

CEYDA NUR BALTACI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2018



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DENEYSEL OTOİMMÜN MİYASTENİA GRAVİS FARE
MODELİNDE İNFLAMAZOM KOMPLEKSLERİNİN
EKSPRESYON SEVİYESİ**

CEYDA NUR BALTACI

**DANIŞMAN
PROF. DR. BURÇAK VURAL**

GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Ceyda Nur BALTACI tarafından Prof. Dr. Burçak VURAL'ın danışmanlığında hazırlanan "Deneysel Otoimmün Myastenia Gravis Fare Modelinde İnflamazom Komplekslerinin Ekspresyon Seviyesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 28.12.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Burçak VURAL
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Vuslat YILMAZ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Sinirbilim Anabilim Dalı



Doç. Dr. Fahri AKBAS
Bezmialem V. Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ceyda Nur Baltacı



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında her aşamada büyük destek gördüğüm, birbirinden değerli hocalar ile tanışmama vesile olan, hem akademisyen olarak çok saygı duyduğum hem de ailemin bir ferdiymiş gibi sevdiğim tez danışmanım Prof. Dr. Burçak VURAL'a, tezimin oluşum aşaması ve sonrasında büyük emekleri olan, tanıma şerefine nail olduğum için büyük mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Erdem TÜZÜN'e, olanca yoğunluğuna rağmen yardımlarını esirgemeyip tezime katkı sağlayan, bilimsel uyarı ve önerilerinden yararlandığım Uzm Dr. Vuslat YILMAZ'a, içten gülümsemesiyle her daim pozitif enerji vermesi, motive eden tutumu ve tez çalışmamın kilit noktasındaki katkısından ötürü Canan Aysel Ulusoy'a, uygulama sırasında değerli yardımlarından ötürü Ezgi CİBALİ'ye, bana her zaman destek olarak çalışmamı tamamlamamı sağlayan annem Nazan BALTACI, babam Afettin BALTACI ve eğitim hayatım boyunca beni destekleyip yüreklendiren canım dayım Fatih KIVANÇ başta olmak üzere tüm aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-27428

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET.....	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Myastenia Gravis Hastalığının Epidemiolojisi.....	3
2.2. Myastenia Gravis Hastalığının Tarihçesi.....	3
2.3. Myastenia Gravis Alt tipleri.....	4
2.4. Klinik özellikler.....	5
2.4.1. Klinik Sınıflandırma.....	6
2.5. MG'nin Patogenezi.....	7
2.5.1. AChR MG'nin Patojenik Mekanizması.....	8
2.5.2. Kas spesifik tirozin kinaz (MuSK) MG'nin patojenik mekanizması:	9
2.5.3. MG ve Serolojik çalışmalar	10
2.6. DOMG MODELİ	10
2.6.1. Başarılı bir immünizasyon için dikkat edilmesi gereken hususlar	12
2.6.2. Terapötik yaklaşımların araştırılması için DOMG modelleri	15
2.7. İNFLAMAZOMLAR	15
2.7.1. NLRP3 inflamazomu	16
2.7.2. İnflamazom Aktivitesini Düzenleyen Faktörler	17
2.7.3. İnflamazomların Hastalıklar İle İlişkisi.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22

3.1. DOMG Modelinin Oluşturulması.....	22
3.1.1. Deney Hayvanları	22
3.1.2. AChR Proteini Eldesi	22
3.1.3. İmmünizasyon.....	22
3.2. Klinik Değerlendirmeler	23
3.2.3. Kas Gücü Değerlendirmesi.....	23
3.2.4. Kuyruk Veninden Periferik Kan Örneklerinin Toplanması.....	23
3.3. Deneyin Sonlandırılması.....	24
3.4. Laboratuvar Değerlendirmeleri	24
3.4.1. ELISA ile Antikor Tayini.....	24
3.4.2. RNA İzolasyonu:	24
3.4.3. cDNA Yapımı:	25
3.4.4. Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyonu	26
3.4.5. İstatistiksel Hesaplamalar	28
3.4.6. Kullanılan Malzemeler	28
3.4.7. Kullanılan Ekipmanlar	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. ELİSA:	30
4.2. RNA İzolasyonu Sonuçları	31
4.3. Gen Ekspresyon Düzeyleri.....	32
4.3.1. Akt1 geni için:	32
4.3.2. Akt-1 gen profili	33
4.3.3. Akt-1 geni erime eğrileri	33
4.3.4. NLRP3 geni için:	33
4.3.5. NLRP3 gen profili.....	34
4.3.6. NLRP3 erime eğrileri	34
4.3.7. P2X7R geni için:	34
4.3.8. P2X7R gen profili	35
4.3.9. P2X7R erime eğrileri	36
4.3.10. Kaspaz-1 için:	36
4.3.11. Kaspaz-1 gen profili.....	37
4.3.12. Kaspaz-1 erime eğrileri	37

4.3.13. IL-1 β geni için:	37
4.3.14. IL-1 β için gen profili	38
4.3.15. IL-1 β erime eğrileri	38
4.4. Serum anti- AChR antikor düzeyleri ile gen ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırılması	39
5. TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR	44
ETİK KURUL KARARI	52
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	53
ÖZGEÇMİŞ	54



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. MG hastalığının klinik olarak sınıflandırılması	6
Tablo 2-2. Tablo 1 MG ve deneysel modeli arasındaki immünopatolojik benzerlikler ve farklılıklar	11
Tablo 2-3. DOMG semptomlarının klinik olarak değerlendirilmesi.....	14
Tablo 2-4. İnflamazomların negatif regülasyon faktörleri.	18
Tablo 2-5. Çeşitli hastalıklarda inflamazomların rolü.....	20
Tablo 3-1. cDNA yapımı için hazırlanan karışım.....	25
Tablo 3-2. cDNA sentezi için uygulanan ısı koşulları	26
Tablo 3-3. Gerçek zamanlı PZR karışım içeriği	26
Tablo 3-4. Gerçek zamanlı PZR için tasarlanan primer dizileri:	27
Tablo 4-1.1. 1.Grup Fare Elisa Sonuçları	30
Tablo 4-2.1. 2.Grup Fare Elisa Sonuçları	31
Tablo 4-3. RNA izolasyon sonuçları.....	31
Tablo 4-4. Akt-1 ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu.....	39
Tablo 4-5. NLRP3 ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu.....	39
Tablo 4-6. P2x7R ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu.....	39
Tablo 4-7. Kaspaz-1 ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu.....	40
Tablo 4-8: IL-1 β ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Nöromusküler kavşak.....	8
Şekil 2-2 NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu.....	16
Şekil4-1 Akt-1 geni transkripsiyon seviyeleri.....	32
Şekil 4-2 Akt-1 gen profili.....	33
Şekil: 4-3 Akt-1 geni erime eğrileri.....	33
Şekil 4.4 NLRP3 geni ekspresyon seviyesi.....	34
Şekil 4-5 NLRP3 gen profili.....	34
Şekil 4-6 NLRP3 erime eğrileri.....	34
Şekil 4-7 P2X7R geni ekspresyon seviyesi.....	35
Şekil 4-8 P2X7R gen profili.....	35
Şekil: 4-9 P2X7R erime eğrileri.....	36
Şekil 4-10 Kaspaz-1 geni ekspresyon seviyesi.....	36
Şekil 4-11 Kaspaz-1 gen profili.....	37
Şekil 4-12 Kaspaz-1 erime eğrileri.....	37
Şekil 4-13 IL-1 β geni ekspresyon seviyesi.....	38
Şekil 4-14 IL-1 β için gen profili.....	38
Şekil 4-15 IL-1 β erime eğrileri.....	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MG:	Mayastenia Gravis
DOMG:	Deneysel otoimmün Myastenia Gravis
mEPP:	Minyatür son plak potansiyeli
EPP:	Postsinaptik son plak potansiyeli
VGCC:	Sinir aksiyon potansiyeli voltaj kapılı kalsiyum kanalları
VGNaC:	Voltaj kapılı sodyum kanalları
AChR:	Asetilkolin reseptörleri
nAChR:	Nikotinik asetilkolin reseptörleri
TACHR:	Torpedo californica asetilkolin reseptörleri
LRP4:	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilşkili protein 4
TNFAIP3:	Tümör Nekroz Faktör α ile İndüklenmiş Protein 3
POM-1:	Polioksotungstat-1
EAE:	Deneysel otoimmün ensefalomyelit
IL-1β:	İnterleukin 1 β
CARD:	Caspase recruitment domain
CAPS:	Kryopirin ilişkili periyodik sendromlar
ASC:	Apoptosis associated speck like protein containing a CARD
IgG:	İmmünglobulin G
TLR:	Toll-benzeri reseptörler
GAPDH:	Gliseraldehit 3- fosfat dehidrojenaz
P2RX7:	P2X pürino reseptör 7
NLRP3:	NOD-benzeri reseptör proteini 3
NMJ:	Nöromüsküler kavşak
CFA:	Komple Freund adjuvanı
NLR:	NOD-benzeri reseptörler
dsDNA:	Çift zincirli DNA
LRR:	Lösin tekrar motifleri
PYD:	Pirin N-homoloji bölgesi

NOD:	Nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon bölgesi
NF-κB:	Nükleer faktör kappa B
PAMP:	Patojen ilişkili moleküler motifler
PI3K:	Fosfoinositol-3 kinaz
DOK7:	DOK protein ailesi 7
MUSK:	Kasa özgü kinaz
Anti MUSK:	Kasa özgü kinaz antikorlu
NBD:	Nükleotid bağlayıcı bölge
RyR:	Ryanodin reseptör antikorları
POM-1:	Sodyum polioksotungstat
A20/TNFAIP3:	Tumor nekrozis faktör alfa ile indüklenmiş protein 3
MWS:	Muckle Wells Sendromu

ÖZET

Baltacı CN. Deneysel Otoimmün Miyastenia Gravis Fare Modelinde İnflamazom Komplekslerinin Ekspresyon Seviyesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2018.

Myasthenia gravis (MG) anormal kas zaafı, çabuk yorulma ile seyreden, patolojik olarak timus anormallikleri ve immünolojik olarak nikotinik asetilkolin reseptörlerine karşı anti AchR antikorları gelişimi, kompleman ile reseptör hasarı oluşumu ile karakterize otoimmün nöromusküler bir hastalıktır [1, 3].

AchR'ye karşı gelişen antikorlar, kompleman aracılığı ile postsnaptik membran harabiyeti ve antikorların çapraz bağlanması yolu ile reseptörleri azalttığı bilinmekte, ancak otoimmün yanıtın nasıl başladığı bilinmemektedir.

MG hastalığının inflamazomlarla ilişkili olabileceğine dair ipuçlarına rağmen literatürde MG hastalığı ve inflamazomlarla ilgili bir araştırma yer almamaktadır. Bu çalışmada, inflamazom kompleksinde yer alan genler ile hastalıktaki inflamatuvar yanıt arasındaki ilişkinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda, fareler MG hastalığına özgü antikor olan AchR ve adjuvan olarak Freund's Complete Adjuvant(CFA) ile immünize edilerek deneysel otoimmün MG oluşturuldu (DOMG). Farelerin kas zaafı, klinik skorlama, asma ve motor aktivite testleri ile değerlendirildi. Serum anti-AChR Ig seviyeleri ELISA ile belirlendi. Serumda AchR'ye karşı antikor geliştiren fareler hasta grubuna dahil edildi. Farelerden elde edilen total lenf ganglionuna RNA izolasyonu yapıldı ve qPCR ile kaspaz-1, NLRP3, IL-1 beta, GAPDH, P2X7R ve Akt-1 gen ekspresyonu seviyeleri incelendi. DOMG grubundaki fareler, CFA ile immünize edilen kontrol grubu fareleri ile kıyaslandığında kaspaz-1, NLRP3 ve P2X7R gen ekspresyonlarında artma, Akt-1 de ise azalma gözlenmiştir. Buna karşılık IL-1 beta'da DOMG grubundaki artış anlamlı idi ($p= 0,01$). Serum antikor düzeyleri ve gen ekspresyon seviyeleri arasında ise korelasyon saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Miyastenia Gravis, inflamazom, DOMG

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-27428

ABSTRACT

Baltacı CN. Expression Levels of Inflammasome Complexes in Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Mouse Model. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department, Istanbul. 2018.

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune neuromuscular disease characterized by abnormal muscle weakness, rapid fatigue, pathologic thymus abnormalities, and immunologically an anti-AchR antibody development against nicotinic acetylcholine receptors and receptor damage formation by complement system [1,3].

It is known that the antibodies developed against AchR cause postsynaptic membrane destruction via complement system and decrease the number of receptors by cross-linking of these antibodies. However, how the autoimmune response begin is still not known.

Despite the clues that myasthenia gravis (MG) disease may be associated with inflammation, there is no literature study on MG disease and inflammation. In this study, mice were immunized with MG-specific antibody AchR and adjuvant with Freund's Complete Adjuvant (CFA) to generate experimental autoimmune MG(EAMG). Muscle weakness, clinical scoring, paw-grip test and motor activity tests of mice were evaluated. Serum anti-AChR Ig levels were determined by ELISA. Mice that developed antibodies against AchR in the serum were included in the experimental group(EAMG). RNA was isolated from the total lymph node from mice, and caspase-1, NLRP3, IL-1 beta, GADPH, P2X7R and Akt-1 gene expression levels were examined by qPCR. The mice in the EAMG group showed increasement in the levels of caspase-1, NLRP3 and P2X7R gene expressions, and decreasement in Akt-1 gene expression compared to the control group mice immunized only with CFA. The increasement in the level of IL-1 beta in EAMG group was significant ($p = 0.01$). There was no correlation between serum antibody levels and gene expression levels.

Key Words: Myasthenia Gravis, inflammasome, EAMG

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2017-27428

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Myasthenia gravis (*Myasthenia Gravis* (MG)), nöromüsküler kavşağa zarar veren otoantikorlar sonucunda kas kasılmasında rol alan asetilkolin reseptörlerinin kaybı ile ilişkili, kas zaafına ve yorgunluğa yol açan nispeten nadir bir nörolojik hastalıktır [1,2].

Hastalığın güncel tedavisi semptomları gidermeye yöneliktir fakat bu tedavi yöntemleri fırsatçı infeksiyon, osteoporoz ve diabetes mellitus gibi yan etkilere sebep olmakta ve MG olgularının %2-3'ü tedavi yan etkileri sebebiyle kaybedilmektedir. Bu sebeple düşük yan etki profilili ve daha spesifik etki mekanizmalı tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç bulunmaktadır [3].

2015 yılında yapılan bir çalışma, kaspaz-1 inhibitörünün MG hayvan modelinde hastalığın semptomlarını kayda değer ölçüde iyileştirdiğini ve buna bağlı olarak, kaspaz-1'in hastalığın etiyolojisinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir [4]. İnflamazomların kaspaz-1'i aktive ettiği göz önünde bulundurulduğunda, bu bulgu bize hastalığın etiyolojisinde inflamazom moleküllerinin rol aldığını düşündürmektedir.

İnflamazomlar kaspaz-1'in aktivasyonunu regüle edip hastalık yapıcı mikroplar ve konak proteinlerden türemiş moleküllere karşı enflamatuvar yanıtı oluşturan multimerik protein kompleksleridir. Son yıllarda inflamazom komplekslerin Gut, kriyoprin ilişkili periyodik sendrom (CAPS), Alzheimer, obezite ve tip-2 diyabet gibi pek çok rahatsızlıkta rol oynadığı gösterilmiştir [5].

Tüm bu çalışmalar umut vaadedici gibi görünse de, MG hastalığının inflamazomlarla ilişkili olabileceğine dair ipuçlarına rağmen literatürde MG hastalığı ve inflamazomlarla ilgili bir araştırma yer almamaktadır. Çalışmamızda, C57BL6 soyu fareler MG hastalığına özgü antikor olan AchR ve adjuvan olarak Freund's Complete Adjuvant(CFA) ile immünize edilerek deneysel otoimmün MG oluşturulmuştur (DOMG). DOMG'nin klinik, fizyopatolojik ve elektrofizyolojik özellikleriyle MG hastalığını çok yüksek oranda taklit ettiği gösterilmiştir [36].

Bu çalışmada inflamazom komplekslerinin MG hastalığına olan etkisini anlamak ve MG patogenezi aydınlatmak için DOMG modeli ve kontrol grubu farelerinden elde

ettiğimiz total lenf ganglionuna RNA izolasyonu yapılmış olup, qPCR ile kaspaz-1, NLRP3, $Il-1\beta$, GADPH, P2X7R ve Akt-1 gen ekspresyonu seviyeleri incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Myasthenia Gravis Hastalığının Epidemiolojisi

Myasthenia gravis (*Myasthenia Gravis* (MG)) kas zaafı, çabuk yorulma ile seyreden, patolojik olarak timus anormallikleri ve immünolojik olarak nikotinik asetilkolin reseptörlerine karşı anti-AchR antikor gelişimi, kompleman ile reseptör hasarı oluşumu ile karakterize otoimmün nöromusküler bir hastalıktır [6].

Myasthenia gravis, ABD popülasyonunda 100.000 kişi başına yaklaşık 20'ye çıkmış olan yaygınlık oranları ile nispeten nadir görülen bir rahatsızlıktır. Avrupa nüfusunun ise 77-317 milyonluk kısmında bu hastalık görülmektedir [7]. Bu otoimmün hastalık, kas zaafı, aktivite durumunda kötüleşme ve istirahat ile iyileşme ile karakterizedir. Ekstraoküler kasların tutulumu hastaların büyük bir bölümünde ilk belirti olarak ortaya çıkmakta ve hastalık ilerledikçe bulber kasları ve bacak kas sistemini de etkilemektedir. Bozukluğun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, patogenezinde nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) karşı oluşan otoantikorların rolü olduğu kesin olarak bilinmektedir [8].

MG'nin görülme sıklığı yaş ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir. MG'nin genç yaşlarda görülme sıklığı kadınlarda daha fazladır. Erkeklerde ise 50 yaşından sonra ortaya çıkmasına daha sık rastlanır. 40 yaş altında kadın:erkek oranı 3:1 iken; 40 yaşından sonra ise hemen hemen 1:1 dir. Kuzey Amerika ve Avrupada çocukluk çağında MG hastalığının görülme oranı %10-%15 iken; Asya ülkelerinde 15 yaş altında görülme oranı %50 civarındadır [9].

2.2. Myasthenia Gravis Hastalığının Tarihçesi

17. yüzyılda, İngiliz doktor Willis ilk kez, meslektaşları tarafından “sahte felç” olarak tanımlanan ve oküler ve bulbar kas zaafı gözlenen bir MG hastasını tarif etmiştir. Buna karşın, bildirilen ilk MG vakasının 1664 yılında ölen Kızılderili şefi Opechancanough olduğu düşünülmektedir.

1893'te Samuel Goldflam zaman zaman hiddetlenen ve bazı zamanlar kendiliğinden azalan kas zaafından yakınan üç vakada MG'nin detaylı ve tam tanımını yapmış vakalarının değişen görülme şekillerini, şiddetini ve prognozunu analiz etmiştir. Wilhelm Erb ve sonrasında Samuel Goldflam'ın önemli katkıları nedeniyle hastalığa

“Erb hastalığı” adı verildi ve kısa bir süre sonra “Erb-Goldflam sendromu” olarak adlandırılmıştır.

1895'te, Friederich Jolly, Berlin Psikiyatri ve Nöroloji Topluluğu toplantısında, “myastenia gravis pseudo-paralytica” başlığı altında iki olgu açıkladı. Bu bozukluğun ilk iki sözcüğü sonradan hastalığın resmi adı olarak kabul edilmiştir. 1934'te Mary Walker, MG semptomlarının bir kolinesteraz inhibitörü olan Fizostigmin ile tedavi edilen kürar zehirlenmesi ile benzer olduğunu fark etmiş ve kolinesteraz inhibitörlerinin hastalık semptomları iyileştirdiğini saptamıştır.

1937'de Blalock, timektomiden sonra myastenik hastalarda iyileşme bildirmiştir. Bu keşifleri takiben, kolinesteraz inhibitör tedavisi ve timektomi MG hastalığının tedavisinde standart hale gelmiştir.

1959-1960 yıllarında Nastuk. ve Simpson birbirlerinden bağımsız olarak MG'nin otoimmün etiyolojiye sahip olduğu hipotezini öne sürmüşlerdir. (Hastalığıdaki kötüleşme ve onu takip eden iyileşme dönemleri, immün sistemin merkez organı olan timüs anormallikleri bunu düşündürmüştür).

1973 yılında Patrick ve Lindstrom, saflaştırılmış asetilkolin reseptörü (AChR) ile immünize ettikleri tavşanlarda MG hastalarınınkine benzer kas zaafiyeti gözlediler ve böylelikle ilk kez deneysel otoimmün MG'yi (DOMG) indüklemiş oldular. Yine 1970'lerde, prednizon ve azatiyoprin, MG için tedavi modaliteleri olarak uygulanmış ve bunu takiben, şiddetli MG'nin akut tedavisi için uygulanan plazma değişimi de otoimmün etiyolojiyi doğrulamıştır [10].

2.3. Myastenia Gravis Alt tipleri

MG hastaları otoantikorlara, başlangıç yaşına, timus anormalliklerine ve klinik semptomlara göre sınıflandırılır. MG alt tipleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır:

Erken başlangıçlı MG: 50 yaşından önce ortaya çıkar. timus hiperplazisi görülür, erkek kadın oranı: 1:4'tür.

Geç başlangıçlı MG: 50 yaşından sonra ortaya çıkar, atrofik timus dokusu mevcuttur. Erkeklerde görülme oranı daha yüksektir.

Timomalı MG: Hasta serumunda titin ve ryanodin (RyR) reseptör antikorları görülür.

MuSK-MG: Hasta serumunda Anti-MuSK antikorları bulunur. Timik anomaliler yoktur ya da minimal düzeydedir.

Oküler MG : Yalnızca oküler semptomlar görülür. Timoma görülmez.

Seronegatif MG: Hasta serumunda AChR ve (MuSK) antikorları yoktur.

Geç başlangıçlı MG hastalarında oküler MG insidansı erken başlangıçlı MG hastalarına kıyasla daha yüksektir [11].

Oküler MG hastalarında, çift görme ve göz kapaklarında sarkması görülür. Bir veya iki göz kapağı, gözbebeğinin tamamını veya bir kısmını kaplayacak şekilde düşebilir ve bu durum iyi bir görüşe engel olur. Bu semptomların şiddeti genellikle gündün güne ve gün içerisinde değişir. Bu alt gruptaki hastalar yutma, konuşma ya da nefes almada zorluk çekmezler, kol ve bacaklarda zafiyet yoktur [12].

Vakaların % 85'inde, asetilkolin reseptör antikorları (AChR MG) veya kas spesifik kinaz antikorları (MuSK MG) gibi patojenik antikorlar mevcut iken geri kalanında, hiçbir antikor tanımlanamamıştır [13]. Bu alt grubun % 40'ında MuSK ve nöromusküler kavşak (NMJ) proteini antikorları bulunur [8].

Timomalar olgun T hücreleri ile çevrelenmiş epitelyal neoplastik hücrelerdir. Epitel hücreleri, asetilkolin reseptörü (AChR), titin ve ryanodin reseptörü (RyR) gibi iskelet kas proteinleri ile çapraz reaktif olan epitoplara eksprese edebilir. AChR'ye özgü otoreaktif T hücreleri, timomalarda ve timoma MG hastalarının serumlarında bulunur [14]. 60 yaş altı MG hastalarında serumda titin ve RyR antikorlarının varlığı, timoma varlığı açısından güçlü bir delil iken, bu antikorların herhangi bir yaş grubundaki MG hastalarında görülmeşi timomayı güçlü bir şekilde dışlar [14]. Timomalı MG hastalarından alınan serumlar, kas hücre kültürlerinde apoptoz ve nekroz gibi dejeneratif değişikliklere neden olurlar. Timomalı MG erken başlangıçlı MG'den daha şiddetli olma eğilimindedir [14, 15, 16].

2.4. Klinik özellikler

MG'nin ana özelliği, yorucu ve tekrarlayan aktivitelerle kötüleşen ve dinlenerek hafifleyen kas zaafıdır. Sıcaklık, enfeksiyon ve strese maruz kalma ile mevcut durum kötüleşir. Bu dalgalanmalar, MG'yi benzer bir kas zafiyeti ile ortaya çıkan diğer bozukluklardan ayırır. Tipik olarak zafiyet belirli iskelet kas gruplarını içerir. Zafiyetin

etkilediği kaslar genellikle oküler, bulbar, proksimal ekstremiteler ve boyun kaslarıdır. Bazı hastalarda solunum kasları da etkilenmiştir. [45].

Oküler kas zaafı, MG'nin en sık görülen başlangıç semptomudur ve hastaların yaklaşık % 85'inde görülür. İki yıl içinde bu hastaların % 50'sinde şikayetlerde ilerleme gelişecektir. İlerleyen dönemlerde ptoz ve diplopi veya bazen bulanık görme ortaya çıkabilir. Diplopi hastanın 20–30 saniye boyunca lateral olarak gözlenmesiyle ortaya çıkarılabilir ve bu da miyastenik zaaf sonucu meydana gelen göz kası yorgunluğuna neden olur [8].

Hastalığın seyri sırasında, hastaların % 60'ında, bulbar kaslarının tutulumu sonucu katı gıdaları çiğnemekte zorlanma görülebilmektedir [47,48]. Solunum kaslarını içeren zafiyet, başlangıçtaki ilk 2 yıl içinde nadir görülen bir özelliktir [49]. Solunum kaslarının tutulumu, hayatı tehdit edebilecek, mekanik ventilasyon ve nazo-mide tüp beslemesi gerektiren miyastenik krizlere yol açabilir [8].

2.4.1. Klinik Sınıflandırma

Amerika'daki Myasthenia Gravis Vakfı (MGFA) MG'yi 5 ana sınıfa ayırır ve aşağıdaki gibidir [10].

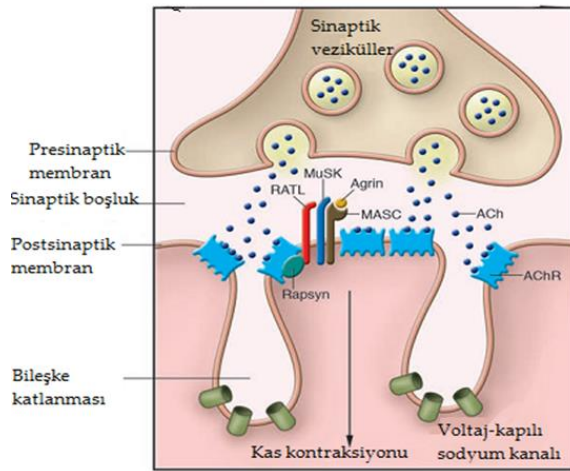
Tablo 2-1. MG hastalığının klinik olarak sınıflandırılması

Sınıf	Klinik bulgular
I	Oküler kas zaafı mevcuttur, diğer tüm kaslar normaldir.
II	Oküler kaslar hariç diğer kasları etkileyen hafif dereceli kas zaafiyeti
II A	Kol ve bacak kasları, aksiyal kaslar etkilenmiştir. Daha az olmakla birlikte orofaringeal kaslar da etkilenmiş olabilir.
II B	Ağırlıklı olarak orofaringeal kaslar ve solunum kasları etkilenmiştir. Daha az ya da eşit derecede olmakla birlikte kol ve bacak kasları, aksiyal kaslar da etkilenmiş olabilir.
III	Oküler kaslar hariç diğer kasları etkileyen orta dereceli kas zaafiyeti
III A	Kol ve bacak kasları, aksiyal kaslar etkilenmiştir. Daha az olmakla birlikte orofaringeal

	kaslar da etkilenmiş olabilir.
III B	Ağırlıklı olarak orofaringeal kaslar ve solunum kasları etkilenmiştir. Daha az ya da eşit derecede olmakla birlikte kol ve bacak kasları, aksiyal kaslar da etkilenmiş olabilir.
IV	Oküler kaslar hariç diğer kasları etkileyen şiddetli kas zaafiyeti
IV A	Kol ve bacak kasları, aksiyal kaslar etkilenmiştir. Daha az olmakla birlikte orofaringeal kaslar da etkilenmiş olabilir.
IV B	Ağırlıklı olarak orofaringeal kaslar ve solunum kasları etkilenmiştir. Daha az ya da eşit derecede olmakla birlikte kol ve bacak kasları, aksiyal kaslar da etkilenmiş olabilir.
V	Entübasyon gereklidir.

2.5. MG'nin Patogenezi

MG otoantikor temelli hastalıklardandır. Asetilkolin reseptörüne (AChR) karşı gelişen antikorlar, hastaların büyük çoğunluğunda mevcuttur ve bu antikorların patojenik olduğuna ilişkin çok sayıda delil vardır. AChR antikorları tipik olarak immünoglobulin IgG1 ve IgG3 (insan) alt sınıflarına aittir ve kompleman aracılı ataklara yol açabilir ve kas yüzeyindeki AChR'lere bağlanabilmeleri de AChR internalizasyonunu arttırabilir. Nöromüsküler kavşakta (NMJ) AChR'lerin azalışı, nöromüsküler iletimi bozar. Bu durum, MG hastalığının klinik belirtilerine yol açar. Hastaların çok az bir kısmında ise otoantikorlar, kasa özgü kinaza (MuSK) bağlanır. MuSK'nin nöromüsküler kavşağın gelişimi sırasında AChR kümelemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. MuSK'a karşı gelişen bu otoantikoların patojenik olduğu bilinmesine karşın mekanizması hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir [17, 18].



Şekil 2-1: Nöromüsküler kavşak [3].

2.5.1. AChR MG'nin Patojenik Mekanizması

Nöromuskular iletimde sağlıklı insanlar ile MG hastaları arasındaki fark şu şekildedir: Sağlıklı bireylerde sinir uçları, asetilkolin içeren keseciklerdeki içeriği ekzositoz ile salar ve bunun sonucu olarak postsinaptik membrandaki AChR'ler katyon kanallarını aktive ederek, minyatür son plak potansiyeli (mEPP) olarak adlandırılan geçici bir depolarizasyon meydana getirir. Bu durum, voltaj kapılı kalsiyum kanallarını (VGCCs) açar ve asetilkolin keseciklerinin ekzositozunu tetikler. Bu durum, çok daha fazla EPP(postsinaptik son plak potansiyeli) üretimini sağlar. Böylelikle voltaj kapılı sodyum kanallarını (VGNaC'ler) aktive etmek için gerekli eşik değere ulaşılır ve bir kas aksiyon potansiyeli meydana gelir. MG hastalarında ise; AChR antikorları klasik komplement yolağını aktive eder, bu da post sinaptik membranda hasara yol açar ve AChR internalizasyonunu indükleyen antikorlar yüzünden postsinaptik AChR'lerin sayıca azalmasına neden olur. AChR'lerin kaybı daha küçük mPP ve EPP amplitüdleriyle sonuçlandığı gibi voltaj kapılı sodyum kanallarının kaybına da yol açar ve bu durumun bir sonucu olarak EPP'nin kas aksiyon potansiyelini tetiklemek için ulaşması gereken eşiği arttırır. EPP, eşik değerin altında kaldığında kalıcı kas zaafiyetine yol açar. Divalent IgG antikorunun AChR'lere çapraz bağlanması da, normalde daha yavaş bir şekilde gerçekleşen AChR'lerin internalizasyonunu ve lizozomal degradasyonu arttırır ve bu durum kompleman sisteminin yokluğunda bile AChR'lerin kaybıyla sonuçlanır [21]. Kas zaafının şiddetinin hastalar arasındaki ve aynı hastanın farklı kaslarındaki değişkenliğine yönelik sorulara ilişkin bir takım teorik açıklamalar vardır. AChR antikorlarının serumdan sinaptik yarığına yayılma hızı,

iletimde bir bozukluk meydana gelmeden önce bu alanda sayıca fazla olan AChR'lerin hedeflenmesinin gerekliliği, hayvan modellerinde gösterilmiş olan sinaptik kompensasyon mekanizmaları, kompleman regülatörlerinin ekspresyon seviyesi gibi faktörlerin bu farklılığa katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. MG hastalarından alınan biyopsilerde, AChR alt birimlerinin ekspresyonunun arttığı ve her sinir impulsunda sinir uçlarından salınan asetilkolin keselerinin içeriğinde artış olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, pasif IgG transfer deneylerinde de kaslarda AChR sentezinde artış tespit edilmiştir. Bu adaptif yanıtların, nöromüsküler iletimi patojenik etkilere korumaya yönelik olduğu düşünülmektedir [21].

2.5.2. Kas spesifik tirozin kinaz (MuSK) MG'nin patojenik mekanizması:

NMJ'de MuSK aracılı postsinaptik farklılaşma yolu sağlıklı bireylerde şu şekildedir: Motor sinir terminali tarafından salgılanan nöral agrin, MuSK'nin dimerizasyonuna neden olan düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilişkili protein 4 (LRP4) LRP4'e bağlanır. MuSK dimerizasyonu, MuSK'nın fosforilasyonuna ve Dok7 ve AChR β -alt-birimi dahil olmak üzere MuSK yolağındaki proteinlerin fosforilasyonuna neden olur. Rapsin, AChR'lerin lokalizasyonunu sağlar. MuSK myastenia gravis hayvan modellerinde ise bozulmuş postsinaptik farklılaşma şu şekildedir: MuSK otoantikoru olan (Ig) G4'ler Agrin-LRP4-MuSK kompleksinin oluşumunu bloke eder. Bu durum, postsinaptik AChR kümelerinin dağılmasına ve bunun sonucu olarak mPP ve EPP şiddetinde meydana gelen düşüş, kas aksiyon potansiyelinde yetersizliğe ve MG hastalığının semptomlarından biri olan kas zaafı ve yorgunluğa yol açar. Bu duruma her ne kadar düşük konsantrasyonda da olsa IgG1-3 antikorlarının da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir fakat bu antikorların MG hastalığındaki patojenik rolü henüz aydınlatılamamıştır. AChR MG'de gözlenen sinaptik kompensasyon MuSK MG'de meydana gelmemektedir [21].

AChR-MG ve MuSK-MG hastalarının sitokin üretim modellerinin karşılaştırılmasına yönelik ilk kez yapılan bir çalışmada, MuSK-MG hastalarında Th1, Th17 ve T foliküler yardımcı hücre ilişkili sitokinler olan IFN- γ , IL-17A ve IL-21 salgılanmasında artış olduğunu göstermiştir. Bu sitokinlerdeki artış AChR-MG hastalarında mevcut değildir. Bu çalışmada aynı zamanda, immünsüpresyonun, AChR-MG ve MuSK-MG'deki Th1 yanıtını zayıflattığı, ancak AChR-MG ve MuSK-MG hastalarında immün yanıtları farklı şekilde modüle ettiği de gösterilmiştir [22]. AChR-

MG'de immünsüpresif tedavinin FN- γ ve IL12p40 gibi Th1 sitokinlerin anlatımını azaltıcı, IL-10 ve IL-6 sitokinleri üzerinde ise anlatımı arttıran bir etkisi olduğu da tespit edilmiştir. MuSK-MG hastalarında ise aynı immünosupresyon tedavisinin IL-10 ve IL-6 sitokinleri üzerinde up-regüle edici etkisi kanıtlanamamıştır [22].

2.5.3. MG ve Serolojik çalışmalar

MG hastalarının önemli bir bölümünde(tüm dünyada 0% - 49%) rutin analizlerde saptanabilir AChR veya MuSK antikorları görülmez. Fakat sonradan yapılan daha hassas analizler bu “seronegatif” hastaların çoğunun gerçekte IgG1 alt tipli AChR otoantikorlarına sahip olduğunu göstermiştir. Bu antikorların büyük kısmının klasik kompleman yolağını aktive ettiği de gözlenmiştir [23]. Yapılan diğer çalışmalar bazı seronegatif MG hastalarının LRP4 antikorlarına (esas olarak IgG1 ve IgG2) sahip olduğunu bulmuştur. LRP4'e karşı immünize edilen farelerde nöromusküler iletimin bozulması ve miyastenik zafiyet gözlenmiştir[21].

2.6. DOMG MODELİ

DOMG pek çok hayvan türünde indüklenebilmesine rağmen, deneysel modellerin çoğu, klinik DOMG belirteçlerin daha yüksek oranda görülmesi nedeniyle sıçanlarda ve farelerde indüklenmiştir. Duyarlı sıçan suşlarında, DOMG, Torpedo californica AChR (TACHR) veya anti-AChR antikorlarının pasif transferi ile indüklenir[29]. Yıllar boyunca, deney hayvanlarının saflaştırılmış AChR'ye karşı aktif immünizasyonu ile oluşturulan deneysel otoimmün MG (DOMG) hastalığının altında yatan patojenik mekanizmaları araştırmak ve yeni immünoterapilerin etkinliğini değerlendirmek için mükemmel bir model oluşturmuştur.

Deneysel MG hastalığının modeli ile ilgili ilk rapor 30 yıldan uzun bir süre önce yayımlanmıştır. Bu çalışmada, AChR ile immünize edilmiş tavşanların MG benzeri semptomlar geliştirdiği gösterilmiştir. Bunu takiben yapılan pek çok hayvan çalışması, MG hastalarında AChR'ye karşı bir otoimmün yanıtın meydana geldiğini ve anti-AChR antikorlarının NMJ'nin yapısal ve fonksiyonel hasarından sorumlu olduğunu kanıtlamıştır.

MG ve deneysel MG hayvan modelleri, serumda anti-AChR antikorların varlığı, IgG'ler, NMJ'de kompleman birikimi gibi immüнопatolojik özellikler ile kas zaafı ve yorulma gibi klinik belirtileri paylaşmaktadırlar. Bunun yanı sıra, her iki grupta da,

antikolinesteraz ilaçları ile tedavi sonrasında kas gücünün geçici olarak geri kazanımı söz konusudur [24].

Tablo 2-2. MG ve deneysel modeli arasındaki immünopatolojik benzerlikler ve farklılıklar [24].

Özellik	MG	DOMG
Kas zaafı ve anti-kolinesteraz ile geçici iyileşme	Evet	Evet
Elektromiyografi	Azaltma	Azaltma
MEPP	Azaltma	Azaltma
Otoantijen	AChR (~% 90)	AChR
Genetik yatkınlık	MHC sınıf II (HLA-DQ β zincir polimorfizmi)	MHC sınıf II I-Ab (β zinciri)
Patoloji	AChR kaybı	AChR kaybı
Patolojinin nedeni	Anti-AChR antikor Kompleman aktivasyonu	Anti-AChR antikor Kompleman aktivasyonu

MG ve DOMG arasındaki benzerlikler; serumda anti-AChR antikorların varlığı, nöromusküler kavşakta IgG'ler ve kompleman birikimi, kas dokusunda AChR'ların kaybı, T helper(yardımcı) hücrelerin B hücresi antikor üretiminde rol oynamasıdır. Farklılıklar ise; hastalığın kendiliğinden ortaya çıkmaması, indüklemeye faktörlerine ihtiyaç duyulması, deney modellerinde timüsün olmaması, timik farklılaşmanın gözlenmemesi(hipertrofi ve timomalar MG hastalığında mevcuttur)dir [24].

MG, HLA / DQ β zincir polimorfizmi ile ilintilidir ve DOMG'nin gelişiminde majör doku uyumu (MHC) sınıf II molekülleri önemli bir rol oynar. MHC sınıf II β -zincir genindeki bir mutasyon DOMG modelinin gelişimini önler [24].

AChR molekülünün α zinciri üzerinde yer alan T hücresi epitoplarından α 146-162'nin, C57BL6 / J farelerinde DOMG'nin gelişiminde rol oynayan patojenik T hücresi epitoplarından biri olduğu gösterilmiştir [24]. 146-162 peptidine reaktif T lenfositler, B hücrelerinin patojenik anti-AChR antikorları üretmesine yardımcı olur. IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α gibi çeşitli sitokinler T ve B hücresi proliferasyonu ve farklılaşması için önemlidir ve dolayısıyla DOMG patogenezinde dikkate değer bir şekilde rol oynarlar. Bu sitokinlerin, IL-1 reseptör antagonisti ve rekombinant insan tümör nekroz faktörü reseptörü Fc proteini gibi reaktifler tarafından inhibisyonu, DOMG'yi önler veya tedavi eder. Kompleman yolağının C3, C5; C1q ve C4 bileşenleri DOMG indüklenmesinde önemli rollere sahiptir. Bu kompleman bileşenlerin eksik olduğu durumlarda serum anti-AChR antikor seviyelerini düşürmeden DOMG'ye karşı dirençli fareler oluşur, bu da DOMG'deki nöromüsküler kavşağın yıkımının anti-AChR antikorları ile klasik kompleman yolunun aktivasyonuna bağlı olduğunu kanıtlar niteliktedir [26, 27, 28]. DOMG'nin C1q inhibe edici antikorlar ile tedavisi ve önlenmesi de DOMG patogenezinde klasik kompleman yolunun önemini gösterir [24]. Bir çalışmada, DOMG indüklenmesini önlemesinin, C5a eksikliğiyle ilişkisi olmayıp, C5b'nin yokluğundan kaynaklanan yetersiz MAC üretiminden kaynaklandığı bulunmuştur. Bu nedenle, C5a'nın blokajının, MG hastalarında kas zaafına yol açması beklenmez [19]. Buna karşın bir çalışmada C5aR'in miyastenik timik dokuda başlangıçta eksprese edildiği gösterilmiştir [20]. DOMG farelerinde timik anormalliklerin mevcut olmayışı göz önünde bulundurulduğunda, C5a eksikliğinin, DOMG modelinin indüklenmesini önleme ile ilişkisi olmaması anlaşılabilir [19].

2.6.1. Başarılı bir immünizasyon için dikkat edilmesi gereken hususlar

Emülsiyonun kalitesi ve enjeksiyonun doğru bir biçimde yapılması hastalığı indükleyebilmek açısından oldukça kritiktir. Sulu AChR çözeltisi, önce Freund'un adjuvanına (CFA) eklenmelidir. Şırıngalar arasındaki ilk birkaç transfer, yağda başarılı bir su emülsiyonu oluşturabilmek için hızlı bir şekilde yapılmalıdır ve emülsiyon, bu sırasında oluşan ısının azaltılması ve daha yoğun bir hale gelmesi için 4 ° C'de saklanmalıdır. Başarılı bir emülsiyon elde edilip edilmediğini kontrol etmenin iki yolu vardır: Bir yol, emülsiyondaki küçük hava kabarcıklarının bir yerde sabitlenip sabitlenmediğini gözlemlemektir. Diğer yol ise, 25-G iğne kullanarak beher kabındaki soğuk suya bir damla emülsiyon damlatmaktır. İlk birkaç damla yayılabilir, ancak daha

sonraki damlalar bozulmadan kalmalıdır. Deri altı enjeksiyonu diğer enjeksiyon yollarından daha fazla immünojenik olduğundan, iğne uygun şekilde konumlandırılmalı ve emülsiyon enjekte edilmeden önce iğnenin cildin altında net bir şekilde görünmesi gerekir [24].

MG'nin klinik belirtileri, AChR ile ikinci immünizasyondan 3 ila 10 gün sonra görülmelidir. Farelerin yaklaşık% 10'u, birincil immünizasyondan 25 gün sonra hastalık belirtileri geliştirebilir. Hastalık insidansı düşükse, ikinci immünizasyondan 30 gün sonra üçüncü bir immünizasyon uygulanabilir. İmmünizasyondan sonra, özellikle ikinci immünizasyondan önce ve sonra, fareler günlük olarak dikkatle gözlemlenmeli ve kas zaafı açısından değerlendirilmelidir. Hastalığı değerlendirme azımsanmayacak derecede zaman alır. Hayvanlar enfeksiyon veya hastalık belirtileri gösteriyorsa, bir veterinere danışılmalıdır. Hastalığı çok şiddetli seyreden hayvanlara, denemenin sona ermesini beklemeden ötenazi yapılmalıdır [24].

DOMG'deki otoimmün yanıtın hedefi olduğundan dolayı, kas dokusundaki AChR'ye karşı oluşan serumdaki antikorun düzeyini ölçmek çok önemlidir fakat patojenik antikor olmadıklarından dolayı TACHR'ye karşı serum antikorunun ölçülmesi gerekli değildir [24].

İmmünize edilmiş hayvanların yüzde otuz ila yetmişinde en azından 1. derece kas zafiyeti gözlenmelidir. Serum anti-AChR antikor seviyesi, serum litresi başına 0 ila 6 mM arası olmalıdır. AChR ile immünize edilen farelerin yaklaşık % 10 ila % 20'si AChR'ye karşı antikor üretemez. Bu grup seronegatif olacaktır. Kas dokusundaki AChR kaybı % 20 ila % 70 arasında olmalıdır. AChR ile bağışıklanmış farelerin tümünde IgG ve komplemanlar saptanır, ancak sadece CFA ile immünüze edilmiş veya hiç immünize edilmemiş farelerde saptanmaz [24].

DOMG'nin seyri, immünize hayvanların vücut ağırlığı ve kas gücü kaybının izlenmesi ile değerlendirilmektedir. Egzersiz sonrası tremor, kambur duruş, kas zaafı ve yorgunluğu gibi miyastenik semptomlar değerlendirilir [29].

Tablo 2-3. DOMG semptomlarının klinik olarak değerlendirilmesi [25].

Klinik Skor	Klinik Bulgular
0 derece	Normal kas gücü ve yorgunluğun gözlenmemesi
1. derece	Hafifçe azalmış aktivite ve kavrama yeteneği ya da ağlama
2. derece	Klinik semptomların egzersiz öncesinde gözlenmesi
3. derece	Dinlenme sırasında şiddetli klinik belirtiler, kaybolmuş kavrayış yeteneği, can çekişme
4. derece	Ölüm

MG hastalığının patogeneğinde rol oynayan faktörlerin araştırılması için gerekli olan transgenik, knockout ve mutant farelerin mevcut olmasından dolayı deneysel hastalığın çalışılabilmesi açısından en ideal model farelerdir [30, 31, 32]. Bu nedenle DOMG modeli en çok farelerde çalışılmıştır. Yüksek duyarlılıklarından dolayı en çok C57BL/6, SJL ve AKR suşları tercih edilmiştir. BALB / c ve SWR suşları ise daha az duyarlıdır [31, 32]. Farelerde DOMG, iki ya da üç kez verilen CFA adjuvanında saf AChR (20g) ile indüklenir. Bu işlem farede AChR'ye karşı antikorların üretimini tetikler ve myastenik semptomlar tipik olarak son enjeksiyondan 7-14 gün sonra ortaya çıkar [29, 33]. TACHR ile indüklenmiş farelerde insandakine en benzer klinik semptomlar gözlenen suş Lewis sıçanıdır [34]. Lewis sıçanlarındaki DOMG genellikle, CFA'da AChR (20 ug) tek doz immünizasyonu yoluyla indüklenir [29,33]. Sıçanlarda DOMG modelinin AChR α - alt biriminin (R97-116) immünojenik bölgesine (11-1616) tekabül eden sentetik bir peptid ile de indüklenebileceği kanıtlanmıştır. TACHR ile indüklenen DOMG ile karşılaştırıldığında, R97-116-indüklü DOMG'da hastalığın seyri daha yavaştır [35].

2.6.2. Terapötik yaklaşımların araştırılması için DOMG modelleri

Deneysel MG'nin temel amacı, hastalığın patolojik mekanizmalarını anlamak ve potansiyel yeni tedavi yaklaşımlarını araştırmaktır[36]. MG hastalığının güncel tedavisi hastaların bir bölümünde etkili olmamakla birlikte tedavi amacıyla kullanılan immünosupresif ilaçların çok sayıda yan etkisi bulunmaktadır. Dolayısıyla, antijen-spesifik bağışıklık hücrelerini baskılamak ve MG hastalarında gözlenen istenmeyen etkileri azaltmak için yeni yaklaşımlar gereklidir.

Son yıllarda DOMG modelinde çalışılmış yeni tedavi yaklaşımları 5 ana gruba ayrılır: 1- periferal toleransı sağlamak amacıyla immüno-modüle edici hücrelerin kullanımı 2- sitokinler veya probiyotikler gibi biyolojik ajanlar yoluyla immünomodülasyonu indüklemek için tedaviler 3- yeni geliştirilen farmakolojik yaklaşımlar; 4- kompleman aktivitesinin inhibitörleri; ve 5- RNA / mikroRNA interferansı gibi moleküler biyoloji yaklaşımları [37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44].

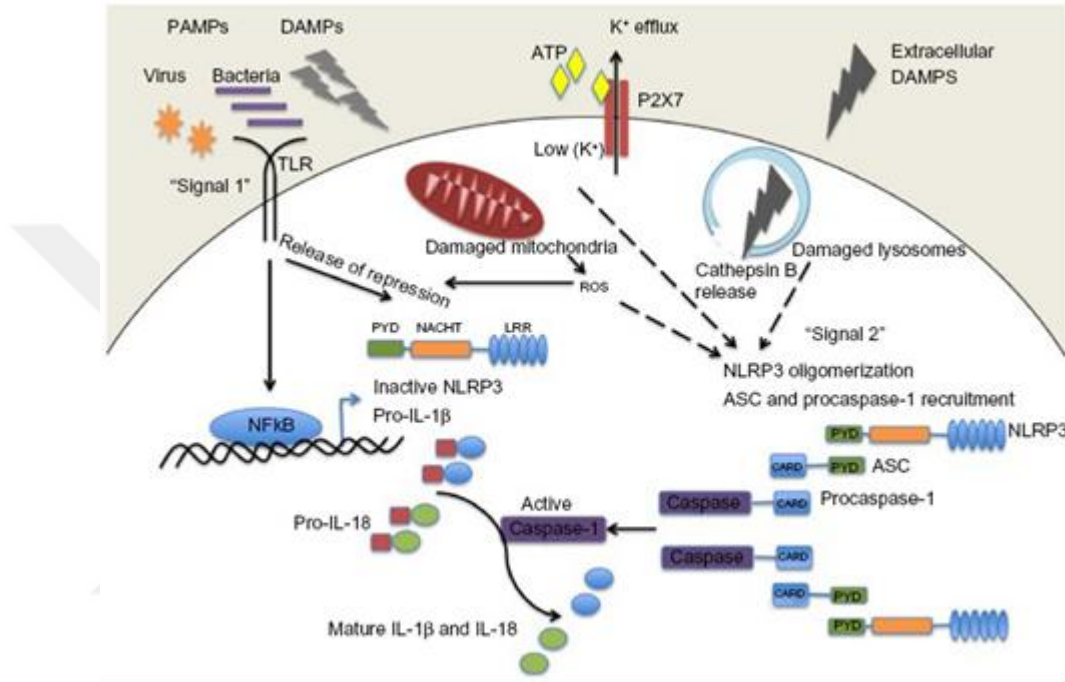
DOMG modeli, otoantikorların patojenik mekanizmalarını anlamada ve hem farmakolojik tedavilerin hem de hücre terapisi stratejilerinin etkinliğini kanıtlamada insan hastalığının araştırılmasını teşvik eden sonuçlarla büyük bir değere sahiptir. DOMG modeli ile çalışırken her zaman Russell ve Burch'un 3R kuralına (yerine koyma, azaltma ve iyileştirme) uymak gereklidir: mümkün olduğu müddetçe deney hayvanları dışında alternatif yöntemler kullanarak en iyi sonucu elde etmek, mümkün olabilecek en az sayıda deney hayvanı kullanmak, uygulanacak işlemler sırasında hayvanın ağrısı ve stresinin en aza indirilmesidir [45].

2.7. İNFLAMAZOMLAR

İnflamazomlar kaspaz-1'in aktivasyonunu regüle edip hastalık yapıcı mikroplar ve konak proteinlerden türemiş moleküllere karşı enflamatuvar yanıtı oluşturan multimerik protein kompleksleridir [5].

Nod benzeri reseptör (NLR) protein ailesi, geniş bir yelpazedeki tehlike ve patojenle ilişkili moleküler modellerin(DAMP ve PAMP) tanınmasında hayati bir rol oynayan doğal bağışıklık sisteminin hücre içi patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) grubudur [50, 51]. İnsanlarda, NLR ailesi 22 genden oluşur iken fare genomu en az 34 NLR-kodlayan gen içermektedir [52]. NLR proteinlerinden NLRP3 (NALP3 veya kriyoprin olarak da bilinir), NLRP1, NLRC4 ve AIM2 aktivasyonu, inflamazom olarak adlandırılan büyük protein komplekslerinin oluşumuyla sonuçlanır. NLR'lerin

aktivasyon mekanizması hala aktif bir tartışma konusu olmakla birlikte, NLRP3, NLRP1, NLRC4 ve AIM2 aktive edildikten sonra, bir inflamazom adaptör proteini, ASC (PYCARD) ile etkileşime izin veren bir konformasyonel değişime uğrar ve kaspaz-1 ile etkileşir. Ortaya çıkan inflamazom, IL-1 β ve IL-18'in pro-formlarını aktif formlara dönüştüren kaspaz-1'in otomatik aktivasyonuna aracılık eden bir moleküler platform olarak işlev görür [53].



Şekil 2-2: NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu (Ozaki E, Campbell M, Doyle S, 2014).

2.7.1. NLRP3 inflamazomu

NLRP3 inflamazomu en geniş agonist(uyaran) yelpazesine yanıt veren inflamazomdur [54, 55, 56]. Her ne kadar bu agonistler birbirinden son derece farklı olsa da, NLRP3 inflamazomunu aktive etmeleri sonucunda oldukça benzer olayların geliştiği bilinmektedir. NLRP3 aktivasyonunun mekanizmaları; hücre dışına potasyum akışı, mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin(ROS) oluşumu, NLRP3'ün mitokondriye translokasyonu, mitokondriyal DNA veya kardiyolipin salınımı ve katepsinlerin sitozole salınımı gibi olayları içermektedir [57, 54]. Ne var ki, bu olaylar tüm NLRP3 agonistleri tarafından tetiklenmez, dolayısıyla NLRP3 aktivasyonunun kesin mekanizması hala tartışmalıdır.

Çoğu hücre tipinde lipopolisakkaritin (LPS) TLR4'e bağlanmasının NLRP3'ün NF- κ B yolağı ile hücrel ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir.

NLRP3 inflamazom oluşumunu indükleyen NLRP3 agonistleri arasında ATP, bazı toksinler, kristalin maddeler, nükleik asitler, hiyalüronan ve fungal, bakteriyel veya viral patojenler bulunmaktadır [57, 58]. Bu uyaranlara enfeksiyon sırasında rastlanabilir, bunlar patojenler tarafından üretilir veya hasarlı konakçı hücreler tarafından salınır. Ek olarak, vücuttaki patolojik koşullar, enfeksiyonun yokluğunda da bu uyaranların oluşumunu teşvik edebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kaspaz-8'in NLRP3 inflamazomunun transkripsiyonu ve aktivasyonu için gerekli olduğu da göstermiştir [5].

2.7.2. İnflamazom Aktivitesini Düzenleyen Faktörler

NLRP3'ün aşağıdaki aktivasyon mekanizması tarif edilmiştir: İlk olarak, bakteriyel veya viral RNA, ATP, ürik asit kristalleri, silika ve diğer benzer faktörler, toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), NOD2, TNFR1 veya TNFR2 ile etkileşime girer ve bunun sonucunda NLRP3'ün eksprese olması indüklenir [59, 60, 61]. Sonrasında, PAMP veya DAMP, inflamatuvar oluşumu başlatmak için NLRP3'ü tetikler [63]. P2X7 / P2X4'ün ATP'nin bir reseptörü olduğu gösterilmiştir ve P2X (4) reseptörleri, inflamazomları aktive eden bir başka önemli sinyaldir. P2X(4)'ün omurilik yaralanması ve osteoartrit gibi durumlarda NLRP1 inflamazom sinyalini etkilediği bildirilmiştir [64]. Bir çalışmada, CD4 + bellek T hücrelerinin, P2X7R sinyalini azaltarak NLRP3 aktivasyonunu bastırdığı, Başka bir çalışmada ise kaspaz-1 ile ilişkili kaspaz-12'nin aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir [65, 66]. Dahası, bir proteoglikan olan biglikanın, makrofajlar üzerindeki TLR2 / 4 ve purin P2X4 / P2X7 reseptörleri ile etkileşerek NLRP3 inflamazomlarını aktive ettiği de gösterilmiştir [67]. Antiapoptotik proteinler, aktive edilmiş T hücreleri ve mikroRNA'lar, inflammasomların negatif düzenleyicileridir [68]. TNFAIP3 ve antiapoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-X (L) 'nin bağlanmalarının NLRP1'e negatif etkide bulunduğu gösterilmiştir [69, 70]. NF- κ B'da inflamazomlar için aktivasyon sinyallerinden biridir[71]. Atorvastatinin TLR4 / MyD88 / NF- κ B yolağı ile monositlerdeki inflamazomları baskıladığı gösterilmiştir [72]. Miyeloid spesifik mikroRNA'lar, miR-223 ve miR-7, NLRP3 protein ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla NLRP3 inflamazom aktivitesini bastırır [73, 74].

Yapılan bir başka çalışmada, polioksotungstat-1 (POM-1)'in, ATP bağımlı inflamazom aktivasyonunu inhibe edebildiği gösterilmiştir [75].

Tablo 2-4. İnflamazomların negatif regülasyon faktörleri. [76].

Regülasyon Faktörü	Hedef	Mekanizma
A20/TNFAIP3	NLRP1	Bcl-2 ve Bcl-X(L) ile bağlanma
miR-223	NLRP3	NLRP3'ün tercüme edilmeyen bölgesi(UTR) içinde korunan bağlanma bölgesine etki etme
miR-7	NLRP3	Post-transkripsiyonel olarak kontrol edilen NLRP3 ifadesi
İnsan CD4 + hafıza T hücreleri	NLRP3	P2X7R sinyalleme moleküllerinin down regülasyonu
Kaspaz-12	Kaspaz-1	Kaspaz-1 ile ilişkili
POM-1	NLRP1	ATP-bağımlı inflamazom ile ilgili olayların inhibisyonu
Probenesid	NLRP3	Pannexin 1 kanal blokajı ve yüksek düzeyde ekstraselüler potasyum
TipI interferonlar	NLRP1/ NLRP3	STAT1 transkripsiyon faktörü aracılığı ile

2.7.3. İnflamazomların Hastalıklar İle İlişkisi

İnflamazom aktivasyonu, konakçıların patojenlere karşı savunması için kritik öneme sahiptir, fakat son yıllarda yapılan çalışmalar, inflamazomların pek çok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğunu göstermektedir.

Otoimmün hastalıklar, adaptif immün sistem tarafından meydana gelen ve doğal antijenlere karşı immün reaktivite oluşumu ile sonuçlanan inflamasyon olarak tanımlanabilir. T ve B hücrelerinin hiper-reaktivitesi (aynı zamanda anormal dendritik

hücrelerin), otoantikorların ve antijene özgü T hücrelerinin vücudun kendi dokusuna saldırıp tahrip etmesine neden olur. Otoimmün hastalıklar çoklu organ tutulumuna neden olabilir, fakat etkilenen birincil organ, hastalığın klinik sunumunu ve tanımını belirler [53]. Prototipik otoinflamatuvar bozuklukların bir kısmı, inflamazom oluşturan NLR'lerde mutasyonlarla güçlü bir şekilde bağlantılıdır [77]. Örneğin, NLRP3 inflamazomunun aşırı aktivitesine yol açan mutasyonlar, IL-1 β salımını artırır ve kryopirin ilişkili periyodik sendromlara (CAPS) neden olur [78]. CINCA/NOMID(Yenidoğan Başlangıçlı Multisistem İnflamatuvar Hastalık) sendromunda, anakinra, rilonacept veya canakinumab ile IL-1 β 'nin doğrudan, sürekli inhibisyonu kemik iliği büyümesi dışında tüm klinik belirtileri iyileştirir[77, 78].

Otoimmünitede inflamazomların rolünün henüz tam olarak anlaşılamamıştır. İnflamasom indükleyen NLR'ler ve otoimmün hastalıklar arasındaki genetik bağlantılar sınırlıdır, ancak bu, bu hastalıkların ilerlemesinde enflamatuvar aktivasyonun potansiyel rolünü dışlamaz. NLR'leri aktive eden endojen tehlike sinyallerinin geniş spektrumunun ve IL-1 β ve IL-18 gibi enflamasyon ürünlerinin, adaptif bağışıklığın şekillenmesinde oynayabileceği rolü göz önünde bulundurmak gereklidir [79, 80]. IL-1 β , IL-2 reseptör anlatımını arttırması, T hücrelerinin hayatta kalmasını uzatmak, B hücrelerinin antikor üretimini arttırmak ve B hücresi proliferasyonunu arttırmak gibi çeşitli yollarla lenfositler üzerinde etki gösterebilir [81, 82]. IL-1 β ve IL-18 ayrıca Th17 ve Th1 hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını yönlendirmede kritik bir rol oynar. Bu nedenle, genel olarak IL-1 β ve IL-18, T ve B hücre yanıtlarını arttırır ve NLR aktivasyonunu adaptif immün tepkilere dönüştüren önemli bir bağlantı olarak görev alabilir [53].

Yapılan bir çalışmada, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) enjeksiyonları, C57BL / 6 farelerinde klinik DOMG'nin şiddetini ve serumdaki serum IFN- γ , TNF- α , IL-1p, C3 ve anti-AChR IgG1 miktarını azaltmıştır [83]. Yapılan bir diğer çalışmada, kaspaz-1 inhibisyonunun, Th17 hücrelerinin gelişimini ve EAE (deneysel otoimmün ensefalomyelit)'nin indüksiyonunu baskıladığı ve bu durumun, IL-1 β uygulanmasıyla tersine çevrildiği gözlenmiştir [84]. Bazı çalışmalar, aktive edilmiş kaspaz-1'in, IL-1 β salgılanması yoluyla DC'de MHC sınıf II, CD80 ve CD86'nın ekspresyon artışına yol açabileceğini doğrulamıştır [85]. 2015 yılında yapılan bir çalışmada ise kaspaz-1 inhibitörünün MG hayvan modelinde hastalığın semptomlarını kayda değer ölçüde

iyileştirdiğini ve buna bağlı olarak, kaspaz-1'in hastalığın etiolojisinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir [4]. İnflamazomların kaspaz-1'i aktive ettiği göz önünde bulundurulduğunda, bu bulgu bize hastalığın ve diğer otoimmün hastalıkların etiolojisinde inflamazom moleküllerinin rol aldığını düşündürmektedir.

Tablo 2-5. Çeşitli hastalıklarda inflamazomların rolü [53].

Hastalık	Hastalık nedeni	Genetik mutasyonlarla ilişki	IL-1 blokajına yanıt	Hayvan modelinde inflamazom etkisi
İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH)	Gastrointestinal kanalın poligenik enflamasyonu	Var	Yok	Var
Tip 2 Diyabet	Poligenik / metabolik stres ve inflamasyon	Yok	Var	Var
Esansiyel hipertansiyon	Nedeni belirsiz yüksek tansiyon	Var	Test edilmemiş	Test edilmemiş
Alzheimer hastalığı	Dejeneratif beyin hastalığı	Yok	Test edilmemiş	Var
Ateroskleroz	Yağlı materyallerin birikmesi sonucu arter duvar kalınlaşması	Yok	Test edilmemiş	Var
Kontakt alerjik Dermatit	Hassaslaştırıcı alerjenler	Var	Test edilmemiş	Var
Ailevi soğuk otoinflamatuar sendrom (FCAS)	NLRP3 mutasyonu	Var	Var	Var
Muckle Wells Sendromu (MWS)	NLRP3 mutasyonu	Var	Var	Var
Yenidoğan Başlangıçlı	NLRP3 mutasyonu	Var	Var	Var

Multisistem İnflamatuvar Hastalık (CINCA)				
Tip 1 diyabet	Pankreas β hücrelerinin kendini yok etmesi	Var	Test edilmemiş	Test edilmemiş
Multiple Skleroz (MS)	Oligodendrositlerin kendini yok etmesi	Yok	Test aşamasında	Belirsiz
Sistemik lupus eritematoz	antijenler ile reaksiyona giren patojen antikorlar	Yok	Var	Test edilmemiş
Vitiligo	Melanositlerin kendini yok etmesi	Var	Test edilmemiş	Test edilmemiş
Addison hastalığı	Adrenal korteksin yıkımı	Var	Test edilmemiş	Test edilmemiş
Romatoid artrit	Sinovyal eklemlerin kendini yok etmesi	Var	Var	Yok
Çölyak hastalığı	Gluten ile tetiklenen ince bağırsak astarının tahribi	Var	Test edilmemiş	Test edilmemiş

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DOMG Modelinin Oluşturulması

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, 8 haftalık 15 adet erkek C57Bl/6J (B6) fare kullanılmıştır. Fareler, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan temin edilerek, diyet ve bakımları çalışma boyunca bu anabilim dalı bünyesindeki bariyer sistemli steril bakım odalarında rutin kontrol altında gerçekleştirilmiştir. Deneyler, hem AChR ve CFA ile birlikte immünize edilen(AChR+CFA) hem de yalnızca CFA ile immünize edilen (CFA) fare gruplarından oluşturulmuştur. Bu çalışma için etik kurul onayı, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Karar No:10.07.2017) tarafından verilmiştir.

3.1.2. AChR Proteini Eldesi

İmmünizasyonda immünojen olarak kullanılan insan AChR proteini Teksas Üniversitesinden Dr. Premkumar Christadoss ve ekibi tarafından sentezlenip saflaştırılmıştır.

3.1.3. İmmünizasyon

Çalışma 2 ayrı zamanda, kontrol grubu olarak complete freud ajduvantı enjekte edilen 7 fare ve deney grubu olarak torpedo AChR proteini ile adjuvan karıştırılarak hazırlanan emulsiyon enjekte edilen 8 fareye subkutan enjeksiyon şeklinde yapılmıştır.

İmmünizasyon oluşturmak amacıyla 40 µg AChR proteini (100 µl fosfat tamponu içinde) ve 100 µg Mycobacterium butyricum içeren (100 µl) ‘complete Freund’s adjuvant’ (CFA) karıştırılarak 200 µl’lik bir emulsiyon hazırlanmış ve bir taraf bacak ve omuza s.c. olarak enjekte edilmiştir. Aynı işlem 4 hafta sonra aynı miktarda complete Freund’s adjuvant (CFA) ile oluşturulmuş emulsiyon ile karşı taraf bacak ve omuza uygulanmıştır. Fareler izlenmiş ve kas zaafları skorlanmıştır. AChR ile immünize edilen fareler her gün kontrol edilmiştir. İmmünizasyon işlemi öncesi anestezik olarak 1:5 oranında PBS ile sulandırılmış propofol intraperitoneal olarak fare başına 20 µl/gr kullanılmıştır. İmmünizasyon öncesinde proteinin saflığı jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

Tüm hayvanlara dört haftada bir defa olmak üzere toplamda 3 kez immünizasyon yapılmıştır. İlk immünizasyondan sonra her immünizasyon sonrasında

farelerin kuyruk veninden az miktarda kan alınıp serumlarda Eliza ie antikor tespiti yapılmıştır.

AChR proteini PBS içinde çözülerek CFA ile 1:1 oranında bir emülsiyon hazırlanmış ve bu emülsiyondan fare başına 20 µg olacak şekilde toplam 200 µl uygulanmıştır. Tüm enjeksiyon uygulamaları subkütan olarak yapılmıştır. Birinci immünizasyonda sağ ve sol ayak patisine ve sağ ve sol omuza, ikinci ve üçüncü immünizasyonda ise iki (sağ ve sol) omuz ve iki (sağ ve sol) bacak bölgesine enjekte edilmiştir. Üçüncü immünizasyon sonrasında tüm farelerin kuyruk kanları alınmıştır. Kuyruk kanları toplandıktan sonra tüm fareler sakrifiye edilip lenf gangliyonu hücreleri izole edilmiş ve serumlar kullanılıncaya kadar -80C'de dondurulmuştur. Farelerin kol ve bacak kasları ise histolojik incelemeler için -80C de saklanmıştır.

3.2. Klinik Değerlendirmeler

İmmünizasyon sonrasında fareler her gün kontrol edilmiştir. Farelere haftada iki kez asma testi uygulanmış, kas zaafları skorlanmış ve haftada bir kez ağırlıkları ölçülmüştür. Deney grubu sadece CFA (n=7) ve AChR +CFA (n=8) olarak belirlenmiştir.

3.2.3. Kas Gücü Değerlendirmesi

İmmünizasyon sonrasında farelere haftada iki kez asma testi uygulandı ve kas zaafları skorlandı. Asma testi öncesinde farelere 40 kez kafes kapağının tellerinde egzersiz yaptırıldıktan sonra tele tutunmaları sağlandı ve kafesin kapağı ters çevrildikten sonra farelerin kavrama yeteneğini yitirip aşağı düşme süreleri not edildi. Düşen farelere kafes kapağında bu defa 20 kez olmak üzere tekrardan egzersiz yaptırıldı ve ortalamaları anlamlı değer olarak alındı. Beş dakika boyunca tele tutunabilen farelere tekrar egzersizi yaptırılmadı.

3.2.4. Kuyruk Veninden Periferik Kan Örneklerinin Toplanması

Farelerden kuyruk kanlarının alınma işlemi öncesinde vazodilatasyonu sağlamak amacıyla Infrared lamba kullanıldı. Ven üzerinde kesi atılacak bölge dezenfekte edildi.

Bu yöntemle her fareden ikinci immünizasyondan sonra yaklaşık olarak 100-150 µl kan örneği toplanmıştır.

3.3. Deneyin Sonlandırılması

3. İmmünizasyon sonrasında tüm fareler sakrifiye edilip lenf ganglionları izole edildi ve hücreler donduruldu. Kol ve bacak kasları ise histolojik testler için ependorf tüplere aktarıldı.

3.4. Laboratuvar Değerlendirmeleri

3.4.1. ELISA ile Antikor Tayini

AChR-CFA ve CFA farelerinin serumlarında anti-AChR IgG antikorları ölçüldü. ELISA plağı, antikor ölçümleri için torpedo AChR proteini ile kaplama solüsyonu (karbonat bikarbonat solüsyonu, pH 8.6) içinde kuyu başına 1 µg protein düşecek ve her bir kuyuda total hacim 100 µl olacak şekilde kaplandı ve gece boyu +4 derecede inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün plak bir kez % 0,5 Tween 20-PBS solüsyonu ile yıkandıktan sonra PBS içinde % 5 “fetal bovine serum” (FBS-PBS) solüsyonu ile her bir kuyuda total hacim 100 µl olacak şekilde oda sıcaklığında 2 saat bloklama yapıldı. Ardından % 5 FBS-PBS solüsyonu içinde 1:1000 ve 1:500 oranında sulandırılmış fare serumları her bir kuyuya 100 µl olarak konuldu ve 90 dakika +37°C de inkübe edildi. Tween-PBS solüsyonu ile yıkamadan sonra antikor ölçümleri için 1:5000 oranında sulandırılmış %2 FBS-PBS içinde HRP-konjuge sekonder antikor (keçi anti-fare IgG Abcam, Cambridge, İngiltere) her bir kuyuya 100 µl konuldu. Doksan dakika +37°C de inkübasyonun ardından, plak Tween-PBS solüsyonu ile yıkandı. Substrat olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) her kuyuya 100 µl konuldu. On dakika sonra reaksiyonu durdurma solüsyonu olarak 2M H₂SO₄ 100'er µl kuyulara konuldu. Hemen ardından 450 nm'de ELISA okuma işlemi gerçekleştirildi.

3.4.2. RNA İzolasyonu:

RNA izolasyonu için hazır ticari solüsyonlar kullanıldı. MRC (Kanada menşeli Cat. no: RN190) firmasının RNAzol RT solüsyonu kullanılarak total RNA izolasyonu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Hücreler -20 dereceden çıkartılarak buz üzerine konuldu ve 5 ml 'lik tüp içerisine aktarıldı. Üzerine 1mL RNAzol RT solüsyonu koyularak el homojenizatörü kullanılarak homojenize edildi. Sonra lizat üzerine 400 ul su eklenerek karışım 15 saniye boyunca çalkalandıktan sonra 15 dakika bekletildi. Sonra karışım santrifüje koyularak 12000 g de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen 1mL süpernatant alınıp

başka bir eppendorf tüpe konuldu. Süpernatant üzerine 5 ul 4-bromoanisole(BAN) eklenerek 15 saniye boyunca çalkalandıktan sonra 4 dakika bekletildi. Sonra santrifüje konularak 12000 g de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen 750 ul süpernatant alınarak başka bir eppendorf tüpe konuldu. Süpernatant üzerine yine aynı oranda 750 ul isopropanol eklendi ve 15 dakika bekletildi. Sonra santrifüje konularak 12000 g de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte kalan süpernatant pipet ile atılarak çökelti üzerine 400 ul %75 ethanol eklendi. Sonra santrifüje konularak 4000 g de 3 dakika santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Santrifüj sonunda alkol pipet ile atılarak çökelti üzerine 40 ul RNase free su eklenerek karışım oda ısısında 2-3 dakika vortekslenerek iyice çözüldü. RNA izolasyonu yapıldıktan sonra tüm örneklerin RNA konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Scientific Nanodrop 2000 cihazı ile ölçüldü. 1ul RNA örneği alınıp cihaza konularak konsantrasyon miktarı ve 260/280 ve 260/230 oranlarına bakılarak saflıkları belirlendi. Ölçüm yapıldıktan sonra RNA'lar -20 dereceye konularak saklandı.

3.4.3. cDNA Yapımı:

RNA eldesinden sonra, cDNA aşaması için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının (Alman menşeli Cat no: PCR511) script cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi.

cDNA yapımı öncesi tüm RNA konsantrasyonları 200ng/ul olacak şekilde eşitlendi ve cDNA reaksiyonu toplam hacim 20 ul olacak şekilde aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3-1. cDNA yapımı için hazırlanan karışım

RNAse free su	10,5 ul
Script RT buffer	4 ul
dNTP mix	1 ul
Oligo dT Primer	0.5 ul
DTT	1 ul
RNAse Inhibitor	0.5 ul

Enzim	0.5 ul
RNA ürün	2 ul

Enzim eklemeyen önce tüpe konulan tüm reaktifler birkaç kez pipet ile karıştırıldı. Tüm reaktifler ve örnek tüpe konulduktan sonra tüpler Bio-Rad termal cycler cihazına konularak cDNA reaksiyonu aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirildi:

Tablo 3-2. cDNA eldesi için uygulanan ısı koşulları

Sıcaklık °C	Süre(dakika)
42	10
50	60
70	10
4	33

Bu süre sonunda elde edilen ürünler -20 derecede saklandı.

3.4.4. Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyonu

cDNA eldesinden sonra diğer aşama olan Gerçek zamanlı PZR işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının (Alman menşeli Cat no: PCR306) qPCR GreenMaster with UNG/lowROX kiti kullanılarak Gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. Toplam hacim 20 ul olacak şekilde aşağıdaki tabloda belirtilen karışım hazırlandı.

Tablo 3-3. Gerçek zamanlı PZR karışım içeriği

PCR grade su	6.8 ul
RealTime Master Mix	10 ul
Forward Primer	0.6 ul

Reverse Primer	0.6 ul
cDNA ürün	2 ul

Çoğaltılacak gen bölgelerine özgün primerler “NCBI Primer Blast” programı kullanılarak tasarlanmıştır.

Tablo 3-4. Gerçek zamanlı PZR için tasarlanan primer dizileri:

Gen	Dizi	Tm
Akt1 F	TAGGCCCAGTCGCCCCG	54.6 °C
Akt1 R	AGGTGCCATCGTTCTTGAGG	54.6 °C
P2rx7 F	CCTAGGTGAGGGTTTGCTGT	61 °C
P2rx7 R	GGTGTGCACGGAGCTGATAA	61 °C
casp1 F	GGACCCTCAAGTTTTGCCCT	58.1 °C
casp1 R	GCAAGACGTGTACGAGTGGT	58.1 °C
IL1b F	TGTCTTTCCCGTGGACCTTC	61 °C
IL1b R	TCATATGGGTCCGACAGCAC	61 °C
Nlrp3 F	TCCCAGACACTCATGTTGCC	54.6 °C
Nlrp3 R	GTCCAGTTCAGTGAGGCTCC	54.6 °C
Gapdh F (housekeeping gen 1)	AGCTACTCGCGGCTTTACG	54.6 °C
Gapdh R (housekeeping gen)	AATCCGTTACACCGACCTT	54.6 °C

ActB F(housekeeping gen-2)	CTGGCTCCTAGCACCATGAA	54.6 °C
ActB R(housekeeping gen-2)	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTA	54.6 °C

Daha sonra 96 well plate içine konulan standart ve örnek karışımları Biorad CFX Connect cihazına konularak reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. 50 derecede 2 dakika 95 derecede 2 dakika 95 derecede 15 saniye 55 derecede 45 saniye (primere göre değişiyor) 72 derecede 30 saniye.

3.4.5. İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışmamızda kontrol grubu ile hasta grubu arasındaki gen ekspresyon seviyesindeki farklılıklar Graph Pad programında t testi ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Serum anti- AChR antikor düzeyleri ve gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki pearson korelasyon testi ile yapılmış ve ve two tailed p değerleri hesaplanmıştır.

3.4.6. Kullanılan Malzemeler

- RNAzol RT MRC (Cat. no: RN190)
- 4-bromoanisole(BAN)
- Jena Bioscience PCR-511S SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Cat no: PCR511)
- Jena Bioscience qPCR green master with UNG/lowROX kit (Cat no: PCR306)
- İzopropanol

3.4.7. Kullanılan Ekipmanlar

- Buzdolabı (+4°C) ve derin dondurucular (-20°C, -80°C), (Panasonic, mdf-u537D)
- Santrifüj, (Beckman coulter allegra x-30r)
- Mikropipet seti

- PCR cihazı (RT-PCR, LightCycler, Roche)
- Vorteks (Microspin FV-2400, Biosan)
- Nanodrop (Maestro nano)
- Buz Makinesi (Cornelius)
- Eppendorf



4. BULGULAR

4.1. ELİSA:

Serum asetil kolin IgG (AChR) düzeyleri 2. ve 3. immünizasyondan sonra Elisa ile ölçüldü. Antikor düzeyi 1/500 ve 1/1000 olmak üzere iki konsantrasyonda denendi. Hasta grupta(ACH+CFA) serum asetil kolin IgG (AChR) değerinin ortalaması kontrol grubununkine(CFA) kıyasla belirgin derecede yüksekti.

8 adet fareden oluşan hasta grubun(ACH+CFA) ortalama değeri ile 7 adet fareden oluşan kontrol grubunun(CFA) ortalama değerinin birbirine oranı alınarak indeks elde edildi ve bulduğumuz indeksin 3. İmmünizasyondan sonra belirgin derecede yüksek olması DOMG modelinin klinik bulgularının doğrulandığını düşündürdü.

Tablo 4-1.1. 1.Grup Fare Eliza Sonuçları

fare	tarih	OD 1/500	OD 1/1000		INDEX	
ACH1	2.11.2017	0,117	0,105			
ACH3	2.11.2017	0,130	0,123			
ACH4	2.11.2017	0,236	0,196			
ACH5	2.11.2017	0,242	0,207			
ACH6	2.11.2017	0,201	0,175			
		0,185	0,161			
CFA1	2.11.2017	0,251	0,217			
CFA2	2.11.2017	0,226	0,184			
CFA3	2.11.2017	0,328	0,264			
CFA4	2.11.2017	0,231	0,220			
CFA6	2.11.2017	0,257	0,231			
		0,259	0,223		0,7	0,7
ACH1	14.12.2017	0,353	0,267			
ACH3	14.12.2017	0,408	0,382			
ACH4	14.12.2017	0,460	0,483			
ACH5	14.12.2017	0,477	0,458			
		0,425	0,398			
CFA6	14.12.2017	0,287	0,258			
CFA1	14.12.2017	0,261	0,211			
CFA2	14.12.2017	0,160	0,142			
CFA3	14.12.2017	0,293	0,227			
CFA4	14.12.2017	0,265	0,194			
		0,253	0,206		1,7	1,9

Tablo 4-2.1. 2.Grup Fare Eliza Sonuçları

fare	tarih	OD 1/500	OD 1/1000		INDEX	
ACH2	8.3.2018	0,263	0,225			
ACH4	8.3.2018	0,276	0,253			
ACH5	8.3.2018	0,432	0,404			
		0,324	0,294			
CFA1	8.3.2018	0,098	0,096			
CFA3	8.3.2018	0,117	0,091			
CFA4	8.3.2018	0,090	0,094			
		0,102	0,094		3,2	3,1
ACH2	5.4.2018	0,237	0,210			
ACH4	5.4.2018	0,329	0,240			
ACH5	5.4.2018	0,446	0,413			
		0,337	0,288			
CFA3	5.4.2018	0,122	0,088			
CFA4	5.4.2018	0,105	0,092			
		0,114	0,090		3,0	3,2

4.2. RNA İzolasyonu Sonuçları**Tablo 4-3.RNA izolasyonu**

Örnek	Konsantrasyon(ng/ul)	260/280	260/230
1CFA	320.3	1.666	0.716
2CFA	91.4	1.721	1.007
3 CFA	262.9	1.861	1.528
4CFA	160.6	1.631	0.665
5CFA	127.2	1.590	0.569
6 CFA	277.5	1.711	0.913
7CFA	466.2	1.815	1.277
8ACH	260.8	1.535	0.573
9 ACH	567.6	1.782	1.098
10ACH	247.8	1.680	0.649
11 ACH	190.6	1.662	0.703
12 ACH	39.5	1.374	0.402
13ACH	303.3	1.739	0.965
14ACH	190.7	1.688	0.805
15ACH	269.5	1.631	0.705

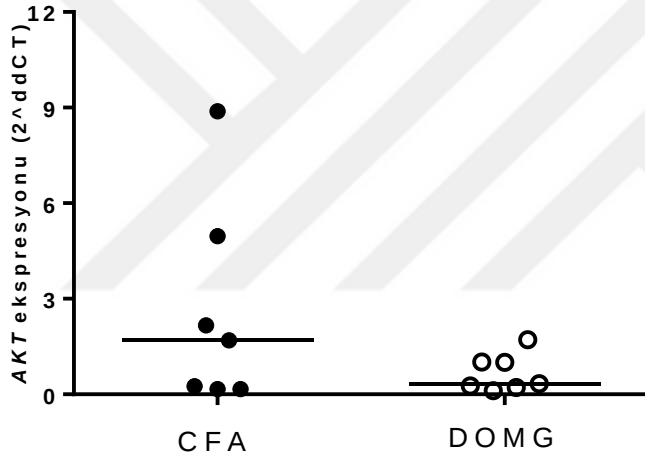
4.3. Gen Ekspresyon Düzeyleri

Hesaplanan Ct değerleri ile $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ formülü kullanılarak, DOMG grubunun gen anlatım düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldı. GAPDH ve Beta-actin genleri housekeeping genler (internal kontrol) olarak kullanıldı.

Bu çalışmada, deney grubu 8 fareden, kontrol grubu ise 7 fareden oluşmaktaydı.

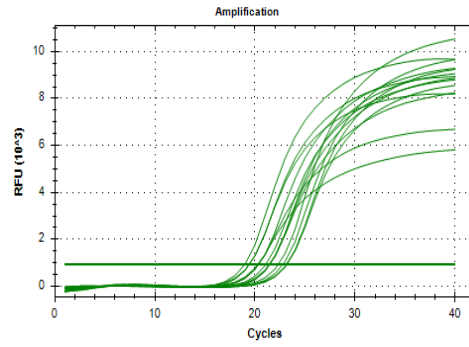
Q-PCR analizi sonuçlarına göre deney ve kontrol grupları arasında, kaspaz-1, Akt-1, P2X7R, NLRP3, IL-1 β inflamazomu, geni ekspresyon seviyesinde ise deney ve kontrol grubu karşılaştırıldığında artış görülmüştür. IL-1 β geninin ifadesindeki artış istatistiki olarak anlamlı düzeydedir ($P=0,01$, $P<0.05$).

4.3.1. Akt1 geni için:



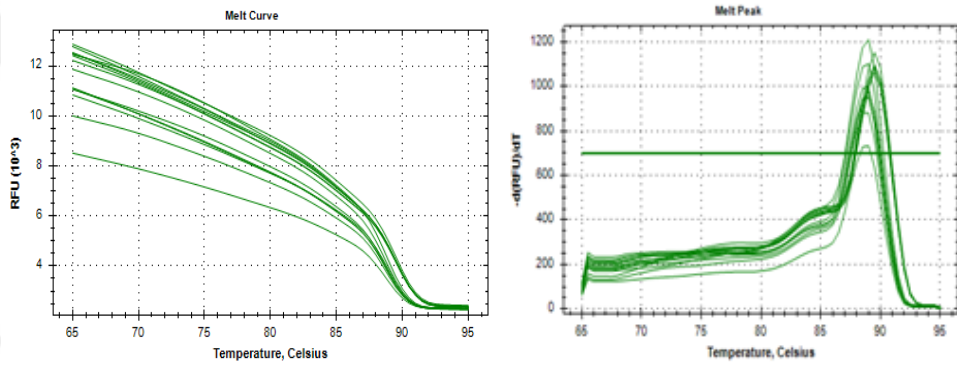
Şekil4-1.: Akt-1 geni transkripsiyon seviyesi. Kontrol ve Deneysel Otoimmün Myastenia Gravis (DOMG) oluşturulmuş farelerin total lenf ganglionlarından elde edilen hücrelerde Akt-1 geni transkripsiyon seviyeleri. Gruplar arasında Akt-1 gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak ($P=0,1451$, $P>0.05$) anlamlı bir fark yoktu. Genlerin ekspresyon düzeyleri GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Normalize edilen verilere $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ formülü uygulanmıştır.

4.3.2. Akt-1 gen profili



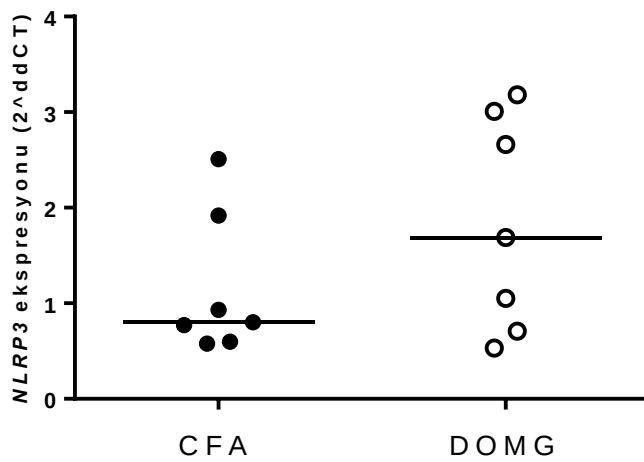
Şekil 4-2: Akt-1 gen profili.

4.3.3. Akt-1 geni erime eğrileri



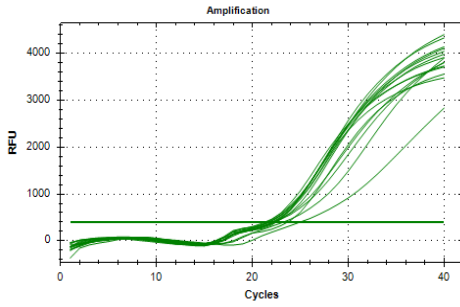
Şekil: 4-3: Akt-1 geni erime eğrileri

4.3.4. NLRP3 geni için:



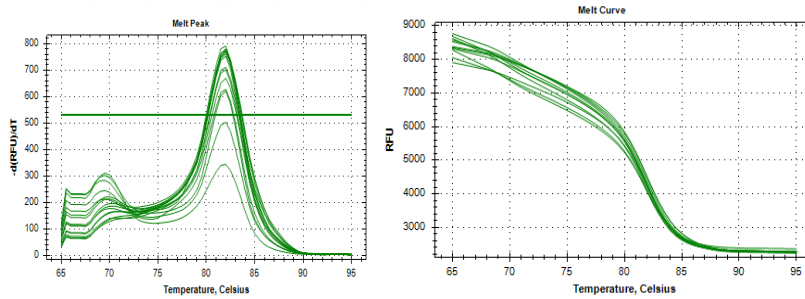
Şekil 4.4: NLRP3 geni ekspresyon seviyesi. Kontrol ve Deneysel Otoimmün Myastenia Gravis (DOMG) oluşturulmuş farelerin total lenf ganglionlarından elde edilen hücrelerde NLRP3 geni ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması. Q-PCR sonuçları gruplar arasında NLRP3 gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak ($P=0,2095$, $P>0.05$) anlamlı bir farklılık yoktu. Genlerin ekspresyon düzeyleri GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Normalize edilen verilere $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ formülü uygulanmıştır.

4.3.5. NLRP3 gen profili



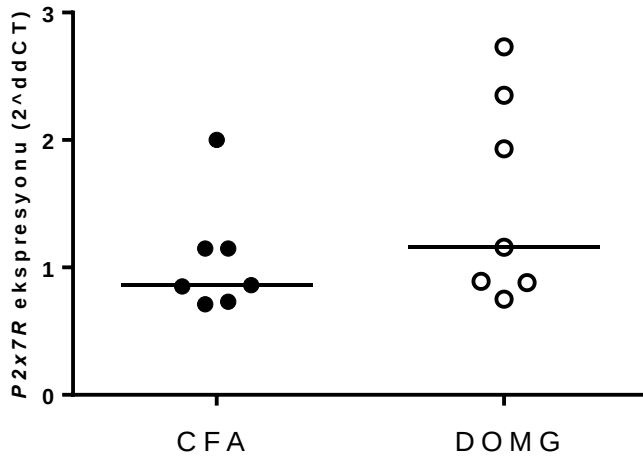
Şekil 4-5: NLRP3 gen profili

4.3.6. NLRP3 erime eğrileri



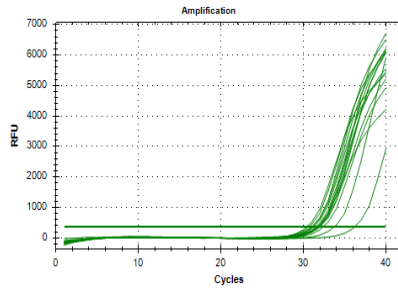
Şekil 4-6: NLRP3 erime eğrileri

4.3.7. P2X7R geni için:



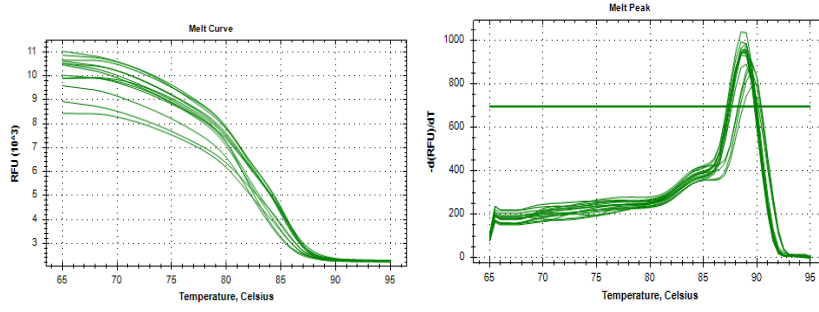
Şekil 4-7: P2X7R geni ekspresyon seviyesi. Kontrol ve Deneysel Otoimmün Myastenia Gravis (DOMG) oluşturulmuş farelerin total lenf ganglionlarından elde edilen hücrelerde P2X7R geni ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması. Q-PCR sonuçları gruplar arasında P2X7R gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak ($P=0,2073$ $P>0.05$) anlamlı bir farklılık yoktu. Genlerin ekspresyon düzeyleri GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Normalize edilen verilere $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ formülü uygulanmıştır.

4.3.8. P2X7R gen profili



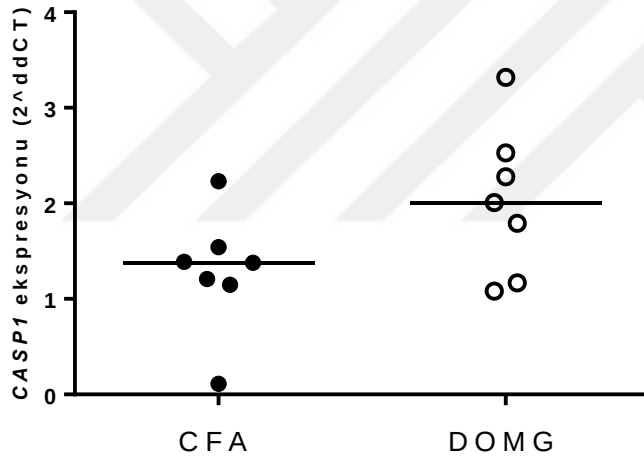
Şekil 4-8: P2X7R gen profili.

4.3.9. P2X7R erime eğrileri



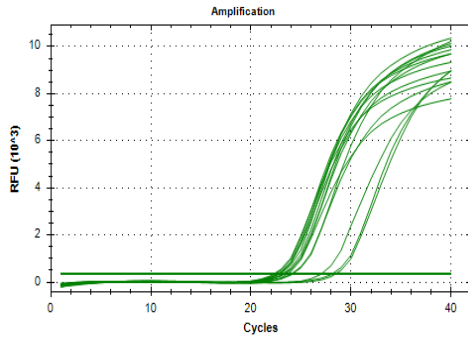
Şekil: 4-9: P2X7R erime eğrileri.

4.3.10. Kaspaz-1 için:



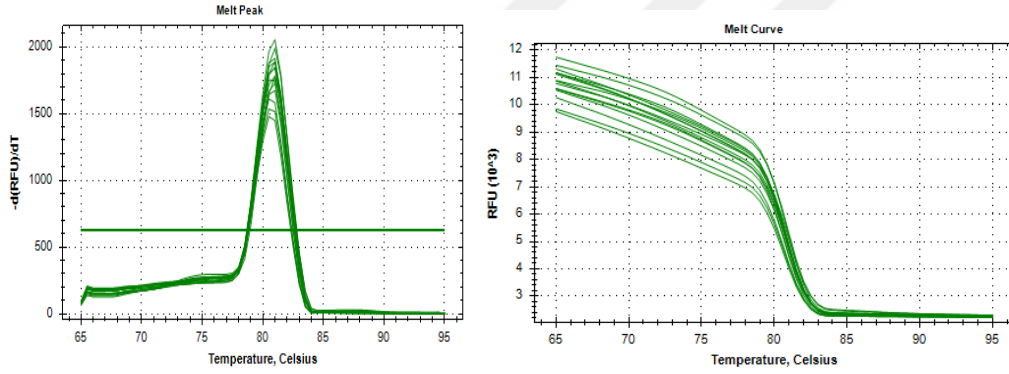
Şekil 4-10: Kaspaz-1 geni ekspresyon seviyesi. Kontrol ve Deneysel Otoimmün Myastenia Gravis (DOMG) oluşturulmuş farelerin total lenf ganglionlarından elde edilen hücrelerde kaspaz-1 geni ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması. Q-PCR sonuçları gruplar arasında kaspaz-1 gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak ($P=0,07$ $P>0,05$) anlamlı bir farklılık yoktu. Genlerin ekspresyon düzeyleri GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Normalize edilen verilere $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ uygulanmıştır.

4.3.11. Kaspaz-1 gen profili



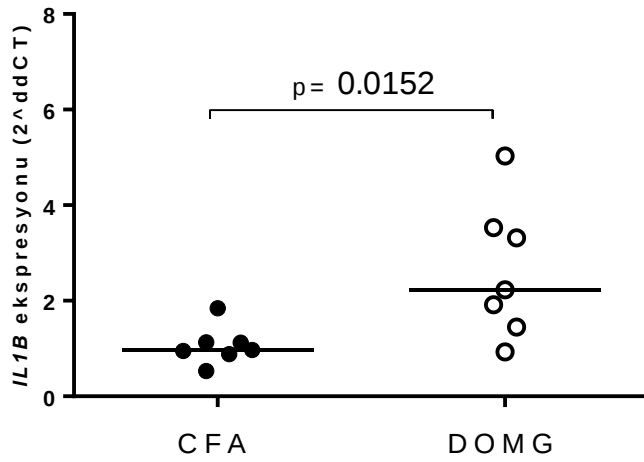
Şekil 4-11: Kaspaz-1 gen profili.

4.3.12. Kaspaz-1 erime eğrileri



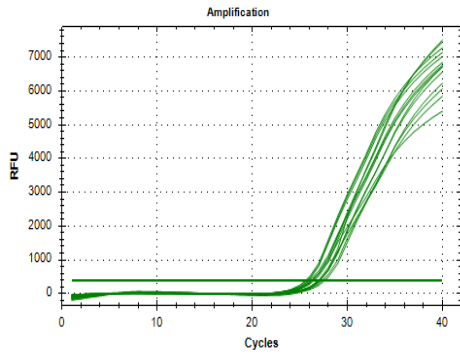
Şekil 4-12: Kaspaz-1 erime eğrileri.

4.3.13. IL-1 β geni için:



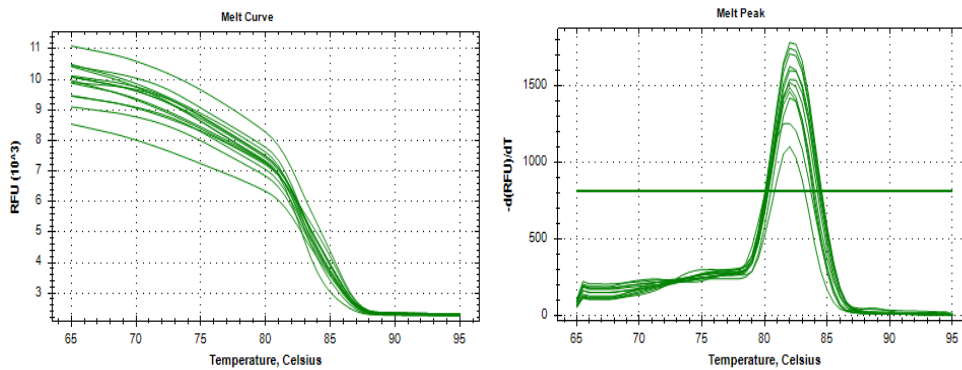
Şekil 4-13: IL-1 β geni ekspresyon seviyesi. Kontrol ve Deneysel Otoimmün Myastenia Gravis (DOMG) oluşturulmuş farelerin total lenf ganglionlarından elde edilen hücrelerde IL-1 β geni ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması. Q-PCR sonuçları gruplar arasında IL-1 β gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak ($P=0,01$, $P<0.05$) anlamlı bir farklılık olduğunu gösterdi. Genlerin ekspresyon düzeyleri GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Normalize edilen verilere $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ formülü uygulanmıştır.

4.3.14. IL-1 β için gen profili



Şekil 4-14: IL-1 β için gen profili.

4.3.15. IL-1 β erime eğrileri



Şekil 4-15: IL-1 β erime eğrileri.

4.4. Serum anti- AChR antikor düzeyleri ile gen ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırılması

Gen ekspresyon düzeyi ve asetil kolin IgG (AChR) antikor düzeyi arasında korelasyon bulunamamıştır. Aşağıdaki tablolarda DOMG modellenmiş fareler ve kontrol grubu kıyaslanmıştır.

Tablo 4-4.: Akt-1 ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu (pearson korelasyon testi p değerleri= two tailed)

	CFA Akt	ACH Akt	CFA IgG	ACH IgG
CFA Akt		-0,499	0,126	-0,731
ACH Akt	-0,499		0,255	0,477
CFA IgG	0,126	0,255		-0,175
ACH IgG	-0,731	0,477	-0,175	

Tablo 4-5.: NLRP3 ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu (pearson korelasyon testi p değerleri= two tailed).

	CFA NLRP3	ACH NLRP3	CFA IgG	ACH IgG
CFA NLRP3		0,450	0,950	0,052
ACH NLRP3	0,450		0,905	0,223
CFA IgG	0,950	0,905		0,707
ACH IgG	0,052	0,223	0,707	

Tablo 4-6: P2x7R ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu (pearson korelasyon testi p değerleri= two tailed).

	CFA P2x7R	ACH P2x7R	CFA IgG	ACH IgG
CFA P2x7R		0,374	0,531	0,082
ACH P2x7R	0,374		0,890	0,118
CFA IgG	0,531	0,890		0,707
ACH IgG	0,082	0,118	0,707	

Tablo 4-7: Kaspaz-1 ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu (pearson korelasyon testi p değerleri= two tailed).

	CFA CASP1	ACH CASP1	CFA IgG	ACH IgG
CFA CASP1		0,490	0,746	0,215
ACH CASP1	0,490		0,945	0,229
CFA IgG	0,746	0,945		0,707
ACH IgG	0,215	0,229	0,707	

Tablo 4-8: IL-1 β ekspresyon düzeyi ile serum anti- AChR antikor düzeylerinin korelasyonu (pearson korelasyon testi p değerleri= two tailed).

	CFA IL-1β	ACH IL-1β	CFA IgG	ACH IgG
CFA IL-1β		0,586	0,723	0,286
ACH IL-1β	0,586		0,565	0,490
CFA IgG	0,723	0,565		0,707
ACH IgG	0,286	0,490	0,707	

5. TARTIŞMA

Myasthenia gravis (MG) anormal kas zayıflığı, çabuk yorulma ile seyreden, patolojik olarak timus anormallikleri ve immünolojik olarak nikotinik asetilkolin reseptörlerine karşı anti-AchR antikoru gelişimi, kompleman ile reseptör hasarı oluşumu ile karakterize otoimmün nöromusküler bir hastalıktır [3,86].

Anti-asetilkolin reseptör (AchR) otoantijenleri, kompleman aracılığı ile postsnaptik membran harabiyeti ve antikorların çapraz bağlanması yolu ile reseptörleri azaltır. Anti-AchR antikorları, B lenfositleri tarafından yapılır fakat otoimmün yanıtın nasıl başladığı bilinmemektedir [86, 87].

MG sebep olduğu ekonomik ve sosyal kayıplar nedeniyle önemli bir sağlık sorunu teşkil etmektedir. MG'nin önlenmesi ve ilerlemesinin durdurulmasına katkı sağlayacak tedavi seçenekleri bu nedenle önem arz etmektedir. Hastalığın güncel tedavisi semptomları gidermeye yöneliktir. Bu bağlamda, bağışıklık baskılayıcı ilaçlar, plazmaferez , timektomi ve destek terapileri kullanılmaktadır fakat bu tedavi yöntemleri fırsatçı infeksiyon, osteoporoz ve diabetes mellitus gibi yan etkilere sebep olmakta ve MG olgularının %2-3'ü tedavi yan etkileri sebebiyle kaybedilmektedir. Bu sebeple düşük yan etki profilili ve daha spesifik etki mekanizmalı tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç bulunmaktadır [3].

Pek çok klinik belirti ve patolojik özellikleri paylaştığı göz önünde bulundurulduğunda, immünizasyon yoluyla deneysel olarak oluşturulmuş hayvan modelleri MG'nin altında yatan patogenezi aydınlatmak için oldukça elverişlidir.

Bu çalışmada inflamazom kompleksi ilk defa DOMG modelinde denenmiştir. Bu çalışma ile inflamazom komplekslerinin MG hastalığına olan etkisine ilişkin önemli veriler elde ederek MG patogenezi aydınlatmak hedeflenmiştir.

AChR+CFA ile immünize edilmiş hasta grubu farelerinin serumlarında saptanan anti-AChR IgG antikoru DOMG modelinin başarılı olduğunu göstermektedir.

İnflamazomlar kaspaz-1'in aktivasyonunu regüle edip hastalık yapıcı mikroplar ve konak proteinlerden türemiş moleküllere karşı enflamatuvar yanıtı oluşturan multimerik protein kompleksleridir. İnflamazomlar Il-1 β 'yı aktif formuna çeviren

kaspaz-1'i aktive ederek etki eder. IL-1 β , vücutta ağrıya, enflamasyona ve çeşitli otoimmün bozukluklara yol açan enflamasyon yapıcı bir sitokindir [5].

NLRP3 inflamazomu, diğer tüm inflamazomlar içerisinde en geniş yelpazede uyarana yanıt veren inflamazomdur. Bunun yanı sıra, NLRP3, epitel hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve keratinositler dahil olmak üzere bir çok hücrede yaygın olarak eksprese olur [88].

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu, TLR agonisti (örneğin LPS) ile ve sonrasında ikinci bir uyarın yardımı ile (örneğin ATP) gerçekleşir. Aktive olan NLRP3 inflamazomu, pro-kaspaz-1'in pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i biyoaktif formu olan, kaspaz-1'e (p10 veya p20) proteolitik olarak dönüştürülmesini tetikler [89].

Birçok çalışma, otoimmün hastalıklar ve inflamazom bileşenlerini kodlayan genlerdeki varyasyonlar arasındaki genetik ilişkinin varlığına işaret etmektedir. Ancak, MG hastalığında şimdiye dek böyle bir çalışma yapılmamıştır.

IL-1 β , aktive olmuş makrofajlar, endotel hücreler, B hücreleri ve fibroblastlar tarafından üretilen proinflamatuvar bir sitokindir. IL-1 β , immün ve inflamatuvar yanıtı açar [90]. 2015 yılında yapılan bir çalışma, kaspaz-1 inhibitörünün MG hayvan modelinde hastalığın semptomlarını IL-1 β ve IL-17 yolağı aracılığı ile kayda değer ölçüde iyileştirdiğini ve buna bağlı olarak, kaspaz-1'in hastalığın etiyolojisinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir [4]. Kaspaz-1'in IL-1 β 'yı aktif formuna çevirdiği ve inflamazomların da IL-1 β 'yı aktif formuna çevirdiği göz önünde bulundurulduğunda MG hayvan modelinde IL-1 β , kaspaz-1 ve inflamazom ekspresyonunda artış olması beklenir. Nitekim, çalışmamızda MG hayvan modelinde, kontrol grubuna kıyasla özellikle IL-1 β ekspresyon düzeyindeki anlamlı artış ($p=0,01$) enflamasyon yanıtının önemine işaret etmektedir. Aynı zamanda kaspaz-1, NLRP3 inflamazomu ve P2X7R ekspresyonlarında da kontrol grubuna kıyasla artış görülmüştür. Gen ekspresyonunda anlamlılığa ulaşmayan farklılıklar çalışmaya dahil edilen fare sayısının azlığından kaynaklanabilmektedir. Ancak özellikle IL-1 β ekspresyon düzeyindeki anlamlı artış enflamasyon yanıtının önemine işaret etmektedir.

Hücrelerdeki IL-1 β aktivitesi başlıca 4 klasik hücresel sinyal yolağı aracılığı ile gerçekleşir. Bunlardan üçü, MAP kinaz (MAPK) yoluna aittir. B yol üç ana enzim tarafından kanalize edilir: c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK) 1/2 (jun kinazları), 38-kd

protein kinazlar (p38) ve (ERK) 1/2. IL-1 β sinyalleşmesine aracılık eden dördüncü sinyal yolu ise, NF- κ B'dır [91].

Çalışmamızda, inflamazom kompleksi ekspresyon düzeylerinin IL-1 β düzeyleri kadar artış göstermemesi, bu sitokini aktive eden diğer yolların da göz ardı edilmemesi gerektiğini düşündürmektedir.

Bunun yanı sıra, MG hastalığında NF- κ B sinyallerinin immün yanıtı düzenlediği ve PI3K-Akt yolağının da bu sinyalleri aktive ettiği bilinmektedir [92]. PI3K/Akt yolağı, P2X7R ekspresyonunun up-regülasyonu için önemlidir ve P2X7R ekspresyonunun kaspaz-1'in aktivasyonunu sağladığı bilinmektedir. Gerçekleştirilen bir çalışmada, MG'li hastaların kan örneklerinde P2X7R ekspresyonunun artış eğilimi gösterilmiştir [93].

Akt yolağının kas fizyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. Yayımlanan bir çalışmada AchR antikorunun Akt fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir [94]. Hastalığa sebep olan otoantikorların hedef otoantijeni AchR ile hayvanların immünizasyonu deneysel otoimmün myasthenia gravis (DOMG)'e sebep olmaktadır. DOMG'nin klinik, fizyopatolojik ve elektrofizyolojik özellikleriyle MG hastalığını çok yüksek oranda taklit ettiği gösterilmiştir [24]. Buna karşın, çalışmamızda DOMG modellenmiş farelerde kontrol grubuna kıyasla Akt-1 ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir.

Ayrıca serum antikor düzeyleri ve gen ekspresyon seviyeleri arasında ise korelasyon saptanmamıştır. Gen ekspresyonunda anlamlılığa ulaşmayan farklılıklar çalışmaya dahil edilen fare sayısının azlığından kaynaklanabilmektedir. Ancak özellikle IL-1 β ekspresyon düzeyindeki anlamlı artış inflamasyon yanıtının önemine işaret etmektedir. Bu çalışmanın, inflamazom komplekslerinin MG patogeneziindeki önemini belirlenmesine olanak sağlayacağı ve gelecek diğer çalışmalara olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, inflamozom kompleksi ekspresyon düzeylerinin IL-1 β düzeyleri kadar artış göstermemesi bu sitokini aktive eden diğer yolları da göz ardı edilmemesi gerektiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Angela Vincent. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nature Reviews Immunology* volume 2, pages 797–804 (2002)
- 2- Gilhus NE, et. al. Myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol*. doi: 10.1038/nrneurol.2016.44. Epub 2016 Apr 22.
- 3- Bianca M. Conti-Fine, Monica Milani, Henry J. Kaminski. Myasthenia gravis: past, present, and future. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(11):2843–2854.
- 4- Cong-Cong Wang, et. al. Caspase-1 inhibitor ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by innate dendritic cell IL-1-IL-17 pathway. *J Neuroinflammation* doi: 10.1186/s12974-015-0334-4.
- 5- Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* doi: 10.1038/nm.3893. Epub 2015 Jun 29.
- 6- Erdem Tüzün, et. al. Increased Complement Consumption in MuSK-Antibody-Positive Myasthenia Gravis Patients. *Med Princ Pract* DOI: 10.1159/000330031.
- 7- Boldingh M.I, et. al. Geographical Distribution of Myasthenia Gravis in Northern Europe - Results from a Population-Based Study from Two Countries. *Neuroepidemiology*. <https://doi.org/10.1159/000431036>.
- 8- Annapurni, et. al. Myasthenia Gravis: A Review. *Autoimmune Dis*. doi: 10.1155/2012/874680.
- 9- Conquer Myasthenia Gravis(Myasthenia Gravis Foundation of Illinois), Feb.2018
- 10- James F. Howard, Jr., M.D., Editor. Myasthenia Gravis: A Manual for the Health Care Provider. Myasthenia Gravis Foundation of America. ISBN 10: 0981888305
- 11- Eun Bin Cho, et. al. Late-onset non-thymomatous myasthenia gravis: Comparison with early-onset and very late-onset myasthenia gravis. *Neurology Asia* 2017; 22(2) : 123 – 131.
- 12- Akshay Gopinathan Nair, et. al. Ocular myasthenia gravis: A review.

- 13- Matthew N Meriggioli, Donald B Sanders. Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis? *Expert Rev Clin Immunol*. doi: 10.1586/eci.12.34.
- 14- Fredrik Romi. Autoimmune Dis. Thymoma in Myasthenia Gravis: From Diagnosis to Treatment. doi: 10.4061/2011/474512.
- 15- Romi F. Thymoma in myasthenia gravis: from diagnosis to treatment. *Autoimmune Dis*. 2011;2011:474512. doi: 10.4061/2011/474512. Epub 2011 Aug 10.
- 16- Said R Beydoun, et. al. Myasthenia gravis associated with invasive malignant thymoma: two case reports and a review of the literature. *J Med Case Rep*. 2014; 8: 340. doi: [10.1186/1752-1947-8-340]
- 17- Hoch W, et. al. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*. 2001 Mar; 7(3):365-8.
- 18- McConville J, et. al. Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 2004 Apr; 55(4):580-4.
- 19- Huibin Qi, et. al. C5a is not involved in experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis. *J Neuroimmunol*. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.03.007.
- 20- Leite MI, et. al. Myasthenia gravis thymus: complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol*. 2007 Sep;171(3):893-905. Epub 2007 Aug 3.
- 21- William D. Phillips, Angela Vincent. Pathogenesis of myasthenia gravis: update on disease types, models, and mechanisms. Version 1. *F1000Res*. doi: 10.12688/f1000research.8206.1.
- 22- Vuslat Yilmaz, et. al. Differential Cytokine Changes in Patients with Myasthenia Gravis with Antibodies against AChR and MuSK. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0123546..
- 23- Maria Isabel Leite, et. al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain*. doi: 10.1093/brain/awn092.
- 24- Bo Wu, et. al. Experimental autoimmune myasthenia gravis in the mouse. *Curr Protoc Immunol*. doi: 10.1002/0471142735.im1508s21.

- 25-Mantegazza R, et. al. Animal models of myasthenia gravis: utility and limitations. International Journal of General Medicine. DOI <https://doi.org/10.2147/IJGM.S88552>.
- 26-Tüzün E, et. al. Predictive value of serum anti-C1q antibody levels in experimental autoimmune myasthenia gravis. Neuromuscul Disord. 2006;16:137–143.
- 27-Tüzün E, et. al. Genetic evidence for involvement of classical complement pathway in induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. J Immunol. 2003 Oct 1; 171(7):3847-54.
- 28-Tüzün E, et. al. Targeting classical complement pathway to treat complement mediated autoimmune diseases. Adv Exp Med Biol. 2008; 632():265-72.
- 29-Link H, Xiao BG. Rat models as tool to develop new immunotherapies. Immunol Rev. 2001 Dec; 184():117-28.
- 30-Christadoss P, Poussin M. Deng C. Animal models of myasthenia gravis. Clin Immunol. 2000 Feb; 94(2):75-87.
- 31-Berman PW, Patrick J. Experimental myasthenia gravis. A murine system. J Exp Med. 1980 Jan 1; 151(1):204-23.
- 32-Berman PW, Patrick J. Linkage between the frequency of muscular weakness and loci that regulate immune responsiveness in murine experimental myasthenia gravis. J Exp Med. 1980 Sep 1; 152(3):507-20.
- 33-Lindstrom J. Experimental autoimmune myasthenia gravis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1980 Jul; 43(7):568-76.
- 34-Biesecker G, Gomez CM. Inhibition of acute passive transfer experimental autoimmune myasthenia gravis with Fab antibody to complement C6. J Immunol. 1989 Apr 15; 142(8):2654-9.
- 35-Baggi F, et. al. Breakdown of tolerance to a self-peptide of acetylcholine receptor alpha-subunit induces experimental myasthenia gravis in rats. J Immunol. 2004 Feb 15; 172(4):2697-703.
- 36-Fuchs S, et. al. Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis (EAMG): from immunochemical characterization to therapeutic approaches. J Autoimmun. 2014 Nov; 54():51-9

- 37-Baggi F, et. al. Oral administration of an immunodominant T-cell epitope downregulates Th1/Th2 cytokines and prevents experimental myasthenia gravis. *J Clin Invest.* 1999;104:1287–1295
- 38-Maiti PK, et. al. Immunosuppression of rat myasthenia gravis by oral administration of a syngeneic acetylcholine receptor fragment. *J Neuroimmunol.* 2004;152:112–120
- 39- Ma CG, et. al. Suppression of experimental autoimmune myasthenia gravis by nasal administration of acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol.* 1995;58(1):51–60.
- 40-Sun W, et. al. Specific immunotherapy of experimental myasthenia gravis in vitro and in vivo: the Guided Missile strategy. *J Neuroimmunol.* 2012;251:25–32
- 41-Li Y, et. al. Myeloid-derived suppressor cells as a potential therapy for experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol.* 2014;193:2127–2134
- 42-Sheng JR, Quan S, Soliven B. CD1d(hi)CD5+ B cells expanded by GM-CSF in vivo suppress experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol.* 2014;193:2669–2677.
- 43-Zhang JM, et. al. Silencing miR-146a influences B cells and ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis. *Immunology.* 2014;144:56–67
- 44-Sun L, et. al. A new method to induce myasthenia gravis models and the protective effect of soluble decay accelerating factors. *Genet Mol Res.* 2015;14:7782–7792.
- 45-Russel WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London: Methuen & Co; 1992. (Special Edition UFAW).
- 46-Grob D, et. al. The course of myasthenia gravis and therapies affecting outcome. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 505():472-99.
- 47-Pal S, Sanyal D. Jaw muscle weakness: a differential indicator of neuromuscular weakness--preliminary observations. *Muscle Nerve.* 2011 Jun; 43(6):807-11.
- 48-GROB D. Course and management of myasthenia gravis. *J Am Med Assoc.* 1953 Oct 10; 153(6):529-32.
- 49-Keesey JC. Clinical evaluation and management of myasthenia gravis. *Muscle Nerve.* 2004 Apr; 29(4):484-505.

- 50- Najwane Saïd-Sadier, David M. Ojcius. Alarmins, Inflammasomes and Immunity. *Biomed J.* 2012 Nov-Dec; 35(6): 437–449. doi: [10.4103/2319-4170.104408]
- 51- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity.* 2007 Oct; 27(4):549-59.
- 52- Ting JP, et. al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 2008 Mar; 28(3):285-7.
- 53- Patrick J. Shaw, Michael F. McDermott, Thirumala-Devi Kanneganti. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med.* doi: 10.1016/j.molmed.2010.11.001.
- 54- Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 Jun; 1319():82-95.
- 55- Ratsimandresy RA, Dorfleutner A, Christian Stehlik. An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology. *Front Immunol.* 2013 Dec 9; 4():440.
- 56- Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol.* 2012 Mar 19; 13(4):333-42.
- 57- Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* 2015 May; 25(5):308-15.
- 58- Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014 May 22; 157(5):1013-22.
- 59- Wenwen Sha, et. al. Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 45, pp. 16059–16064, 2014.
- 60- S. Mariathasan, et. al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, vol. 440, no. 7081, pp. 228–232, 2006.
- 61- F. Martinon, et. al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, vol. 440, no. 7081, pp. 237–241, 2006.
- 62- V. Hornung, et. al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*, vol. 9, no. 8, pp. 847–856, 2008

- 63- B. N. Martin, et. al. T cell–intrinsic ASC critically promotes TH17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Immunology*, vol. 17, no. 5, pp. 583–592, 2016.
- 64- C. Fan, et. al. P2X4 promotes interleukin-1 β production in osteoarthritis via NLRP1. *Molecular Medicine Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 340–344, 2014.
- 65- V. Beynon, F. J. Quintana, Howard L. Weiner. Activated human CD4⁺CD45RO⁺ memory T-cells indirectly inhibit NLRP3 inflammasome activation through downregulation of P2X7R signaling. *PLoS One*, vol. 7, no. 6, article e39576, 2012.
- 66- M. Saleh, et. al. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature*, vol. 440, no. 7087, pp. 1064–1068, 2006.
- 67- A. Babelova, et. al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 36, pp. 24035–24048, 2009
- 68- S. Chen and B. Sun. Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling. *Protein & Cell*, vol. 4, no. 4, pp. 251–258, 2013.
- 69- J. M. Bruey, et. al. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell*, vol. 129, no. 1, pp. 45–56, 2007.
- 70- L. V. Walle, et. al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature*, vol. 512, no. 7512, pp. 69–73, 2014.
- 71- T. Eigenbrod, K. A. Bode, Dalpke AH. Early inhibition of IL-1 β expression by IFN- γ is mediated by impaired binding of NF- κ B to the IL-1 β promoter but is independent of nitric oxide. *The Journal of Immunology*, vol. 190, no. 12, pp. 6533–6541, 2013.
- 72- F. Q. Kong, et. al. Atorvastatin suppresses NLRP3 inflammasome activation via TLR4/MyD88/NF- κ B signaling in PMA-stimulated THP-1 monocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 82, pp. 167–172, 2016.
- 73- F. Bauernfeind, et. al. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *The Journal of Immunology*, vol. 189, no. 8, pp. 4175–4181, 2012.
- 74- Z. Fan, et. al. MicroRNA-7 enhances subventricular zone neurogenesis by inhibiting NLRP3/caspase-1 axis in adult neural stem cells. *Molecular Neurobiology*, vol. 53, no. 10, pp. 7057–7069, 2016.

- 75- G. Pimenta-dos-Reis, et. al. POM-1 inhibits P2 receptors and exhibits anti-inflammatory effects in macrophages. *Purinergic Signal*, vol. 13, no. 4, pp. 611–627, 2017.
- 76- Yue Lang, et. al. Role of Inflammasomes in Neuroimmune and Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2018/1549549>.
- 77- Shinkai K, McCalmont, Leslie KS. Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clin Exp Dermatol*. 2008 Jan; 33(1):1-9.
- 78- Aksentijevich I, et al. The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis Rheum*. 2007;56:1273–1285.
- 79- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010 Mar 19; 140(6):821-32.
- 80- Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010 Feb; 10(2):89-102.
- 81- Ben-Sasson SZ, et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 28; 106(17):7119-24.
- 82- Maliszewski CR, et al. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. *J Immunol*. 1990 Apr 15; 144(8):3028-33.
- 83- Yang H, et al. IL-1 receptor antagonist-mediated therapeutic effect in murine myasthenia gravis is associated with suppressed serum proinflammatory cytokines, C3, and anti-acetylcholine receptor IgG1. *J Immunol*. 2005 Aug 1; 175(3):2018-25.
- 84- Sutton CE, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009 Aug 21; 31(2):331-41.
- 85- Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*. 2007 Jun 6; 25(23):4575-85.
- 86- Oosterhuis HJ. The natural course of myasthenia gravis: a long term follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989 Oct;52(10):1121-7.

- 87- Shiraishi H, et al. Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):289-93.
- 88- Yanli Wang, et al. Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2016 Apr;35(4):2053-64. doi: 10.3892/or.2016.4569. Epub 2016 Jan 18.
- 89- Yuan He, Hideki Hara, Gabriel Núñez. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci*. 2016 Dec; 41(12): 1012–1021.
- 90- Jun-Ming Zhang, Jianxiong An. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007 Spring; 45(2): 27–37 doi: [10.1097/AIA.0b013e318034194e]
- 91- Zhiyong Fan, et al. Activation of Interleukin-1 Signaling Cascades in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage. *Am J Pathol*. 2007 Sep; 171(3): 938–946. doi: [10.2353/ajpath.2007.061083]
- 92- Bastian Hoesel, Johannes A Schmid. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013; 12: 86. doi: [10.1186/1476-4598-12-86]
- 93- Zhang Y, et al. Increased expression of P2X7 receptor in peripheral blood mononuclear cells correlates with clinical severity and serum levels of Th17-related cytokines in patients with myasthenia gravis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2017 Jun;157:88-94. doi: 10.1016/j.clineuro.2017.04.012.
- 94- Marie Maurer, et al. IL-6 and Akt are involved in muscular pathogenesis in myasthenia gravis. *Acta Neuropathol Commun*. 2015; 3:1. doi: [10.1186/s40478-014-0179-6].

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Burçak Vural
İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü

Basvuru : 21.06.2017

Toplantı Tarihi : 10.07.2017

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Yüksek Lisans Öğrencisi Ceyda Nur BALTACI** ya ait "Deneyel Otoimmün Miyasthenia Gravis Fare Modelinde İnflamazom Komplekslerinin Ekspresyon Seviyesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	16
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	14.07.2017/ 14.07.2018	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIKIR
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygöl EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yrd. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak. Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DENEYSEL OTOİMMÜN MİYASTENİA GRAVİS FARE MODELİNDE İNFLAMAZOM KOMPLEKSLERİNİN EKSPRESYON SEVİYESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%3	%1	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRCİCİL KAYNAKLAR

1	issuu.com İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Sakarya University Öğrenci Ödevi	%1
3	www.sbedergi.hitit.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	Zhiyong Fan, Stephan Söder, Stephan Oehler, Katrin Fundel, Thomas Aigner. "Activation of Interleukin-1 Signaling Cascades in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage", The American Journal of Pathology, 2007 Yayın	<%1
5	Premkumar Christadoss, Chella S. David, Steve Keve. "I-Aαk transgene Pairs with I-Aβb gene and protects C57BL10 mice from developing autoimmune myasthenia gravis", Clinical Immunology and Immunopathology,	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ceyda Nur	Soyadı	Baltacı
Doğ. Yeri		Doğ. Tar.	
Uyruğu		TC Kim No	70453170018
Email		Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):