.
 129. Cizeron-Clairac, G., Le Panse, R., Frenkian-Cuvelier, M., Meraouna, A., Truffault, F., Bismuth, J. ve diğerleri. (2008) Thymus and

Myasthenia Gravis: what can we learn from DNA microarrays? *J Neuroimmunol*, 201-202, 57-63.

130. Weiss, J.M., Cufi, P., Bismuth, J., Eymard, B., Fadel, E., Berrih-Aknin, S. ve diğerleri. (2013) SDF-1/CXCL12 recruits B cells and antigen-presenting cells to the thymus of autoimmune myasthenia gravis patients. *Immunobiology*, 218 (3), 373-381.
131. Le Panse, R., Bismuth, J., Cizeron-Clairac, G., Weiss, J.M., Cufi, P., Dartevielle, P. ve diğerleri. (2010) Thymic remodeling associated with hyperplasia in myasthenia gravis. *Autoimmunity*, 43 (5-6), 401-412.
132. Okumura, M., Fujii, Y., Shiono, H., Inoue, M., Minami, M., Utsumi, T. ve diğerleri. (2008) Immunological function of thymoma and pathogenesis of paraneoplastic myasthenia gravis. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 56 (4), 143-150.
133. Rosai, J., Sobin, L.H. (1999). World Health Organization. International histological classification of tumors. Histological typing of tumors of the thymus, 2nd edition (s. 9-14). New York: Springer
134. Maggi, L., Andretta, F., Antozzi, C., Baggi, F., Bernasconi, P., Cavalcante, P. ve diğerleri. (2008) Thymoma-associated myasthenia gravis: outcome, clinical and pathological correlations in 197 patients on a 20-year experience. *J Neuroimmunol*, 201-202, 237-244.
135. Strobel, P., Bauer, A., Puppe, B., Kraushaar, T., Krein, A., Toyka, K. ve diğerleri. (2004) Tumor recurrence and survival in patients treated for thymomas and thymic squamous cell carcinomas: a retrospective analysis. *J Clin Oncol*, 22 (8), 1501-1509.
136. Filosso, P.L., Galassi, C., Ruffini, E., Margaritora, S., Bertolaccini, L., Casadio, C. ve diğerleri. (2013) Thymoma and the increased risk of developing extrathymic malignancies: a multicentre study. *Eur J Cardiothorac Surg*, 44 (2), 219-224; discussion 224.
137. Marx, A., Pfister, F., Schalke, B., Saruhan-Direskeneli, G., Melms, A., Strobel, P. (2013) The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmun Rev*, 12 (9), 875-884.
138. Meager, A., Wadhwa, M., Dilger, P., Bird, C., Thorpe, R., Newsom-Davis, J. ve diğerleri. (2003) Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol*, 132 (1), 128-136.

139. Müller-Hermelink, H.K., Marx, A., Geuder, K.I., Kirchner, T. (1996). Thymus. I. Damjanov & J. Linder (Ed.). *Anderson's pathology* (c. 1, s. 1218-1243). St. Louis, MO: Mosby
140. Wakkach, A., Guyon, T., Bruand, C., Tzartos, S., Cohen-Kaminsky, S., Berrih-Aknin, S. (1996) Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. *J Immunol*, 157 (8), 3752-3760.
141. Roxanis, I., Micklem, K., McConville, J., Newsom-Davis, J., Willcox, N. (2002) Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis. *J Neuroimmunol*, 125 (1-2), 185-197.
142. Melms, A., Schalke, B.C., Kirchner, T., Müller-Hermelink, H.K., Albert, E., Wekerle, H. (1988) Thymus in myasthenia gravis. Isolation of T-lymphocyte lines specific for the nicotinic acetylcholine receptor from thymuses of myasthenic patients. *J Clin Invest*, 81 (3), 902-908.
143. Sommer, N., Willcox, N., Harcourt, G.C., Newsom-Davis, J. (1990) Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor-reactive T cells. *Ann Neurol*, 28 (3), 312-319.
144. Hill, M.E., Shiono, H., Newsom-Davis, J., Willcox, N. (2008) The myasthenia gravis thymus: a rare source of human autoantibody-secreting plasma cells for testing potential therapeutics. *J Neuroimmunol*, 201-202, 50-56.
145. Mesnard-Rouiller, L., Bismuth, J., Wakkach, A., Poëa-Guyon, S., Berrih-Aknin, S. (2004) Thymic myoid cells express high levels of muscle genes. *J Neuroimmunol*, 148 (1-2), 97-105.
146. Kirchner, T., Hoppe, F., Schalke, B., Müller-Hermelink, H.K. (1988) Microenvironment of thymic myoid cells in myasthenia gravis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 54 (5), 295-302.
147. Villadangos, J.A., Heath, W.R., Carbone, F.R. (2007) Outside looking in: the inner workings of the cross-presentation pathway within dendritic cells. *Trends Immunol*, 28 (2), 45-47.
148. Rosai, J., Levine, G.D. (1976). Tumors of the thymus. *Atlas of tumor pathology, series II. Fascicle 13* (s. 34–161). Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology
149. Maclennan, C.A., Vincent, A., Marx, A., Willcox, N., Gilhus, N.E., Newsom-Davis, J. ve diğerleri. (2008) Preferential expression of AChR epsilon-subunit in thymomas from patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 201-202, 28-32.

150. Poea-Guyon, S., Christadoss, P., Le Panse, R., Guyon, T., De Baets, M., Wakkach, A. ve diğerleri. (2005) Effects of cytokines on acetylcholine receptor expression: implications for myasthenia gravis. *J Immunol*, 174 (10), 5941-5949.
151. Sommer, N., Harcourt, G.C., Willcox, N., Beeson, D., Newsom-Davis, J. (1991) Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients. *Neurology*, 41 (8), 1270-1276.
152. Moidola, L., Karachunski, P., Protti, M.P., Howard, J.F., Jr., Conti-Tronconi, B.M. (1994) Epitopes on the beta subunit of human muscle acetylcholine receptor recognized by CD4+ cells of myasthenia gravis patients and healthy subjects. *J Clin Invest*, 93 (3), 1020-1028.
153. Hohlfeld, R., Kalies, I., Kohleisen, B., Heininger, K., Conti-Tronconi, B., Toyka, K.V. (1986) Myasthenia gravis: stimulation of antireceptor autoantibodies by autoreactive T cell lines. *Neurology*, 36 (5), 618-621.
154. Ahlberg, R., Yi, Q., Pirskanen, R., Matell, G., Swerup, C., Rieber, E.P. ve diğerleri. (1994) Treatment of myasthenia gravis with anti-CD4 antibody: improvement correlates to decreased T-cell autoreactivity. *Neurology*, 44 (9), 1732-1737.
155. Sisely, A., Lisak, R.P., Brenner, T. (1989) Proliferative response of blood cells of patients with myasthenia gravis to purified mammalian acetylcholine receptor. *Pathol Immunopathol Res*, 8 (2), 113-117.
156. Ragheb, S., Mohamed, M., Lisak, R.P. (2005) Myasthenia gravis patients, but not healthy subjects, recognize epitopes that are unique to the epsilon-subunit of the acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol*, 159 (1-2), 137-145.
157. Aloisi, F., Pujol-Borrell, R. (2006) Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*, 6 (3), 205-217.
158. Humby, F., Bombardieri, M., Manzo, A., Kelly, S., Blades, M.C., Kirkham, B. ve diğerleri. (2009) Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med*, 6 (1), e1.
159. Armengol, M.P., Juan, M., Lucas-Martin, A., Fernandez-Figueras, M.T., Jaraquemada, D., Gallart, T. ve diğerleri. (2001) Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol*, 159 (3), 861-873.

160. Vincent, A., Scadding, G.K., Thomas, H.C., Newsom-Davis, J. (1978) In-vitro synthesis of anti-acetylcholine-receptor antibody by thymic lymphocytes in myasthenia gravis. *Lancet*, 1 (8059), 305-307.
161. Fujii, Y., Hashimoto, J., Monden, Y., Ito, T., Nakahara, K., Kawashima, Y. (1986) Specific activation of lymphocytes against acetylcholine receptor in the thymus in myasthenia gravis. *J Immunol*, 136 (3), 887-891.
162. Safar, D., Berrih-Aknin, S., Morel, E. (1987) In vitro anti-acetylcholine receptor antibody synthesis by myasthenia gravis patient lymphocytes: correlations with thymic histology and thymic epithelial-cell interactions. *J Clin Immunol*, 7 (3), 225-234.
163. Leprince, C., Cohen-Kaminsky, S., Berrih-Aknin, S., Vernet-Der Garabedian, B., Treton, D., Galanaud, P. ve diğerleri. (1990) Thymic B cells from myasthenia gravis patients are activated B cells. Phenotypic and functional analysis. *J Immunol*, 145 (7), 2115-2122.
164. Yates, A., Bergmann, C., Van Hemmen, J.L., Stark, J., Callard, R. (2000) Cytokine-modulated regulation of helper T cell populations. *J Theor Biol*, 206 (4), 539-560.
165. Maniati, E., Soper, R., Hagemann, T. (2010) Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene*, 29 (42), 5653-5662.
166. Saoudi, A., Bernard, I., Hoedemaekers, A., Cautain, B., Martinez, K., Druet, P. ve diğerleri. (1999) Experimental autoimmune myasthenia gravis may occur in the context of a polarized Th1- or Th2-type immune response in rats. *J Immunol*, 162 (12), 7189-7197.
167. Wang, Z.Y., Karachunski, P.I., Howard, J.F., Jr., Conti-Fine, B.M. (1999) Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: role of CD4+ and CD8+ cells. *Neurology*, 52 (3), 484-497.
168. Hohlfeld, R., Engel, A.G. (1990) Induction of HLA-DR expression on human myoblasts with interferon-gamma. *Am J Pathol*, 136 (3), 503-508.
169. Tzartos, S.J., Lindstrom, J.M. (1980) Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77 (2), 755-759.
170. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M. ve diğerleri. (2006) Reciprocal developmental pathways for the

- generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441 (7090), 235-238.
171. Aricha, R., Mizrachi, K., Fuchs, S., Souroujon, M.C. (2011) Blocking of IL-6 suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun*, 36 (2), 135-141.
 172. Masuda, M., Matsumoto, M., Tanaka, S., Nakajima, K., Yamada, N., Ido, N. ve diğerleri. (2010) Clinical implication of peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol*, 225 (1-2), 123-131.
 173. Sun, Y., Qiao, J., Lu, C.Z., Zhao, C.B., Zhu, X.M., Xiao, B.G. (2004) Increase of circulating CD4+CD25+ T cells in myasthenia gravis patients with stability and thymectomy. *Clin Immunol*, 112 (3), 284-289.
 174. Dalakas, M.C. (2013) Novel future therapeutic options in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*, 12 (9), 936-941.
 175. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B. (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24 (2), 179-189.
 176. Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O. ve diğerleri. (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441 (7090), 231-234.
 177. Esendagli, G., Kurne, A.T., Sayat, G., Kilic, A.K., Guc, D., Karabudak, R. (2013) Evaluation of Th17-related cytokines and receptors in multiple sclerosis patients under interferon beta-1 therapy. *J Neuroimmunol*, 255 (1-2), 81-84.
 178. Mu, L., Sun, B., Kong, Q., Wang, J., Wang, G., Zhang, S. ve diğerleri. (2009) Disequilibrium of T helper type 1, 2 and 17 cells and regulatory T cells during the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Immunology*, 128 (1 Suppl), e826-836.
 179. Roche, J.C., Capablo, J.L., Larrad, L., Gervas-Arruga, J., Ara, J.R., Sanchez, A. ve diğerleri. (2011) Increased serum interleukin-17 levels in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 44 (2), 278-280.
 180. Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B. ve diğerleri. (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 448 (7152), 484-487.

181. Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L. ve diğerleri. (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448 (7152), 480-483.
182. Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T. ve diğerleri. (2007) IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, 8 (9), 967-974.
183. Hunter, C.A. (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol*, 5 (7), 521-531.
184. Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D. ve diğerleri. (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201 (2), 233-240.
185. Bettelli, E., Kuchroo, V.K. (2005) IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med*, 201 (2), 169-171.
186. Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S. ve diğerleri. (2007) STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*, 282 (13), 9358-9363.
187. Hirose, T., Smith, R.J., Jetten, A.M. (1994) ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 205 (3), 1976-1983.
188. He, Y.W., Deftos, M.L., Ojala, E.W., Bevan, M.J. (1998) RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity*, 9 (6), 797-806.
189. Villey, I., de Chasseval, R., de Villartay, J.P. (1999) RORgammaT, a thymus-specific isoform of the orphan nuclear receptor RORgamma / TOR, is up-regulated by signaling through the pre-T cell receptor and binds to the TEA promoter. *Eur J Immunol*, 29 (12), 4072-4080.
190. Eberl, G., Littman, D.R. (2003) The role of the nuclear hormone receptor RORgamma t in the development of lymph nodes and Peyer's patches. *Immunol Rev*, 195, 81-90.
191. Medvedev, A., Chistokhina, A., Hirose, T., Jetten, A.M. (1997) Genomic structure and chromosomal mapping of the nuclear orphan receptor ROR gamma (RORC) gene. *Genomics*, 46 (1), 93-102.
192. Medvedev, A., Yan, Z.H., Hirose, T., Giguere, V., Jetten, A.M. (1996) Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR

- gamma and characterization of its response element. *Gene*, 181 (1-2), 199-206.
193. Ortiz, M.A., Piedrafita, F.J., Pfahl, M., Maki, R. (1995) TOR: a new orphan receptor expressed in the thymus that can modulate retinoid and thyroid hormone signals. *Mol Endocrinol*, 9 (12), 1679-1691.
 194. Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M.J., Rennert, P.D., Choi, Y., Littman, D.R. (2004) An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol*, 5 (1), 64-73.
 195. Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y.R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S. ve diğ erleri. (2000) Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science*, 288 (5475), 2369-2373.
 196. Eberl, G., Littman, D.R. (2004) Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells. *Science*, 305 (5681), 248-251.
 197. Romagnani, S. (2008) Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther*, 10 (2), 206.
 198. Fattorossi, A., Battaglia, A., Buzzonetti, A., Minicuci, G., Riso, R., Peri, L. ve diğ erleri. (2008) Thymopoiesis, regulatory T cells, and TCRVbeta expression in thymoma with and without myasthenia gravis, and modulatory effects of steroid therapy. *J Clin Immunol*, 28 (2), 194-206.
 199. Tan, Z.Y., Bealgey, K.W., Fang, Y., Gong, Y.M., Bao, S. (2009) Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol*, 41 (4), 733-735.