

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**MYASTHENİA GRAVİS’Lİ HASTALARIN
TİMUS DOKULARINDA *TRAIL* LİGAND VE
RESEPTÖRLERİNİN VE ANTİAPOPTOTİK
NFκB MOLEKÜLÜNÜN EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İrem KANATLI AYDENİZ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2014

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**MYASTHENİA GRAVİS’Lİ HASTALARIN
TİMUS DOKULARINDA *TRAIL* LİGAND VE
RESEPTÖRLERİNİN VE ANTİAPOPTOTİK
NFκB MOLEKÜLÜNÜN EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İrem KANATLI AYDENİZ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç.Dr.Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2012.02.0122.015)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma, j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Tıbbi Genetik programında y¼ksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 28 / 01 /2014

Tez Danışmanı: **Doç.Dr. Ahter Dilşad şANLIOğLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ye **:** **Prof.Dr. Hilmi UYSAL**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fak¼ltesi
N¼roloji Anabilim Dalı

ye **:** **Prof.Dr. Bahar AKKAYA**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fak¼ltesi
Patoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından
uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun / / 2014 tarih ve /
sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. İsmail ÜST¼NEL
Enstit¼ M¼d¼r¼

ÖZET

Myasthenia Gravis (MG), farklı timus anomalilerinin eşlik ettiği, heterojen yapıda bir nöromusküler hastalıktır. MG hastalarının yaklaşık %40-70'inde timusun foliküler hiperplazisi, %10-15'inde ise timoma gözlenir. Timusta özellikle timositlerin negatif seçilimindeki olası rolü araştırılan TNF süper ailesi üyelerinden biri, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand'tır (TRAIL). Bu konudaki çalışmalar, TRAIL'ın bu süreçte regülatör rol üstleniyor olabileceğine işaret etmektedir, ancak TRAIL'ın MG gelişimindeki olası rolü henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır. TRAIL'ın farklı dokularda, ve hastalıkların farklı gelişim aşamalarında üstlendiği fonksiyonların gerçekleşebilmesinde, hem kendisinin hem de reseptörlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin önemli olduğu bilinmektedir. Buradan yola çıkarak, çalışmamızda, timik hiperplazili 22 ve timomalı 5 MG hastasına ait timus dokularında, ve 10 normal timus dokusunda TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon düzeyleri, ve TRAIL'ın apoptotik etkisini bloke edebildiği bilinen antiapoptotik NFkB molekülünün aktivasyon düzeyleri araştırıldı. Bunun yanında, her üç doku tipindeki apoptotik hücre oranları belirlendi ve TRAIL ekspresyon oranları ile korelasyonları araştırıldı.

Sonuçlarımız, timoma dokusunda DR4, DR5 ve DcR2 reseptörlerinin, timik hiperplazi dokusunda ise DR5 reseptörünün sentez seviyelerinin normal timus dokusuna oranla anlamlı oranda yüksek olduğunu göstermiştir. Timik hiperplazi, timoma ve normal timus dokuları arasında TRAIL ekspresyonu açısından ise anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bunun yanında, anomalili ya da normal timus dokusunda NFkB'nin aktif formuna rastlanmamıştır.

Bulgularımız, TRAIL'ın normal timustaki ve MG'de gözlenen anomalili timus dokularındaki muhtemel rolüne yönelik olarak, ve TRAIL aracılı timektominin uygulanabilirliği açısından değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: TRAIL, Myasthenia Gravis, NFkB, Timus, Timik Hiperplazi, Timoma

ABSTRACT

Myasthenia Gravis (MG) is a heterogeneous autoimmune neuromuscular disease, accompanied by different thymic abnormalities. Approximately 40-70% of the MG patients display follicular thymic hyperplasia, while 10-15% of the cases have thymoma. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) is one of the many TNF family members investigated for a possible role in the negative selection of thymocytes in thymus. Related studies point out for a regulator role of TRAIL throughout this process. Yet the results are controversial, and the putative role of TRAIL in development of MG is yet to be clarified. It is well known that alterations in the expression levels of TRAIL ligand and its receptors is significant, in terms of different roles exerted by TRAIL in different tissues and at different times in progression of various diseases. Thus, we investigated the expression levels of TRAIL ligand and receptors in 22 MG patients with thymoma, 5 MG patients with thymic hyperplasia, and in 10 normal thymic tissue samples. Furthermore, activation levels of the antiapoptotic NFkB molecule, which can inhibit the apoptotic effects of TRAIL were examined. In addition, the apoptotic cell counts in all three types of tissues were detected, and their correlations with TRAIL expression levels were investigated.

Our results revealed that expression levels of DR4, DR5, and DcR2 receptors were significantly higher in thymoma, while thymic hyperplasia displayed an increased level of DR5 expression. On the other hand, there was no statistically significant difference between the expression levels of TRAIL in thymoma, thymic hyperplasia, or normal thymic tissues. Furthermore, analysis targeting active forms of NFkB revealed no active NFkB levels in abnormal or normal thymic tissues.

Our results were evaluated in terms of TRAIL's putative role in normal thymus and thymic anomalies, and in terms of applicability of a possible TRAIL-mediated thymectomy.

Key Words: TRAIL, Myasthenia Gravis, NFkB, Thymus, Thymic Hyperplasia, Thymoma

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca danışmanlığımı yapan, çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın danışman hocam Doç.Dr. Ahter D. ŞANLIOĞLU'na,

Çalışmamın çeşitli aşamalarında yardımlarını gördüğüm Sayın Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na, Gen ve Hücre Tedavi Merkezi'nde bulunan çok sevdiğim çalışma arkadaşlarıma ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tez çalışmama katkılarından dolayı Prof.Dr. Hilmi UYSAL ve Prof.Dr. Bahar AKKAYA hocalarıma, yine tez savunma jürimde bulunan Prof.Dr. Babur DORA ve Prof.Dr. Özgül ALPER hocalarıma,

Tez çalışmam ile ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi, manevi hiçbir desteğini esirgemeyen babam Lütfü Murat KANATLI'ya, annem Emel KANATLI'ya ve kardeşim Kaan KANATLI'ya, ve verdiği destek ve göstermiş olduğu sabır için eşim Mehmet AYDENİZ'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2 Myasthenia Gravis	2
2.1. Genel Tanım	2
2.1.2. Tarihçe	3
2.1.3. Patofizyolojisi	4
2.1.4. Genetik Temeli	6
2.1.4. Tedavisi	7
2.2. Timus	7
2.2.1. Timusun Genel Yapısı	7
2.2.2. Timusun Fonksiyonu	8
2.2.3. Timusta Yaşa Bağlı Değişimler	9
2.2.4. Timik Patolojiler	10
2.2.4.1. Kistler	10
2.2.4.2. Hiperplazi	11
2.2.4.3. Neoplazmlar	11
2.3. TRAIL	12
2.3.1. Genel Özellikleri	12
2.3.2. TRAIL'ın Timusla İlişkisi	14
2.3.3. NFkB	14
2.3.4. NFkB'nin TRAIL Dirençliliği ile İlişkisi	15
MATERYAL VE METOD	17
3.1. Hasta Materyalleri	17
3.2. TRAIL Ligand ve Reseptör Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi	18
3.3. TRAIL Ligand ve Reseptör Boyamalarının Analizi	20
3.4. Aktif NFkB Oranlarının İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi	20

3.5.	Aktif NFkB Boyamalarının Analizi	21
3.6.	Apoptotik Hücre Oranlarının Belirlenmesi için TUNEL Uygulaması	21
3.7.	TUNEL Boyamalarının Analizi	22
3.8.	İstatistiksel Analiz	22
BULGULAR		23
4.1.	Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon oranları belirlendi.	23
4.2.	DR4 ölüm reseptörünün timomada normal timus dokusuna kıyasla anlamlı oranda yüksek ifade edildiği gözlemlendi.	24
4.3.	DR5 ölüm reseptörünün, timik hiperplazi ve timoma dokularında normal timus dokusuna göre anlamlı oranda fazla ifade edildiği gözlemlendi.	26
4.4.	Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında DcR1 reseptörünün sentez seviyesi açısından anlamlı fark gözlenmedi.	27
4.5.	DcR2 yalancı reseptör ekspresyonunun, timomada normal timus dokusuna oranla daha yüksek oranda ifade edildiği gözlemlendi.	28
4.6.	Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokuları arasında TRAIL ekspresyonu açısından anlamlı farklılık gözlenmedi.	29
4.7.	Timik hiperplazi ve timoma dokularında NFkB molekülünün fosforillenmiş aktif formuna rastlanmadı.	30
4.8.	MG hastalarının timus dokularındaki apoptotik indeks, kontrol timus dokularına oranla daha yüksek bulundu.	31
4.9.	Normal timus dokusundaki TRAIL ligand ekspresyon oranları, apoptotik hücre oranları ile korelasyon gösterdi.	33
TARTIŞMA		34
SONUÇ		38
KAYNAKLAR		39
ÖZGEÇMİŞ		43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AchE	:	Acetylcholinesterase
AChR	:	Acetylcholine Receptor
bcl-2	:	B-cell lymphoma 2
CD	:	Cluster of Differentiation
cIAP	:	Cellular Inhibitor of Apoptosis
CTLA4	:	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DcR	:	Decoy Receptor
DR	:	Death Receptor
FADD	:	Fas-Associated Death Domain
Fas-L	:	Fas Ligand
FCGR	:	Fc Gamma Receptor
FLICE	:	FADD-like Interleukin-1 Beta-Converting Enzyme
FLIP	:	Cellular FLICE Inhibitory Protein
HLA	:	Human Leukocyte Antigen
IgG	:	Immunoglobulin G
IκB	:	I kappa B
IKK	:	IκB Kinase
IL	:	Interleukin
MG	:	Myasthenia Gravis
MHC	:	Major Histocompatibility Complex
MuSK	:	Muscle-Specific Kinase
NFκB	:	Nuclear Factor κB
Nur-77	:	Nuclear Orphan Receptor
OPG	:	Osteoprotegerin
RyR	:	Ryanodine Receptor
TNF	:	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	:	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
5AzC	:	5-Azacytidine

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Opechancanough	3
2.2.	Sinir-kas kavşağının komponentleri	5
2.3.	Timusun histolojik görünümü	8
2.4.	Timusta yaşa bağlı değişimler	10
2.5.	Multilokular timik kist	10
2.6.	Timik hiperplazi	11
2.7.	WHO sınıflandırmasına göre farklı timoma tiplerinin histolojik görüntüleri	12
2.8.	TRAIL'ın bağlanabildiği 5 farklı reseptör	13
2.9.	TRAIL'ın indüklediği sinyal yolları	14
2.10.	NFkB aktivasyon ve inhibisyon yolları	16
3.1.	Hasta ve kontrol bireylere ait yaş aralıklarının grafik halinde gösterimi	18
4.1.	Normal timus dokusunda TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri	23
4.2.	Timik hiperplazi dokusunda TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri	24
4.3.	Timoma dokusunda TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri	24
4.4.	Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında DR4 ekspresyonları	25
4.5.	Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında DR5 ekspresyonları	26
4.6.	Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında DcR1 ekspresyonları	27
4.7.	Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında DcR2 ekspresyonları	28

4.8.	Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında TRAIL ligand ekspresyonları	29
4.9.	Pozitif kontrol olarak meme dokusunda NFkB ekspresyonunun gösterilmesi	30
4.10.	Farklı dokulardaki NFkB boyamalarının sonuçları	30
4.11.	Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularındaki apoptotik hücrelerin gösterilmesi.	31
4.12.	Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında apoptotik hücre oranlarının grafik şeklinde gösterimi	32

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
3.1.	Çalışmada timus dokuları kullanılan hasta gruplarına ait bilgiler	17
3.2.	Çalışmada timus dokuları kullanılan kontrol bireylere ait bilgiler	18
4.1.	Dokulardaki DR4 ekspresyonunun istatistiksel değerlendirmesi	25
4.2.	Dokulardaki DR5 ifade seviyelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	26
4.3.	Dokulardaki DcR1 ekspresyon oranlarının istatistiksel değerlendirmesi	27
4.4.	Dokulardaki DcR2 ekspresyon oranlarının istatistiksel açıdan karşılaştırılması	28
4.5.	Dokulardaki TRAIL ekspresyon oranlarının istatistiksel yöntemlerle karşılaştırılması	29
4.6.	Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında apoptotik hücre oranlarının gösterilmesi	32
4.7.	Apoptotik hücre oranlarının TRAIL ekspresyon oranları ile korelasyon dereceleri	33

GİRİŞ VE AMAÇ

Timusun MG gelişiminde oynadığı rol henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, timus yüzeyindeki myoid hücrelerde AChR ekspresyonunun varlığı, MG'li hastalarda timus anomalilerinin önemli oranda gözlenmesi, ve MG hastalarının önemli bir kısmında timektomi sonrası semptomların gerilemesi, MG ile timus arasında önemli bir ilişki olduğuna dair güçlü kanıtlar oluşturmaktadır. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand'ın (TRAIL) timositlerin negatif seleksiyonunda rol aldığına dair çelişkili bulgular mevcuttur. Bunun yanında, TRAIL'ın timositlerin negatif seleksiyon sürecinde direk görevli olmayabileceği, ancak timosit sayısının regülasyonunda önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir. Dolayısıyla TRAIL'ın hem timus biyolojisinde hem de MG gelişiminde rolü olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, TRAIL ligand ve reseptörlerinin normal timusta ve MG ile ilişkili anomalili timus dokusundaki olası farklı ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, bu bulguların aynı dokulardaki apoptotik hücre oranları ile ilişkilendirilmesi, ve bu yolla TRAIL'ın MG gelişim sürecinde ve farklı timus yapılarının ortaya çıkmasında üstlenmiş olabileceği rol konusunda bilgi edinilmesi amaçlandı. Bunun yanısıra, bugün MG tedavisinde sıklıkla kullanılan cerrahi timektomiye alternatif olabilecek “TRAIL aracılı medikal timektomi” yaklaşımının uygulanabilirliğinin araştırılmasında gerekli ön bilginin edinilmesi amaçlandı. Bu amaçla, timik hiperplazili veya timomalı MG hastalarına ait timus dokularında ve normal timus dokularında TRAIL ligand ve reseptörlerinin, ve TRAIL'ın fonksiyonunu inhibe edebilen hücre içi antiapoptotik NFkB molekülünün aktif formunun ekspresyon profilleri araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

2. Myasthenia Gravis

2.1 Genel Tanım

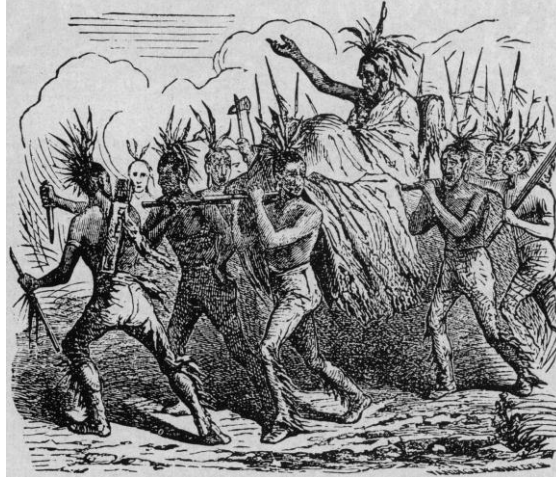
Myasthenia gravis (MG), kas güçsüzlüğü ile karakterize olan otoimmün nöromusküler bir hastalıktır [1]. Hastalığın başlangıç aşamasında, kranial sinir innervasyonlu kasların, özellikle de göz kapağı ve ekstraoküler kasların tutulumu nedeniyle çift görme ve göz kapağı düşüklüğü belirgindir. Hastalığın ilerleyen aşamalarında kranial sinir innervasyonlu kas tutulumunun yanı sıra solunum ve yutma güçlüğü ile birlikte yaygın kas güçsüzlüğüne bağlı yakınmalar gelişir. Genel insidansı son 50 yılda artış göstermiştir. MG'nin bugünkü insidansı 1 milyonda 1 ila 9, prevalansı ise 1 milyonda 25 ila 142 olarak bildirilmektedir. Asya ülkelerinde MG görülme sıklığı diğer ülkelere göre daha yüksektir. Kadınlarda erkeklere göre daha yüksek oranda görülür (3:2), ve 20-24 ila 70-75 yaşlar arasında daha sıklıkla ortaya çıktığı bilinmektedir [2, 3]. MG'de otoimmün atağın hedefi ve efektör yolları iyi tanımlanmıştır. Genel tanımıyla, hastaların yaklaşık %90'ında gözlenen nikotinik asetilkolin reseptörlerine (AChR) yönelik antikolar, AChR'a bağlandıktan sonra çoğunlukla komplement yolunu aktive eder, ve AChR'ın antikör ve komplement aracılı yıkımı gerçekleşir. Sonuçta nöromusküler iletim defektleri ve hastalığın buna bağlı belirtileri ortaya çıkar [4].

MG, genellikle başlangıç yaşı, timik patoloji ve antikör profiline bağlı olarak farklı alt gruplara ayrılır. Bunlardan *oküler MG*'de sadece oküler semptomlar mevcut olup, toplam MG populasyonunun %17'sini temsil eder. AChR antikolları hastaların %50'sinde gözlenirken, nadir olarak kas spesifik tirozin kinaz antikolları (MuSK) ve asetilkolin esteraz (AChE) antikollarına da rastlanır. *Erken başlangıçlı MG*'de AChR antikolları, daha nadir olarak titin antikolları, ve yine nadiren ryanodin reseptör antikolları (RyR) gözlenir. Bu hastalarda çoğunlukla timik hiperplazi mevcutken, timomaya rastlanmaz. *Geç başlangıçlı MG*, erken başlangıçlı MG'nin aksine genellikle 50 yaş sonrasında ortaya çıkar. Tüm hastalarda AChR antikolları gözlenir, bunun yanında hastaların %60'ında ek olarak titin antikolları ve %14'ünde RyR antikolları bulunur. *Timoma ile seyreden MG* tüm yaş gruplarında ortaya çıkabilse de, en fazla 50 yaş üstü bireylerde görülür. MG hastalarının %10-15'lik kısmını oluşturur. MuSK pozitif MG, genellikle AChR antikoru gözlenmeyen hasta grubunu tanımlar. MG hastalarının bir kısmı ise, konvensiyonel ya da deneysel metodlarla antikör tespit edilemeyen hastalardır ve seronegatif olarak tanımlanırlar. Bu hastalarda postsinaptik membranda henüz tanımlanmamış antijenlerin varlığı düşünülmektedir [5].

2.1.2. Tarihçe

Myasthenia Gravis'in (MG) literatürde ilk bahsi, 1664'te ölen Virjinya kabilesinin lideri Opechancanough'un, kendi hastalığını tarif ettiği yazılarında geçmektedir. Opechancanough'a göre karşılaştığı bu hastalık bünyesini harap etmekte ve aşırı yormaktadır. Kasları elastikiyetini kaybetmiş, göz kapakları o kadar ağırlaşmıştır ki, parmakları yardımıyla göz kapaklarını kaldırmaksızın etrafı görememektedir [6].

1672 yılına gelindiğinde; hastalarda günlük yaşamı zorlaştıran bu hastalık, İngiliz Doktor Thomas Willis tarafından "ekstremitelerde ve bulbar kaslarda yorulmayla artan zayıflık" şeklinde tanımlanmıştır. 1800'lerin sonlarında ise ilk modern tanımlama yapılmış ve kaslarda güçsüzlük anlamı taşıyan Yunanca "myasthenia" tanımına, şiddetli anlamı katan Latince "gravis" sıfatı eklenerek hastalığa Myasthenia Gravis ismi verilmiştir [7].



Şekil 2.1. Opechancanough. Opechancanough, kaslarının zayıflamasına bağlı olarak yürüyemediğinden kabilesinin savaşçıları onun tabiri ile "enkaz vücudunu" omuzlarında taşıyordu.

1930'lara kadar MG için etkili bir tedavi geliştirilememiş, buna bağlı olarak hastaların yaklaşık 2/3'ü hastalığın neden olduğu solunum yetmezliği nedeniyle kaybedilmiştir. Bu döneme ait yayınlar, MG'nin kişiden kişiye değişkenlik gösteren seyrini ve yüksek mortalite oranını vurgulamıştır. 1930'larda MG için tedaviler geliştirilmeye başlanmış, 1934'te Mary Walker'ın MG semptomlarının kürar zehirlenmesine benzediğini fark etmesiyle büyük bir adım atılmıştır. Walker, MG hastası bir kadına kürar zehirlenmesine karşı kullanılan, ve kolinesteraz inhibitörü olan fizostigmin enjekte ettikten sonra sol göz kapağının açıldığını, kollarının güçlendiğini, yutma işleminin geliştiğini ve hastada ağırlık hissinin azaldığını bildirmiştir. Walker, fizostigminin MG hastalarında geçici etkisi olduğunu, ancak bu etkinin solunum krizlerinde hasta için hayati önemi olabildiğini göstermiş, böylece MG tedavisinde kolinesteraz inhibitörlerinin önemini vurgulamıştır. 1800'lerin sonlarında MG hastalarında timus patolojisinin yaygın olduğu keşfedilmiştir. 1937'de Blalock, 19 yaşında MG hastası genç bir kadından iyi huylu kistik timik tümör çıkarmıştır. Bu hastada timektomi öncesinde sık ve şiddetli alevlenmeler gözlenirken; timektomi sonrasında hastanın hızla gelişme gösterdiği, kısa bir süre

sonra dans etmeye ve yüzmeye başlayabildiği bildirilmiştir. Bu sayede, Blalock, MG tedavisinde timektomiye hayata geçirmiştir [8].

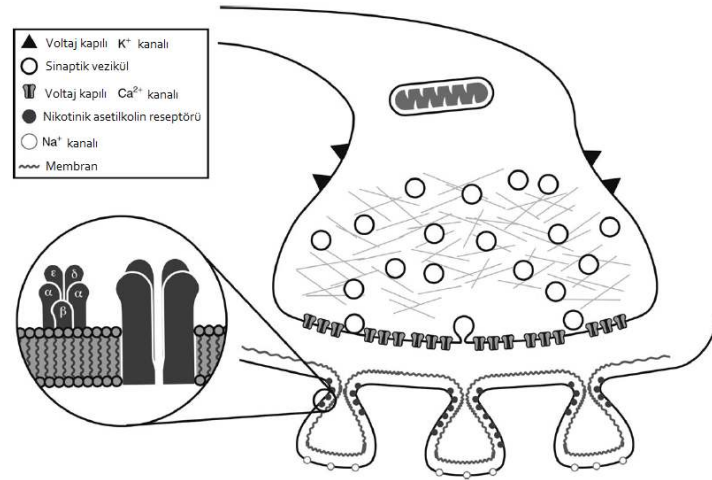
1973'te Patrick ve Lindstrom'un, tavşanlara saflaştırılmış AChR vererek MG benzeri semptomlar geliştirmesinin ardından (deneysel otoimmün MG), yeni ufuklar açan araştırmalar ardarda gelmiştir. Birçok çalışmada, MG hastalarında anti-AChR antikorlarının nöromuskular yapıda fonksiyonel hasara yol açtığı gösterilmiştir. Bu bulgular immüsupresanların kullanımını yaygınlaştırmıştır.

2.1.3. Patofizyolojisi

Myasthenia Gravis (MG), biyolojik, genetik, ve klinik açıdan heterojen bir hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkışı, nöromusküler kavşağın normal fizyolojisinde bozulmalar ile karakterizedir.

Normal nöromusküler kavşak (sinir-kas kavşağı) fizyolojisi:

Sinir-kas kavşaklarına, "son plak" adı verilir (Şekil 2.2). Motor nöronlar ile iskelet kas telleri arasındaki özelleşmiş sinaptik bölgeler olarak tanımlanırlar [9]. İskelet kas liflerini innerve eden motor nöronların aksonları, kasa ulaşmadan hemen önce terminal kollara ayrılır. Bu kolların her biri, bir presinaptik sinir terminalinde sonlanır. Presinaptik sinir terminalinde, çok sayıda mitokondri, ve sinir-kas kavşaklarının nörotransmitteri olan asetilkolini depolayan vesiküller bulunur. Aksiyon potansiyelinin sinir terminaline ulaşmasıyla plazma membranı depolarize olur. Bu depolarizasyonla, voltaja duyarlı kalsiyum kanalları açılır ve hücre dışı sıvıda bulunan kalsiyum iyonları, akson içine difuze olur. Bu durum, asetilkolin içeren vesiküllerin presinaptik membran ile birleşmesini tetikler. Böylece asetilkolin, sinaptik boşluk içine salınır. Motor son plak bölgesindeki kas hücresi membranları üzerinde oldukça fazla sayıda nikotinik asetilkolin reseptörleri (AChR'ler) bulunur. Sinaptik boşluğa salınan asetilkolin molekülleri, bu boşluğu geçerek AChR'lere bağlanır. Bunu takiben, AChR'lerdeki kanallar özellikle Na^+ ve K^+ gibi küçük katyonlar için geçirgen hale gelir. Bu kanalların açılmasının net etkisi, kas lifinin depolarizasyonu ve kasın kasılmasıdır. Asetilkolin daha sonra, sinaptik katlanmalarda bazal membrana bağlı olarak bulunan, ve sinaptik boşluğa da salınabilen asetilkolinesteraz enzimi tarafından parçalanır [9, 10]. MG tedavisinde kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörleri, AChR'ler ile etkileşime girebilen asetilkolin miktarını artırır [11].



Şekil 2.2. Sinir-kas kavşağının komponentleri [12].

MG’de sinir-kas kavşağı fizyolojisinde bozulmalar:

MG’de kas-sinir kavşağındaki sorunlar, asetilkolin reseptörlerinin (AChR) sayıca azalması, terminal katlanmaların yıkımına bağlı olarak sinaptik katlanmaların kısılması, ve katlanmaların kısılmasına bağlı olarak sinaptik boşluğun genişlemesi sonucu ortaya çıkabilir. Bu değişiklikler, postsinaptik membrana yönelik otoimmün reaksiyondan kaynaklanır. AChR yıkımının ardındaki mekanizma, AChR’lere bağlanarak endositozun hızlanmasına ve kas hücreleri tarafından reseptörlerin degrade edilmesine yol açan AChR antikorlarıdır. Bu antikorlar aynı zamanda AChR’lerin bağlanma bölgelerini bloke eder ve postsinaptik membran katlanmalarının komplement-aracılı yıkımı gerçekleşir. MG’li hastaların %10 ila %20’sinde AChR antikorları gözlenmez. Bu hastaların bir kısmında postsinaptik membrandaki kas spesifik tirozin kinaz (MuSK) proteinine karşı antikorlar mevcuttur. MuSK, AChR’yi postsinaptik membrana bağlı tutan proteinlerden biridir [10]. Myastenik bir kas-sinir kavşağında, defektlere bağlı olarak, asetilkolin moleküllerinin AChR’lerle birleşme oranı azalır. Bunun sonucunda bu kavşaklarda son plak potansiyeli düşer. Kavşakların bir kısmında her yeni gelen impulsta serbest kalan asetilkolin miktarı azalır, ve son plak potansiyeli aksiyon potansiyelini oluşturacak eşiğe ulaşamaz. Aksiyon potansiyeli oluşamadığında, kas kasılması gerektiği gibi gerçekleşemez, ve kaslar güçsüzleşir.

Timus ile ilişkisi:

MG hastalarının çoğu benzer klinik ve biyolojik özellikler taşısa da, MG heterojen bir hastalıktır. Heterojenitede en önemli etken, hastaların önemli bir kısmında gözlenen timus anomalileridir [13]. Timusun MG’deki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, hastaların önemli bir kısmında timektomi uygulamasının pozitif sonuçları bildirilmiştir. İmmunolojik olarak kendi antijenlerine cevap veren T hücreleri timusta elimine edilir. Timusun yüzeyinde AChR taşıyan myoid hücreler vardır. Timik lenfositlerin anti-AChR antikorunu üretebildiği, ayrıca timomalarda AChR benzeri protein salgılandığı bildirilmiştir [14].

Timusun, MG gelişiminde başlangıç döneminde mi yoksa daha sonraki aşamalarda mı rol oynadığı bilinmemektedir. Ancak timus yüzeyindeki myoid hücrelerde AChR ekspresyonunun varlığı, MG’li hastalarda timus anomalilerinin

önemli oranda gözlenmesi, ve MG hastalarının önemli bir kısmında timektomi sonrası semptomların gerilemesi, timusun MG gelişiminde önemli rolü olduğuna yönelik güçlü kanıtlar oluşturmaktadır.

MG hastalarında başlıca iki tip timik anomaliden bahsedilmektedir. Birincisi, hastaların %40 ila %70'inde görülen timik hiperplazidir. Timik hiperplazinin histolojik olarak farklı iki tipi mevcuttur. Bunlar gerçek (medullar) timik hiperplazi ve foliküler (lenfoid) hiperplazi olarak tanımlanır (Şekil 2.3) [15]. MG ile ilişkilendirilen timik hiperplazi tipi, foliküler hiperplazidir, ve lenfoid foliküllerin sayısında artışla karakterizedir. Bu hiperplazi tipinde, yüksek sayıda germinal merkez oluşumu dikkat çeker. Germinal merkezler, timusta B hücre farklılaşmasının gerçekleştiği bölgeler olarak bilinmektedir. Bu merkezlerde B hücreleri spesifik bir antijeni tanır ve T hücreleri ve antijen sunan hücreler ile etkileşime girerek somatik hipermutasyon geçirir. Bu süreç sonunda B hücreleri, ilgili spesifik antikoru daha yüksek afinite ile üreten hücelere farklılaşır [16]. MG'li hastaların timuslarından izole edilen B hücrelerinin de anti-AChR antikorları salgıladığı gözlenmiştir [17]. Dolayısıyla, anti-AChR antikoru üreten B hücrelerinin spesifik farklılaşmasının, MG gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. MG hastalarında görülen ikinci major timik anomali ise, hastaların yaklaşık %10 ila %15'inde görülen timomadır (Şekil 4) [18]. Timusun epitel hücrelerinden köken alan timomada timik kortikal epitel fonksiyonunun korunduğu ve T hücre farklılaşmasının devam ettiği, ancak özellikle T hücrelerinin negatif seleksiyon mekanizmasının hasarlı olduğu bildirilmiştir [16]. Timomalı hastalarda, elimine edilemeyen bu otoreaktif T hücrelerinin MG fenotipinin ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Timik tümörlerin yaklaşık %10'unu oluşturan timik kistler de, bazen timomalarla karıştırılabilir.

2.1.4. Genetik Temeli

MG genel olarak sporadiktir. Aynı ailede 2 ya da 3 MG hastasının bulunduğu ailesel olgular ile nadiren karşılaşılır [19, 20]. Ancak monozigotik ikizlerde, dizigotik ikizlere oranla MG görülme konkordansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [5]. Bunun yanında, otoimmün temelli bir hastalık olan MG'de otoimmün yatkınlıkla ilişkili çok sayıda bulgu mevcuttur. MG hastalarının farklı otoimmün hastalıklara yakalanma yatkınlıklarının yanısıra, diğer aile üyelerinin de otoimmün hastalıklardan etkilenme oranlarının normal bireylere göre daha fazla olduğu, ve hasta yakınlarında MG görülme olasılığının, genel popülasyona oranla 1000 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [5, 21]. MG'li hastaların birinci derece akrabalarında, özellikle sistemik lupus eritematoz, romatoid artrit, ve tiroid ile ilişkili hastalıkların görülme oranlarının yüksek olması, ortak genetik mekanizmaların varlığını düşündürmektedir [21].

Otoimmün hastalıkların patogenezinin genel olarak oldukça kompleks ve multifaktöriyel olduğu, ve farklı zamanlarda birçok farklı doku ve hücre tipinin etkilenebildiği bilinmektedir. MG'de, patojeniteye neden olan genetik mekanizmaların heterojenitesi yanında, hala tanımlanmamış çevresel faktörlerin de mevcudiyeti, bu hastalığı daha kompleks hale getirmektedir [19]. MG'nin, Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC) veya MHC dışı olarak sınıflandırılan birçok gen ile asosiasyonu bildirilmiştir. Örneğin, timik hiperplazi görülen erken başlangıçlı

MG hastalarında HLA alellerinden HLA-A1, B8, DR3 haplotipinin ilişkisi bilinmektedir. Geç başlangıçlı MG hastalarında ise HLA-A3, B7, DR2, ve DR4 ile asosiasyon tanımlanmıştır. Bunların yanında, Fc gama reseptörünü kodlayan FCGR genleri, interlökin 10 molekülünü kodlayan IL-10 geni, ve TNF kodlayan genler ile farklı asosiasyonlar bildirilmiştir [5]. MHC dışı olup MG ile ilişkileri bildirilmiş genlere örnek olarak, alfa ve beta antijen lokuslarında bulunan T hücre reseptör genleri, AChR'nin beta alt birimini kodlayan gen, bunun yanında IL-1beta, IL6, IL4, IL10, beta-2 adrenerjik reseptörü ve CTLA4 kodlayan genler verilebilir.

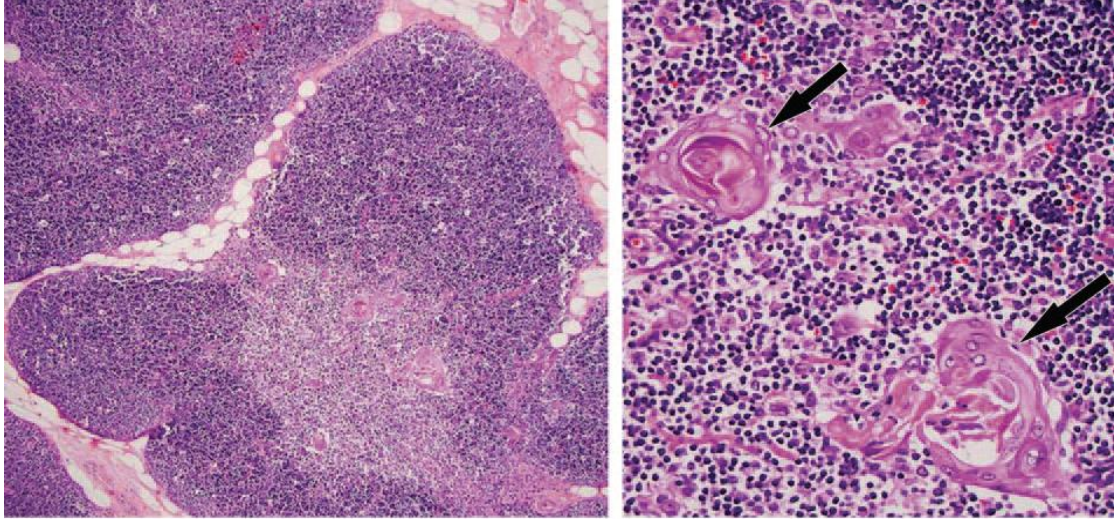
2.1.4. Tedavisi

Günümüzde MG tedavisinde farklı seçenekler mevcut olmakla birlikte, genel kabul gören 4 farklı tedavi yaklaşımı bildirilmektedir: 1) Asetilkolin esteraz enzim inhibitörlerinin uygulanması, 2) İmmunomodülatör ilaçlarla tedavi, 3) Plazma değişimi, ve 4) Timektomi. Bunlardan timektomi, timus bezinin cerrahi olarak çıkarılması işlemidir, ve birçok hastada hastalığın seyrinde iyileşme sağladığı ve bugün cerrahi olarak uygulandığı bilinmektedir [22]. Timektominin, yüksek afiniteli anti-AChR antikoru üreten B hücrelerinin periferik organlara gönderilmesinin durdurulmasına yardımcı olduğu, timomalı hastalarda ise self-reaktif T hücrelerinin üretiminin sonlandırılması nedeniyle yarar sağladığı düşünülmektedir. Dolayısıyla, timektominin MG için biyolojik etkileri kısmen aydınlatılmıştır [16, 23].

2.2. Timus

2.2.1. Timusun Genel Yapısı

Timus, anterosuperior mediastende yerleşmiş, santral lenfoid bir organdır. Timus bağ dokudan oluşan bir kapsül ile sarıdır ve fibröz septumlar ile “korteks” ve “medulla” kısımlarına ayrılır. Korteks endodermal kökenli olup çoğunlukla lenfositlerden oluşurken (timositler), az sayıda epitel ve mezenşimal hücre içerir. Ektodermal kökenli olan medulla ise daha çok epitel hücrelerden oluşurken az sayıda lenfosit içerir. Medullada bulunan, timusa özgü “Hassal cisimcikleri”, olgunlaşmış epitel hücrelerin oluşturduğu yuvarlak keratinize kistik oluşumlardır ve timositlerin olgunlaşmasında önemli rol oynarlar (Şekil 2.3). Timusta epitel hücreler ve lenfositler dışında, fibroblastlar, makrofajlar, dendritik hücreler, ve myoid hücreler gibi farklı hücre tipleri de bulunur [24].



Şekil 2.3. Timusun histolojik görünümü. Soldaki şekilde, çoğunlukla lenfositlerden oluşan (timositler) korteks ve iç kısımda çoğunlukla epitel hücrelerden oluşan medulla kısımları görülmektedir (100X büyütme, H-E boyama). Sağdaki şekilde, medulla'daki yuvarlak, keratinize Hassal cisimcikleri oklarla gösterilmiştir (400X büyütme, H-E boyama) [24].

2.2.2. Timusun Fonksiyonu

Timus, dolaşımdaki T lenfositleri oluşturan, dolayısıyla hücreli immunitede önemli rol alan bir lenfoid organdır [24]. Timositlerin olgunlaşması, timusun yapısındaki epitel hücreler tarafından üretilen çeşitli indükleyici, hormonal ve proliferatif sinyaller aracılığıyla gerçekleşir. Yaşamın birinci yılında bu yolla üretilen T hücre repertuarı, normal şartlarda yaşam boyu korunabilir, ve vücuda gerekli olan normal T hücre popülasyonu timusun yokluğunda dahi sağlanabilir. İnsanda yaş ilerledikçe timustan sürekli olarak sağlanacak T hücre katkısına olan ihtiyaç azalsa da, timusun insan yaşamı boyunca T hücre farklılaşması ve olgunlaşmasının gerçekleştiği organ olarak fonksiyon görmeye devam edebildiği bilinmektedir [25]. Örneğin “yaşlı timus”un, kemik iliği transplantasyonu sonrası naif T hücre popülasyonunun yerine konmasını indükleyebildiği bildirilmiştir [26].

Kemik iliğinde üretilen progenitor T hücreleri, kemik iliğinden timusa göç eder. Timusta, T hücre reseptörlerinin kodlandığı genom dizilerinde yeniden düzenlenmeler meydana gelir ve ardından self-reaktif T hücre reseptörü oluşturmuş olan, dolayısıyla vücudun kendi hücrelerine zarar verme potansiyeli olan timositler klonal delesyon aracılığıyla apoptoza uğratarak self-tolerans oluşturulur. Timusa gelen progenitor hücreler, multipotent özellikte olup farklı hücrelere farklılaşabilirler. T hücreleri, farklılaşma aşamalarından timusun farklı bölmelerinde ilerlerken geçerler. Bu süreç, periferik gönderilen T hücrelerinin organizmanın kendi Major Histokompatibilite Kompleksleri (MHC’ler) ile otoreaktiviteye yol açmayacak seviyede interaksyona girebilmesini sağlar. Korteksten erken CD4⁺CD8⁻ evrede göç ederler, ve kortikal epitel hücrelerle etkileşime girmelerini takiben CD4⁺CD8⁺ evreye ilerlerler. Bu etkileşim ile bu hücrelerin apoptoza uğramaları engellenir, ve organizmanın kendi MHC’lerini ayırt edebilen T hücrelerinin pozitif seleksiyonu

gerekleşir. Hücreler CD4⁺ veya CD8⁺ evreye farklılaştığında, medullaya göç ederler, ve burada dört gün kadar beklerler. Bu sürecin ilk iki gününde, self-reaktif timositlerin gerektiğinde klonal delesyona uğratılabilmeleri için bu hücreler apoptoza duyarlı konumdadırlar. Bunu takiben son bir fonksiyonel olgunlaşma evresi sonrasında, hayatta kalan hücreler, lenf veya kan damarları aracılığıyla dolaşıma girerler ve burada spesifik antijenler ile karşılaşmayı beklerler [27, 28]. Hücre farklılaşmasının başarılı şekilde sonuçlanması için pozitif T hücre seleksiyonunun kalitesi ve spesifikliğı önemlidir.

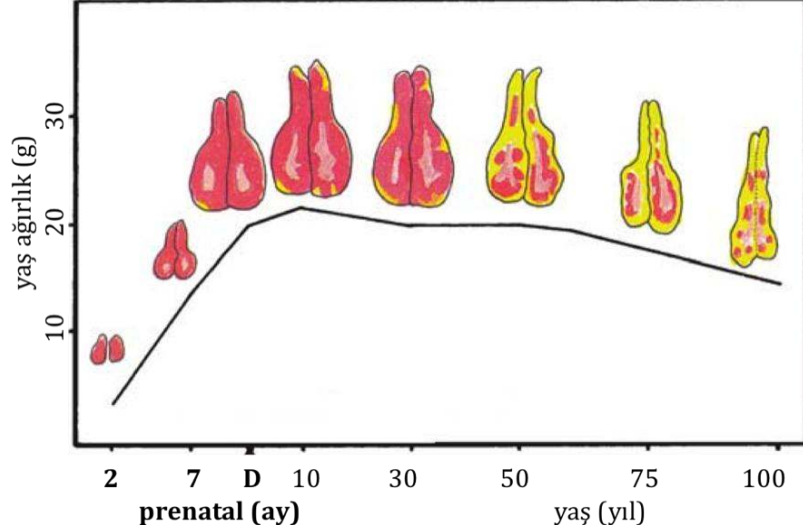
T hücrelerinin negatif seleksiyonunun, organizmanın kendi antijenlerine karşı toleranslı olan periferel T hücre repertuarının oluşması ve otoimmün hastalıkların önlenmesi açısından önemi bilinmektedir. Bu süreçte otoreaktif T hücrelerinin eliminasyon mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Negatif seleksiyonda önemli olduğu düşünülen intraselüler sinyal yollarında, Nur-77 transkripsiyon faktörü ailesi, ve proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri olan Bim, Bax ve Bak gibi moleküllerin rol oynadığı bildirilmiştir [28]. Ayrıca, TNF ailesi üyesi birçok sitokin de, T hücrelerinin negatif seleksiyonunda rol oynayıp oynamadıkları araştırılmıştır. Bunlar arasında CD30, TNF, Fas, ve TRAIL molekülleri sayılabilir. Özellikle Fas ve TRAIL'ın bu süreçteki rolüne yönelik çelişkili bulgular vardır. Kishimoto ve arkadaşları, yüksek intensiteli T hücre reseptörü stimölasyonunda Fas reseptörünün rolü olduğunu savunmuş [29], buna karşın Fas'ın negatif seleksiyonda gerekli olmadığına yönelik çalışma sonuçları bildirilmiştir [30, 31]. TRAIL'ın da bu süreçteki rolü tartışmalıdır.

2.2.3. Timusta Yaşa Bağlı Değişimler

Timusun embriyonik dönemdeki gelişimi, 6. gestasyonel haftada başlar. Dokuzuncu gestasyonel haftaya kadar tamamen epitelyal yapıdadır. Onuncu haftada, fetal karaciğer ve kemik iliğinden göç eden küçük lenfoid hücreler, bezin lobulasyonunu oluşturur. Korteks ve medulla kısımlarına farklılaşma 14-16. haftalarda tamamlanır. Doğumdan önce vücut ağırlığına oranla en yüksek ağırlığına ulaşan timus, doğumda ortalama 10-15 g ağırlığındadır (Şekil 2.4) [24]. Timusun ağırlığı doğumdan sonra artarak 7-12 yaşlar arasında yaklaşık 2 katına ulaşır ve ergenlikte en yüksek mutlak ağırlığına gelir. Bir yetişkinde ortalama timus ağırlığı 25 gr olup kapladığı hacim 25cm³'dür. Erken yaşlarda kan damarları yönünden zengin olan timus, pembe-sarı renkli ve piramidal yapıdadır. İleri yaşlarda yağ miktarının birikmesi ile rengi sarılaşır. Perivasküler alanların çoğu adipoz ve fibröz doku ile yer değiştirir. Öyle ki, 50 yaşındaki bir yetişkinde toplam timik hacmin %80'inden fazlası yağ dokusundan oluşur. Erişkin dönemde üretilen T hücrelerinin, uyarılara genç bireylerde üretilenler kadar etkili cevap veremediğı bilinmektedir. Bu dönemde daha çok aktive olmuş ve hafıza T hücrelerinin sayısında artış tanımlanmaktadır [32].

Timustaki bu değişimlerin, yaşa bağli olarak nöroendokrin-timik etkileşimlerin bozulması ile ortaya çıktığı ileri sürölmektedir. Fonksiyonel glandular dokuda meydana gelen ve genel olarak bezin toplam büyüklüğünde değişikliğe neden olmayan bu kayıp, "invölüsyon" olarak tanımlanır. İnvölüsyon sırasında, timusun epitelyal komponenti atrofiye uğrar, ve adipoz dokuda yayılmış küçük lenfositler belirginleşir. İnvölüsyonun aslında doğumda başladığına ve yavaş yavaş

ilerlediğine yönelik görüşler de mevcuttur. Bu süreçte bir dizi gonadal ve timik hormonun görev aldığı, bunun yanında çeşitli sitokinlerin de etkili olduğu bildirilmiştir [32]. Timusun yapısında zamanla meydana gelen bu değişiklikler, “normal timus” tanımının da yaşa bağlı olarak değişmesine neden olmaktadır.

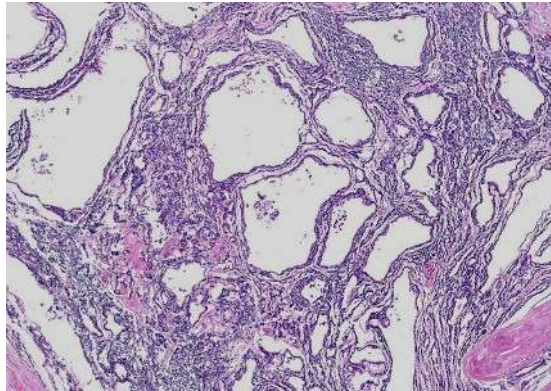


Şekil 2.4 Timusta yaşa bağlı değişimler [32].

2.2.4. Timik Patolojiler

2.2.4.1. Kistler

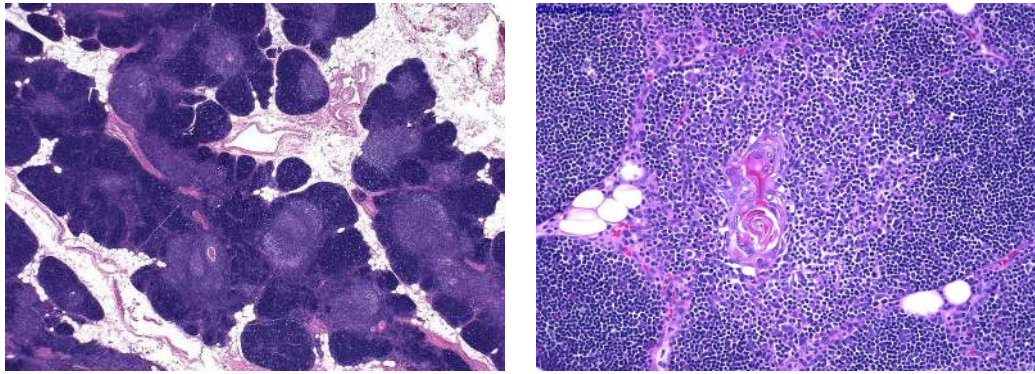
Timik tümörlerin yaklaşık %10'u timik kistlerdir. Bunlar boyun ve diyafram arasında herhangi bir bölgede gelişebilirler ve genellikle asemptomatiklerdir. Her iki cinsiyette de eşit oranda görülürler. Timik kistler doğuştan mevcut olabilir, veya sonradan gelişebilir. Sonradan gelişen kistlerin inflamasyon veya timoma, Hodkin lenfoma, veya timik karsinoma ile ilişkili olma ihtimali daha yüksektir. Makroskopik görünimleri yuvarlak veya oval görüntülü, multiloküler veya uniloküler olabilir, beraberinde yağlı timik dokusu bulundurabilirler [27].



Şekil 2.5. Multilokular timik kist (40X büyütme, H-E boyama) [33].

2.2.4.2.Hiperplazi

Timik hiperplazi histolojik ve morfolojik olarak timik medüller hiperplazi (gerçek timik hiperplazi) ve foliküler lenfoid hiperplazi olarak 2'ye ayrılır (Şekil 2.6). Gerçek timik hiperplazide, timik dokuda ağırlık artışı gözlenir. İdiyopatik olabileceği gibi, kemoterapi, steroid tedavisi, veya yanıklardan sonra da gelişebilir. Foliküler lenfoid hiperplazide timustaki lenfoid foliküllerin ve B hücre farklılaşmasının gerçekleştiği germinal merkezlerin sayısında artış olur, bezin büyüklüğünde ise genellikle artış gözlenmez. Bu hiperplazi tipi, en sıklıkla myasthenia gravis ile ilişkilidir; hastaların %65'inden fazlasında mevcuttur. Myasthenia gravis yanında, sistemik lupus eritematoz, romatoid artrit, skleroderma, vaskulit, ve otoimmün tiroid hastalıkları gibi diğer otoimmün hastalıklarla ilişkili olarak da ortaya çıkabilir [27]. Her iki timik hiperplazide de, timus bezinin makroskopik konfigürasyonu, timomanın tersine korunur.



Şekil 2.6 Timik hiperplazi. a) Foliküler timus hiperplazisi (FTH) (40X büyütme, H-E boyama), b) Gerçek timus hiperplazisi (100X büyütme, H-E boyama) [33].

2.2.4.3.Neoplazmlar

Timik Epitelyal Tümörler

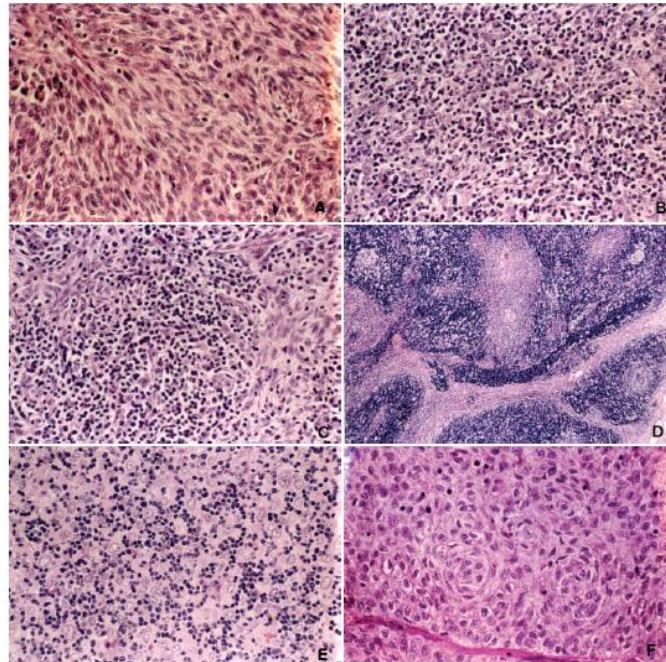
Timik epitelyal tümörler, timoma ve timik karsinomaları içerir. Tüm mediasten kitlelerin %10-15'ini, tüm anterior mediasten kitlelerin ise %50'sini oluşturur. Çoğunlukla 50-60 yaş arası bireylerde gözlenir. Bu tümörlerde timik kortikal epitel fonksiyonunun korunduğu ve T hücre farklılaşmasının devam ettiği, ancak özellikle T hücrelerinin negatif seleksiyon mekanizmasında defekt olduğu bildirilmiştir. Negatif seleksiyon mekanizmasındaki hasara bağlı olarak elimine edilemeyen otoreaktif T hücrelerinin MG fenotipinin ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Myasthenia gravis hastalarının %10-15'inde timoma gözlenir. Timomalar, invaziv ve non-invaziv olmak üzere ikiye ayrılır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre lenfosit sayısı ve epitel hücre içeriklerine göre A, AB, B, B1, B2, ve B3 olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.7) [34]. Bu sınıflandırmada A ve AB tipleri, genellikle klinik olarak benign olup sınırlıdır. B tiplerinde ise (özellikle B3'te) invaziv olma olasılığı daha yüksektir. C tipi timomalar ise malign özellik gösterirler, hemen hemen her zaman invazivdirler, ve timik karsinomaları tanımlamak için kullanılırlar [24]. Bu karsinomalarda lenfosit miktarı azalmış, proliferatif aktivite artmıştır. Timomalar ile kıyaslandıklarında yüksek rekürans ve düşük sağkalım gösterirler. Timomaların aksine, otoimmün hastalıklarla ilişkileri nadirdir.

Nadir Timik Neoplazmlar

Timolipoma Nadir, yavaş büyüyen benign tümörlerdir ve tüm timik neoplazmların %2-%9'unu oluştururlar. Histolojik yapılarında yağ dokusu ve timik doku gözlenir. Myasthenia gravis, Graves hastalığı, aplastik anemi, ve diğer bazı hematolojik hastalıklarla ilişkileri bildirilmiştir. Myasthenia gravis ile ilişkilendiren timolipoma olgularının oranı yaklaşık %10'dur.

Timik karsinoid Primer malign timik neoplazm tipidir. Tekrar oluşma ve metastaz riski yüksek olduğundan genellikle kötü prognoz gösterirler. Erkeklerde kadınlara oranla 3 kat daha fazla görülürler.

Lenfoma Lenfomaların timusa yayılabildiği, veya izole olarak timusla ilişkili olduğu bilinmektedir. Timik lenfomaların büyük çoğunluğu Hodgkin hastalığı şeklinde kendini gösterir [34].



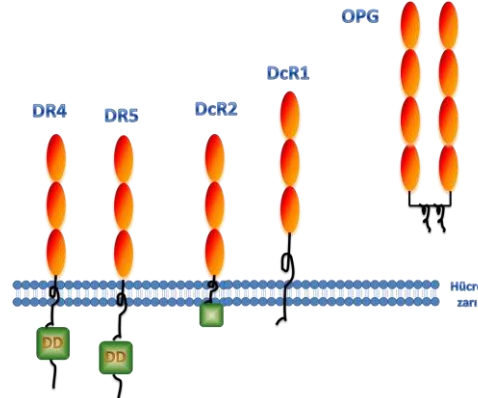
Şekil 2.7. WHO sınıflandırmasına göre farklı timoma tiplerinin histolojik görüntüleri A) Tip A; B) Tip B; C) Tip AB; D) Tip B1; E) Tip B2; F) Tip B3

2.3. TRAIL

2.3.1. Genel Özellikleri

TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), 1995 yılında iki ayrı grup tarafından tanımlanan bir transmembran proteindir [35, 36]. Amino asit dizisi TNF-alfa'ya %23, Fas-liganda ise %28 benzerlik gösteren TRAIL, 281 amino asit kodlar ve 32 kDa ağırlığındadır [37]. Bir veya iki reseptörü olan FasL veya TNF-alfanın aksine, TRAIL'ın bağlanabildiği 5 farklı reseptör vardır (Şekil 8). Bu reseptörlerin ikisi (TR-1/DR4 ve TR-2/DR5) ölüm reseptörüdür. Bu transmembran reseptörler, sitoplazmik bölgede ölüm domainleri bulundurlar. TRAIL'ın bu reseptörlere bağlanmasıyla, hücrede kaspaz bağımlı apoptotik sürecin aktivasyonu gerçekleşir. TRAIL, yalancı reseptörler olarak adlandırılan TR-3/DcR1 ve TR-4/DcR2'ye

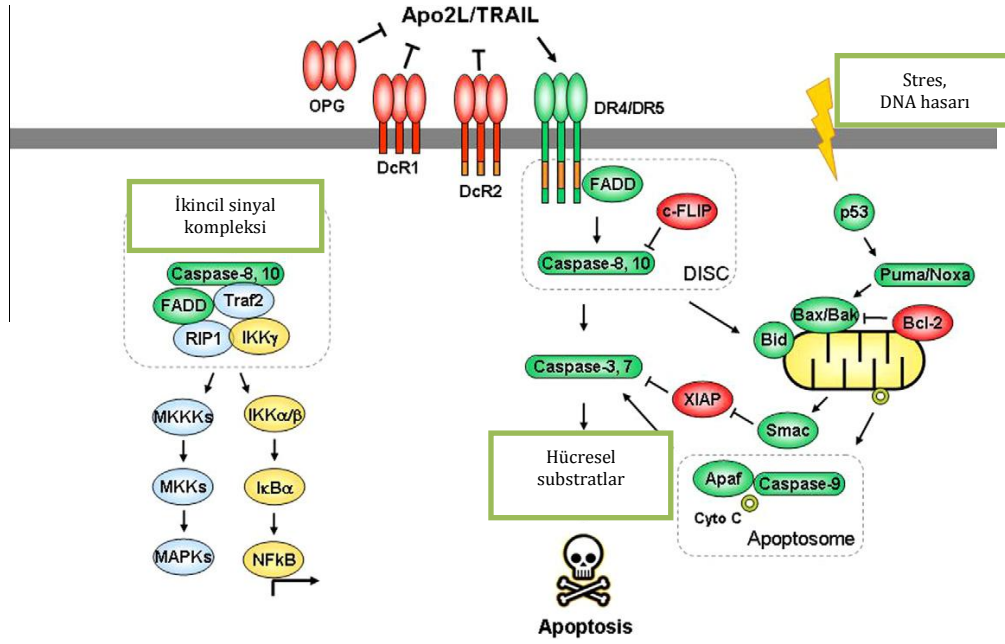
bağlandığında ise, apoptotik yol indüklenmez [38]. DcR1'in sitoplazmik bölgede, apoptotik sinyali başlatan ölüm domaini bulunmaz, DcR2'nin sitoplazmik domaini ise güdüktür ve fonksiyonel değildir. Osteoprotegerin ise, TRAIL'ın bağlanabildiği bir diğer yalancı reseptördür, ve TRAIL'ın bilinen tek çözülebilir reseptörüdür. TRAIL'ı kodlayan genin kromozomal lokalizasyonu 3q26'dır. TRAIL'ın dört transmembran reseptörünü kodlayan genler ise, 8p21-22 bölgesinde bulunur. Öte yandan, TRAIL'ın bağlanabildiği çözülebilir reseptör osteoprotegerini kodlayan TNFRSF11BOPG geni, 8q24 bölgesinde konumlanmıştır [39].



Şekil 2.8. TRAIL'ın bağlanabildiği 5 farklı reseptör

TRAIL'ın bir hücrede apoptozu indükleyebilmesi için, ölüm reseptörleri DR4 veya DR5'e bağlanması gerekir. Bağlanmayı takiben TRAIL bir çinko atomu etrafında trimerize olur. Bunu reseptör trimerizasyonu izler. Reseptör trimerizasyonu sonrası, adaptör protein Fas-Associated Death Domain (FADD), reseptörlerin intraselüler ölüm domainlerine bağlanabilir ve apoptotik yolu başlatıcı kaspaz 8'in hücre ölümünü indükleyen sinyal kompleksine (Death-Inducing Signaling Complex; DISC) dahil olmasını ve aktivasyonunu tetikler. Çoğu hücrede, kaspaz 8 daha sonra Bid molekülünü kırarak mitokondriyel apoptotik yolu indükler (Şekil 9) [40].

TRAIL, DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerine bağlansa dahi apoptotik yol indüklenmez. DcR1'in sistince zengin ekstraselüler kısmı, proapoptotik TRAIL reseptörlerine benzerlik gösterir, ve plazma membranına, COOH-terminalinde bulunan glikozil-fosfatidilinositol birimi ile bağlıdır. Ancak sitoplazmik bölgede, apoptotik sinyali başlatan ölüm domaini bulunmaz. DcR2'nin DR4 ve DR5 ile yüksek benzerliği vardır, ancak sitoplazmik domaini güdüktür ve fonksiyonel değildir. DcR1 ve DcR2'nin hücre yüzeyinde yüksek ekspresyonunun TRAIL'ın apoptotik etkisine karşı dirence sebep olabildiği bilinmektedir. TRAIL'ın beşinci reseptörü olan osteoprotegerin ise, osteoklastogenezi negatif olarak regüle eder, ve çözülebilir bir molekül olarak ortamdaki TRAIL moleküllerini bağlamak suretiyle TRAIL'ın etkisini azaltabileceği düşünülmektedir [40].



Şekil 2.9. TRAIL'in indüklediği sinyal yolları [41].

2.3.2. TRAIL'in Timusla İlişkisi

TRAIL'in, TNF ailesi üyesi diğer ölüm ligantlarından farklı olarak iki önemli özelliği dikkat çekmektedir. Öncelikle TRAIL, birçok kanser hücresinde seçici olarak apoptozu indüklerken, genel olarak normal hücreler üzerinde apoptotik etki göstermemektedir. TRAIL bu özelliği nedeniyle, kansere karşı yeni ve/veya bütüncü tedavi metotlarında kullanımı gündemde olan önemli bir moleküldür. İkinci olarak da, diğer apoptotik moleküllerin ekspresyonları sıkı regülasyon altında tutulup geçici olarak ifade edilirken, TRAIL ligand ve reseptörleri normal dokuların büyük çoğunluğunda ifade edilmektedir. Bu durum, TRAIL'in henüz tanımlanmamış farklı rolleri olabileceğini düşündürmektedir [42]. Nitekim Lamhamedi-Cherradi ve ark., TRAIL ekspresyonunun olmadığı transgenik farelerde timosit apoptozunun gerçekleşmediğini, ve timik delesyonun indüklenmediğini göstermişlerdir [43]. Bir başka çalışmada, bir sitidin analogu olan ve myelodisplastik sendromun tedavisinde kullanılan 5-Azasitidin'in (5AzC), erişkin fare timositlerinde apoptozu indüklediği, bunu da TRAIL aktivasyonu yoluyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir [44]. Bunun yanında, TRAIL eksprese etmeyen timositlerin mitokondri aracılı apoptozu duyarlılıklarının azaldığı bildirilmiştir [45]. Ancak TRAIL bağlanmasının, timositler üzerinde direk negatif seleksiyonu indüklemeyeceği, TRAIL'in mitokondriyel apoptotik yolların kontrolü ile timosit apoptozunu regüle edebileceği ileri sürülmüştür. İntratimik negatif seleksiyonun TRAIL aracılı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğine yönelik çelişkili bulgular olsa da, genel olarak bu süreçte TRAIL'in timosit sayılarının regülasyonunda henüz tanımlanmamış farklı görevleri olabileceği düşünülmektedir [28, 46].

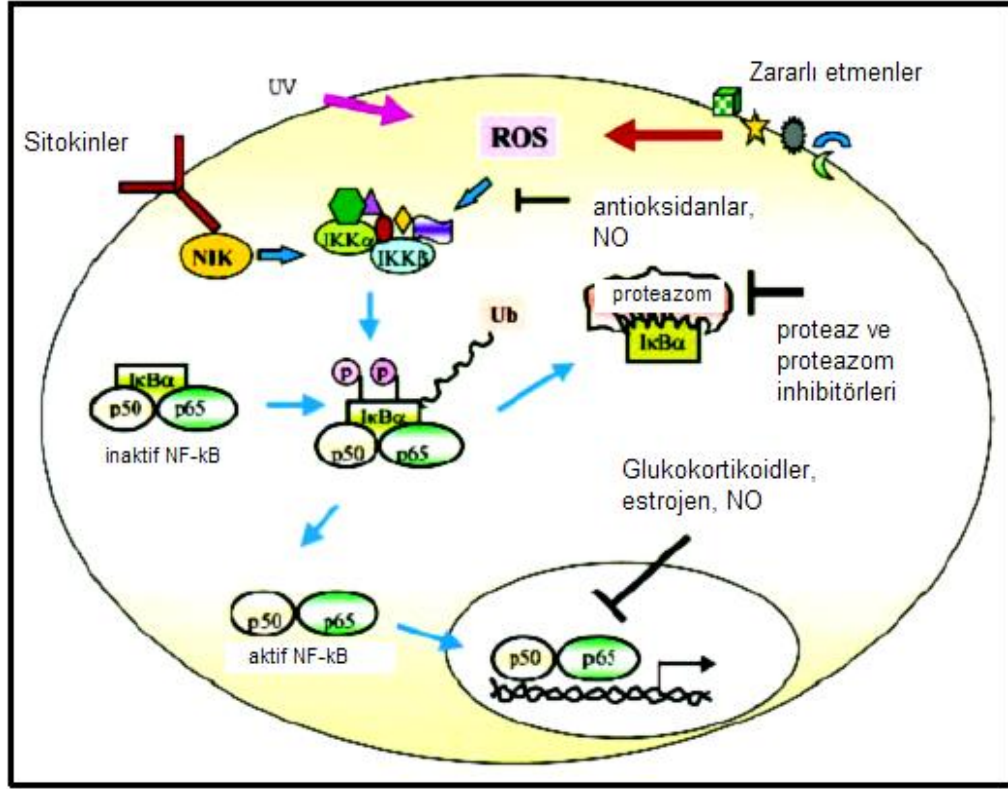
2.3.3. NFκB

Nuclear Factor kappa B (NFκB), inflamasyonda, ve doğal ve adaptif immün sistemde rol alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. NFκB transkripsiyon faktörleri, Rel protein ailesi üyesi moleküllerden oluşan dimerlerdir ve DNA'ya

bağlanmada, dimerizasyonda ve IκB gibi inhibitör proteinlerle etkileşimlerde görev alan Rel homoloji birimleri ile karakterizedirler. IκB proteinleri, NFκB ile fiziksel etkileşime girererek NFκB'nin nüklear lokalizasyon sinyallerini bloke eder ve NFκB proteinlerini sitoplazmada tutar (Şekil 2.10). Bu sayede, NFκB'nin nukleusta geçici ve kalıcı seviyelerini düzenler [47-49]. Dolayısıyla NFκB, uyarılmamış halde iken, IκBα, IκBβ ve IκBε inhibitör proteinlerine bağlı olarak sitoplazmada tutulur ve birçok hücre tipinde, uygun uyarı alıncaya dek transkripsiyonel olarak inaktiftir. Çeşitli intraselüler ve ekstraselüler sinyaller, IκB kinaz komplekslerinin (IKK) aktivasyonunu sağlar. IκB proteinleri, örneğin TNF gibi inflamasyon indükleyici sitokinlerin veya bakteriyel lipopolisakkaritlerin etkisiyle, N terminal bölgelerinde bulunan iki serin biriminden fosforillenir. [47-49]. IκB proteinlerinin fosforilasyonu, hızlı bir şekilde ubiquitinlenmelerine ve sonrasında 26S proteazomlar tarafından parçalanmalarına yol açar. Bu sayede NFκB serbest kalır ve nukleusa göç ederek, çeşitli genlerin promotor ve enhancer bölgelerindeki κB elementlerine bağlanarak regülasyon sağlar [47-50].

2.3.4. NFκB'nin TRAIL Dirençliliği ile İlişkisi

TRAIL'ın, birçok farklı kanser hücresinde apoptozu seçici olarak indüklediği, ancak genel olarak normal hücrelerde apoptotik etki göstermediği bilinmektedir. Normal hücrelerin yanı sıra, özellikle ileri evrelerdeki birçok kanser hücresinde de TRAIL dirençliliği olabileceği gösterilmiştir. Hücrelerde TRAIL'a dirençliliğin açıklanması için iki farklı hipotez geliştirilmiştir. Bunlardan birincisi, normal hücrelerde ölüm reseptörleri (DR4 ve DR5) ile rekabete giren yalancı reseptörlerin (DcR1 ve DcR2) TRAIL ligantlarının sayısını düşürerek veya hücre içi anti-apoptotik yolları aktive ederek TRAIL'a dirençliliğe neden olabileceğini savunmaktadır [51, 52]. Bugünkü bilgilere göre, TRAIL'ın 4 farklı transmembran reseptörünün her biri NFκB'yi aktive edebilmektedir. Ayrıca, kanser hücrelerinde yalancı reseptörlerin sentezinin promotor hipermetilasyonu sonucu azaldığı gösterilmiştir [53]. İkinci hipotez, TRAIL'a dirençli hücrelerde apoptozu inhibe edici moleküllerin sentezinin arttığını savunmaktadır. Bu hipoteze uygun olarak, bir kaspaz 8 homologu olan c-FLIP'in (cellular FLICE Inhibitory Protein) TRAIL aracılı apoptozu engellediği gösterilmiştir [54]. Ayrıca, NFκB aktivasyonundaki artışın, DcR1 reseptörünün ve anti-apoptotik Bcl-xL molekülünün sentezini artırdığı bildirilmiştir [55-57]. NFκB yollarının, aynı zamanda apoptozu inhibe edici cIAP inhibitör proteinlerinin sentezini de artırıcı etkisi gösterilmiştir [58]. Bu bulgular ışığında, hücre içi aktif NFκB sinyal yolunun en az dört farklı yolla hücreleri TRAIL'a dirençli kılabilceği görülmektedir.



Şekil 2.10. NFκB aktivasyon ve inhibisyon yolları [59].

MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta Materyalleri

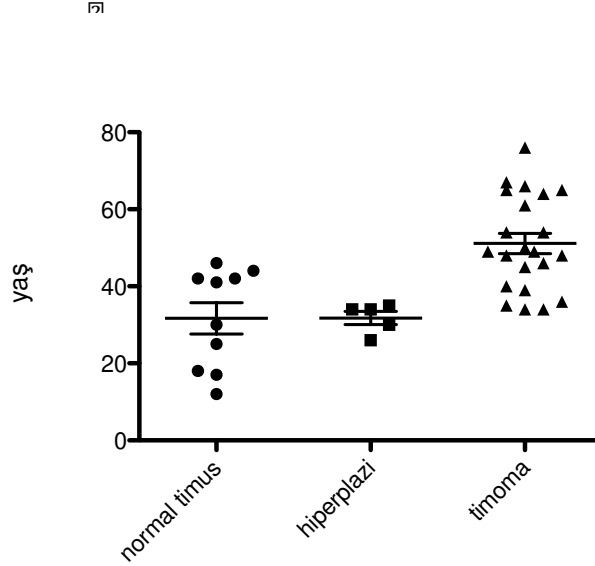
Çalışmamızda, Aralık 2005 ile Mart 2012 arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Nöromusküler Hastalıklar Polikliniğine başvuran timik hiperplazili 5 ve timomalı 22 Myasthenia Gravis hastasına ait timus dokuları, ve yaşları 12 ile 46 arasında değişen 10 bireye ait normal timus dokuları kullanıldı (Tablo 3.1 ve 3.2, Şekil 3.1). Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda parafine gömülerek arşivlenmiş ilgili doku bloklarından 5 mikron kalınlığında alınan kesitler, Akdeniz Üniversitesi Gen ve Hücre Tedavisi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde immunohistokimyasal boyama aşamalarından geçirildi.

Tablo 3.1. Çalışmada timus dokuları kullanılan hasta gruplarına ait bilgiler. Antikor bilgilerine ulaşılamayan MG hastaları ve histolojik sınıflandırma bilgilerine ulaşılamayan timomalı hastalarda ilgili kısımlar boş bırakılmıştır.

HASTA NO	CİNSİYET	YAŞ	ANTİKOR	HİSTOLOJİK SINIFLANDIRMA
TİMİK HİPERPLAZİ				
1	K	26	-	-
2	K	34	AChR(+)	-
3	K	35	AChR(+)	-
4	E	30	-	-
5	E	34	AChR(+)	-
TİMOMA				
1	K	34	-	-
2	K	50	AChR(+)	AB
3	K	65	AChR(+)	-
4	K	34	AChR/AntiMusK (-)	B2
5	K	39	AChR(+)	B3
6	K	36	AChR(+)	-
7	K	76	-	B2
8	K	67	AChR(+)	-
9	E	48	AChR(+)	B3
10	E	35	AChR(+)	AB
11	E	49	AChR(+)	Malign Timoma
12	E	54	AChR(+)	-
13	E	67	-	B2B3
14	E	49	AChR(+)	-
15	E	46	-	B2
16	E	54	-	B2B3
17	E	64	-	-
18	E	40	AChR(+)	-
19	E	45	AChR(+)	Kapsüllü, Sınırlı
20	E	65	-	B2B3
21	E	61	AChR(+)	-
22	E	49	AChR(+)	Malign Timoma

Tablo 3.2. Çalışmada timus dokuları kullanılan kontrol bireylere ait bilgiler

BİREY NO.	CİNSİYET	YAŞ
YAŞIYLA UYUMLU TIMUS DOKUSU		
1	K	25
2	K	17
3	K	42
4	K	12
5	K	30
6	K	18
7	K	44
8	K	42
9	K	41
10	E	46



Şekil 3.1. Hasta ve kontrol bireylere ait yaş aralıklarının grafik halinde gösterimi.

3.2. TRAIL Ligand ve Reseptör Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi

Kullanılan Antikorlar:

Primer Antikorlar

TRAIL Ligand ve Reseptör Primer Antikor Seti (ProSci, PSI1801) içeriği:

- TRAIL Antikoru (tavşanda geliştirilmiş, poliklonal)
- DR4 Antikoru (tavşanda geliştirilmiş, poliklonal)
- DR5 Antikoru (tavşanda geliştirilmiş, poliklonal)
- DcR1 Antikoru (tavşanda geliştirilmiş, poliklonal)
- DcR2 Antikoru (tavşanda geliştirilmiş, poliklonal)

Sekonder Antikor

Tavşana karşı geliştirilmiş IgG1 sekonder antikor (Thermo 31548, HRP konjuge)

TRAIL ligandına yönelik primer antikor 1X Fosfat Tampon Solusyonu (PBS) içinde 1/25 oranında, TRAIL reseptörlerine yönelik primer antikorlar ise 1/50 oranında sulandırılarak kullanıldı. Sekonder antikor, 1/200 oranında sulandırıldı.

Kullanılan Solusyonlar:

Fosfat Tampon Solusyonu (10X Phosphate Buffer Saline, PBS):

160 g NaCl (Sigma), 40 g KCl (Sigma), 57,6 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 4.8 g KH₂PO₄ (Sigma) tartılarak 1,5 lt distile suda (dH₂O) çözdürüldü. Solusyonun pH'sı 10M NaOH ile pH 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 2 lt'ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi ve stok solüsyon hazır hale getirildi. Deneysel aşamalarda, 10XPBS'ten 100ml alınarak 1 lt'lik hacime dH₂O ile tamamlanarak hazırlanan 1XPBS solüsyonu kullanıldı.

Sitrik Asit Solüsyonu:

2,1 g sitrik asit monohidrat (Sigma), 900 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü ve 10M NaOH ilave edilerek solüsyonun pH'sı 6'ya ayarlandı. Solusyonun toplam hacmi dH₂O ile 1 lt'ye tamamlandı.

Kromojen (Thermo):

Large Volume DAB (Diaminobenzidin) Substrate, DAB kromojen (Thermo) ile 4:100 oranında karıştırılarak kullanıldı.

UltraV Blok (Thermo):

Doğrudan örnekler üzerine uygulandı.

Peroksit Blok (Thermo):

Doğrudan örnekler üzerine uygulandı.

THERMO Shandon Finesse 325 Mikrotom Cihazı'nda 5 mikron kalınlığında alınan kesitler, boyama işlemlerine geçilmeden önce en az 3 gün bekletildi. Boyamaların yapılacağı gün kesitler 1 ila 1,5 saat süreyle 60°C'de etüvde tutuldu. Kesitler daha sonra %100'lük ksilolde iki kez 5'er dakika tutularak şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Rehidratasyon için kesitler sırasıyla %100, %90, %80, ve %70'lik alkol serilerinde 5'er dakika, ve ardından 5 dakika dH₂O'da tutuldu. Dokudaki antijenlerin açığa çıkarılması amacıyla sitrat tamponu kullanıldı. Bunun için, 500 ml sitrat tamponu içine konulan kesitler, mikrodalga fırında 500W'de 6 dakika kaynatıldı ve 30 dakika süreyle oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Kesitler yeterince soğuduğunda 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Daha sonra, kesitler nemli boyama kutusu içine dizildi ve dokuların etrafı pap-pen ile çizilerek sınırlandırıldı. Bu aşamayı takiben dokuların üzerine peroksidad eklendi ve oda ısısında 25 dakika bekletildikten sonra 2 kez PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra dokuların üzerini kapatacak şekilde UV Block Solusyonu eklenerek 10 dakika oda ısısında tutuldu. UV Block'un uzaklaştırılması sonrasında sulandırılan primer antikor

eklendi ve gece boyu +4°C’de (buzdolabı ortamında) bırakıldı. Primer antikor ile inkübasyon sonrasında preparatlar 3 kez 5’er dakika PBS ile yıkandı. Bunu takiben sekonder antikor eklendi ve 1 saat süreyle oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi ve sonrasında 3 kez 5’er dakika PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Daha sonra dokuların üzerine 1/25 oranında sulandırılarak hazırlanan DAB solüsyonu eklendi ve 3 dakika bekletildikten sonra dH₂O ile yıkama yapıldı. Hücre çekirdeklerinin boyanması amacıyla preparatlar 10 saniye süreyle hematoksilene daldırıldıktan sonra distile su ile yıkama yapıldı. Kurumamasına özen gösterilen dokular, daha sonra sırasıyla %70, %80, %90, ve %100’lük çıkış alkol serilerinden geçirildikten sonra iki kez %100’lük ksilole daldırıldı ve entellan damlatılarak üzerleri lamel ile kapatıldı.

3.3. TRAIL Ligand ve Reseptör Boyamalarının Analizi

Dokulardaki TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon oranlarının belirlenmesi için, boyamalar yoğunluk ve dağılım açısından ayrı ayrı değerlendirildi [60]. Toplam immun boyama skoru, yoğunluk ve dağılım skorlarının toplamı ile elde edildi.

Boyanmanın yoğunluğunun değerlendirilme şekli:

- 0, negatif
- 1, zayıf
- 2, orta
- 3, güçlü

Dağılımın değerlendirilme şekli:

- 0, <%10
- 1, %10-40
- 2, %40-70
- 3, >%70

3.4. Aktif NFkB Oranlarının İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi

NFkB’nin p65 alt ünitesinin fosforilasyonunun, p65 transkripsiyonel aktivitesini artırdığı bilinmektedir. Fosforillenmiş alt üniteye yönelik primer antikor kullanılarak dokulardaki aktif NFkB oranları belirlendi.

Primer Antikor

Primer antikor olarak, p-NFkB 65 (Ser 276): sc-101749 kullanıldı. Serin 276 bölgesinden fosforillenmiş NFkB’yi tanıyan antikor, PBS ile 1/30 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Sekonder Antikor

Tavşana karşı geliştirilmiş IgG1 sekonder antikor (Thermo 31548, HRP konjuge), PBS ile 1/200 oranında sulandırılarak kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar ve Metodoloji:

Fosfat Tampon Solüsyonu (10X Phosphate Buffer Saline, PBS), Sitrik Asit Solüsyonu, Kromojen, Ultra V Blok (Thermo), ve Peroksit Blok (Thermo), yukarıda TRAIL ligand ve reseptör antikorları için tanımlanan şekilde hazırlanmış ve uygulanmıştır.

3.5. Aktif NFkB Boyamalarının Analizi

Aktif Fosfo-p65 ünitesinin ekspresyon oranları, sitoplazmik ve/veya nükleer olarak pozitif sonuç veren hücrelerin 400X büyütme mikroskop altında sayılan toplam hücrelere oranı ile belirlendi.

3.6. Apoptotik Hücre Oranlarının Belirlenmesi için TUNEL Uygulaması

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling (TUNEL), DNA kırıklarının *in situ* olarak saptanabilmesini sağlayan bir yöntemdir [61]. Bu yöntemde, apoptoza giden hücrelerde meydana gelen DNA kırıklarındaki serbest 3'-OH uçları, işaretli nükleotitlerle enzimatik olarak (terminal deoksinnükleotidil transferaz aracılığıyla) tanımlanır. Tek zincirde veya çift zincirde mevcut olabilen bu kırıklar, çoğu zaman morfolojik olarak da ayırt edilebilen apoptotik nükleus ve apoptotik cisimciklerde bulunurlar.

Kullanılan Kit:

ApopTag Plus Peroksidaz *In Situ* Apoptoz Belirleme Kiti, (Milipore, S7101)

Kit içeriği:

Stop Wash Buffer (Sonlandırıcı Yıkama Tamponu)

1 ml tampon, 34 ml dH₂O'da çözündürülerek hazırlandı.

Reaksiyon Tamponu ve TdT Enzimi

77 µl reaksiyon tamponu ile 33 µl TdT enzim ependorf tüp içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

Anti-Digoksinin Peroksidaz

Doğrudan örnekler üzerine, dokuların üzerini kapatacak şekilde uygulandı.

Dengeleme Tamponu

Doğrudan örnekler üzerine, dokuların üzerini kapatacak şekilde uygulandı.

DAB Substrat ve DAB Dilüsyon Tamponu

147 µl DAB Dilüsyon Tamponu 3µl DAB substrat ile karıştırılarak hazırlandı.

Kit içeriği dışında kullanılan solusyonlar:

Fosfat Tampon Solüsyonu (10XPBS)

117 g NaCl (Sigma), 55 g Na₂HPO₄ (Sigma), 13.5 g KH₂PO₄ (Sigma), 40 g KCl (Sigma), 900 ml dH₂O'da çözündürüldü. Solüsyonun pH'sı 10M NaOH ile pH 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 lt'ye tamamlanacak şekilde dH₂O eklendi ve stok solüsyon hazır hale getirildi. DeneySEL aşamalarda, 10XPBS'ten 100ml alınarak 1 lt'lik hacime dH₂O ile tamamlanarak hazırlanan 1XPBS solüsyonu kullanıldı.

Proteinaz K

Yaklaşık 2 mg proteinaz K (Sigma), 10 ml PBS içerisinde çözündürüldü ve 200 µg/ml stok hazırlandı. Deneyde kullanımı için 1/10 sulandırıldı.

Metil Yeşili (Sigma)

Metil yeşilinin çözündürülebilmesi için 0.1M sodyum asetat hazırlandı. Bunun için, 136 gr sodyum asetat (Sigma) 80 ml dH₂O'da çözündürülüp pH'sı glasiyal asetik asit ile pH:4'e ayarlandıktan sonra dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Bunu takiben %0.5 metil yeşili, hazırlanan 0.1M sodyum asetat içerisinde çözündürüldü, ve 0.45 µl filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Hidrojen Peroksit (Merck)

Oda sıcaklığında saklanan 4 ml %30 hidrojen peroksit (Merck) ile 36 ml PBS karıştırılarak toplamda 40 ml stok solusyon hazırlandı.

Parafine gömülü dokulardan alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitler, boyamalar öncesinde 1.5 saat 60°C'de etüvde tutuldu. Şeffaflandırma işlemi için iki kez %100'lük ksilol'de 7'şer dakika tutuldu. Rehidratasyon işlemi için %100'lük etil alkol'de 5'er dakika tutuldu, ardından da sırasıyla %95 ve %70 alkol serilerinde 3'er dakika tutularak rehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Kesitler daha sonra 5 dakika PBS'te yıkandı. Ardından dokuların etrafı pap-pen ile çizildi. Dokuların üzerine 20 µg/ml proteinaz K'dan 55 µl damlatılarak oda sıcaklığında 17 dk bekletildi. Kesitler daha sonra iki kez 2 dk dH₂O'da yıkandı. Bunu takiben kesitler %3'lük hidrojen peroksit solusyonu içinde 5 dakika bekletildi. Kesitler 2 kez 5 dk PBS'te yıkandıktan sonra üzerlerine 75 µl dengeleme tamponu damlatıldı ve ortalama 40 sn bekletildi. TdT solusyonu örneklerin üzerine 55 µl eklendi ve nemli kutu içinde 37°C etüvde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kesitler hazırlanan sonlandırıcı yıkama solusyonu içinde 10 dk bekletildi ve üç kez 1'er dk PBS'te yıkandı. Dokuların üzerine oda sıcaklığına getirilmiş antidioksigeninden 65'er µl konularak oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Daha sonra PBS ile dört kez 2'şer dakika yıkandı. Bu aşamadan sonra, dokuların üzerine DAB solusyonu eklendi ve 5 dakika bekletildi. Örnekler daha sonra üç kez 1'er dk dH₂O'da bekletilerek reaksiyon durduruldu ve metil yeşili eklendi. Boyanın dokulara nüfuz etmesi için 5 dakika bekletildi. Kesitler daha sonra on kez dH₂O'da yıkandı ve temiz dH₂O içinde 30 saniye tutuldu. Bunu takiben, 20 kez N-bütanole daldırılıp çıkarıldı ve üç kez 2'şer dakika ksilolde bekletildikten sonra örnekler entellan ile kapatıldı.

3.7. TUNEL Boyamalarının Analizi

Kullanılan Milipore marka ApopTag Plus Peroksidaz *In Situ* Apoptoz Tespit kitindeki işaretleme yöntemine bağlı olarak pozitif reaksiyonlar ışık mikroskobu altında analiz edildi. Apoptotik indeks, boyanan hücrelerin sayılan toplam hücrelere oranı ile belirlendi. Bir hasta için 10 farklı alan tarandı ve ortalama değerler elde edildi. Analizlerde hücrelerin apoptotik morfolojisi de dikkate alındı. TUNEL kiti ile pozitif reaksiyon veren, aynı zamanda apoptotik morfoloji sergileyen hücrelerde boyama pozitif olarak değerlendirildi.

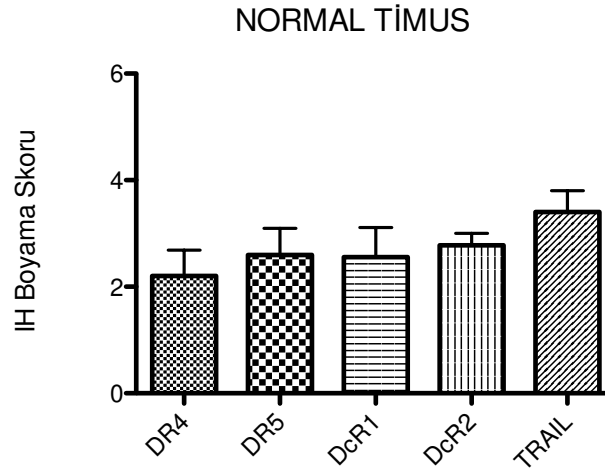
3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için, SPSS istatistik programı kullanıldı. Genel olarak, normal dağılım göstermeyen grup skorlarımızın değerlendirmesinde, Kruskal-Wallis testi ile varyans analizi yapıldı, bunu takiben de Mann Whitney U testi ile, grupların ortalama skorları, ikili gruplar halinde değerlendirildi. İstatistiksel açıdan önemli farklılıkların güven aralıkları, şekil açıklamalarında verilmiştir.

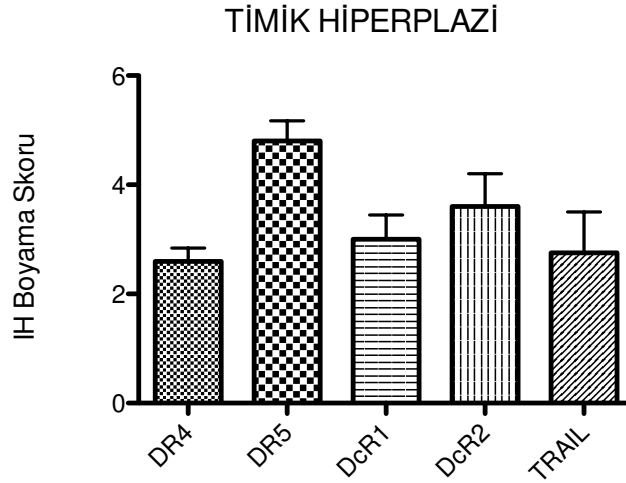
BULGULAR

4.1. Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon oranları belirlendi.

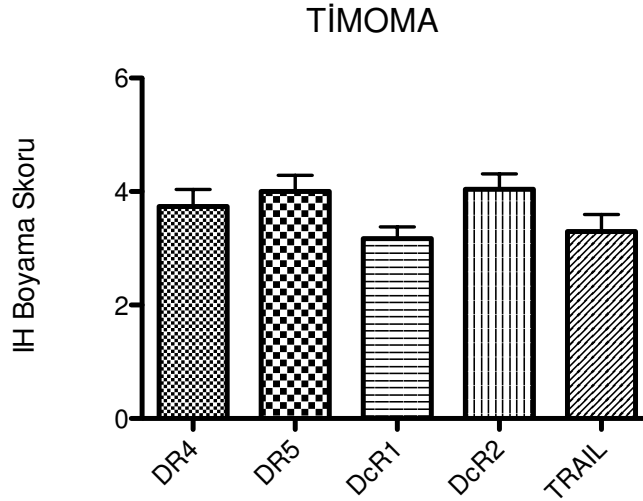
TRAIL ligandı ve reseptörlerine yönelik antikorlar kullanılarak timik hiperplazi, timoma, ve normal timus dokularında immunohistokimyasal analizler gerçekleştirildi. Her üç dokuda da TRAIL ligand ve reseptörlerinin belirgin oranlarda sentezlendiği görüldü. Normal timus dokusunda özellikle TRAIL molekülünün diğer markerlardan daha fazla eksprese edildiği gözlemlendi, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.1). Timik hiperplazi dokusunda DR5 reseptörünün en yüksek oranda ifade edildiği, en düşük oranda ifade edilen reseptörün ise DR4 olduğu gözlemlendi. Yalancı reseptörlerin de belirgin oranda ekspresyonu olduğu görüldü (Şekil 4.2). Timoma dokusunda ise her 5 marker'ın ekspresyonunun da genel olarak yüksek seviyede seyrettiği belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Normal timus dokusunda TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri. Hata çubukları, $\pm$ SEM değerlerini ifade etmektedir.



Şekil 4.2. Timik hiperplazi dokusunda TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri. Hata çubukları, $\pm$ SEM değerlerini ifade etmektedir. IH: Immunohistokimya.



Şekil 4.3. Timoma dokusunda TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri. Hata çubukları, $\pm$ SEM değerlerini ifade etmektedir.

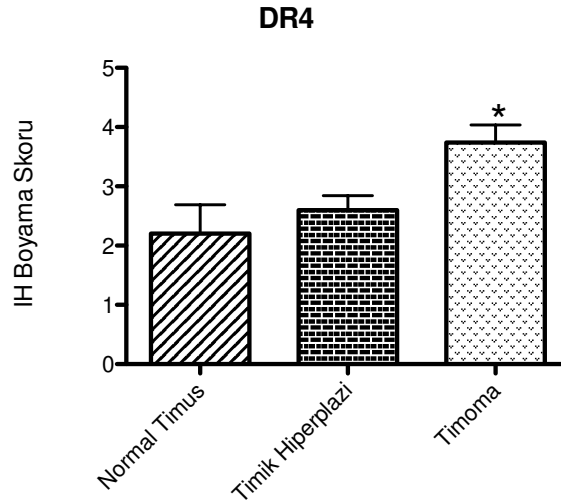
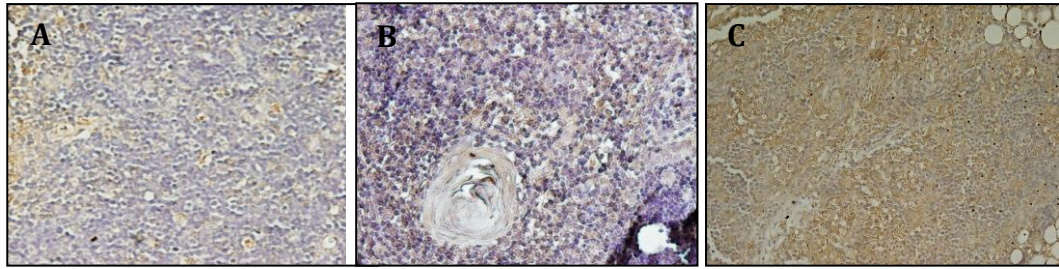
4.2. DR4 ölüm reseptörünün timomada normal timus dokusuna kıyasla anlamlı oranda yüksek ifade edildiği gözlemlendi.

TRAIL ölüm reseptörlerinden biri olan DR4'e karşı kullanılan primer antikorlar ile, bu molekülün normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularındaki ekspresyon oranları belirlendi. Timik hiperplazi dokusunda elde edilen sonuçlar ile normal timus dokusunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, DR4 ekspresyon seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Timoma dokusunda belirlenen DR4 oranları ise, normal timus dokusunda belirlenen oranlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Tablo 4.1, Şekil 4.4).

Tablo 4.1. Dokulardaki DR4 ekspresyonunun istatistiksel değeri. Solda, timik hiperplazi ile normal timus dokusunda belirlenen DR4 ekspresyon oranlarının, sağda ise timoma ile normal timus dokusunda belirlenen DR4 ekspresyonlarının Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırma sonuçları bulunmaktadır ($p \leq 0.05$).

Test Statistics ^b		Test Statistics ^b	
	dr4_ boyama		dr4_ boyama
Mann-Whitney U	21,000	Mann-Whitney U	53,500
Wilcoxon W	76,000	Wilcoxon W	108,500
Z	-,522	Z	-2,507
Asymp. Sig. (2-tailed)	,602	Asymp. Sig. (2-tailed)	,012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,679 ^a	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,014 ^a

a. Not corrected for ties.



Şekil 4.4. Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında DR4 ekspresyonları. Üst panelde (A) normal timus dokusu, (B) timik hiperplazi, (C) timoma dokularındaki boyamalara ilişkin temsili resimler görülmektedir. Alt panelde, immunohistokimyasal boyama sonuçlarının kantitatif analizi verilmiştir. Hata çubukları, $\pm$ SEM değerlerini ifade etmektedir. * $p \leq 0.05$

4.3. DR5 ölüm reseptörünün, timik hiperplazi ve timoma dokularında normal timus dokusuna göre anlamlı oranda fazla ifade edildiği gözlemlendi.

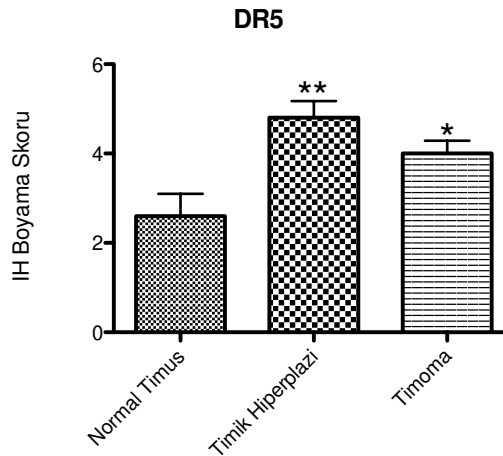
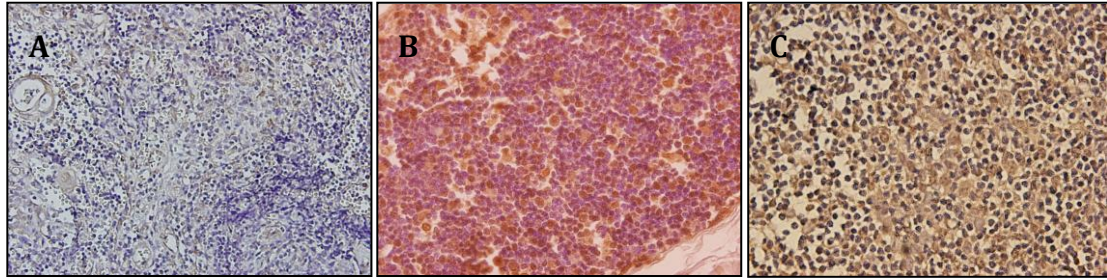
Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularındaki DR5 ekspresyon oranları, immunohistokimyasal analizlerle belirlendi. Hem timik hiperplazi hem de timoma dokularındaki DR5 ekspresyonunun, normal timusa göre istatistiksel açıdan anlamlı oranda yüksek olduğu, ancak timik hiperplazideki farkın daha yüksek seyrettiği, ve istatistiksel anlamlılık açısından güven aralığının daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p \leq 0.01$) (Tablo 4.2, Şekil 4.5).

Tablo 4.2. Dokulardaki DR5 ifade seviyelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması. Solda, timik hiperplazi ile normal timus dokusunda belirlenen DR5 ekspresyon oranlarının, sağda ise timoma ile normal timus dokusunda belirlenen DR5 ekspresyon seviyelerinin Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırma sonuçları bulunmaktadır.

Test Statistics ^b		Test Statistics ^b	
	dr5_boyama		dr5_boyama
Mann-Whitney U	4,000	Mann-Whitney U	58,000
Wilcoxon W	59,000	Wilcoxon W	113,000
Z	-2,666	Z	-2,291
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008	Asymp. Sig. (2-tailed)	.022
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.025 ^a

a. Not corrected for ties.

a. Not corrected for ties.



Şekil 4.5. Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında DR5 ekspresyonları. Üst panelde (A) normal timus, (B) timik hiperplazi, (C) timomadaki boyamalara ilişkin temsili resimler görülmektedir. Alt panelde, immunohistokimyasal boyama sonuçlarının kantitatif analizi verilmiştir. Hata çubukları, $\pm$ SEM değerlerini ifade etmektedir. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

4.4. Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında DcR1 reseptörünün sentez seviyesi açısından anlamlı fark gözlenmedi.

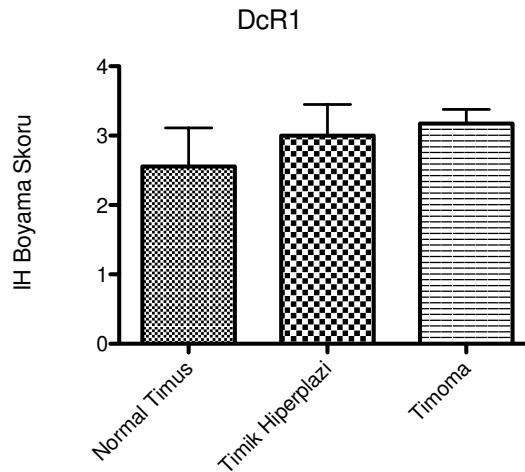
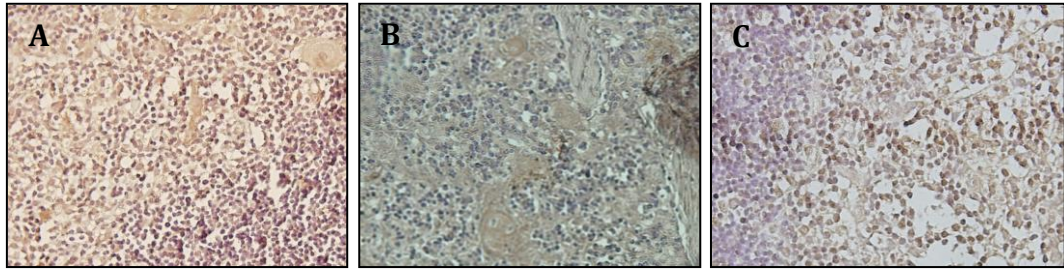
DcR1'e yönelik primer antikorlarla, normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında immunohistokimyasal analizler gerçekleştirildi. Yalancı reseptör DcR1'in, her üç dokuda da belirgin oranda sentezlendiği gözlemlendi, ancak yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, üç dokudaki ekspresyon oranları arasında anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 4.3, Şekil 4.6).

Tablo 4.3. Dokulardaki DcR1 ekspresyon oranlarının istatistiksel değerlendirmesi. Solda, timik hiperplazi ile normal timus dokusunda belirlenen DcR1 ekspresyon oranlarının, sağda ise timoma ile normal timus dokusunda belirlenen DcR1 ekspresyonlarının karşılaştırılması amacıyla uygulanan Mann-Whitney U Testi'ne ilişkin sonuçlar gözlenmektedir.

Test Statistics ^b		Test Statistics ^b	
	dcr1 boyama		dcr1 boyama
Mann-Whitney U	20,000	Mann-Whitney U	86,500
Wilcoxon W	65,000	Wilcoxon W	131,500
Z	-,344	Z	-,751
Asymp. Sig. (2-tailed)	,730	Asymp. Sig. (2-tailed)	,453
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,797 ^a	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,483 ^a

a. Not corrected for ties.

a. Not corrected for ties.



Şekil 4.6. Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında DcR1 ekspresyonları. Üst panelde (A) normal timus, (B) timik hiperplazi, (C) timomadaki boyamalara ilişkin temsili resimler görülmektedir. Alt panelde, immunohistokimyasal boyama sonuçlarının kantitatif analizi verilmiştir. Hata çubukları, $\pm$ SEM değerlerini ifade etmektedir.

4.5. DcR2 yalancı reseptör ekspresyonunun, timomada normal timus dokusuna oranla daha yüksek oranda ifade edildiği gözlemlendi.

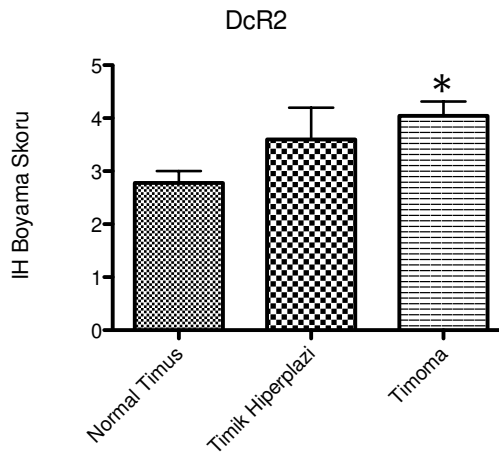
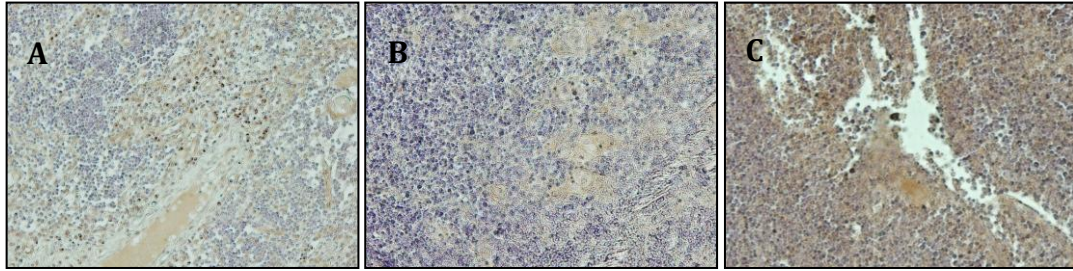
DcR2 reseptörüne yönelik immunohistokimyasal analizler sonucu, timomada DcR2 ekspresyonunun, normal timus dokusuna oranla daha yüksek seyrettiği gözlemlendi. DcR2 ekspresyonu açısından, timik hiperplazi ile normal timus dokusu arasında anlamlı farklılık belirlenmedi (Tablo 4.4, Şekil 4.7).

Tablo 4.4. Dokulardaki DcR2 ekspresyon oranlarının istatistiksel açıdan karşılaştırılması. Solda, timoma ile normal timus dokusunda belirlenen DcR2 ekspresyon oranlarının, sağda ise timik hiperplazi ile normal timus dokusunda belirlenen DcR2 ekspresyonlarının Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırma sonuçları bulunmaktadır.

Test Statistics ^b		Test Statistics ^b	
	dcr2_boyama		dcr2_boyama
Mann-Whitney U	45,000	Mann-Whitney U	46,000
Wilcoxon W	90,000	Wilcoxon W	61,000
Z	-2,556	Z	-,714
Asymp. Sig. (2-tailed)	,011	Asymp. Sig. (2-tailed)	,475
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,013 ^a	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,521 ^a

a. Not corrected for ties.

a. Not corrected for ties.



Şekil 4.7. Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında DcR2 ekspresyonları. Üst panelde (A) normal timus, (B) timik hiperplazi, (C) timomadaki boyamalara ilişkin temsili resimler görülmektedir. Alt panelde, immunohistokimyasal boyama sonuçlarının kantitatif analizi verilmiştir. Hata çubukları, $\pm$ SEM değerlerini ifade etmektedir.

4.6. Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokuları arasında TRAIL ekspresyonu açısından anlamlı farklılık gözlenmedi.

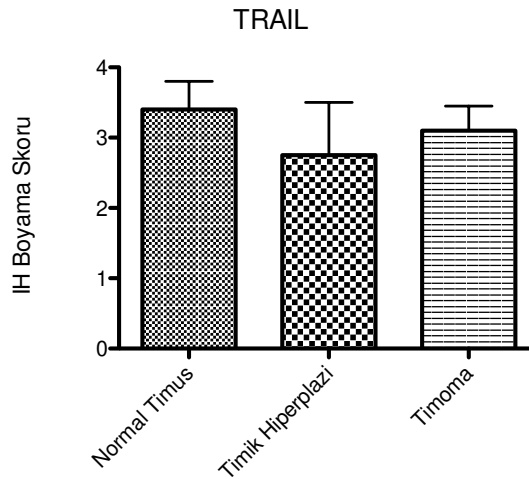
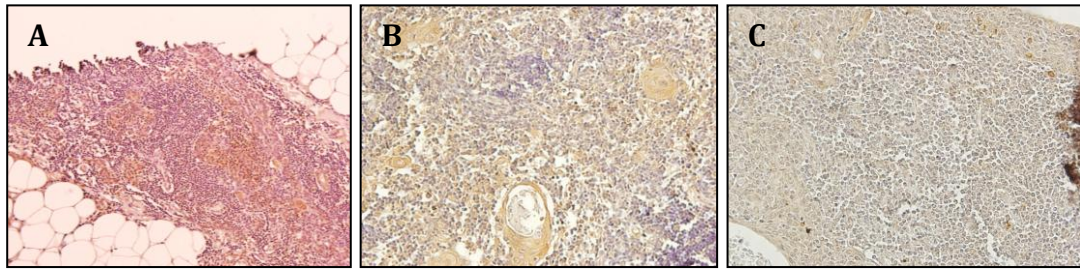
Her üç doku tipinde de önemli oranda sentezlendiği belirlenen TRAIL molekülünün, dokulardaki ifade seviyesinin anlamlı oranda farklılık göstermediği görüldü (Tablo 4.5, Şekil 4.8).

Tablo 4.5. Dokulardaki TRAIL ekspresyon oranlarının istatistiksel yöntemlerle karşılaştırılması. Solda, timik hiperplazi ile normal timus dokusunda belirlenen TRAIL ekspresyon oranlarının, sağda ise timoma ile normal timus dokusunda belirlenen TRAIL ekspresyonlarının Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırma sonuçları bulunmaktadır.

Test Statistics ^b		Test Statistics ^b	
	trail_boyama		trail_boyama
Mann-Whitney U	6,500	Mann-Whitney U	45,500
Wilcoxon W	16,500	Wilcoxon W	255,500
Z	-,912	Z	-,317
Asymp. Sig. (2-tailed)	,362	Asymp. Sig. (2-tailed)	,751
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,413 ^a	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,767 ^a

a. Not corrected for ties.

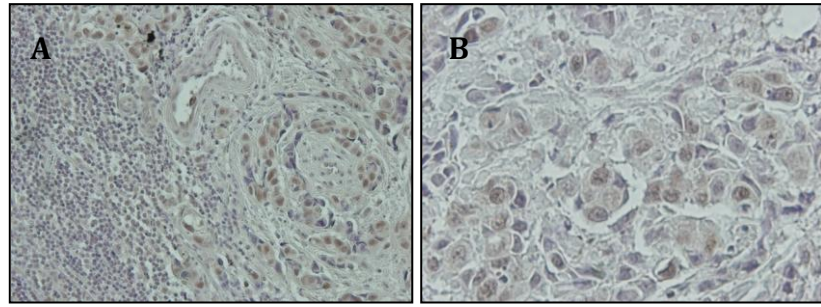
a. Not corrected for ties.



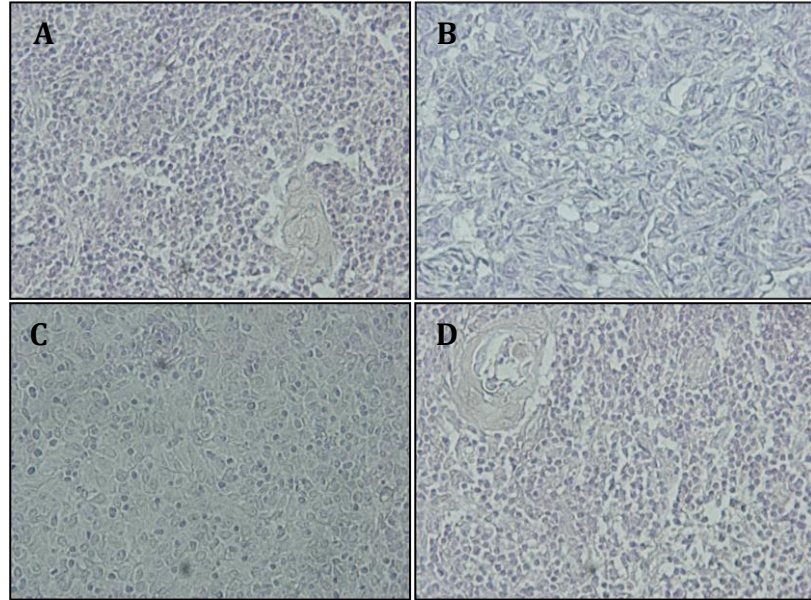
Şekil 4.8. Normal timus, timik hiperplazi, ve normal timus dokularında TRAIL ekspresyonları. Üst panelde (A) normal timus, (B) timik hiperplazi, (C) timomadaki boyamalara ilişkin temsili resimler görülmektedir. Alt panelde, immunohistokimyasal boyama sonuçlarının kantitatif analizi verilmiştir. Hata çubukları, $\pm$ SEM değerlerini ifade etmektedir.

4.7. Timik hiperplazi ve timoma dokularında NFkB molekülünün fosforillenmiş aktif formuna rastlanmadı.

Nuclear Factor kappa B (NFkB) molekülü, uyarılmamış halde iken hücre sitoplazmasında inaktif halde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Aktive olduğunda nukleusa geçer ve burada immünite, büyüme, inflamasyon, ve apoptozu denetleyen 200'ün üzerinde genin transkripsiyonel regülasyonunu gerçekleştirir [62]. Dokularda aktif (fosforile) NFkB oranlarının belirlenmesi amacıyla, fosforile p65 ünitesine karşı antikorlar kullanılarak immunohistokimyasal analiz yapıldı. NFkB'nin sürekli aktif konumda olduğu bilinen meme kanser dokusunda aktif NFkB'ye yönelik boyamalar gerçekleştirilerek pozitif kontrol oluşturuldu (Şekil 4.9). Aynı şartlarda yapılan immunohistokimyasal deney ve analizler, timik hiperplazi, timoma, ve normal timus dokularında NFkB'nin aktif halde bulunmadığını gösterdi (Şekil 4.10).



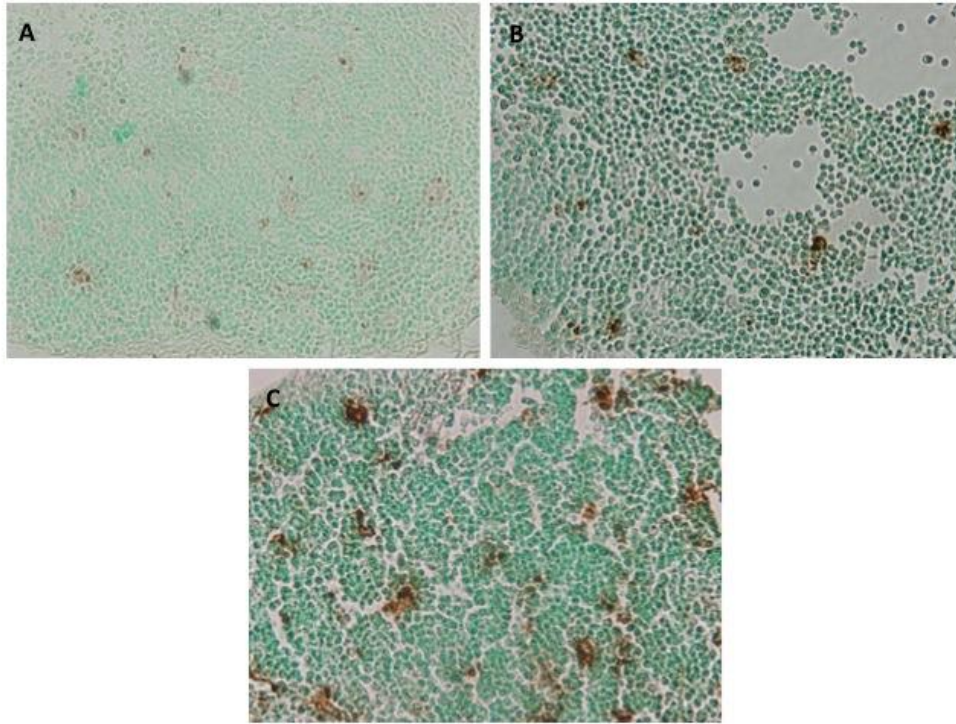
Şekil 4.9. Pozitif kontrol olarak meme dokusunda NFkB ekspresyonunun gösterilmesi. A) 200X büyütme, B) 400X büyütme.



Şekil 4.10. Farklı dokulardaki NFkB boyamalarının sonuçları. A) Negatif kontrol, B) Timik hiperplazi, C) Timoma, D) Normal timus dokusunda gerçekleştirilen aktif NFkB boyamalarına yönelik temsili resimler görülmektedir.

4.8. MG hastalarının timus dokularındaki apoptotik indeks, kontrol timus dokularına oranla daha yüksek bulundu.

Timik hiperplazili ve timomalı Myasthenia Gravis (MG) hastalarının timus dokularında ve normal timus dokularındaki apoptotik hücre oranlarının belirlenebilmesi, ve bu oranların TRAIL ligandının ekspresyon oranları ile olası korelasyonlarının araştırılabilmesi için TUNEL testi yapıldı (Şekil 4.11). Verilen değerler, 5 timik hiperplazi, 19 timoma, ve 5 normal timus dokusundan elde edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen grup skorlarının değerlendirmesinde, parametrik olmayan tek yönlü varyans analizi (Kruskal-Wallis) testi uygulandı. Bunu takiben, gruplar arasında iki ortalama değer arası farkın değerlendirilmesini sağlayan Mann-Whitney U testi uygulandı. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda, timik hiperplazili grup ile kontrol grubu arasında, ve timomalı grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü (sırasıyla $p=0,045$; $p=0.002$). Timoma ile normal timus dokusu arasındaki istatistiksel fark, timik hiperplazili hastalara göre daha belirgindi (Tablo 4.6, Şekil 4.12). Timik hiperplazi ile timoma arasında ise, apoptotik hücre oranı açısından anlamlı fark gözlenmedi.



Şekil 4.11. Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularındaki apoptotik hücrelerin gösterilmesi. A) Normal timus dokularında gerçekleştirilen TUNEL boyamaları ile ilişkili örnek resim B) Timik hiperplazili dokularda gerçekleştirilen TUNEL boyamaları ile ilişkili örnek resim; C) Timomalı dokularda gerçekleştirilen TUNEL boyamaları ile ilişkili örnek resim

Tablo 4.6. Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında apoptotik hücre oranlarının gösterilmesi. (A) Normal timus ile timik hiperplazi dokularındaki sonuçların, (B) Normal timus ile timoma dokularındaki sonuçların, (C) Timik hiperplazi ile timoma dokularındaki sonuçların karşılaştırılması.

Test Statistics ^b		Test Statistics ^b	
A	tunel	B	tunel
Mann-Whitney U	4,000	Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	25,000	Wilcoxon W	29,000
Z	-2,008	Z	-3,118
Asymp. Sig. (2-tailed)	,045	Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,052 ^a	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: siniflandirma

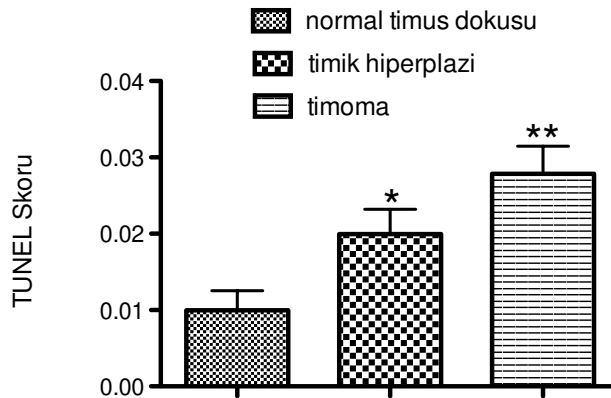
a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: siniflandirma

Test Statistics ^b	
C	tunel
Mann-Whitney U	29,000
Wilcoxon W	44,000
Z	-1,315
Asymp. Sig. (2-tailed)	,189
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,208 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: siniflandirma



Şekil 4.12. Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında apoptotik hücre oranlarının grafik şeklinde gösterimi. Timomalı hastalardan alınan timus dokuları ile timik hiperplazili hastalardan alınan timus dokularında, normal timus dokularına oranla apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak önemli farklılık gözlenmiştir. *p=0.045, **p=0.002

4.9. Normal timus dokusundaki TRAIL ligand ekspresyon oranları, apoptotik hücre oranları ile korelasyon gösterdi.

Normal timus, timik hiperplazi, ve timoma dokularında, apoptotik hücre oranlarının TRAIL ligand ekspresyonu ile korelasyon gösterip göstermediğinin belirlenmesi için Spearman Rho korelasyon testi uygulandı. Normal timus dokusundaki TRAIL ligand ekspresyon oranların dokudaki apoptotik hücre oranı ile korelasyon gösterdiği gözlenirken, timik hiperplazi ve timoma dokularında benzer bir korelasyona rastlanmadı.

Tablo 4.7. Apoptotik hücre oranlarının TRAIL ekspresyon oranları ile korelasyon dereceleri. Birinci tablo normal timus dokusuna ilişkin Spearman Rho korelasyon test sonuçlarını gösterirken, ikinci tablo timik hiperplazi dokusunda elde edilen sonuçların, üçüncü tablo ise timoma dokusunda elde edilen sonuçların korelasyon değerlendirmelerini göstermektedir.

Correlations			tunel	trail_boyama
Spearman's rho	tunel	Correlation Coefficient	1,000	-,258
		Sig. (2-tailed)	.	,742
		N	6	4
	trail_boyama	Correlation Coefficient	-,258	1,000
		Sig. (2-tailed)	,742	.
		N	4	5

Correlations			tunel	trail_boyama
Spearman's rho	tunel	Correlation Coefficient	1,000	,775
		Sig. (2-tailed)	.	,225
		N	5	4
	trail_boyama	Correlation Coefficient	,775	1,000
		Sig. (2-tailed)	,225	.
		N	4	4

Correlations			tunel	trail_boyama
Spearman's rho	tunel	Correlation Coefficient	1,000	,349
		Sig. (2-tailed)	.	,185
		N	19	16
	trail_boyama	Correlation Coefficient	,349	1,000
		Sig. (2-tailed)	,185	.
		N	16	20

TARTIŞMA

Myasthenia gravis (MG), kas güçsüzlüğü ile karakterize olan otoimmün temelli nadir bir nöromusküler hastalıktır [1]. MG, hastalık belirtilerinin farklı yaşlarda ortaya çıkması, farklı otoantikör profillerinin gözlenmesi, ve hastalığa eşlik eden timik patolojiler dolayısıyla heterojen yapıdadır [13]. Hastalığın gelişiminde önemli rolü olduğu düşünülen timus, organizmada T hücre repertuarının oluşturulduğu kompleks bir organdır. Timusta olgunlaşan timositler pozitif seleksiyonla periferik taşınırken, organizmanın kendi antijenlerini yüksek afinite ile tanıyan timositler ise negatif seleksiyona uğrar ve apoptoz aracılığıyla elimine edilir [28, 63].

MG hastalık sürecine sıklıkla timik hiperplazi (%40-70) ve timomanın (%10-15) eşlik ettiği, ve timektominin birçok hastada semptomların gerilemesini sağladığı bilinmektedir. Ancak timusun MG gelişimindeki rolüne yönelik mekanizma henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır, ve timusun hastalığın hangi evresinde önemli olduğu bilinmemektedir. Timusta MG sürecinde normal timusa kıyasla belirlenebilecek her farklılık, bu sürecin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bu nedenle çalışmamızda normal timus yanında, timik hiperplazili ve timomalı MG hastalarından alınarak arşivlenmiş olan timus örnekleri kullanılarak, timus biyolojisinde ve MG gelişiminde önemli rolü olduğu düşünülen TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand'ın (TRAIL) ve transmembran reseptörlerinin ekspresyon profilleri belirlendi. İnsan organizması için önemli diğer biyolojik moleküller gibi, immün sistemde önemli görevleri olan TRAIL'in fonksiyonunun da farklı hücrelerde farklı zaman ve koşullara göre değişmesi, kendisinin ve reseptörlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler ile yakından ilişkilidir. Gerek farklı hastalıkların oluşum mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesinde, gerekse TRAIL molekülünü içeren terapötik yaklaşımlarda, bu molekülün ve ilgili reseptörlerinin ekspresyon düzeyleri, özellikle TRAIL'in fonksiyonlarını indükleyen veya inhibe eden moleküllerle birlikte değerlendirildiğinde anlamlı olmaktadır.

Birçok kanser hücresinde seçici olarak apoptozu indüklediği bilinen, sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler tarafından hedeflerini elimine etmek için kullanılan TRAIL'in farklı dokularda henüz tanımlanmamış rolleri olabileceği düşünülmektedir [42]. Bunun en önemli nedeni, bu molekülün hem ligand hem de reseptör seviyesinde normal dokuların büyük çoğunluğunda ifade edilmesidir. Buna zıt olarak, TNF ailesinin diğer üyeleri, dokularda genellikle geçici olarak ve sıkı regülasyon altında ifade edilir. Örneğin TRAIL'in, primer insan vasküler endotel hücrelerinde (HUVEC) proanjyogenik etki gösterdiği [64], Akt ve ERK yollarını aktive ederek sağkalımı ve proliferasyonu indüklediği gösterilmiştir [65]. TRAIL'in timus biyolojisinde de henüz açığa çıkarılmamış önemli rolü olabileceği, özellikle timosit sayılarının regülasyonundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir [28, 46]. Normal timusta TRAIL'in potansiyel rolü henüz tartışmalıdır. Ancak örneğin TRAIL

ekspresyonunun olmadığı knockout farelerde timosit apoptozu gerçekleşmemiştir [43]. Öte yandan, timositlerde TRAIL bağlanması sonucu direk eliminasyon gözlenmemekle birlikte, TRAIL eksprese etmeyen timositlerin mitokondri aracılı apoptoza duyarlılıklarının azaldığı bildirilmiştir [45]. Bunun yanında, insan periferel T hücrelerinin TRAIL aracılı apoptoza dirençli olduğu, ancak timositler uyarıldıklarında hücre yüzeylerinde özellikle DR4 ve DR5 ölüm reseptörlerinin artışıyla TRAIL aracılı apoptoza duyarlı hale gelebildikleri gözlenmiştir [45]. Normal timusta TRAIL ligandının ve ölüm reseptörlerinin belirgin oranda, ve orta şiddette ifade edildiğini gözledik (Şekil 4.1). Bu gözlem, hücrelerin TRAIL aracılığıyla apoptoza gittiklerini kanıtlamamakla birlikte, TRAIL aracılı apoptozun bu dokularda mümkün olduğuna işaret etmektedir. TRAIL aracılı apoptozu engelleyen iki önemli mekanizmadan biri, DcR1 ve/veya DcR2 yalancı reseptörlerinin yüksek oranda ifade edilmesi, diğeri ise, hücre içinde birçok antiapoptotik molekülün ekspresyonunu artıran NFkB molekülünün aktivitesinin yüksek olmasıdır [66]. Çalışmamızda, DcR1 ve DcR2 reseptörlerinin normal timus dokularında yüksek ekspresyonuna rastlanmamış, bunun yanında NFkB antiapoptotik molekülünün aktif halde bulunmadığı gözlenmiştir. Bu durum, TRAIL apoptotik yolunun bu hücrelerde açık olduğu, ancak belirli şartlarda gerçekleştiğini düşündürmektedir.

TRAIL'ın belli bir hücrede apoptotik etki göstermesinde önemli bir etken, hücre yüzeyinde ölüm reseptörlerinin belirli bir oranda sentezlenmesi, bunun yanında yalancı reseptör ekspresyonunun, ölüm reseptörlerinin etkisini bloke edecek kadar yüksek olmamasıdır. MG hastalarının önemli bir kısmında gözlenen foliküler timik hiperplazi, timustaki lenfoid foliküllerin ve B hücre farklılaşmasının gerçekleştiği germinal merkezlerin sayısında artış ile karakterizedir. Çalışmamızda, timik hiperplazide TRAIL ligandının ve tüm reseptörlerinin belirgin oranda sentezlendiği gözlemlendi (Şekil 4.2). Ancak genel olarak DR5 reseptörünün bu dokuda normal timusa kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda fazla eksprese edildiği görüldü (Tablo 4.2, Şekil 4.5). DR5 ölüm reseptörü, TRAIL'ın apoptotik fonksiyonu için önemli bir reseptördür. Öyle ki TRAIL'a dirençli olan birçok kanser dokusunda, DR5'in ekspresyonunu artıran ajanların, kanser hücrelerindeki TRAIL dirençliliğini kırabildiği/TRAIL'a duyarlılığı artırabildiği gözlenmiştir [67]. DR5 reseptörünün bu kadar yüksek oranda ifade edilmesi, ve yalancı reseptör ekspresyonlarının orta düzeyde olması, bunun yanında aktif NFkB ifadesine de rastlanmamış olması (Şekil 4.10), bu dokuda TRAIL aracılı apoptozun gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Timik hiperplazide, timik atrofinin engellendiği, dolayısıyla aslında normal süreçte işleyen apoptotik yollarda defekt olması gerektiği düşünüldüğünde, bulgularımız, TRAIL yolağının bu dokulardaki major apoptotik mekanizma olmadığını destekler niteliktedir.

Çalışmamızda incelenen diğer timik anomali, timomadır. Timomada kortikal epitel fonksiyonun korunduğu ve T hücre farklılaşmasının devam ettiği, ancak özellikle T hücrelerinin negatif seleksiyon mekanizmasında defekt olduğu ve buna bağlı olarak, elimine edilemeyen otoreaktif T hücrelerinin MG fenotipinin ortaya çıkmasında rol oynadığı ileri sürülmektedir [34]. Sonuçlarımız, timomada, genel olarak TRAIL ligandı ve tüm reseptörlerinin orta şiddetin üzerinde ifade edildiğini gösterdi (Şekil 4.2). Normal timus ile karşılaştırıldığında ise, DR4, DR5, ve DcR2

reseptörlerinin anlamlı oranda yüksek sentezlendiği gözlemlendi (Şekil 4.4, 4.5, 4.7). TRAIL, immun sistemin önemli bir komponentidir, ve özellikle otoimmun hastalıklarla ilişkili ve infiltrasyonun mevcut olduğu doku değişimlerinde bu molekülde ve reseptörlerinde normal dokuya göre ekspresyon farklılıklarının olması beklenebilecek bir durumdur. Timoma da, timik hiperplazi de bu tanıma uyan anomalilerdir, ve buradan yola çıkılarak, bu dokularda normal timus dokusuna kıyasla TRAIL ligand ve reseptör ekspresyonlarında değişiklik olabileceği öngörülmüştür. Bu mekanizmaya örnek olarak, tip 1 diyabet modeli NOD farelerde, pankreatik adacıklarda hasar arttıkça ve infiltrasyon ilerledikçe TRAIL ve DcR1 yalancı reseptöründe önemli oranda artış gözlenmiştir [68]. Bu durumun, infiltrasyonda rol alan ve TRAIL sentezleyen T hücrelerine karşı koruma mekanizması olabileceği ileri sürülmüştür. Hücre yüzeyinde TRAIL yalancı reseptörlerinin yüksek oranda bulunmasının, ölüm reseptörlerinin etkisini azaltabileceği bilinmektedir. Bunun yanında, timomada da, TRAIL'ın etkisini bloke edebilecek en önemli moleküllerden olan NFkB'nin aktif formu tespit edilememiştir (Şekil 4.10). TRAIL'ın bu şartlarda timomada apoptotik etkisinin olup olamayacağı, fonksiyonel testlerle netleşebilecektir. Hücre içi antiapoptotik yolların apoptozu inhibe edebilecek oranda aktif olmadığı hücrelerde, TRAIL direncinin, hücre yüzeyinde sentezlenen ölüm reseptörü oranlarının artırılması ile, veya yalancı reseptörlerin ekspresyonlarının baskılanması ile kırılabilirdiği de bilinmektedir [69, 70].

Çalışmamızda, dokularda NFkB'nin aktif formuna rastlanmaması, TRAIL apoptotik yolunun aktivitesi açısından önemlidir, çünkü NFkB, TRAIL'ın indüklediği apoptotik yolların bloke edilmesinde en etkili moleküllerden biridir. NFkB'nin, birçok antiapoptotik molekülün sentezini artırdığı bilinmektedir. Bunlara örnek olarak, bir kaspaz 8 homologu olan c-FLIP [54], DcR1 reseptörü ve anti-apoptotik Bcl-xL moleülleri [55-57], ve apoptozu inhibe edici cIAP inhibitör proteinleri [58] verilebilir. TRAIL molekülünün çeşitli kanser hücreleri üzerindeki etkisinin ve TRAIL'a dirençlilik mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda, ileri evre prostat, meme ve akciğer kanseri hücrelerinde TRAIL'ın apoptotik etkisine karşı gözlenen direnç hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyon profiline [66, 71], ve/veya NF-kB'nin hücre içi aktivasyon düzeyinin yüksek olmasına bağlanmıştır [66]. Buna uygun olarak, örneğin TRAIL'a dirençli hücrelerde yüksek ekspresyonu gözlenen DcR2 yalancı reseptörünün ekspresyonu ilgili siRNA ile bloke edildiğinde [69, 70], veya NF-kB'nin aktivasyonundan sorumlu olan IKK enzimi adenoviral vektör aracılı gen aktarımı ile inhibe edildiğinde, hücrelerin TRAIL duyarlılığı kazandığı görülmüştür [66, 72]. NF-kB anti-apoptotik yolu, TRAIL'ın kendi reseptörlerinin etkisi ile de aktive olabilmektedir. Öyle ki, her dört TRAIL transmembran reseptörünün de NF-kB aktivasyonunda görev alabildiği görülmüştür [42, 73-75]. Çalışmamızda normal timus dokusunda da anomalili timus dokularında da NFkB'nin aktif formuna rastlanmamıştır. Bu durum, TRAIL'ın olası apoptotik etkisini bloke edebilecek en önemli hücre içi mekanizmanın aktif olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızda ayrıca, timik hiperplazi ve timoma dokularında apoptotik hücre oranları, normal timusla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 4.11). İncelenen üç doku tipi arasında en yüksek apoptotik indeksin timomada

olduğu gözlemlendi. Bunun yanında, normal timustaki apoptotik hücre oranları ile TRAIL ekspresyonu arasında korelasyon belirlendi (Tablo 4.7). Normal timusun, yaşa bağlı olarak apoptotik mekanizmalar ile atrofiye uğradığı bilinmektedir. Ancak böyle bir mekanizmada, sürecin uzun yıllara yayıldığı, dolayısıyla apoptoz belirleyici testlerle ancak incelemenin yapıldığı anda tespit edilebilen apoptotik hücre oranlarının sonuca yansıtacağı göz önünde bulundurulmalıdır. TRAIL'ın farklı şartlarda timik hasara neden olabildiği bilinmektedir. Örneğin farelerde allojenik kemik iliği transplantasyonu sonrası TRAIL/DR5 interaksiyonlarının timik hasarda major rol oynadığı gösterilmiştir [76]. TRAIL'ın timositlerin negatif seleksiyonunda ileri sürülen regülatör rolü yanında, timik atrofide de rolü olabileceği düşünülmelidir. Normal timusta TRAIL ekspresyonunun yaşa göre değişip değişmediği de bu aşamada önemli olabilir. Çalışmamızda genel olarak değerlendirildiğinde bu tür bir korelasyona rastlanmamıştır. Ancak daha doğru bir değerlendirme, yakın yaşlardaki bireylere ait örnek sayılarının artırılıp gruplandırıldıktan sonra karşılaştırılması ile mümkün olabilecektir. Öte yandan, proliferasyon gerçekleşen dokularda yüksek bölünme hızına düşük veya yüksek apoptotik indeksin eşlik edebileceği, çoğalan hücre oranının apoptoza giden hücre oranından yüksek olması ile hacimsel artış veya belirli hücre bölgelerinde artış meydana gelebileceği bilinmektedir. Örneğin kanser dokusunda apoptotik indeks hasta prognozu ile ilişkilendirilebilmektedir [77]. Çalışmamızda timik hiperplazi ve timoma dokularında da yüksek apoptotik indeks belirlenmiş, ancak apoptotik indeks TRAIL ekspresyonu ile korelasyon göstermemiştir. Bu durum, bu dokularda farklı apoptotik mekanizmaların aktif olduğunu düşündürülebilir.

Bugün cerrahi timektomiye alternatif olabilecek yeni “medikal timektomi” yaklaşımlarının geliştirilmesinin, cerrahi timektominin dezavantajlarını da ortadan kaldıracabileceği düşünülmektedir. Timus, erişkin yaşamda apoptoz ile atrofiye olan, dolayısıyla apoptotik olarak elimine edilme potansiyeli yüksek olan bir dokudur. Bu durum, TRAIL molekülü kullanılarak gerçekleştirilebilecek muhtemel bir “apoptotik gen aracılı medikal timektomi” uygulamasını akla getirmektedir. TRAIL'ın normal şartlarda timositler üzerinde apoptotik etki göstermediği bilinmektedir. Ancak, TRAIL üzerine farklı alanlarda yapılan birçok çalışma, bu molekölün hücreler üzerindeki etkisinin, hücre yüzeyinde eksprese edilen reseptör miktarlarının değişmesiyle, hücre içi anti-apoptotik moleküllerin sentez düzeyinde meydana gelebilecek farklılıklarla, bunun yanında hedef hücrelerin bulunduğu mikroçevredeki muhtemel değişikliklerle farklılık gösterebileceğini ortaya koymuştur. TRAIL'ın, TNFalfa ve FasL gibi diğer TNF ailesi üyesi apoptotik ligandların aksine sistemik toksisiteye neden olmaması, bu tip bir yaklaşım için uygun bir moleköl olmasını sağlamaktadır. Bu çerçevede, TRAIL'ın timik hiperplazi ve timomadaki spesifik etkisi, hücresel fonksiyonel testlerle değerlendirilmelidir. Özellikle timusa spesifik gen aktarımı yapabilecek TRAIL kodlayan vektörlerin uygun hayvan modellerinde denenmesi, bu yaklaşımın uygulanabilirliği konusunda önemli oranda bilgi verici olacaktır.

SONUÇ

Çalışmamızda, normal timusta, ve Myasthenia Gravis’li hastalara ait foliküler timik hiperplazi ve timoma dokularında TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand ve transmembran reseptörlerinin ekspresyon profilleri, ve antiapoptotik NFkB molekülünün aktif formu araştırılmış, bunun yanında dokulardaki apoptotik hücre indeksleri belirlenmiştir. Sonuçlarımız, dokularda belirlenen reseptör profilleri açısından, ve intraselüler antiapoptotik NFkB aktivasyonun gözlenmemesine dayanılarak, normal timusta TRAIL’ın apoptotik yolunun açık olduğuna, TRAIL’ın timik atrofide rolü olabileceğine, ve timik hiperplazi ve timomada TRAIL ligand ve reseptörlerinin sentez profillerinin değiştiğine işaret etmektedir. Bu bulgular, fonksiyonel ve *in vivo* testlerle birleştirildiğinde, olası bir “TRAIL aracılı medikal timektomi” yaklaşımının uygulanabilirliğinin değerlendirilmesinde bilgi verici olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Christadoss, P., M. Poussin, and C. Deng, *Animal models of myasthenia gravis*. Clin Immunol, 2000. **94**(2): p. 75-87.
2. Osserman, K.E. and G. Genkins, *Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience in over 1200 patients*. Mt Sinai J Med, 1971. **38**(6): p. 497-537.
3. Meyer, A. and Y. Levy, *Geoepidemiology of myasthenia gravis [corrected]*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A383-6.
4. Vincent, A., J. Palace, and D. Hilton-Jones, *Myasthenia gravis*. Lancet, 2001. **357**(9274): p. 2122-8.
5. Alseth, E.H., *Genetic associations in myasthenia gravis: Implications for pathogenesis*, 2010, University of Bergen.
6. Marsteller, H.B., *The first American case of myasthenia gravis*. Arch Neurol, 1988. **45**(2): p. 185-7.
7. Conti-Fine, B.M., M. Milani, and H.J. Kaminski, *Myasthenia gravis: past, present, and future*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 2843-54.
8. Burns, T.M., *History of outcome measures for myasthenia gravis*. Muscle Nerve, 2010. **42**(1): p. 5-13.
9. Mc Laughlin D., S.J., White D., *İnsan Fizyolojisi*. 2007: Nobel Yayın Dağıtım.
10. Turner, C., *A review of myasthenia gravis: Pathogenesis, clinical features and treatment*. Current Anaesthesia & Critical Care, 2007. **18**: p. 15-23.
11. Pal, J., et al., *Clinical and biological heterogeneity of autoimmune myasthenia gravis*. J Neuroimmunol, 2011. **231**(1-2): p. 43-54.
12. Hirsch, N.P., *Neuromuscular junction in health and disease*. Br J Anaesth, 2007. **99**(1): p. 132-8.
13. Hohlfield, R. and H. Wekerle, *The role of the thymus in myasthenia gravis*. Adv Neuroimmunol, 1994. **4**(4): p. 373-86.
14. Yalçın, N.Ç., *Timektomi ile tedavi edilen Myasthenia Gravis hastalarında prognostik faktörler in Göğüs Cerrahisi AD2006*, Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi: İstanbul. p. 65.
15. Mendelson, D.S., *Imaging of the thymus*. Chest Surg Clin N Am, 2001. **11**(2): p. 269-93, x.
16. Okumura, M., et al., *Biological implications of thymectomy for myasthenia gravis*. Surg Today, 2010. **40**(2): p. 102-7.
17. Fujii, Y., et al., *Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: production by lymphocytes from thymus or thymoma*. Neurology, 1984. **34**(9): p. 1182-6.
18. Lewis, J.E., et al., *Thymoma. A clinicopathologic review*. Cancer, 1987. **60**(11): p. 2727-43.
19. Giraud, M., C. Vandiedonck, and H.J. Garchon, *Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1132**: p. 180-92.
20. Khadilkar, S.V. and S.V. Shah, *Autoimmune myasthenia gravis in two brothers*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 253-4.

21. Khadilkar, S.V., A.O. Sahni, and S.G. Patil, *Myasthenia gravis*. J Assoc Physicians India, 2004. **52**: p. 897-904.
22. Gronseth, G.S. and R.J. Barohn, *Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. Neurology, 2000. **55**(1): p. 7-15.
23. Onodera, H., *The role of the thymus in the pathogenesis of myasthenia gravis*. Tohoku J Exp Med, 2005. **207**(2): p. 87-98.
24. Nishino, M., et al., *The thymus: a comprehensive review*. Radiographics, 2006. **26**(2): p. 335-48.
25. Lele, S.M., M.S. Lele, and V.M. Anderson, *The thymus in infancy and childhood. Embryologic, anatomic, and pathologic considerations*. Chest Surg Clin N Am, 2001. **11**(2): p. 233-53, ix.
26. Douek, D.C., et al., *Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution*. Lancet, 2000. **355**(9218): p. 1875-81.
27. Soilleux, E.J., *Surgical Pathology of the Tymus and Mediastinum*. Diagnostic Histopathology, 2009. **16**:3(Hematopathology Update II): p. 143-160.
28. Cretney, E., et al., *No requirement for TRAIL in intrathymic negative selection*. Int Immunol, 2008. **20**(2): p. 267-76.
29. Kishimoto, H., C.D. Surh, and J. Sprent, *A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1427-38.
30. Sidman, C.L., J.D. Marshall, and H. Von Boehmer, *Transgenic T cell receptor interactions in the lymphoproliferative and autoimmune syndromes of lpr and gld mutant mice*. Eur J Immunol, 1992. **22**(2): p. 499-504.
31. Villunger, A., et al., *Negative selection of semimature CD4(+)8(-)HSA+ thymocytes requires the BH3-only protein Bim but is independent of death receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 7052-7.
32. Anastasiadis, K., Ratnatunga, C., *The Thymus Gland*, ed. K. Anastasiadis, Ratnatunga, C. 2007: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
33. <http://www.webpathology.com>, 2012.
34. Mikhail, M., Y. Mekhail, and T. Mekhail, *Thymic neoplasms: a clinical update*. Curr Oncol Rep, 2012. **14**(4): p. 350-8.
35. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
36. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
37. Nagane, M., H.J. Huang, and W.K. Cavenee, *The potential of TRAIL for cancer chemotherapy*. Apoptosis, 2001. **6**(3): p. 191-7.
38. Griffith, T.S. and D.H. Lynch, *TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 559-63.
39. Almasan, A. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 337-48.
40. Hellwig, C.T. and M. Rehm, *TRAIL signaling and synergy mechanisms used in TRAIL-based combination therapies*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(1): p. 3-13.
41. Holland, P.M., *Targeting Apo2L/TRAIL receptors by soluble Apo2L/TRAIL*. Cancer Lett, 2011.
42. LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 66-75.

43. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 255-60.
44. Tochitani, T., et al., *5-azacytidine, a chemotherapeutic drug, induces TRAIL-mediated apoptosis in mouse thymocytes in vivo*. Exp Toxicol Pathol, 2011. **63**(3): p. 237-42.
45. Corazza, N., et al., *TRAIL and thymocyte apoptosis: not so deadly?* Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 2**: p. S213-5.
46. Cretney, E., et al., *Normal thymocyte negative selection in TRAIL-deficient mice*. J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 491-6.
47. Baldwin, A.S., Jr., *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 649-83.
48. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
49. Mayo, M.W. and A.S. Baldwin, *The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1470**(2): p. M55-62.
50. Chen, F. and V. Castranova, *Nuclear factor-kappaB, an unappreciated tumor suppressor*. Cancer Res, 2007. **67**(23): p. 11093-8.
51. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*. Science, 1997. **277**(5327): p. 818-21.
52. Pan, G., et al., *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. Science, 1997. **277**(5327): p. 815-8.
53. van Noesel, M.M., et al., *Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation*. Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 2157-61.
54. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
55. Kreuz, S., et al., *NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3964-73.
56. Ravi, R., et al., *Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 409-16.
57. Hatano, E. and D.A. Brenner, *Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(6): p. G1357-68.
58. Mitsiades, N., et al., *Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4079-86.
59. Chen, F., et al., *New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases*. Clin Chem, 1999. **45**(1): p. 7-17.
60. Sanlioglu, A.D., et al., *Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues*. J Urol, 2007. **177**(1): p. 359-64.
61. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
62. Shishodia, S. and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer?* Biochem Pharmacol, 2004. **68**(6): p. 1071-80.
63. Derbinski, J., et al., *Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 33-45.
64. Secchiero, P., et al., *Evidence for a proangiogenic activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand*. Neoplasia, 2004. **6**(4): p. 364-73.

65. Secchiero, P., et al., *TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways*. *Circulation*, 2003. **107**(17): p. 2250-6.
66. Sanlioglu, A.D., et al., *Adenovirus-mediated IKKbetaKA expression sensitizes prostate carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis*. *Cancer Gene Ther*, 2006. **13**(1): p. 21-31.
67. Nagane, M., et al., *Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo*. *Cancer Res*, 2000. **60**(4): p. 847-53.
68. Dirice, E., et al., *TRAIL and DcR1 expressions are differentially regulated in the pancreatic islets of STZ- versus CY-applied NOD mice*. *Exp Diabetes Res*, 2011. **2011**: p. 625813.
69. Sanlioglu, A.D., et al., *DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells*. *Cancer Gene Ther*, 2007. **14**(12): p. 976-84.
70. Aydin, C., et al., *Decoy receptor-2 small interfering RNA (siRNA) strategy employing three different siRNA constructs in combination defeats adenovirus-transferred tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in lung cancer cells*. *Hum Gene Ther*, 2007. **18**(1): p. 39-50.
71. Sanlioglu, A.D., et al., *Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells*. *BMC Cancer*, 2005. **5**(1): p. 54.
72. Aydin, C., et al., *NF-kappaB targeting by way of IKK inhibition sensitizes lung cancer cells to adenovirus delivery of TRAIL*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 584.
73. Zhang, X.D., et al., *Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types*. *FEBS Lett*, 2000. **482**(3): p. 193-9.
74. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*. *Science*, 1997. **277**(5327): p. 818-21.
75. Degli-Esposti, M.A., et al., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 813-20.
76. Na, I.K., et al., *The cytolytic molecules Fas ligand and TRAIL are required for murine thymic graft-versus-host disease*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(1): p. 343-56.
77. Wu, X., et al., *Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis*. *Cancer Cell Int*, 2013. **13**(1): p. 56.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Eskişehir’de doğan İrem (KANATLI) AYDENİZ, ilköğrenimini 1995-2002 yılları arasında Barbaros İlköğretim Okulu’nda tamamlamıştır. 2002-2005 yılları arasında Antalya Muratpaşa Lisesi’nde öğrenim görmüştür. 2006 yılında öğrenimine başladığı Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden, 2010 yılında mezun olmuştur. 2010-2011 yılları arasında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Eğitim Fakültesinde Biyoloji Öğretmenliği üzerine pedagojik formasyon dersleri almıştır. 2011 yılı Şubat ayında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Temel Genetik yüksek lisans programına kayıt olmuştur.