

T.C.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TERİFLUNAMİD'İN DENEYSEL MYASTENİA GRAVİS
MODELLERİNDE TERAPÖTİK ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

Tezi Hazırlayan

Emel KÖSEOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TDK - 2019-9670 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Haziran 2021

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı : Emel KÖSEOĞLU

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Teriflunamid’in Deneysel Myastenia Gravis Modellerinde Terapötik Etkisinin İncelenmesi” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Emel KÖSEOĞLU

Danışman

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU danışmanlığında **Emel KÖSEOĞLU** tarafından hazırlanan “**Teriflunamid’in Deneysel Myastenia Gravis Modellerinde Terapötik Etkisinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyokimya** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.... / ... / 2021

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Eser KILIÇ
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. İhsan ÇETİN
(Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. Mustafa NİSARİ
(Nuh Naci Yazgan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. Ahmet EKEN
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.... / / 2021

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora sürecimde beni her zaman destekleyip yol gösteren, bilgi ve tecrübelerinden hep yararlandığım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU başta olmak üzere tüm değerli Erciyes Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Doktora çalışma projem ve deneylerim sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Ahmet EKEN'e,

Doktora tez çalışmamın projesine maddi katkı sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi ile sağladıkları kolaylık ve imkanlar için Sağlık Bilimleri Enstitüsü, DEKAM ve GENKÖK birimi ve çalışanlarına,

Her zaman olduğu gibi bu süreçte de moral ve motivasyon sağlayan, çocukları olmaktan gurur duyduğum babam Prof. Dr. Fevzi KÖKSAL ve annem Matematik Öğretmeni Sabahat KÖKSAL'a;

Son olarak, bana her zaman sabır ve anlayış göstermenin yanısıra tezimin resimlerini oluşturmakta yardım eden sevgili eşim Doç. Dr. Rahmi KÖSEOĞLU ile sevgili kızım Esin Dilek KÖSEOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Prof. Dr. Emel KÖSEOĞLU

Kayseri, Haziran 2021

TERİFLUNAMİD’İN DENEYSEL MYASTENİA GRAVİS MODELLERİNDE TERAPÖTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Emel KÖSEOĞLU

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Haziran 2021
Danışman: Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU**

ÖZET

Myastenia Gravis (MG) egzersiz ile artan iskelet kası güçsüzlüğü ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Tedavisinde, mevcut ilaçlara refrakter hastalarda fayda sağlayacak ve yan etkisi düşük yeni ilaçlara gereksinim duyulmaktadır. Bu yüzden yan etkisi düşük bir immunomodülatör ilaç olan teriflunamidin tedavide faydalı olma potansiyelini düşünerek preklinik bir çalışma yapmayı amaçladık.

Çalışmamızda aralıklı olarak üç kez asetilkolin reseptör (AChR) proteininin subkutan enjeksiyonu ile deneysel MG fare modeli oluşturduk. Ardından farelerin bir kısmına beş hafta teriflunamid vererek (10 mg/kg/gün, intraperitoneal) ilaç alan (n:21) ve almayan hasta fare (n:19) grupları oluşturduk. Hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunu (n:10) birbirleriyle, klinik durum yönünden karşılaştırmanın yanısıra dalak, lenf nodu ile timus doku hücrelerinde akım sitometrisi incelemeleri ile T hücre, B hücre ve sitokinler yönünden ve serumlarında ELİSA yöntemiyle yaptığımız incelemelerle AChR’e karşı antikorlar yönünden karşılaştırdık.

Çalışmamız, teriflunamidin proinflamatuvar sitokin ve adaptif immunitenin oluşması ile ilgili sitokin üreten T hücrelerinin, antikor üreten plazma hücrelerinin sayısını azaltmak ve muhtemelen yaşam süresi kısa plazma hücrelerinin antikor üretmesini sağlayarak AChR’ye karşı oluşan antikor profilini değiştirmek gibi farklı mekanizmalarla klinik olarak fayda sağladığını göstermiştir. Myastenik farelerde teriflunamid kullanımı ile oluşan antikorların IgG tipinden IgM tipine kayma eğiliminde olduğunu gözlemledik. Bir başka deyişle, teriflunamid IgG oluşumu ile giden sekonder immuniteden, IgM oluşumu ile karakterize primer immuniteye immunolojik cevapları değiştirmekte, yani sekonder immunitenin gelişmesini engellemektedir. Bu sonuçların, teriflunamidin insanlarda MG tedavisinde faydalı bir ilaç olabileceğine işaret ettiğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Teriflunamid, myastenia gravis, anti-asetilkolin reseptör antikorları, sitokinler, lenfositler

THE INVESTIGATION OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF TERIFLUNOMIDE IN EXPERIMENTAL MYASTHENIA GRAVIS MODELS

Emel KÖSEOĞLU

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biochemistry**

PhD Thesis, June 2021

Supervisor: Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

ABSTRACT

Myasthenia Gravis (MG) is an autoimmune disease characterized by skeletal muscle weakness increased with exercise. In its treatment, there is a need for new drugs that will benefit the in refractory patients to the existing drugs and have low side effects. Therefore, we aimed to conduct a preclinical study considering the potential of teriflunomide, an immunomodulatory drug with low side effects, to be beneficial in MG.

In this study, we created an experimental MG mouse model with three intermittent subcutaneous injections of acetylcholine receptor (AChR) protein. Afterwards by giving teriflunomide (10 mg/kg/day, intraperitoneal) to some of these mice for five weeks, we formed groups of sick mice with medication (n:21) and without medication (n:19). We compared the patient groups and the healthy control group (n:10) with each other in terms of clinical status, as well as quantities of T cells, B cells and various cytokines in spleen, lymph node and thymic tissue by means of flow cytometry investigations and also in terms of anti AChR antibodies in their serum with ELISA analysis.

Our study showed that teriflunomide is clinically useful with various different mechanisms, such as reducing the number of proinflammatory cytokine-producing T cells, the number of T cells related to the formation adaptive immunity and the number of antibody-producing plasma cells, and changing the antibody profile against AChR possibly by causing short-lived plasma cells to produce antibodies. We observed that antibodies generated in myasthenic mice tend to shift from IgG type to IgM type with its use. In other words, it changes the immunological responses from secondary immunity with IgG formation to primary immunity characterized by IgM formation, preventing the development of secondary immunity. We think that these results indicate that teriflunomide may be a useful drug in the treatment of MG in humans.

Key words: Teriflunomide, myasthenia gravis, anti-acetylcholine receptor antibodies, cytokines, lymphocytes

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Myastenia Gravis Hastalığının Genel ve Klinik Özellikleri	3
2.2. Myastenia Gravis Hastalığı Tedavisi	5
2.3. Myastenia Gravis Hastalığı İmmunopatogenezi	6
2.3.1. MG Hastalık Başlangıç ve Gelişim Süreci Hakkındaki Hipotezler	7
2.3.2. AChR-Myastenia Gravis Hastalığının İmmunopatogenezinde Son Basamak ve Antikorların Rolü	9
2.4. Asetilkolin Reseptörünün Yapısı, Görevi ve İmmunojenitesi	11
2.5. Timus, Lenf Nodu ve Dalak İmmun Organlarının İmmunolojik Olaylardaki ve Myastenia Gravis Hastalığındaki Rolü	13
2.5.1. Timus Organının Myastenia Gravis Hastalığındaki Rolü.....	13
2.5.2. Timus Dışı Diğer İmmunolojik Organların Görevleri.....	14
2.5.2.1. ‘Lenf Nodu’ nun İmmunolojik Hastalıklardaki Rolü.....	15
2.5.2.2. ‘Dalak’ın İmmunolojik Hastalıklardaki Rolü.....	15
2.6. Deneysel AChR Myastenia Gravis Modelleri	16
2.6.1. Klasik Aktif AChR Deneysel Myastenia Fare Modeli	17
2.6.2. AChR Myastenia Gravis Deneysel Fare Modeli Pasif Transferi.....	18
2.6.3. AChR Deneysel Myastenia Gravis Adaptif Transferi.....	19
2.7. Bir İmmunomodülatör İlaç Olan ‘Teriflunamid’ Hakkında Bilgi	19
2.8. İmmunite ve Sitokinler	21
2.8.1. Doğal İmmunite	21
2.8.2. Antijen Prezantasyonu	22
2.8.3. Adaptif İmmunite	22

2.8.4.	Humoral İmmunité.....	22
2.8.5.	Hücrel Medie İmmunité.....	23
2.8.6.	Primer İmmün Cevap	23
2.8.7.	Sekonder İmmün Cevap.....	23
2.8.8.	Sitokinler	24
2.9.	Akım Sitometri	25
2.9.1.	Akım Sitometri Spektrometresinin Çalışma Prensibi.....	25
2.9.2.	Akım Sitometrinin Avantajları ve Dezavantajları	27
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1.	Deney Hayvanları ve Myastenia Gravis Hayvan Modellerinin Oluşturulması	28
3.2.	Myastenia Gravis Yönünden Yapılan Klinik Değerlendirmeler	29
3.3.	Akım Sitometri ile Dalak, Lenf Nodu ve Timusta İmmün Hücre ve Sitokinlerin Değerlendirilmesi	32
3.4.	ELISA (Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay) Yöntemiyle Serum Anti-AChR Antikorlarının Değerlendirilmesi.....	33
3.5.	İstatistiki Değerlendirme	34
4.	BULGULAR.....	36
4.1.	Teriflunamid Kullanımının Farelerin Klinik Durumuna Etkileri	36
4.2.	Teriflunamid Kullanımının Toplam T Hücre ve Tiplerinin Sayılarına Etkileri.....	37
4.3.	Teriflunamid Kullanımının Toplam B Hücre ve Tiplerinin Sayılarına Etkileri.....	45
4.4.	Teriflunamid Kullanımının AChR'e Karşı Gelişen Otoantikorlar Üzerine Etkisi	48
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6.	KAYNAKLAR	69
	EKLER.....	84
	Ek1. Akım Sitometri Cihazı Verileri.....	84
	ÖZGEÇMİŞ.....	88

KISALTMALAR VE SİMGELER

ACH	: Asetilkolin
ACK	: Ammonium-Chloride-Potassium
AChR	: Asetilkolin reseptörü
ANOVA	: Varyans analizi
AP	: Aksiyon potansiyeli
APC	: Antijen presente eden hücreler
AR	: Adenozin reseptörü
ASC	: Antikor salgılayan hücreler
ATP	: Adenozin trifosfat
ATRA	: All-transretinoik asit
CD	: Cluster of differentiation, classification determinant
CD4+ T hücre	: Yardımcı T hücresi
CD40L	: CD40 Ligand
CD8+ T hücre	: Sitotoksik T hücresi
CFA	: Complete Freund's adjuvant
CTLA	: Sitotoksik T lenfosit assosiye protein
CYP450	: Sitokrom P450 enzim sistemi
DEKAM	: Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi
DHO-DH	: Dehidrooratat dehidrogenaz
DNA	: Deoksi-ribonükleik asit
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
EPP	: End plak potansiyeli
FBS	: Fetal bovine serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, US Food and Drug Administration
GENKÖK	: Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi
GMC-SF	: Granulosit makrofaj stimülizan faktör
GWAS	: Genom boyu ilişkilendirme analizi
HLA	: Human lökosit antijeni
HRP	: Horseradish peroksidaz
IFN	: İnterferon

Ig	: İmmunoglobulin
IL	: İnterlökin
ip	: İntraperitoneal
LN	: Lenf nodu
LPR	: Lipoprotein receptor related protein
MEPP	: Minyatür end plak potansiyeli
MG	: Myastenia Gravis
MHC	: Major histokompatibilite kompleksi
MuSK	: Muscle specific kinase
NK	: Natural killer
OFI	: Ortalama floresan intensitesi
NMJ	: Nöromuskuler Junction
PBS	: Fosfat tamponlu çözelti (phosphate buffered saline)
PTPN	: Protein tyrosine phosphatase non receptor
RA	: Retinoik asit
RAR	: Retinoik asit reseptörü
RXR	: Retinoik X reseptörleri
sc	: Subkutan
SEM	: Standart hata, standart error of mean
SPF	: Spesifik patojenlerden temiz, specific pathogen free
SPSS	: Sosyal bilimler için istatistik programı
TEMA	: Triflorometilanilin
Tfh	: Folliküler yardımcı T hücreleri
Tfr	: Folliküler regülatuar T hücreleri
Th	: Yardımcı T hücresi
Th17	: Yardımcı T17 hücresi
Th1	: Yardımcı T1 hücresi
Th2	: Yardımcı T2 hücresi
TMB	: Tetrametil benzidin
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TNFR	: Tümör Nekrozis Faktör reseptör
Treg	: Düzenleyici T Hücresi
#	: Numara, sayı

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1. Deneyisel myastenia gravis ile insan hastalarda görülen myastenia gravis arasındaki immunopatolojik farklar.	17
--	-----------

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1.	Nöromuskuler kavşak.	4
Şekil 2. 2.	MG immunopatogenezi.	8
Şekil 2. 3.	Nöromuskuler kavşak.	10
Şekil 2. 4.	Asetilkolin reseptörünün yapısı	12
Şekil 2. 5.	Teriflunamid açık yapısı.....	19
Şekil 2. 6.	Akım sitometri spektrometresinin temsili çalışma prensibi.	26
Şekil 4. 1.	İlaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) gruplarının klinik durumları: Toplu karşılaştırmalara ait istatistiksel önemlilik değerleri siyah yıldızlarla, ilaç alan ve ilaç almayan hasta farelerin post hoc testlerdeki karşılaştırmalarının istatistiksel önemlilik değerleri kırmızı yıldızlarla gösterilmiştir. (A) Üç çalışma grubunun hastalık insidans yüzdeleri ortalamaları yönünden karşılaştırılması, (B) Üç çalışma grubunun ortalama MG hastalık skoru $\pm$ SEM lerinin birbirleriyle karşılaştırılması, (C) Üç çalışma grubunun son ölçülen ağırlıklarının, deney başlangıcındaki vücut ağırlıklarına oran yüzdelerinin ortalama $\pm$ SEM lerinin birbirleriyle karşılaştırılması.....	37
Şekil 4. 2.	Dalak dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) grupları toplam T helper (T4) ve sitokin salgılayan T helper hücre sayılarının ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması. (A) CD3+CD4+ hücre (T helper), (B) CD3+CD4+IL2+ hücre (IL2 salgılayan T helper), (C) CD3+CD4+IL17A+ hücre (IL17A salgılayan T helper), (D) CD3+CD4+IFN-gamma+ hücre (IFN-gamma salgılayan T helper), (E) CD3+CD4+GM-CSF+ hücre (GM-CSF salgılayan T helper), (F) CD3+CD4+IL22+ hücre (IL22 salgılayan T helper), (G) CD3+CD4+IL10+ hücre (IL 10 salgılayan T helper), (H) CD3+CD4+TNF-alfa+ hücre (TNF-alfa salgılayan T helper)	38
Şekil 4. 3.	Dalak dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) grupları toplam sitotoksik T (T8) ve sitokin salgılayan sitotoksik T hücre sayılarının ortalama $\pm$ SEM'lerinin	

birbirleriyle karşılaştırılması. (A) CD3+CD8+ hücre (T sitotoksik), (B) CD3+CD8+IL2+ hücre (IL2 salgılayan T sitotoksik), (C) CD3+CD8+IL17A+ hücre (IL17A salgılayan T sitotoksik), (D) CD3+CD8+IFN-gamma+ hücre (IFN-gamma salgılayan T sitotoksik), (E) CD3+CD8+GM-CSF+ hücre (GM-CSF salgılayan T sitotoksik), (F) CD3+CD8+IL22+ hücre (IL22 salgılayan T sitotoksik), (G) CD3+CD8+IL10+ hücre (IL 10 salgılayan T sitotoksik), (H) CD3+CD8+TNF-alfa+ hücre (TNF-alfa salgılayan T sitotoksik).....40

Şekil 4. 4. Lenf nodu dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) grupları toplam T helper (T4) ve sitokin salgılayan T helper hücre sayılarının ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması. (A) CD3+CD4+ hücre (T helper), (B) CD3+CD4+IL2+ hücre (IL2 salgılayan T helper), (C) CD3+CD4+IL17A+ hücre (IL17A salgılayan T helper), (D) CD3+CD4+IFN-gamma+ hücre (IFN-gamma salgılayan T helper), (E) CD3+CD4+GM-CSF+ hücre (GM-CSF salgılayan T helper), (F) CD3+CD4+IL22+ hücre (IL22 salgılayan T helper), (G) CD3+CD4+IL10+ hücre (IL 10 salgılayan T helper), (H) CD3+CD4+TNF-alfa+ hücre (TNF-alfa salgılayan T helper)41

Şekil 4. 5. Lenf nodu dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) grupları toplam T sitotoksik (T8) ve sitokin salgılayan T sitotoksik hücre sayılarının ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması. (A) CD3+CD8+ hücre (T sitotoksik), (B) CD3+CD8+IL2+ hücre (IL2 salgılayan T sitotoksik), (C) CD3+CD8+IL17A+ hücre (IL17A salgılayan T sitotoksik), (D) CD3+CD8+IFN-gamma+ hücre (IFN-gamma salgılayan T sitotoksik), (E) CD3+CD8+GM-CSF+ hücre (GM-CSF salgılayan T sitotoksik), (F) CD3+CD8+IL22+ hücre (IL22 salgılayan T sitotoksik), (G) CD3+CD8+IL10+ hücre (IL 10 salgılayan T sitotoksik) (H) CD3+CD8+TNF-alfa+ hücre (TNF-alfa salgılayan T sitotoksik).....43

Şekil 4. 6. Timus dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) gruplarının total timosit (A), lenfosit (B),

- CD4+ T hücre (C), T helper (D), CD40L+ T helper (E), CD8+ T hücre (F), T sitotoksik (G), CD40L+ sitotoksik T hücre (H) sayıları ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması.44
- Şekil 4. 7.** Dalak dokusunda teriflunamid ilacı alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) gruplarının, B lenfosit (A), plazma hücre (B), kappa immunoglobulini üreten plazma hücre (C), lambda immunoglobulini üreten plazma hücre (D), kappa immunoglobulini üreten B lenfosit (E), lambda immunoglobulini üreten B lenfosit sayıları (F) ile plazma hücresi ortalama floresan intensitelerinin (G) ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması.....46
- Şekil 4. 8.** Lenf nodu dokusunda teriflunamid ilacı alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) gruplarının, B lenfosit (A), plazma hücre (B), kappa immunoglobulini üreten plazma hücre (C), lambda immunoglobulini üreten plazma hücre (D), kappa immunoglobulini üreten B lenfosit (E), lambda immunoglobulini üreten B lenfosit sayıları (F) ile plazma hücresi ortalama floresan intensitelerinin (G) ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması.....47
- Şekil 4. 9.** Teriflunamid alan ve almayan hasta fare grupları ile sağlıklı kontrol grubunun deney başlangıcındaki bazal IgG1 (A), IgG2b (B), IgG3 (C), IgM (D) ELISA sonuçları ile yedinci hafta ve onikinci hafta sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılması.49
- Şekil 4. 10.** Teriflunamid ilacı alan (MG+TF) (A) ve almayan hasta (MG) fare gruplarında (B), aynı grup içinde yapılan bağımlı testlerle farelerin yedinci hafta ve onikinci hafta IgG1, IgG2b, IgG3, IgM ELISA sonuçlarının birbiriyle karşılaştırılması.....50
- Şekil Ek.1. 1.** Dalak dokusunda bir fareye ait toplam T helper (T4) ve çeşitli sitokin salgılayan T helper hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler.....84
- Şekil Ek.1. 2.** Lenf nodu dokusunda bir fareye ait toplam T helper (T4) ve çeşitli sitokin salgılayan T helper hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler.....84

- Şekil Ek.1. 3.** Dalak dokusunda bir fareye ait toplam sitotoksik T (T8) ve çeşitli sitokin salgılayan sitotoksik T hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler.....**85**
- Şekil Ek.1. 4.** Lenf nodu dokusunda bir fareye ait toplam sitotoksik T (T8) ve çeşitli sitokin salgılayan sitotoksik T hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler**85**
- Şekil Ek.1. 5.** Timus dokusunda bir fareye ait toplam T helper (T4) ve çeşitli tipte T helper hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler**86**
- Şekil Ek.1. 6.** Timus dokusunda bir fareye ait toplam sitotoksik T hücreleri (T8) ve çeşitli tipte sitotoksik T hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler.....**86**
- Şekil Ek.1. 7.** Dalak dokusunda bir fareye ait toplam B hücreleri, çeşitli tipleri (A) ve CD138+ B hücreleri ortalama floresan intensitesini (B)gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler**87**
- Şekil Ek.1. 8.** Lenf nodu dokusunda bir fareye ait toplam B hücreleri, çeşitli tipleri (A) ve CD138+ B hücreleri ortalama floresan intensitesini (B)gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler.....**87**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Myastenia Gravis (MG) temel olarak antikorlarla yürüyen egzersiz ile ortaya çıkan veya artan iskelet kası güçsüzlüğü ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Sık görülmemekle birlikte bu hastalık günlük aktiviteleri güçleştirmesi ve iyi tedavi edilmezse %10 olguda solunum yetmezliği ile karakterize myastenik krize sebebiyet verip hastanın hayatını tehdit etmesi sebebiyle ciddi ve önemli bir nöromusküler hastalıktır (Howard, 2018).

Bu hastalığın nedeni, başta nikotinik asetil kolin reseptörü (AChR) olmak üzere, nöromusküler kavşak postsinaptik kas membranındaki hedef yapılara karşı gelişen dolaşımdaki antikorların kavşak yapılarına, direk bağlanma ve kompleman vasıtasıyla zarar vermesidir. Güncel olarak bu hastalığın uzun dönem tedavisi, asetil kolin esteraz inhibitörleri ile yapılan semptomatik tedavi ile son zamanlarda kullanılmaya başlanan rituximabı da içerir şekilde kortikosteroidler, azathioprin, mycophenolat mofetil gibi immunsupresan ilaçlar ile yapılan patogenetik tedavi birlikteliğiyle yürütülmektedir (Silvestri ve Wolfe, 2014; Sonkar ve ark., 2017). Bütün bu tedavilere rağmen bazı hastalar şiddetli kas güçsüzlüğü ve tekrarlayan myastenik krizlerden muzdarip olmaktadır. Ayrıca immunsupresan ilaçların uzun süre kullanımı hastalarda ciddi yan etkilere yol açmaktadır. Sonuç olarak mevcut ilaçlara refrakter vakalara fayda sağlayacak ve yan etkisi düşük olup uzun süreli kullanıma elverişli yeni ilaçlara gereksinim duyulmaktadır.

Bu amaçla multipl sklerozda kullanılan yan etkisi düşük bir immunomodülatör ilaç olan teriflunamidin MG hastalığında da faydalı olma potansiyeli olduğunu düşünerek prelinik bir çalışma yapmayı planladık. Bu ilaç mitokondrial dehydroorotate dehidrogenaz (DHO-DH) enzimini reversibl olarak inhibe ederek pirimidin sentezini

azaltan. DHO-DH inhibitörü veya klinik olarak daha anlamlı bir biçimde pirimidin sentez inhibitörü olarak tanımlanabilen bir ilaçtır. İlaç pirimidin havuzunu azaltarak DNA sentezini azaltır ve hızlı bölünme özelliğine sahip hücreler olan T ve B lenfositlerin aktivasyon ve proliferasyonunu bozar (Committee for Medicinal Products for Human Use-CHMP, 2013). Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda insan T hücrelerinde pürin biyosentezini de bozarak T hücrelerinin sinyalleri gibi ATP'ye bağımlı işlemleri de azalttığı bildirilmiştir (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2013).

Bu çalışmamızda deneysel MG fare modeli oluşturup bu farelerin bir kısmına teriflunamid vererek ilaç alan ve almayan hasta fare grupları oluşturduk. Hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunu birbirleriyle, klinik durum yönünden karşılaştırarak teriflunamidin MG tedavindeki potansiyel klinik etkisini değerlendirmeye çalıştık. Ayrıca deney sonunda hayvanları kurban ederek dalak, lenf nodu ve timüs doku hücrelerinde T lenfositler, sitokinler, B lenfositleri değerlendiren akım sitometrisi çalışmaları yaparak ve serumda anti-AChR antikorlarını ELISA yöntemiyle inceleyerek ilacın bu hastalıktaki immünolojik etkisini ortaya koymak istedik. Çalışmamızın sonuçlarıyla, teriflunamidin myastenik hasta insanlarda kullanım açısından bir seçenek olma potansiyelini değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

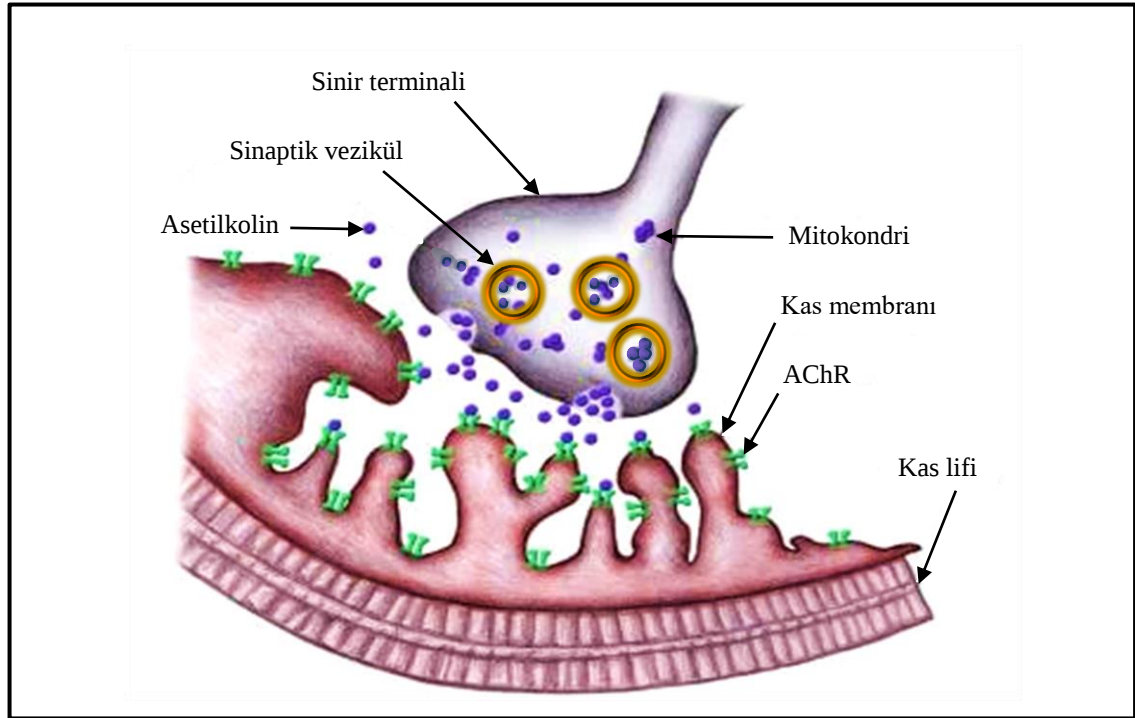
2.1. Myastenia Gravis Hastalığının Genel ve Klinik Özellikleri

Myastenia Gravis (MG) şiddetli (gravis) kas (my) zayıflığı (astenia) anlamına gelmektedir. Hastalığın otoimmün tabiatı, 1970'li yılların başlarında Patrick ve Lindstrom'un (Geha ve Notarangelo, 2016) tavşanları saflaştırılmış Asetilkolin reseptörleri (AChR) ile immunize ettiğinde bu reseptörlere karşı antikorlar geliştiğini saptaması ile ortaya çıkmıştır. Bu tavşanlarda gözlenen düşük kulaklar MG'li hastalarda gözlenen en karakteristik semptom olan göz kapağı düşüklüğüne denk gelmektedir. Ayrıca, kısa bir zaman sonra, MG'li gebe kadınların hastalığı bebeklerine aktarmaları sonucu birkaç ay sürecektir şekilde neonatal MG geliştiği, ve bu durumun anneden fetüse geçen IgG tipindeki antikorlar nedeniyle olduğu tespit edilmiştir. Zira plasentadan geçerek anneden bebeğe aktarılabilen tek maternal serum proteini IgG'dir. Yakın zamanlarda nöromusküler bileşkedeki (neuromuscular junction: NMJ) muscle-specifik kinaz (MuSK) ve lipoprotein-receptor related protein (LPR4) gibi başka postsinaptik membran proteinlerine karşı oluşan antikorlarla da bu hastalığın gelişebildiği anlaşılmıştır (Geha ve Notarangelo, 2016).

MG, iskelet kaslarında kuvvetsizlik ve yorgunlukla seyreden otoimmün nöromusküler bir hastalıktır. Bu hastalıkta nöromusküler iletim bozulmaktadır. Primer olarak postsinaptik nikotinik AChR'lerine karşı (%85) veya postsinaptik membrandaki başka proteinlere karşı geliştirilen antikorlar, postsinaptik kas membranını hasarlayarak veya normal organizasyonunu bozarak NMJ'da sinirden postsinaptik kasa olan sinyal iletimini

engellerler (Gilhus ve ark., 2016; Higuchi ve ark., 2011; Hoch ve ark., 2001; Verschuuren ve ark., 2013; Vincent, 2002; Zisimopoulou ve ark., 2014) (Şek.2.1).

MG patofizyoloji ve semptomlar yönünden heterojen bir hastalıktır. Ana klinik semptom olan kas kuvvetsizliği ve yorgunluk, parsiyel veya generalize olarak seyredebilir. Semptomlar tipik olarak sabah uykusu sonrası hafif, günün ilerleyen vaktiyle birlikte şiddetlenir tarzdadır. Kaslardaki kuvvetsizlik egzersiz ile artar, dinlenme ile azalır. Semptomlar genellikle oküler kaslarda başlar, bazı hastalarda oküler kaslarda sınırlı kalır, çoğu hastada ise iki sene içerisinde diğer iskelet kaslarına yayılarak generalize güçsüzlük oluşur. Bazı hastalarda ise MG yutma bozukluğu, fasial parezi gibi semptomlarla diğer kranial kaslarda başlar (Geha & Notarangelo, 2016).



Şekil 2. 1. Nöromusküler kavşak.

Hastalık iki ayrı yaş grubunda başlangıç göstermektedir. Erken başlangıçlı (< 50 yaş) hastaların çoğu kadındır, geç başlangıçlı hastaların (> 50 yaş) ise çoğu erkektir. Klinik olarak hastalığı, erken başlangıçlı, geç başlangıçlı ve timoma ile birliktelik gösteren hastalık şeklinde gruplara ayırmak, araştırma çalışmalarında fayda sağlamaktadır. Erken ve geç başlangıçlı tipler IgG AChR antikor karakteristikleri yönünden benzerken, birliktelik gösterdikleri HLA (Human leukocyte antigen) tipleri ve timik patolojileri

yönünden farklılık gösterir (Compston ve ark., 1980). Erken başlangıçlı tipte timik hiperplazi görülürken, geç başlangıçlı tipte görülmemektedir. Bu durum farklı yaş başlangıçları olan hastalarda otoantikörlerin farklı patogenetik mekanizmalarla ortaya çıktığını düşündürmektedir (Marx ve ark., 2015).

Son yıllarda hastalığın patogenezi ve tedavisi hakkındaki artan bilgi, tanının erken yapılmasını ve daha etkili tedavilerin uygulanmasını sağlamış, bu sayede ölüm oranları düşmüştür (Grob ve ark., 2008). 1930'lu yıllarda %70 olan ölüm oranı, son yıllarda %10'un altına inmiştir. Bununla birlikte hastalığın insidansı 10 kat fazlalaşmış, yılda 1/200.000'den 1/17.000'e çıkmıştır (Baggi ve ark., 2013; Mantegazza ve Antozzi, 2018). Hastalığın prevalansı ise 1 milyon popülasyonda 150-300'dür (Carr ve ark., 2010).

2.2. Myastenia Gravis Hastalığı Tedavisi

Kolinesteraz inhibitörleri, glukokortikoidler ve immunsupresanlar (örneğin, azathioprin) sıklıkla yeni MG tanısı alan hastalarda ve hafif veya lokalize semptomları olan hastalarda birinci derecede tedavi olarak kullanılır (Gotterer & Li, 2016). Fakat hastalık, hastaların %30'unda bu tedavilerle kontrol altına girmemekte veya kötüleşmektedir (Silvestri ve Wolfe, 2014; Sonkar ve ark., 2017).

Ayrıca glukokortikosteroid ve azathioprin gibi immunsupresan ilaçların uzun süre kullanımı diyabet, obezite, hipertansiyon, steroid bağımlılığı, hepatik disfonksiyon ve kemik iliği supresyonu gibi ciddi yan etkilere neden olmaktadır (Silvestri ve Wolfe, 2014; Sonkar ve ark., 2017).

Rutinde kullanılan bu tedavilere yanıt alınamayan durumlarda veya ilaçların yan etkilerini azaltmak amacıyla son yıllarda tedavide yeni terapötik ilaç arayışına girilmiştir. Şimdilerde, immun sistemin AChR'ünü hasarlamasını engelleyen immunomodülatör maddeler üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Losen ve ark., 2008). Ayrıca yine aynı amaçla birtakım biyolojik ajanlar üzerine çalışılmaktadır (Cai ve ark., 2019). Bu bağlamda, monoklonal anti-CD20 antikörleri (Rituximab, Obinutuzumab), anti-TNF ajanlar (Etanercept, Infliximab, Adalimumab), anti-IL-6 reseptör antikoru, anti-B-lenfosit stimülatör antikoru ve anti-C5 antikoru (Eculizumab) üzerine araştırmalar yürütülmektedir (Cai ve ark., 2019). Nitekim bu ilaçlardan Rituximab özellikle anti-MuSK antikoru olan tedaviye dirençli hastalarda kullanım alanı kazanmıştır (Anderson ve ark., 2016).

Eculizumab ise bir faz-III çalışmasında dirençli hastalarda denenmek üzere FDA tarafından onay almıştır (L. Wang ve ark., 2019). Diğer ilaçlar ve alternatif farmositikler üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Tedavide ayrıca timektominin de yeri bulunmaktadır. Eğer hastada timoma varsa timektomi tümörün büyümesini, invazyonunu ve metastazını engellemek amacıyla kesinlikle yapılması gerekmektedir. Bu gibi vakalarda, timomanın çıkarılmasıyla hastanın MG kliniğinde bir düzelme olmamaktadır (Cosi ve ark., 1997).

Timektominin diğer bir amacı, ilaç vermeden veya ilaç dozunu düşürerek MG hastalarında remisyonu sağlamaktır. İnsanda timus dokusunda AChR antikörlerinin olduğu gözönünde bulundurularak hiperplastik timusun çıkarılmasının, hastalığın gidişatına fayda sağlayabileceği düşünülmüştür. Bu konuda yapılan araştırma ve incelemeler ile timektominin bazı hasta gruplarında faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır (Skeie ve ark., 2010; Wolfe ve ark., 2016). Bu konuda hala tartışmalı durumlar olmakla birlikte, trans-sternal timektomi generalize, erken başlangıçlı, AChR antikoru pozitif, son beş yıl içinde hastalığı başlayan hasta grubuna önerilmektedir. Bu koşullar dışında MG tedavisinde timektominin yeri belli değildir. Timektomiden sonra beklenen iyileşmenin görülmesi 1-2 yılı alabilmektedir (Wolfe ve ark., 2016).

2.3. Myastenia Gravis Hastalığı İmmunopatogenezi

MG, iskelet kaslarında nöromusküler bileşkede postsinaptik kas membranındaki belirli yapılara bağlı gelişen antikörler ile karakterize, nöromusküler ileti bozukluğuna yol açan bir otoimmün hastalıktır. Burada aslında esas anormallik kişinin kendi antijenlerine yönelmiş toleransın kırılmasıdır (Hughes ve ark., 2004).

Bu hastalığın, farklı antigenlere karşı gelişen antikörlerle seyreden alt tipleri bulunmaktadır. En sık görülen MG tipi, hastaların %85'inde görülen nikotinik asetilkolin reseptörlerine (n-AChR) karşı gelişen antikörlerle karakterizedir (Vincent, 2002). Geri kalan hastaların bir kısmında muscle-specific kinaz (MuSK) (%6) veya lipoprotein-receptor related proteini (LPR4) hedefleyen (%2) antikörler bulunur. Hastaların bir kısmında ise kanda dolaşan bir antikör tespit edilememiştir. Bu hastalar seronegatif MG hastaları olarak adlandırılmaktadır (Hoch ve ark., 2001; Carr ve ark., 2010; Higuchi ve ark., 2011; Zisimopoulou ve ark., 2014).

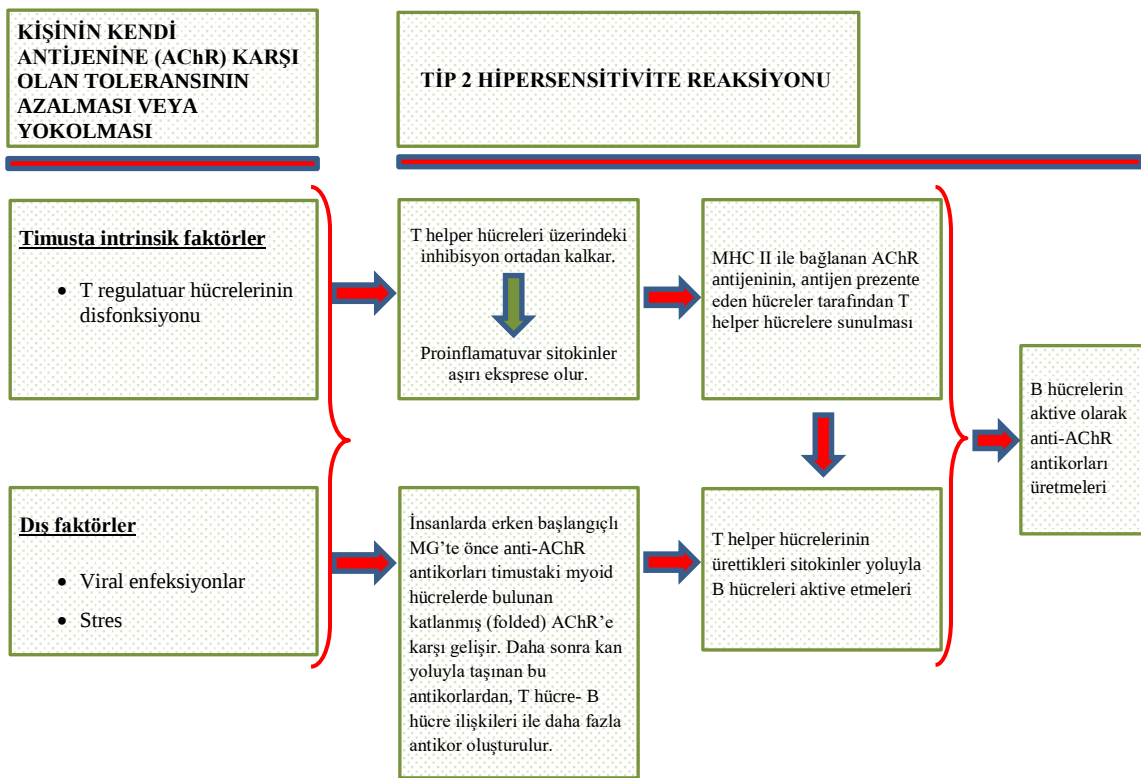
2.3.1. MG Hastalık Başlangıç ve Gelişim Süreci Hakkındaki Hipotezler

MG hastalığının timusta azalan immun tolerans ile başladığı ve ardından tip II hipersensitivite reaksiyonları ile anormal bir immun cevapla devam ettiği bildirilmektedir (Phillips ve Vincent, 2016; Romi ve ark., 2017). MG hastalığında hastanın kendi antijenlerine karşı olan toleransının nasıl kırıldığına dair sorular son yıllarda yapılan çalışmalarla açıklığa kavuşmaya başlamıştır. Bu çalışmalar sonunda viral enfeksiyonlar, stres cevabı ve bunun gibi benzeri dış etkenlerle birlikte, intrinsik olarak timusta ana olarak regülatuar T hücrelerinin (reg T hücreleri) disfonksiyonu sebebiyle hastanın kendi antijenlerine karşı toleransının (self-tolerans) azaldığı ve kırıldığı saptanmıştır. Regülatuar T hücrelerinin disfonksiyonu, CD4+ T helper hücre otoimmun aktivitesi üzerindeki inhibisyonun azalmasına ve proinflatuvar sitokinlerin interleukin-1 (IL), IL-6, IL-17, interferon-gamma (IFN-gamma), tumor nekrozis faktörü-alfa (TNF-alfa) aşırı ekspresyonuna yol açarak hastada self toleransı kırmakta ve anormal bir immun cevabın başlamasına neden olmaktadır (Gradolatto ve ark., 2014; Danikowski ve ark., 2017; Gilhus ve ark., 2018).

Self toleransın kırılmasına ek olarak MG hastalarında, artan CD4+ T helper hücre aktivitesinin timik epitel hücrelerinde yer alan katlanmamış (unfolded) AChR'lerine karşı immun cevap oluşturduğu ve bu bağlamda aktive olan CD4+ T helper hücrelerinin B hücrelerinin antikor üreten hücrelere dönüşüp AChR antikor salgılamalarına neden olduğu bulunmuştur. Bu antikorların ise erken başlangıçlı MG hastalarında, insanlarda timus medullasında yer alan myoid hücrelerde bulunan (katlanmış) folded AChR'e karşı da otoimmun reaksiyon oluşturarak AChR-immunglobulin komplekslerini ürettiği bildirilmektedir (le Panse ve ark., 2008). Oluşan bu kompleksler, antijen prezente eden hücrelerle, CD 4+ T helper hücreleriyle ve B hücreleriyle etkileşime girerek daha fazla AChR antikor oluşmasına neden olmaktadır. Bu antikorlar da kan yoluyla taşınarak direk olarak NMJ postsinaptik membrandaki AChR'ine saldırmaktadır (Christadoss ve ark., 2008; Tüzün ve ark., 2004). Fakat farelerde geliştirilen hastalık modellerinde timusta hiperplastik değişikliklerin olmaması burada sadece self tolerans mekanizmasının kırıldığını, timusta AChR'e karşı immun cevap gelişmediğini düşündürmektedir. Nitekim, IL-17 null farelerde yapılan çalışmalarda, Th17 hücrelerinin AChR'e karşı immun reaksiyon geliştirmekten ziyade farelerde AChR antijenine karşı self toleransı bozduğu sonucu ortaya çıkarmıştır (Schaffert ve ark., 2015) (Şek.2.2). Erken yaşta

başlayan MG tipinde self tolerans kırılmasının primer veya sekonder olarak timusla bağlantılı olduğu bildirilmekte, fakat yine de hastalıkta rol oynayan hücresel immün mekanizmanın tam olarak ortaya konamadığı düşünülmektedir (Phillips ve Vincent, 2016).

Hastalığın human lökosit antijenleri (HLA) ile ilişkisi de T hücrelerine bağımlı patogenezi desteklemektedir. Timoması olmayan 40 yaş altındaki kadın hastalarda HLA-A1, B8 ve DRw3 ve timomasız 40 yaş üstü erkeklerde HLA-A3, -B7 ve -DRw2 daha



Şekil 2. 2. MG immunopatogenezi.

yüksek sıklıkta görüldüğü bilinmekteydi (Hughes ve ark., 2004) Son yıllarda yapılan ‘genom boyu ilişkilendirme analizi’ (GWAS) çalışmaları genetik yatkınlıkla ve hücresel mekanizma ile ilgili faktörleri keşfetme sürecine yardımcı olmaktadır. Kuzey Avrupa’da 649 hasta üzerinde yapılan bir GWAS çalışmasında, erken başlangıçlı AChR MG’te HLA klas 1 bölgesi (özellikle HLA-B*08) ve ‘Protein Tyrosine Phosphatase, Non receptor Type 22 (PTPN22)’ genleriyle bilinen birlikteliklere ilaveten TNFAIP3-interacting protein1 (TNIP1) geniyle olan yeni bir birliktelik ortaya konmuştur (Gregersen ve ark., 2012). Kuzey Amerika’da 1032 hasta üzerinde yapılan başka bir GWAS çalışmasında ise

erken ve geç başlangıçlı MG hastaları birbirleriyle karşılaştırılmış; her iki grupta farklı haplotipler söz konusu olmakla birlikte HLA klas 2 bölgesi ile ve ‘cytototoxic T-lymphocyte-associated protein 4’ geni (CTLA-4: otoimmün hastalıklarda rolü olduğu bilinen bir T-hücre membran proteini) ortak olarak tespit edilmiştir. Geç başlangıçlı hastalık tipinde ise ‘tümör nekrozis faktör reseptör 4 super aile-11a üye’ olarak adlandırılan dendritik hücrelerle T hücreleri arası ilişkilerde görevli bir proteini kodlayan gen ile birliktelik bulunmuştur (Renton ve ark., 2015). Bu çalışmaların hastalığın patogenezi daha iyi aydınlatmaya yardımcı olacağı düşünülmektedir (Phillips ve Vincent, 2016).

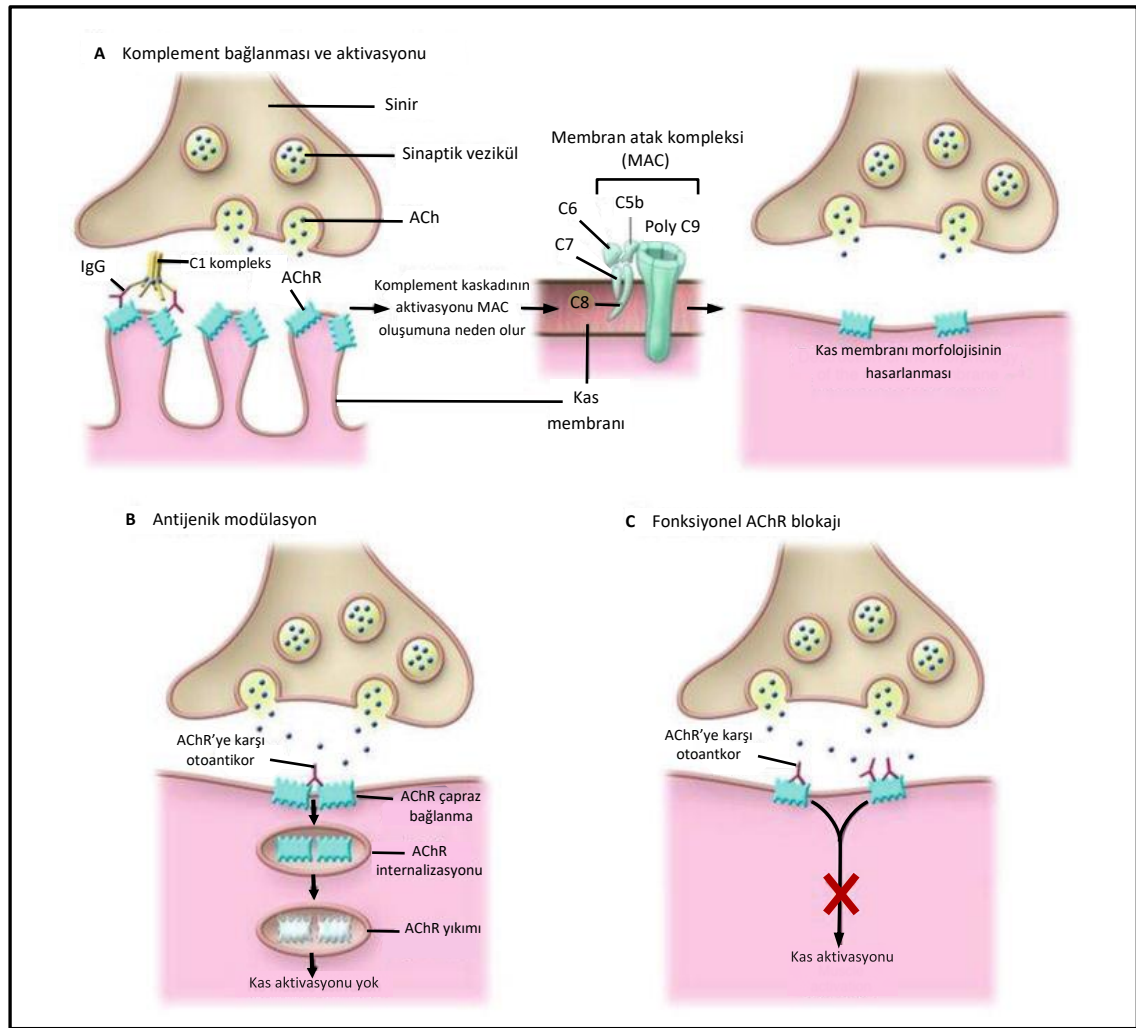
MG’de self-toleransın kırılma mekanizmasından sonra olayların devamının Tip 2 hipersensitivite reaksiyonu tarzında olduğu düşünülmektedir (Phillips ve Vincent, 2016). Otoantikorların oluşumu bu hastalığın B hücresi ile medide bir otoimmün bozukluk olduğunu göstermektedir. Hastalıkta görülen NMJ bozukluğu antikorlar yoluyla olmaktadır. Fakat B hücrelerinin antikor üretmesi T hücrelerine bağımlı bir süreç olarak gerçekleşmektedir (Hughes ve ark., 2004; Phillips ve Vincent, 2016). Öncelikle self antijene karşı reaktivite geliştirebilmesi için bu antijenin MHC-II denilen moleküle bağlanması gerekmektedir. Makrofajlarca fagosite edilen AChR reseptörü antijeni peptid subkomponentlerine bölünür. Oluşan antijenik fragmentler ile MHC-II birleşiminin, makrofajlar ve antigen presente eden hücrelerinin kendi yüzeylerine aktarılması sonucu aktive olmalarıyla sitokinler salınır ve bölgeye T hücreleri çağırılır, gelen T hücreleri CD3 kompleks ve CD4 moleküler reseptör bölgeleri sayesinde antijen kompleksini tanır. Özellikle CD4 T hücreler patogeneze olayları sürükleyici rol alırlar. Aktive olan CD4 T hücreleri (T helper hücreleri) IFN gamma ve IL-17 sitokinlerini üretir. Bu sitokinler de B lenfositlerini stimüle eder, aktive olan B hücreleri de fazlalaşıp kolonize olarak antikor sentezleyen plazma hücrelerine dönüşürler ve böylece antikor üretimi gerçekleşir (Phillips ve Vincent, 2016; Cai ve ark., 2019; Fichtner ve ark., 2020).

2.3.2. AChR-Myastenia Gravis Hastalığının İmmunopatogenezinde Son Basamak ve Antikorların Rolü

Bu tip MG hastalığı, IgG1, IgG2 ve IgG3 tipindeki antikorların NMJ’de oluşturdukları doku hasarı ile meydana gelmektedir. Bu antikorların kaynağının uzun süre yaşamış plazmositler olduğu bulunmuştur. MuSK’ a karşı gelişen antikorların ise çoğunlukla

IgG4 tipinde olmaları, kısa yaşam süreli plazmoblastlardan kaynaklanmaları ve NMJ’de protein-protein etkileşimlerini bozarak etki göstermeleri AChR tipinden farklılık gösterir (Stathopoulos ve ark., 2017).

AChR’ye karşı oluşan antikorlar üç farklı mekanizma ile etki gösterir (Şek. 2.3). Bunların ilki AChR’inin fonksiyonel blokajıdır. Antikorlar, reseptörün kendisine veya yakınına bağlanarak ACh’nin reseptöre bağlanmasını engeller. Bu mekanizma hastalık



Şekil 2. 3. Nöromusküler kavşak.

patogenezinde minör rol oynamaktadır (Almon ve ark., 1974; Whiting ve ark., 1985; Hara H ve ark., 1993; Ha ve Richman, 2015).

İkinci mekanizma, antijen modülasyonu şeklindedir. Bir AChR ye karşı oluşan antikor iki tane AChR’üne çapraz (kross) bağlanma yapabilir. Antikorların, iki tane birbirinin aynısı ağır-hafif zincir yapısından oluştuğu ve iki tane antijen bağlayan bölge ile esas

etkileriyle ilgili bir tane stabil bölge içerdiği akla getirilirse bu bağlanmanın nedeni kolaylıkla açıklanabilir. Antikorların bu şekilde reseptörlere bağlanması ile reseptörler internalize olarak hücre içinde lizozomlar ile degrade olur. AChR (Normalde farelerde yaklaşık 10 gün, insanlarda farklı laboratuvarlara göre 6-13 gün) yarı ömrü kısadır. Böylece kompleman aktivasyonu gerekmeden nöromusküler bileşkedeki AChR sayısı düşer (Drachman ve ark., 1978; Loutrari ve ark., 1992; Ha ve Richman, 2015).

Üçüncü mekanizma, antikorların esas etkisiyle ilgilidir. IgG1 ve IgG3 yapısındaki bu antikorların esas etkileri kompleman aktivasyonudur. Bu aktivasyon ile membran atak kompleksi (MAC) oluşur ve bu kompleks aracılığıyla oluşan kalsiyum influsu membranda lokal hasara neden olur. Ardından AChR' ünü içeren membran parçası kalıntıları sinaptik aralığa atılır. Bu şekilde hasarlanan postsinaptik membranda, ACh'e karşı azalan bir cevap oluşur. Ayrıca postsinaptik membranın yapısındaki katlar azalır ve sinaptik aralık mesafesi fazlalaşır. Bütün bunlar sinirden kasa olan iletimi engeller (Engel A G ve ark., 1977; Engel ve ark., 1979; Ruff ve Lennon, 2008; Tüzün ve Christadoss, 2013). Oluşan immun kompleksler AChR'lerine ek olarak yakın bölgedeki voltaj kapılı sodyum kanallarına da zarar verir. Bunun sonucu olarak ayrıca kasta aksiyon potansiyeli oluşturmakla görevli postsinaptik membran end plak potansiyelinin (EPP) eşik değeri yükselir (Phillips ve Vincent, 2016; Fichtner ve ark., 2020).

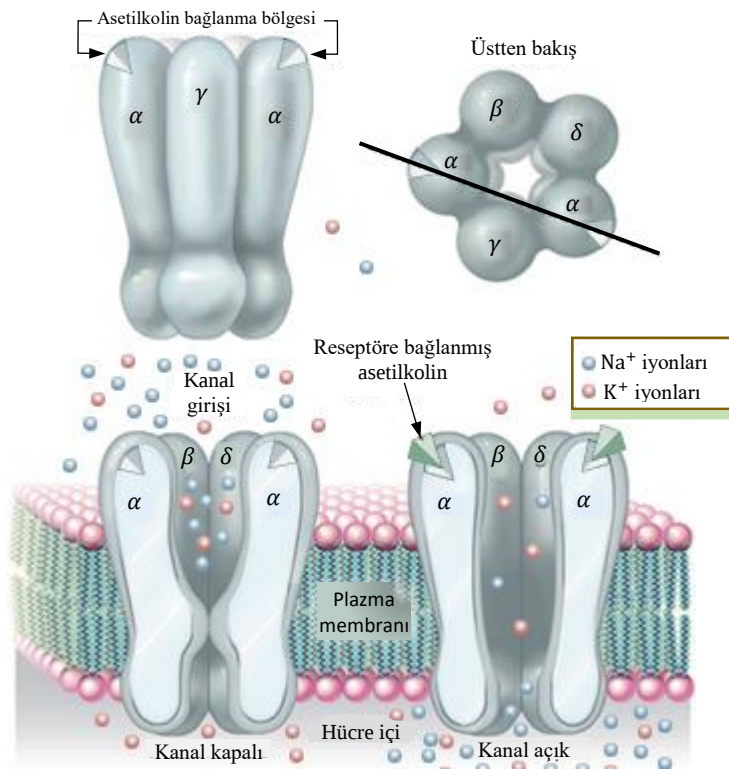
2.4. Asetilkolin Reseptörünün Yapısı, Görevi ve İmmunojenitesi

NMJ'nın postsinaptik kas membranında yer alan AChR, iyonotrofik ligand kapılı bir transmembran reseptördür. Beş subunitten oluşan kuaterner bir glikoprotein yapısına sahiptir. AChR erişkinlerde ve innerve kaslarda, $2\alpha 1\beta 1\delta 1\epsilon$; fetal ve denerve kaslarda ise $2\alpha 1\beta 1\delta 1\gamma$ formundadır. Bu subunitler farklı canlı türlerinde homologtur. Her subunitin dörder transmembran bölgesi (M1-M4) bulunmaktadır. Bu durum hepsinin ortak bir genden köken aldığını göstermektedir. Bu subunitler dairesel bir şekilde dizilirler (Stickler ve ark., 2005; Cetin ve ark., 2020) (Şek.2.4).

Bu reseptörler, postsinaptik membranın yüzey alanını artıran yapısı olan sekonder sinaptik kıvrımlar olarak adlandırılan kıvrımların tepesinde yoğunlaşır (Ha ve Richman, 2015). Bu bölgede ayrıca NMJ'ın normal gelişimi ve devamlılığı ile ilgili MuSK (muscle specific kinase), LRP4, rapsyn, agrin gibi başka proteinler de bulunmaktadır. Bunların birbirleriyle etkileşimi ile AChR dahil önemli postsinaptik proteinler kümeleşir ve bu

olay normal NMJ fonksiyonu için gereklidir (Hughes ve ark., 2004; Hajjar ve ark., 2014; Ha & Richman, 2015).

AChR'nin ligandı ACh dir. İki molekül ACh, AChR'nin α subunitlerine bağlanır ve onlarla birleşir. Bu birleşmeden sonra AChR, üç boyutlu bir konformasyonel değişikliğe uğrar. Reseptörün ortasında, membranda huni (funnel) şeklinde bir açıklık oluşur ve bu açıklık iç yüzeyi negatif yüklü bir katyon kanalı olarak görev görür. Bir milisaniye kadar açık kalan bu kanaldan Na iyonları hücre içine, K iyonları ise hücre dışına alınır. Bu



Şekil 2. 4. Asetilkolin reseptörünün yapısı

geçişler postsinaptik kas hücresi membranında ilerleme göstermeyen minyatür end plate potansiyelinin (MEPP) oluşmasını sağlar. Pek çok ACh molekülünün reseptörlere bağlanması sonucunda postsinaptik membranda daha büyük depolarizasyon oluşturulur ve end plate potansiyel (EPP) meydana gelir. Oluşan EPP, membranda aksiyon potansiyeli meydana getirir, ardından postsinaptik membrandaki sekonder sinaptik yarığın derinliklerinde voltaj kapılı Na kanalları aktive olur ve yayılabilen bir aksiyon potansiyeli (AP) oluşur. Bu AP'nin kasın transvers tübüllerine yayılması ile de voltaj

kapılı Ca kanalları aktive olur, sonuçta hücre içine Ca iyonu akımı ile kas hücresindeki kontraksiyon mekanizması işlev kazanır (Nicolle, 2016).

AChR'ünün ACh'e bağlanma ve anti-AChR antikorlarının bağlandığı ana immunojenik bölgelerinin her ikisi de, alfa subunitlerin ekstrasellüler yüzeye uzanan bölgesinde yer almakla birlikte bu bölgelerin tam lokalizasyonları birbirinden farklıdır. AChR'e bağlanma bölgeleri tam olarak $\alpha 1$ ve δ ile $\alpha 2$ ve ϵ subunitleri arasında yer alırken; AChR antikorlarının çoğu reseptörün α subunitinin 67.-76. peptidleri arasındaki bölgeye bağlanır (Lindstrom, 1980; Tzartos ve ark., 1987; Tzartos S J ve ark., 1988; Conti-Tronconi ve ark., 1994; Vincent & Willcox, 1994).

AChR subunitlerinin ekstrasellüler yüzeyinde yer alan şekerler, hücreden dışarıya doğru 100 Angstrom uzunluğunda uzanırlar ve kompleks dallanma gösterirler. Reseptörün hücre içine bakan yüzeyinde ise reseptörü hücreye çapalayan sitoskeletal elemanlar yer alır (Lindstrom, 1980; Stickler ve ark., 2005; Cetin ve ark., 2020).

2.5. Timus, Lenf Nodu ve Dalak İmmun Organlarının İmmunolojik Olaylardaki ve Myastenia Gravis Hastalığındaki Rolü

2.5.1. Timus Organının Myastenia Gravis Hastalığındaki Rolü

Timus vücuttaki primer lenfoid organlardandır. T hücreleri (thymus cell lymphocytes) timusta olgunlaşır, yabancı hücre ve maddeleri tanımayı öğrenir. T hücreleri, doğal (innate) ve edinsel (adaptif) immün sistemdeki aktiviteleri koordine eder. Ayrıca tüm vücudu dolaşarak tüm hücrelerin yüzeylerinde bir değişiklik olup olmadığını kontrol eder ve değişiklik varsa bir adaptif immünolojik cevap başlatır (Thapa ve Farber, 2019).

MG patogenezinde timusun ayrıca özel önemli bir rolü bulunmaktadır. Normal ve myastenik kişilerde timik medullada kas benzeri (myoid) hücreler bulunur ve bu hücrelerin yüzeyinde AChR'leri vardır. Bu hücrelerin muhtemelen antijenik stimülasyon sağladığı düşünülmektedir (Vincent ve Newsom-Davis, 2007).

Erken başlangıçlı MG hastalarının %70'inin timuslarında genel olarak hiperplazi olarak ifade edilen belirgin yapısal değişiklikler saptanmıştır. Bu değişiklikler folliküler hiperplazi ile B hücre ve antikor sentezleyen hücrelerden oluşan germinal merkez benzeri yapılar olarak tanımlanmaktadır (Staber ve ark., 1975; Safar ve ark., 1987; Roxanis, 2002;

Marx ve ark., 2013; Ha ve Richman, 2015). Hiperplastik timus, anti-AChR antikorlarının önemli bir kaynağıdır (Hohlfeld ve Wekerle, 1994; Berrih-Aknin ve le Panse, 2014). Ayrıca MG'li hastaların %10-20'sinde timoma ve timomalı hastaların %30-50'sinde MG saptanmaktadır (Binks ve ark., 2016; Nicolle, 2016)

Bu hastaların timuslarında AChR'ye karşı antikorlar ve aktive olmuş B hücrelerinin bulunması, hiperplastik timusta AChR antikorlarının yapımının başlatılıp sürdürüldüğü fikrini desteklemektedir. Birçok çalışmada bu fikri destekleyen bulgular bulunmuştur (Fichtner ve ark., 2020). Bunlardan biri AChR MG'li hastaların timusunun immun yetmezlikli farelere aktarımı ile myastenik fare oluşumudur. Timus dokusundan elde edilen AChR'e özel B hücrelerinin yapısal incelemesi bu hücrelerin otoreaktif olduklarını göstermektedir. Bu B hücrelerinde gözlenen klonal heterojenite, tip değişimleri ve somatik hipermutasyonlar antijene bağımlı bir maturasyon varlığını göstermektedir (Cardona ve ark., 1995; Graus ve ark., 1997; Sims ve ark., 2001). Yani AChR antikorlarının ilk olarak salınması hiperplastik timustaki bu B hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir.

2.5.2. Timus Dışı Diğer İmmünolojik Organların Görevleri

Timus ve kemik iliği, vücuttaki primer lenfoid organlardır. Bu organlar vücutta lenfosit olarak isimlendirilen özel immünolojik hücrelerin üretiminden sorumludurlar. Kemik iliği, B ve T hücrelerini üretir. B hücreleri tamamen kemik iliğinde olgunlaşırken, T hücrelerinin olgunlaşması timüste gerçekleşir. Timusta T hücrelerine bir eğitim verilerek vücudun kendi antijenlerine zarar vermemesi, vücutta bulunmayan antijenleri tanıyıp immun cevap oluşturma yeteneği kazanması sağlanır (Thapa ve Farber, 2019).

Primer lenfoid organlarda üretilen lenfositler sekonder lenfoid organlara gelir. T ve B hücrelerinin primer aktivasyonları veya daha önceden aktive olmuşlarsa bu aktivasyonlarının yükseltgenmesi sekonder lenfoid organlarda gerçekleşir. Bu sistem lenf nodu, dalak, peyer plakları ve tonsil gibi organları kapsar. Bu organlarda immünolojik sistem asıl görevini gerçekleştirerek düşman mikroorganizmalara ve yabancı antijenlere karşı immun cevap oluşturur (Buettner ve Bode, 2012; Lewis ve ark., 2019).

2.5.2.1. ‘Lenf Nodu’ nun İmmunolojik Hastalıklardaki Rolü

Lenf nodunun immunolojik olarak fonksiyonu, kendisine akan lenfi filtreleyerek antijenleri tespit etmek ve sonrasında saptanan antijenler patojen ise immun cevap oluşturmak, eğer zararsızsa tolerans mekanizmasını işletmektir (Sainte-Marie, 2010). Özetle, afferent lenfatiklerle gelen antijen yüklü dendritik hücreler, taşıdıkları antijenleri lenf nodun parakorteks alanında (T hücre bölgesi) T hücrelere prezente ederler. Reseptörleri bu antijenle uyumlu T hücreleri, aktive ve proliferer olur.

Aktive olan bu T hücrelerinin bir kısmını oluşturan T helper hücreler, lenf nodunun korteksine (B hücre bölgesi) gelir ve B hücreleri ile etkileşerek antijene özgü B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşmesini ve antikor üretmesini sağlarlar. Daha sonra aktive olan plazma hücreleri, CD4+ ve CD8+ T hücreleri gibi efektör hücrelerin tümü, lenf nodunun medullasına gider. Ardından bu efektör hücreler, efferent lenfatikler veya kan damarları vasıtasıyla lenf nodunu terk edip ilgili bölgelerdeki inflamasyon veya tehlike altındaki yerlere göçerler. Bu göçüşün, efektör hücreler üzerinde bazı moleküllerin up-regulasyonu ile muhtemelen ilgili adrese özel olarak yönlendirildiği ve burada immün cevap oluşturulduğu düşünülmektedir (Ahrendt ve ark., 2008). Antijenlere karşı tolerans ise regultuar T hücrelerince yapılan düzenlemeler, delesyon veya anerji gibi mekanizmalarla, T ve B hücreleri aktivasyonunun supresyonu sonucu gelişmektedir (Buettner ve Bode, 2012).

2.5.2.2. ‘Dalak’ın İmmunolojik Hastalıklardaki Rolü

Sekonder lenfoid organların en büyüğü olan dalak, hematopoez ve kırmızı kan küreleri ile trombositlerin yıkımı dışında pek çok immunolojik fonksiyon yürütmektedir. Dalakta da lenf nodu gibi fonksiyon ve yapı açısından iki farklı bölüm yer almaktadır. Kırmızı pulpa ve beyaz pulpa olarak adlandırılan bu iki bölüm arasında, rodentlerde marginal bölge, insanlarda ise perifoliküler bölge ile geçiş sağlanmaktadır. Dalakta sadece kan dolaşımı vardır, lenf noddaki gibi lenfatik dolaşım yoktur (Lewis ve ark., 2019).

Kan dolaşımından gelen hücre-hücre direk ilişkisi kurulan antigenler, beyaz pulpada periarteriolar lokalizasyonlu T hücre bölgesindeki T hücrelerini (naif ve santral memory hücreler) aktive eder. Daha sonra bu hücreler yardımıyla B hücre bölgesindeki B hücreleri

başkalaşır ve sonuçta oluşan plazmoblastlar kırmızı pulpaya hareket eder (Nolte ve ark., 2000).

Kırmızı pulpada beyaz pulpadan gelen bu plazmoblastlar plazma hücrelerine dönerek antikor üretir, bu antikorlar kan dolaşımına salınır. Kırmızı pulpa ile beyaz pulpa kesişim yerlerinde ise doğal (innate) benzeri B hücreler, marginal bölge B hücreleri ve dalağa özgü antijen presente edici hücreler olan dendritik hücreler bulunur. Bu hücreler kandan gelen antijenleri yakalar ve beyaz pulpaya iletir. Ayrıca yine bu bölgede bulunan makrofajlar, kanla gelen mikroorganizmaları filtre eder (Nolte ve ark., 2000). Kırmızı pulpada ayrıca ekstramedüller hematopoezin yanı sıra monosit, platelet ve kırmızı kan hücreleri gibi hücrelerin depolanması gerçekleşir (Bronte ve Pittet, 2013).

Kısaca, kandan gelen hücre-hücre direk ilişkisi kurulan antijenler dalakta antijen presente eden hücreler ile naif veya hafıza (memory) T ve B hücrelerine sunularak T ve B hücrelerinin rol aldığı adaptif immun cevap oluşturulur.

2.6. Deneysel AChR Myasthenia Gravis Modelleri

MG hastalığının deneysel modeli ilk kez 40 yıl kadar önce tavşanların, elektrikli yılan balığının (*Electrophorus electricus*) elektrik organından elde edilen AChR ile immunize edilmesi ile oluşturulmuştur (Patrick ve ark., 1973). Geçen zaman boyunca çeşitli hayvanlarda, NMJ’de anti-AChR antikorları ile MG hastalığının yapısal ve fonksiyonel olarak MG hastalığı modelleri geliştirilmiş ve bu modeller hastalığın patogenezi ile yeni immunolojik tedavilerin etkinliğinin değerlendirmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Baggi ve ark., 2012; Kusner ve ark., 2018; Mantegazza ve ark., 2016). Deneysel olarak hayvanlarda oluşturulan ve insan hastalarda görülen MG immunopatolojik olarak birbirlerine benzemektedir. Her ikisinde de serumda anti-AChR antikorları, nöromusküler kavşakta IgG ve kompleman depozitleri, kas membranında AChR kaybı, AChR epitoplarının MHC Klas 2 ile sınırlı olan prezentasyonu ve B lenfositlerin antikor üretimi yapması sürecine T helper hücrelerinin katkı sağlaması gibi özellikler ortaktır. Deneysel MG ve MG arasında immunopatolojik benzerlikler olduğu gibi farklılıklar da bulunmaktadır (Mantegazza ve ark., 2016) (Tablo 2.1).

Tablo 2. 1. Deneysel myastenia gravis ile insan hastalarda görülen myastenia gravis arasındaki immunopatolojik farklar.

	Deneysel MG	Myastenia Gravis
Timus dokusunda antikor oluşumu	Yok	Var
Hiperplastik timus ve timusta germinal merkez	Yok	Sıklıkla var
Timoma	Yok	Bazı vakalarda var

Deneysel MG, birçok farklı hayvanda oluşturulabilmekle birlikte pratikte çoğunlukla hastalığın klinik belirtilerinin daha sıklıkla gözlemlendiği rat ve farelerde gerçekleştirilmektedir.

2.6.1. Klasik Aktif AChR Deneysel Myastenia Fare Modeli

Bu model hayvanın aktif immünizasyonu ile oluşturulur. Bu immunizasyon için AChR'e ait peptidler, AChR subunitleri, kas AChR' nin rekombinant fragmentleri veya en sıklıkla Marin Ray Torpedo'nun elektrik organından saflaştırılan AChR'leri kullanılır (Wu ve ark., 2001; Tuzun ve ark., 2015).

H-2b haplotipini taşıyan fare tipleri bu model için daha duyarlıdır. En duyarlı fare tipleri C57BL6, SJL ve AKR dir, Torpedo AChR ile bu hayvanların %50-70'inde EAMG gelişmektedir. BALB/c ve SWR türlerinde hassasiyet düşüktür (Berman ve Patrick, 1980a, 1980b). Bu yüzden C57BL6 doğal tip fareleri bu modellemede en çok kullanılan fare türüdür (Fuchs ve ark., 1976; Berman ve Patrick, 1980a).

Model rutin olarak saflaştırılan 20-30 µgr AChR'nin komplet Freund Adjuvant (CFA) içinde solüsyonu ile ilk immunizasyonu ardından, 20-30 µgr AChR'nin inkomplet Freund Adjuvant içinde solüsyonu ile iki veya üç kez rapeli şeklinde bir işlem sonrası oluşmaktadır. Bu işlemler sonrası hem yabancı, hem de farenin kendi AChR'lerine karşı antikorlar oluşmaktadır (Lindstrom, 1980; Link ve Xiao, 2001). Hastalık belirtileri ise genellikle son enjeksiyondan 1-2 hafta sonra gelişmektedir (Berman ve Patrick, 1980a; Christadoss ve ark., 2000). Bu modelde birden fazla immunizasyon işlemi yapıldığı için koruyucu ve tedavi edici yaklaşımların denenmesinde seçilecek zaman periyodunu belirlemek zordur (Mantegazza ve ark., 2016).

Lewis ratlarda oluşturulan MG modeli, insanda görülen MG hastalığına en benzer klinik bulguları oluşturur (Biesecker ve Gomez, 1989). MG, bu ratlarda genellikle CFA içinde solubulize tek doz purifiye AChR immunizasyonu ile oluşturulur (Lindstrom, 1980). Bu hayvanlarda iki farklı klinik fazın geliştiği bildirilmektedir. İlk görülen akut faz geçicidir, immunizasyondan yaklaşık 7 gün sonra başlar. Bu faz IgM tipinde AChR antikorları ve neden olduğu kas membranında kompleman birikimi ile karakterizedir. Bu fazda nöromusküler kavşakta ileri düzeyde fagositik aktivite vardır ve sonuç olarak postsynaptik membranda hasar oluşur. Bu fagositik sellüler invazyon kasın AChR miktarını azaltır, fakat 2-3 gün sonra denevasyona bağlı kavşak dışı bölgelerde AChR'leri oluşur ve bu şekilde AChR miktarında aşırı bir artış görülür (Lindstrom, 1980). İkinci faz, kronik progresif fazdır ve immunizasyondan yaklaşık 28 gün sonra başlar (Link ve Xiao, 2001). Bu faz daha yüksek miktarda, Ig G tipinde antikor oluşumu ve bu dönemde sinaptik kıvrımların kaybı ile düzleşmiş görünümdeki postsinaptik membranda kompleman birikimi ile karakterizedir. Bu fazda fagositik hücreler bulunmaz ve AChR miktarı düşmüştür. AChR miktarı sağlıklı hayvanlardaki miktarının %30'una kadar düşer. Bu şekilde bu faz, insan hastalığının klinik dönemini temsil eder (Link ve Xiao, 2001).

2.6.2. AChR Myastenia Gravis Deneysel Fare Modeli Pasif Transferi

Otoantikorların pasif transferi ile farelerde MG modeli oluşturulabilmektedir. Bu transfer iki yolla oluşturulabilmektedir. Myastenik hastaların serumlarından elde edilen IgG nin veya AChR immunizasyonu vasıtasıyla kronik deneysel MG geliştirilen hayvanlardan alınan anti-AChR antikorlarının günlük olarak sağlıklı farelere enjeksiyonu ile bu transfer gerçekleştirilmektedir (Toyka ve ark., 1975; Lindstrom ve ark., 1976).

Alternatif olarak, model geliştirilmiş hayvanlardan veya hücre kültürü supernatantlarından elde edilen monoklonal antikorların (IgG1 veya IgG2a) sağlıklı hayvana transferi ile bir günde de model oluşturulabilmektedir (Tzartos ve ark., 1987; Piddlesden ve ark., 1996).

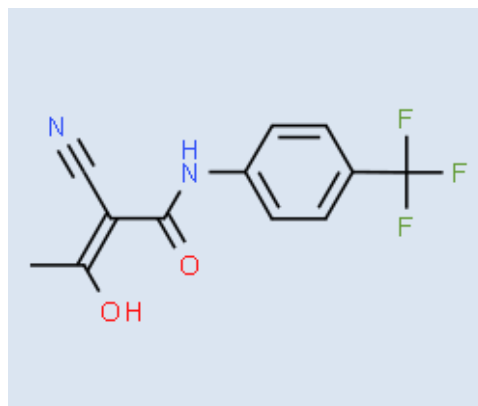
Bu model immunopatogenez üzerine çalışmalarda ve tedavi seçeneklerini değerlendirmede ideal metod olarak görülmektedir (Kusner ve ark., 2015).

2.6.3. AChR Deneysel Myastenia Gravis Adaptif Transferi

Ağır kombine immun yetmezlikli farelerde (olgun T ve B hücreleri yoktur, xenograftları tolere ederler) insan dokusu veya hücrelerinin transferi ile oluşturulurlar. MG'li insan hastaların timus dokularından alınan parçaların transferinden 1-2 hafta sonra farelerde, insan-anti fare AChR oluşmaya başlamakta ve bu üretim transplantasyondan sonra 11 haftaya kadar devam etmektedir (Wang ve ark., 1999). Yine ağır kombine immun yetmezlikli farelere, insan MG hastalarının kanlarından enjeksiyon yapılarak veya bu farelere AChR immunizasyonu yapılmasının ardından sağlıklı insanlardan alınan kan lenfositleri enjekte edilerek deneysel MG oluşturulabilmektedir (Martino ve ark., 1993).

2.7. Bir İmmunomodülatör İlaç Olan ‘Teriflunamid’ Hakkında Bilgi

Teriflunamid (Aubagio) 2011 yılında tekrarlayan ve düzelen (relapsing-remitting) multipl skleroz tedavisinde kullanılmak üzere piyasaya çıkarılan 2008 yılından beri rheumatoid artrit tedavisinde kullanılan leflunomid (Arava) isimli immunomodülatör ilacın major aktif metabolitidir. Leflunomid kendisi farmakolojik olarak aktif olmakla birlikte in vivo ortamda açık-halka formu olan teriflunamide tamamen çevrildiği için leflunomidin aktivitesi aslında teriflunamidin aktivitesidir (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2013). Şekil 2.5 te açık yapısı verilen teriflunamidin kapalı molekül formülü $C_{12}H_9F_3N_2O_2$, moleküler ağırlığı 270.20 atomik kütle birimidir. Kimyasal ismi



Şekil 2. 5. Teriflunamid açık yapısı.

2-Butenamide, 2-cyano-3-hydroxy-N-(4-trifluorometil)fenil-(2Z) veya (Z)-2-cyano-3-hidroxy-but-2-enoik asit-(4-trifluorometil-fenil) amid' tir (Committee for Medicinal Products for Human Use -CHMP, 2013).

Teriflunamid, mitokondriyel dehydroorotate dehidrogenaz (DHO-DH) enzimini reversibl olarak inhibe ederek pirimidin sentezini azaltan immunomodölatör etkili bir ilaçtır. DHO-DH inhibitörü veya klinik olarak daha anlamlı bir biçimde pirimidin sentez inhibitörü olarak tanımlanabilir. Bu ilaç, bahsedilen enzimin inhibisyonu ile pirimidin havuzunu azaltarak DNA sentezini azaltır ve hızlı bölünme özelliğine sahip hücreler olan T ve B lenfositlerin aktivasyon ve proliferasyonunu bozar. Diğer hücreler pirimidin sentezinde salvaj yollar kullanarak DHO-DH enziminin blokajı ile başa çıkabilirler (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2013).

İnsan T hücrelerinde, leflunomid 100 mikromolardan düşük konsantrasyonlarda immunomodölatör etkisini DHO-DH enzimi inhibisyonu ile de-novo pirimidin sentezini engelleyerek gerçekleştirirken, daha yüksek konsantrasyonlarda ayrıca pürin biyosentezini de bozarak T hücrelerinin sinyalleri gibi ATP'ye bağımlı işlemleri de azaltır (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2013). Benzer şekilde farelerde leflunomid ile yapılan bir çalışmada, DHO-DH inhibisyonunun B hücrelerince üretilen antikor miktarını azalttığı bulunmuş; leflunomidin hem T hücrelerine bağlı, hem de T hücrelerinden bağımsız antikor cevabını azalttığı rapor edilmiştir (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2013). DHO-DH enziminin %50 sini inhibe eden teriflunamid konsantrasyonları (IC₅₀) yaklaşık olarak sırasıyla rat, fare ve insan için 20, 80 ve 1000 nM değerlerindedir. Bu enzim üzerine olan inhibisyon, in vitro ortamda eksojen uridin ile ortadan kaldırılabilir (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2013).

Teriflunamidin farmakokinetiği, tüm çalışılan hayvan türlerinde insanınkiyle benzerlik gösterir. Teriflunamid oral olarak verildiğinde hızlı ve iyi absorbe olur, oral biyoyararlanımı (bioavailabilite) yüksektir. Kanda bulunan major komponenttir. Çok yüksek oranda (>95) plazma proteinlerine bağlı olarak bulunur. Dağılım hacmi küçüktür. Enterohepatik sirkülasyona girer, vücuttan atılımı yavaş olur. Atılımı dışkı veya idrar ile olur (Committee for Medicinal Products for Human Use-CHMP, 2013). Yarı ömrü, enterohepatik döngüden dolayı, tavşan (yarı ömür: 4-5 saat) hariç tüm hayvan türlerinde (yarı ömür: 18-37 saat) görece uzundur. İnsanda yarı ömrü ortalama 19.4 gündür. Oral olarak alınan ilacın plazma kinetiği, kabaca dozla orantılıdır ve ilacın birikme potansiyeli bulunmaktadır (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2013).

Teriflunamidin metabolizması, tüm incelenen canlılarda oksidasyon, hidroliz ile glukuronid ve sülfat konjugasyonu şeklindedir. P450 (CYP450) enzimleri bir dereceye kadar olayda yer alır fakat özel bir izozim baskın değildir. İnsan ve diğer hayvan türlerinde kanda dolaşan tek metaboliti 4-triflorometilanilin (TFMA), kandaki ilaçla ilişkili maddelerin ancak %0.01 den azını teşkil eder. İnsanda ve hayvan türlerinde major atılan metaboliti TFMA-oxanilik asittir. Feçes ve idrar yoluyla vücuttan atılır (Committee for Medicinal Products for Human Use -CHMP, 2013).

İlaç proliferen olan hücreleri etkilediği için, toksisitesini de hücrelerinde daha fazla proliferasyon olan kemik iliği (hematopoietik sistem), lenf nodu (immun sistem), pankreas ve gelişen fetüs gibi organ veya sistemler üzerinde gösterir (Committee for Medicinal Products for Human Use-CHMP, 2013). Kemik iliği, dalak, timüs ve lenfoid dokularda hücresel ve atrofik değişikliklerle birlikte anemi, trombositopeni, lökopeni, gastrointestinal traktta ülserasyon, gastrointestinal hemoraji, deri ülserleri, reproduktif doku atrofisi ve teratojenite gibi toksik etkiler oluşturabilir. Ayrıca yüksek dozlarda rodentlerde hepatosellüler atrofiye, köpeklerde ise pankreas nekrozu, fibrozu ve inflamasyonuna neden olmaktadır. Yine orta ve yüksek dozlarda fekal diskolorasyon, diare ve vücut ağırlığında düşme gibi yan etkileri bulunmaktadır (Committee for Medicinal Products for Human Use-CHMP, 2013).

Fare ve ratlarda yapılan tek doz toksisite çalışmalarında, oral ve intraperitoneal (ip) kullanımda benzer klinik bulgular ve mortalite oranları görülmektedir. Bu canlı türlerinde, teriflunamid per oral olarak ≥ 200 mg/kg, intraperitoneal olarak ≥ 100 mg/kg dozlarında öldürücüdür. Farelerde oral olarak ≥ 25 mg/kg dozunda ölüm riskinin arttığı bildirilmiştir (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2013). İntraperitoneal (ip) kullanım olarak, teriflunamidin farelere 10 mg/kg dozunda enjeksiyonu ile klinik fayda sağlandığı ve ilacın önemli toksisiteye neden olmadığı görülmüştür (Gilli ve ark., 2017).

2.8. İmmünite ve Sitokinler

2.8.1. Doğal İmmünite

Doğal (innate) immünite, doğuştan gelen immünite, nonspesifik immünite olarak da adlandırılabilir. İmmün cevabın, vücudu dışarıdan gelen enfeksiyona ve inflamasyona

neden olabilecek zararlı materyallere karşı koruyan ilk kademedeki gelişen formunu temsil eder. Lökosit hücreleri olarak, natural killer hücreler, mast hücreler, eosinofiller, bazofiller; fagositik hücre olarak makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler bu mekanizmada görev almaktadır. Bu bağışıklık sistemi ayrıca antijen prezentasyonu ile adaptif immun sistemi aktive eder (Ademokun ve Dunn-Walters, 2010; Chaplin, 2010).

2.8.2. Antijen Prezentasyonu

Antijen molekülleri makrofajlar ve diğer antijen prezente edici hücrelerin (dendritik hücreler, langerhans hücreleri, B hücreleri) yüzeyinde T helper hücrelerine MHC-Klas 2 molekülleri ile birlikte sunulurken, sitotoksik T hücrelerine MHC- Klas 1 molekülleri ile birlikte sunulur (Zinkernagel ve Doherty, 1997; Turley, 2000; Sadegh-Nasseri ve ark., 2008).

2.8.3. Adaptif İmmunité

Edinsel immunité olarak da adlandırılabilir. Patojenleri yok etmek veya gelişmesini engellemek amacıyla, immun sistemin özelleşmiş hücrelerle yürüttüğü immun cevap mekanizmasıdır. Bu mekanizmada patojene özel immun cevap oluşturulur. Adaptif immunité spesifik patojene verilen başlangıç cevabının ardından immünolojik hafıza oluşmasını sağlar. Bu hafızanın oluşması ile aynı patojenle karşılaşılması durumunda artmış bir cevap oluşturulur. Adaptif immun cevap, lenfosit olarak adlandırılan beyaz küre hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Lenfositler B hücreler ve T hücreler olmak üzere iki tiptir. B hücreler antikor cevabıyla giden humoral immuniteden, T lenfositler ise hücresel immuniteden sorumludur (Ademokun ve Dunn-Walters, 2010; Chaplin, 2010).

2.8.4. Humoral İmmunité

Ekstrasellüler sıvılarda bulunan makromoleküller ile yürütülen immun mekanizmadır. Bu makromoleküller, antikorları, kompleman proteinlerini ve bazı antimikrobial peptidleri kapsar. Bu immunité, antikor üretimi ve Th2 hücrelerinin aktive olması, sitokin üretimi, germinal merkez oluşumu, izotip değişimi, affinite maturasyonu ve hafıza (memory) hücresi gelişimi gibi eşlik eden olayları kapsamaktadır. Humoral immunité, ayrıca patojen ve toksin nötralizasyonu, klasik kompleman aktivasyonu, opsonin vasıtasıyla olan fagositoz gibi antikorların oluşturduğu etkileri de içermektedir (Ademokun ve Dunn-Walters, 2010; Chaplin, 2010).

2.8.5. Hücresel Medie İmmunite

Antikorlarla ilgili olmayan immun cevap şeklidir. Bu tip immunité; fagositlerin aktivasyonu, antijen spesifik sitotoksik T lenfositler ve çeşitli sitokinler aracılığıyla işlemektedir (Ademokun ve Dunn-Walters, 2010; Chaplin, 2010).

2.8.6. Primer İmmun Cevap

Vücudun yabancı bir antijenle ilk kez karşılaşması sonucu oluşur. Bu cevapta naif B hücreleri ve T hücreleri görev alır. Bu süreç sonunda immün sistem, sözkonusu antijeni nasıl tanıyacağını, bu antijene karşı antikor yapmayı ve hafıza (memory) lenfositleri oluşturmayı öğrenir ve başarır. Primer immun cevap humoral veya hücresel tipte olabilir. Yaklaşık olarak iki hafta kadar sürer (Ademokun ve Dunn-Walters, 2010).

Primer cevap sırasında, genellikle birkaç gün- bir hafta (bazen haftalar, aylar) süren latent periyod sırasında B hücreleri plazma hücrelerine diferensiye olur. Önceleri B hücreleri antikor üretmez, plazma hücrelerine dönüşüm ile antikor üretimi başlar. Bu immunité sonucu üretilen antikor miktarı antijenin tabiatına göre değişmekle birlikte, genellikle düşük düzeydedir. Oluşan antikorların çoğu IgM tipindedir, düşük oranda IgG antikoru üretilir. Oluşan antikor miktarı 7-10 gün içinde zirveye ulaşır, kısa bir süre sonra da minime düşer. Primer immün cevap başlıca lenf nodu ve dalakta gelişir. Hem timusa bağımlı (adaptif immunité ile ilgili), hem de timusa bağımlı olmayan antijenler (doğal immunité ile ilgili) primer immün cevaba neden olabilirler (Ademokun ve Dunn-Walters, 2010).

2.8.7. Sekonder İmmun Cevap

Bu cevap daha önce primer cevap oluşturulan antijenle tekrar karşılaşınca oluşur. Burada cevap veren hücreler hafıza (memory) hücreleridir. Humoral veya hücresel tarzda olabilir. Sekonder immün cevaptaki latent faz 1-4 gün sürer, primer cevaba göre daha kısadır. Antikor seviyesi 3-5 gün içerisinde zirve noktasına ulaşır. Bu immunitéyi geliştirmek primer immunité oluşumuna göre daha kısa zaman alır. Ana olarak IgG antikoru oluşurken bazen az miktarda IgM, IgA ve alerji sözkonusu olursa IgE antikorları da gelişebilir. Üretilen antikor miktarı, primer immun cevapta bulunanın 100-1000 katı kadardır ve bu cevapta oluşan antikor seviyesi uzun süre yüksek düzeyde gider (Ademokun ve Dunn-Walters, 2010).

Sekonder immün cevaplar ana olarak kemik iliğinde gelişir. Sırasıyla dalak ve ardından lenf nodları bu cevapta rol alır. Sadece timusa bağımlı antijenler, sekonder immün cevabı oluşturur (Ademokun ve Dunn-Walters, 2010).

2.8.8. Sitokinler

Sitokinler, antijenlere cevap olarak immün hücreler tarafından üretilen solubl, düşük moleküler ağırlıklı protein, peptid veya glikoprotein yapıda kimyasal mesajcılardır. Doğal ve edinsel immunitede yer alan tüm hücreler tarafından üretilebilmekle birlikte özellikle daha çok T helper hücreler tarafından üretilmektedirler (Ray, 2016).

Sitokin üretmesi için önce immün hücreler aktive olur, daha sonra salınan sitokinler immün sistemin diğer hücrelerindeki özel reseptörlere bağlanıp bu hücrelerin aktivitelerini etkiler. Sonuçta sitokinler humoral ve sellüler immünite arasındaki dengeyi, inflamasyon ve hematopoiezisi düzenler (Ray, 2016). Sitokinlerin ayrıca kanser oluşumu, anjiyogenez gibi çeşitli fonksiyon ve olaylarda da rolü bulunmaktadır (Turner ve ark., 2014; Ray, 2016).

Sitokin terimi genel ve eski bir terimdir. Yıllar içinde bu terim lenfokinleri, interferonları, interlökinleri, kemokinleri, monokinleri, mezenkimal büyüme faktörlerini, tümör nekrozis faktörlerini ve adipokin terimlerini de içerir şekilde çeşitlenmiştir. Lenfokinler, lenfositler tarafından yapılan sitokinlerdir. Lenfokinlerin çoğu aynı zamanda lökositlerin hücrel cevaplarını etkiledikleri için interlökin (IL) olarak bilinir. Monosit veya makrofajlar tarafından salınan sitokinler monokin olarak, inflamatuvar hücreler için kemotaktik aktivitesi olan sitokinler kemokin, antiviral cevaplarda etkin sitokinler ise interferon (IFN) olarak adlandırılmaktadır. Birçok IFN çeşiti içinde sadece IFN- gamma inflamatuvar cevapta yer alır (Ray, 2016).

Sitokinler spesifik şekilde otokrin, parakrin, endokrin aktivite gösterebilirler. Hormonlardan farklılıkları ilgi konusudur. Hormonların dolaşımında daha yüksek konsantrasyonda olmaları ve özel bazı organlarda üretilmeleri sitokinlerle aralarındaki farklılıklardandır. Ayrıca sitokinlerin aktiviteleri hormonlara göre daha generalizedir (Turner ve ark., 2014; Ray, 2016).

Sitokinler interaktif olarak çalışarak hücrel aktiviteyi düzenler. Bu aynı sitokinin farklı fonksiyonlara sahip olabilmesi (pleitropi), farklı sitokinlerin aynı veya benzer

fonksiyonları düzenlemeleri (redundancy), iki sitokinin beraber birbirlerine eklenen etkiden daha fazla tesir oluşturabilmeleri (sinergizm), bir sitokinin başka bir sitokinin etkisini inhibe veya yok edebilmesi (antagonism) özellikleri ile sağlanmaktadır (Ray, 2016).

TNF-alfa, IFN-gamma gibi sitokinlerin bir kısmı sellüler immune cevapta, TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13 gibi bazıları ise antikorlarla ilişkili humoral cevapta görev alır. IL-1, IL6, TNF- alfa, IL-17, IFN-alfa, IFN-gamma gibi bazı sitokinler pro-inflamatuvar iken; IL-12, IL-22 gibi sikokinler anti-inflamatuvardır. Sitokinlerin çoğu T helper hücreleri tarafından üretilir. T helper (Th) hücrelerin ürettikleri sitokin kombinasyonuna göre çeşitli alt tipleri tanımlanmıştır. Genel olarak, Th1, Th17 hücrelerinin ürettikleri sitokinler makrofaj ve sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonuna, Th2 hücrelerince üretilen sitokinler B hücrelerinin aktivasyonuna, Th17 hücrelerinin ürettiği sitokinler ise nötrofil ve makrofajların inflamasyon bölgesine çağrılmasına yardım eder. Treg hücreleri ise immun cevabı baskılayan anti- inflamatuvar sitokinler salgılar (Turner ve ark., 2014; Ray, 2016).

2.9. Akım Sitometri

Akım sitometri, hücre ve partiküllerin akmakta olan bir sıvının içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir (Güner, 2011). Bu teknik özellikle immün hücrelerin tanınması ve sayılması için önemli ve güçlü bir yöntemdir.

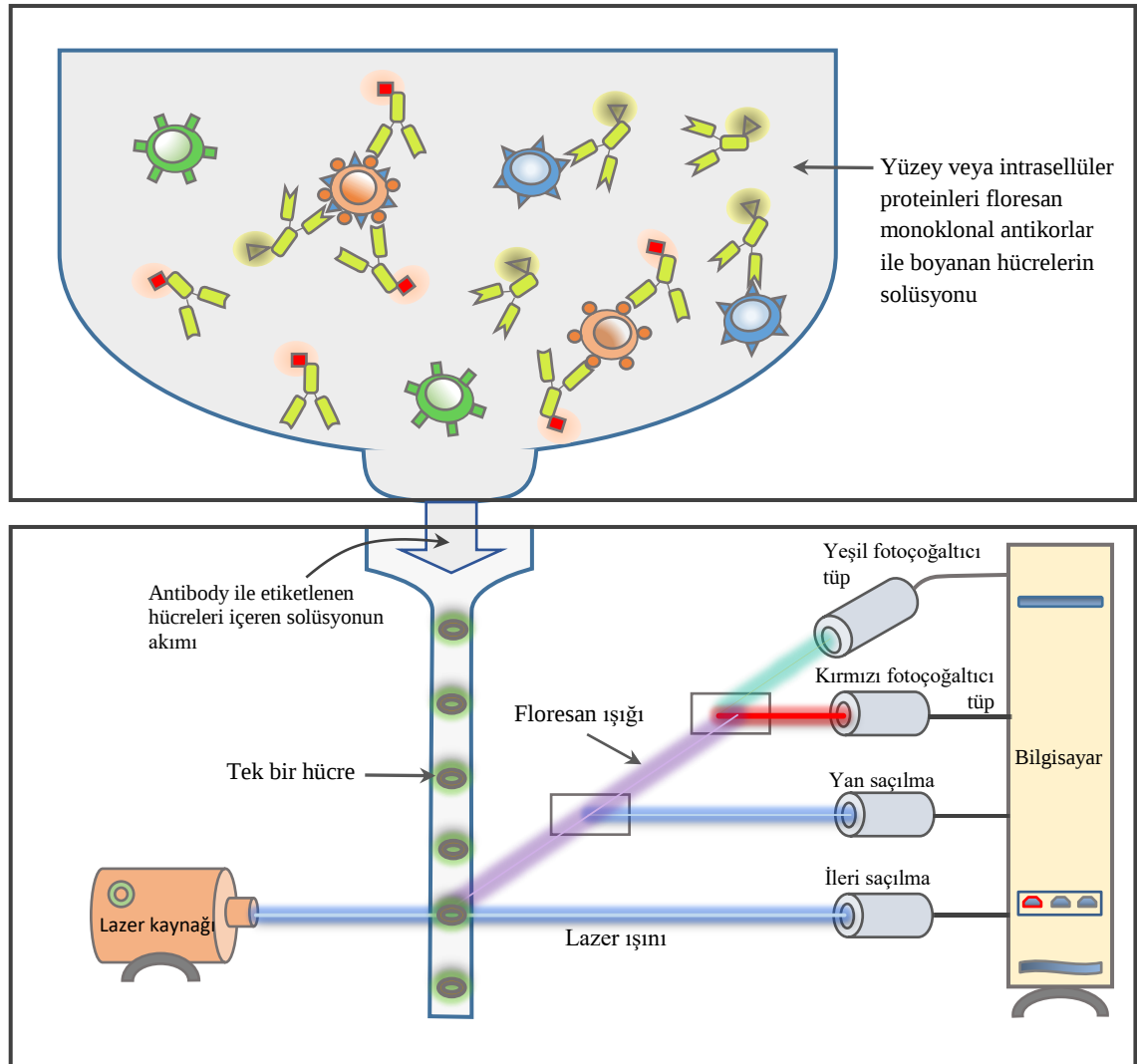
2.9.1. Akım Sitometri Spektrometresinin Çalışma Prensibi

Bu teknikte, bir süspansiyon içinde hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir. Bu esnada hücrelerin verdikleri sinyaller toplanarak bilgisayar yardımıyla analiz edilir (Şek. 2.6). Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi hücreye bağlanan çeşitli florokromlar olabilir (Güner, 2011).

Bu teknikte önce hücrelerin yüzey veya intrasellüler proteinlerinin monoklonal antikorlar yoluyla işaretlenerek tanınması gereklidir. Hücrenin yapılarına özel bu monoklonal antikorlar, ya fluoresan boyalarla eşleştirilerek ya da fluoressansla işaretlenmiş anti-immunoglobulin antikorları kullanılarak etiketlenir ve böylece tespit edilir. Etiketlenen hücre karışımı, kendisinden çok daha büyük bir hacimdeki salinde asılı tutularak küçük

bir nozzle'a kuvvetle yönlendirilir. Bu şekilde, hücre karışımı sıvının her biri bir hücre içeren damla şeklinde cihazda akışı sağlanır (Güner, 2011).

Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır ve sıvı içinde hücreler tek tek askıda durmalıdır. Ayrıca hücreleri içeren sıvı sürekli akarak lazer ışığı içinden geçmelidir. Bu şekildeki akışta her hücre lazer ışığından geçerken lazer ışığını kırarken hücreye bağlanan floresan boya ise lazer ışığı ile uyarılır yani ekstra enerji yüklenir ve sonuçta floresan yayar. Hassas fotoçoğaltıcı tüpler bu yayılan lazer ışığı ve floresan ışınımı hakkında bilgi toplar (Şek.2.6). Her bir hücre veya partikülün saptırdığı lazer ve yaydığı floresan ışık, optik filtreler ve aynalar ile dalga boylarına göre ayrılır ve analog sinyallere dönüştürülür. Lazer ışığı kırılımı hücrelerin büyüklüğü ve granülaritesi hakkında,



Şekil 2. 6. Akım sitometri spektrometresinin temsili çalışma prensibi.

fluoresan ışınım ise etiketlenen monoklonal antibodilerin hücrelere bağlanması yani her hücredeki hücre yüzeyi veya hücre içi proteini ifadesi hakkında bilgi verir (Güner, 2011).

Hücre veya partiküllerden alınan analog sinyaller cihaz içindeki bilgisayarca digitalleştirilerek histogramlar şeklinde cihazın ekranına sunulur. Bu histogramlar, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarını gösterir. Oluşturulan histogramlar, eğer hücreleri etiketlemek için sadece bir tip floresan- antikor kullanılmışsa floresan şiddeti ve hücre sayısının değişimini gösteren tek boyutlu histogram şeklindedir. Eğer birden fazla antikor her biri farklı bir floresan boya ile etiketlenerek çalışılmışsa, o zaman elde edilen bilgiler iki boyutlu dağılım diyagramı (two dimensional scatter diagram) veya kontur diagramı ile sunulur. Birden fazla antikorun araştırıldığı durumda önce bir antikorun etiketlediği hücre popülasyonu belirlenir, sonra bu popülasyonun ikinci bir antikor ile etiketlenen ikinci subpopülasyonu belirlenir. Daha fazla hücre popülasyonu belirlemek için bu işlemler tekrarlanır. Bu şekilde akım sitometri ile yüksek sayıdaki hücreler içerisinde farklı proteinler (hücrelerin yüzeyi veya içinde) taşıyan hücre gruplarının yüzdesi belirlenebilir (Güner, 2011).

2.9.2. Akım Sitometrinin Avantajları ve Dezavantajları

Akım sitometri hızlı, duyarlı ve doğruluk oranı yüksek bir tekniktir. Saniyede binlerce hücreyi tespit edecek potansiyele sahiptir. Epifloresan mikroskopisinde belirlenemeyecek düzeyde floresanı olan hücreler flow sitometrisi ile kolaylıkla belirlenebilir. Aynı tip hücrelerin belirlenmesinde floresan ölçümlerinin varyasyon sabiti %1 gibi küçük bir değerdir. Ayrıca istenirse bu teknikle örneklerdeki hücre grupları optik özelliklerine dayanılarak fiziksel olarak birbirinden ayrılabilir (Olson ve ark., 1989; Güner, 2011).

Yalnız bu teknik ileri yapısal detaylara dayanan incelemelerde yetersiz kalabilmektedir. Ayrıca akım sitometride, örnek boyutunun küçük olması da dezavantaj oluşturur. Birçok sitometre cihazı 0.5 ml'den düşük hacimleri ölçerken, gerçekte bir ml de 1000 hücre kadar az sayıda hücre bulunabilmektedir. Bu yüzden cihazı kullanırken örnek prekonsantrasyonu veya cihaz kalibrasyonu gerekmektedir (Olson ve ark., 1989; Güner, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Myastenia Gravis Hayvan Modellerinin Oluşturulması

Elli tane belli patojenler açısından temiz (SPF: Specific pathogen free) C57BL6 türünde Kobay firmasından alınan dişi fare, Erciyes Üniversitesi DEKAM ünitesinde 10 günlük karantina süresinden sonra sekiz haftalıkken deney sürecine dahil edildi. Fareler deney boyunca rutin chow diyet ile beslendiler.

Farelerin ilk kez immunizasyon işleminden sonra (0. Gün), 21. gün (üçüncü haftanın sonu) ikinci immunizasyonları ve 48. gün (7. Haftanın sonu) ise üçüncü immunizasyon enjeksiyonları gerçekleştirildi. Bu immunizasyonlarda AChR proteininin fosfat tampon (PBS) içindeki solüsyonu (0.3 mg/ml) ile komplet Freund's Adjuvanın (complete Freund's adjuvant: CFA) eşit hacimlerinin karıştırılması ile elde edilen emülsiyonu kullanıldı. Bu emülsiyon, bir stopcock ve 5 ml lik enjektörler kullanılarak oluşturuldu. Farelerin 40 tanesi, subkutan (sc) olarak dört farklı noktadan (inguinal ve yan alt yan bölgelerinde sağdan ve soldan) enjeksiyon başına 50 µl olacak şekilde toplamda 200 µl yukarıdaki emülsiyon ile immunize edildi. Böylece her fareye her immunizasyonda toplam 30 µg AChR proteini verilmiş oldu. Kontrol grubu olarak kullanılan 10 farede ise, içinde AChR proteini olmayan CFA-PBS emülsiyonu ile immunize edilen farelere benzer, aynı hacimlerde sc enjeksiyonlar gerçekleştirildi.

Deneyin 50. gününde, AChR protein ile immunize olan farelerin 21 tanesine teriflunamid 10 mg/kg dozunda PBS içinde solubulize edilerek günlük olarak intraperitoneal olarak yapılmaya başlandı. Enjeksiyon solüsyonunu elde etmek için, 14 mg teriflunamid (Aubagio 14 mg tablet-Exelon firması) 7 ml PBS içinde çözdürüldü ve sonuç olarak her

bir fareye yaklaşık 0.1 ml hacimde solüsyon enjekte edildi. AChR proteini ile myastenia gravis modeli oluşturulmuş farelerin 19'u ve kontrol grubundaki farelere aynı hacimde PBS enjeksiyonu yapıldı. Çalışmada kullanılan tüm hayvanlar 84. günde (12. haftanın sonu) servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

Çalışmamızda E. Coli'de ifade edilen Chinapeptides şirketinden satın aldığımız Torpedo californica AChR proteini kullanıldı. Sentezlenen proteinin dizilimi şu şekildeydi: SEHETRLVAN LLENYNKVIR PVEHHTHFVD ITVGLQLIQL ISVDEVNQIV ETNVRLRQQW IDVRLRWNP A DYGGIKKIRL PSDDVWLPDL VLYNNADGDF AIVHMTKLLL DYTGKIMWTP PAIFKSYCEI IVTHFPFDQQ NCTMKLGIWT YDGTKVSISP ESDRPDLSTF MESGEWVMKD YRGWKHWVYY TCCPDTPY LD ITYHFIMQRI.

3.2. Myastenia Gravis Yönünden Yapılan Klinik Değerlendirmeler

Deneyin başlamasıyla birlikte farelerin klinik değerlendirmesi Erciyes Üniversitesi DEKAM biriminde düzenli olarak gerçekleştirildi. Farelerin ağırlıkları ve genel durumları her gün değerlendirildi. Myastenia gravis hastalığı yönünden kuvvet değerlendirmeleri, deneyin başlamasından sonra ikinci doz AChR immunizasyonuna kadar üç günde bir, ikinci doz immunizasyondan deney sonlanmasına kadar ise günlük olarak yapıldı ve elde edilen sonuçlar not edildi. Bu kuvvet değerlendirmelerine ek olarak haftalık yapılan ters çevrilmiş ızgara testi ve egzersiz sonrası yapılan ters çevrilmiş ızgara testi birlikte değerlendirilerek farelerde haftalık klinik evre skorlaması yapıldı ve not edildi. Haftalık klinik derecelendirme skoru, hafta boyunca farelerin gidişatı göz önünde bulundurularak haftanın sonundaki durum olarak ele alındı.

Her bir çalışma grubunda, hayvanların klinik değerlendirmeleri, hastalık insidansı, hastalık klinik skoru ve ağırlıklarının başlangıçta tartılan ağırlıklarına olan yüzde oranı şeklinde parametrelerle ifade edildi ve grupların karşılaştırmaları bu parametreler kullanılarak yapıldı.

Farelerin klinik skorları değerlendirilirken aşağıdaki testler ve derecelendirmeler kullanıldı:

- **Myastenia gravis hastalığı klinik derecelendirme (klinik kas zaafı skoru):**

MG hastalık modeli farelerindeki klinik kas zaafı istirahat halinde ve egzersiz sonrasındaki gözlemler ve muayene ile şu şekilde derecelendirildi (Tüzün, 2017):

Evre 0: Fare normal duruş, kas gücü ve harekete sahiptir.

Evre 1: Dinlenme durumunda fare normaldir, 25 kez baş aşağı şekilde sarkıtılırken kafes kapağı ızgarasına pati ile tutunma egzersizi sonrasında kambur postür, kısıtlı hareket ve başını kaldırmada zorlanma gibi kas zaafının karakteristik özelliklerini gösterir.

Evre 2: Fare egzersiz yapmadan düz zeminde yapılan gözlemlerde evre 1 belirtilerini gösterir.

Evre 3: Fare evre 2'nin kas zayıflığı belirtileri yanında susuz ve can çekişir durumdadır.

Evre 4: Ölüm.

Bu evrelendirme sistemine göre, klinik skorları belirlemek üzere farelerde yaptırılacak egzersiz, yukarıda da belirtildiği üzere 25 kez farelerin baş aşağı şekilde sarkıtılıp kafes kapağı ızgarasına pati ile tutunmaları şeklindeydi. Bu egzersizin ardından farelerin duruş, hareket ve yürüyüşlerinin değerlendirilmesi yapılarak klinik derecelerine karar verildi.

Ayrıca farelerin çok belirgin olmayan kas zaafılarını değerlendirmek üzere ve şüpheli durumlarda aşağıdaki testler kullanıldı:

- i) **Egzersiz sonrası tutma gücü (ön ayakla) testi:**

Farelerin bir kafes ızgarasını arka arkaya (5-10 s sürelerle) 20 defa ön ayaklarıyla tutmaları tekrarlatılacaktır. Bu arada etkin düzeyde güç sarfetmeleri kuyruklarından orta seviyede ve stabil olarak çekmek suretiyle sağlandı.

Yirmi defa yapılan tutunmanın ardından yaptırılan tutunmadaki güçleri belirgin azalan veya tutunamayan farelerde yorulmayla güç kaybı olduğu sonucuna varıldı (Kusner, 2018).

ii) Ters çevrilmiş ızgara testi:

Fare ızgaranın ortasına alındıktan sonra ızgara ters çevrildi ve 30- 50 cm yüksekte tutuldu. Yaralanma olasılığına karşı alta yumuşak bir zemin malzemesi yerleştirildi. Fare baş aşağı biçimde ızgaraya dört ayağıyla tutunurken tutunma süresi değerlendirildi (Kusner, 2018).

iii) Egzersiz sonrası ters çevrilmiş ızgara testi:

Hayvanlar kafes ızgarasında 40-50 kere kuyruklarından çekilerek egzersiz yaptırıldı. Egzersizden sonra dinlenme olmadan ızgara ters çevrilerek yüksekte (yaralanma olasılığına karşı alta yumuşak bir zemin malzemesi yerleştirilerek) farelerin yer çekimine karşı ızgaraya tutunarak durmaları gözlemlendi. Eşik değer olan 5 dakika süresince bu şekilde duramayan ve teste uyumundan şüphelenilen farelerde 10 dakika dinlenme periyodundan sonra değerlendirme tekrarlandı. Bu testle, farelerin egzersiz sonrası tüm bacaklarıyla tutunarak baş aşağıda yüksekte durma süreleri belirlendi (Tüzün, 2017).

Sonuçta tüm yapılan testler göz önünde bulundurularak, egzersiz olmadan gözlenen kuvvet kayıpları evre 2 olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmeyi yaparken farenin düz zemindeki hareketleri, tutunması ve ters çevrilmiş ızgara testinde gösterdiği performans göz önünde tutuldu.

Egzersiz olmadan normal kuvvet gösteren farelerde, egzersiz sonrası düz zemindeki hareketlerinde kambur postür, kısıtlı hareket ve başını kaldırmada zorlanma gibi kas zaafı belirtileri gösterenler veya egzersiz sonrası tutunma testinde kas güçsüzlüğü veya egzersiz sonrası ters çevrilmiş ızgara testinde performans düşüklüğü gösteren fareler klinik olarak evre 1 olarak değerlendirildi.

Hastalık insidansı değerlendirmelerinde, farelerin myastenik olarak değerlendirilmesi için en az evre 1 klinik skorunda olması koşulu arandı. Bir başka deyişle, evre 1 ve üzerinde kas zaafı gösteren fareler myastenik olarak kabul edilip hastalık insidansı belirlenmesinde kullanıldı.

3.3. Akım Sitometri ile Dalak, Lenf Nodu ve Timusta İmmün Hücre ve Sitokinlerin Değerlendirilmesi

Erciyes Üniversitesi DEKAM biriminde, sakrifiye edilen tüm fareler (n:50) düz bir zemine sabitlendikten sonra hepsinin karın bölgesinden kesi açılarak bilateral inguinal lenf nodları ile dalakları ve göğüs bölgesinden kesi yapılarak 27 tanesinin (12 MG+TF, 8 MG, 9 sağlıklı kontrol grubundan) timusları alındı. Elde edilen dokular fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu içeren buzda bekletilen ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra lenf nodu, dalak ve timus dokuları, BD falcon Cell Strainer (70 µm) ve bir insülün enjektörünün pistonu yardımıyla 1 ml PBS içinde tek hücrelere ayrıldı.

Deneyin bundan sonraki aşamaları, Erciyes Üniversitesi GENKÖK biriminde gerçekleştirildi. Dalaktan alınan hücrelerin kırmızı kan hücrelerinden ayrılması için hücreler, 300 g'de 7 dakika santrifüj edildikten sonra içine ACK lysis buffer (Red Cell Lysis solüsyonu) eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip ardından PBS ile yıkandı. Daha sonra tüm hücrelerin dalaktan elde edilenleri 2 ml, timustan elde edilenleri 1 ml, lenf nodundan elde edilenleri ise 500 µl komple media içerisine konularak çözündürüldü. Yapılacak stimülasyon, boyamalar ve hücre sayımları için bu hücrelerden dalak için 100 µl ve lenf nodlarında 100 µl, timusta 50 µl alınarak 96 kuyulu tabla kuyucuklarına konuldu ve sonrasında akım sitometri için gerekli yüzey ve intrasellüler boyama işlemlerine devam edildi.

Dalak ve lenf nodlarına ait hücrelerin 100 µl'si B lenfosit yüzey boyaması için ayrıldı. Timus hücrelerinin yarısı CD4+, diğer yarısı ise CD8+ yüzey boyamaları için ayrıldı. Dalak ve lenf nodundan alınan CD4+ ve CD8+ yüzey boyaması yapılacak hücrelere ayrıca sitokin değerlendirmesi için daha sonra intrasellüler boyama da yapılacağı için önce bu hücreler stimüle edildi. Uyarımlar için 96-kuyulu tabak içerisinde son hacim 200 µl olacak şekilde hücreler, komple medyumda, 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, 79346), 1µl/ml Ionomycin (Sigma, I3909, 1 µg/ml) ve Golgi Plug (BD, 1µL/mL) varlığında 4 saat 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Sitokin değerlendirmesi yapmadığımız için timus hücrelerine stimülasyon uygulanmadı.

Daha sonra hücreler 4°C de, 3 dakika 400 g de santrifüj edildi. Buz üzerine alınan kültür tablasındaki örnekler, 5 dk 1µg/ml Fc-blok ile muamele edilerek Fc reseptörleri bloke

edildi, ardından içine yüzey antikorları eklenen boyama bufferı (2% Fetal Bovine Serum-FBS içeren PBS) kullanılarak 20 dakikada yüzey boyaması gerçekleştirildi.

Sonrasında intrasellüler boyamalar için hücreler iki defa 400 g'de üç dakika santrifüj edildi ve Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization Kit'indeki (BD 554715) malzemeler kullanılarak fiksasyon ve permeabilizasyon işlemleri yapıldı. Bu amaçla, hücreler boyama bufferı ile (%2 FBS 1XPBS) iki defa yıkanıp 100 µl Fix/Perm Buffer içinde çözüldü ve karanlıkta 20 dakika +4 °C'de bekletilerek fikse edildi. Ardından hücreler 400 g'de 3 dakika santrifüj edilip seyreltilmiş (1:10 oranında) intrasellüler boyama Perm Wash Buffer ile permeabilize edildi ve bu işlem iki kez tekrarlandı.

Daha sonra hücrelere 100 µl Perm buffer içinde seyreltilen intrasellüler boyama antikorları eklenerek karanlıkta 30 dakika +4 °C'de boyama işlemi gerçekleştirildi. Böylece intrasellüler boyama gerçekleştirilecek hücrelere önce yüzeyel, sonrasında da intrasellüler boyama yapılmış oldu. B hücre ve timus değerlendirmelerinde ise sadece yüzeyel boyama gerçekleştirildi.

Yüzeyel boyalar için Biolegend firmasından FITC anti-mouse CD4 #100405, PE anti-mouse CD138 (Syndecan-1) #142503, FITC anti-mouse CD19 #152403, FITC anti-mouse CD8a #100705, Pacific Blue™ anti-mouse CD3ε #100333, APC anti-mouse CD154 (CD40L) #106509; intrasellüler boyamalar içinse yine Biolegend firmasından PE/Cy7 anti-mouse IFN-γ #505825, PerCP/Cy5.5 anti-mouse IL-22 #516411, PerCP/Cy5.5 anti-mouse IL-17A #506919, PE/Cy7 anti-mouse IL-10 #505025, PE anti-mouse GM-CSF #505405, APC/Cy7 anti-mouse TNF-α #506343, PE anti-mouse IL-2 #503807, APC/Cy7 anti-mouse Ig light chain κ #409503, APC anti-mouse Ig light chain λ #407306 kitleri kullanıldı.

Boyamaların ardından hücreler, iki kez boyama bufferı ile yıkanıp akım sitometri cihazında (BD FACSARIAIII) analiz edildi. Akım sitometri sonuç grafikleri Ek 1'de verilmiştir.

3.4. ELISA (Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay) Yöntemiyle Serum Anti-AChR Antikorlarının Değerlendirilmesi

Hasta farelerden -1 (AChR proteini ile immunizasyonundan bir gün önce), 49. gün, 84. gün, sağlıklı kontrol farelerinden ise -1 ve 84. günde fasial venlerinden alınan kan, 6000

g de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum -80°C 'de muhafaza edildi. Test günü oda sıcaklığına getirilen serumlarda ELISA yöntemiyle anti-AChR IgG, IgG2b, Ig G3 ve Ig M antikorları ölçüldü (Yılmaz ve ark., 2020). ELISA tablasında, antikor ölçümleri için kuyucuk başına 0.5 gr AChR proteini düşecek ve her bir kuyuda total hacim 50 μL olacak şekilde AChR protein, kaplama solüsyonu içinde (karbonat bikarbonat solusyonu, pH: 8.6) içinde kuyucuklara konarak antijenle kaplama işlemi yapıldı, ardından tabla gece boyu $+4^{\circ}\text{C}$ de inkubasyona bırakıldı. Ertesi gün tabla, % 0.05 lik Tween 20-PBS solusyonu ile üç kez birer dakika yıkandıktan sonra her bir kuyuda total hacim 50 μL olacak şekilde PBS içinde %2 'fetal bovine serum' (FBS-PBS) solüsyonu ile bir saat bloklandı. Bir kez Tween-solüsyonu ile yıkamanın ardından 1:1000 oranında sulandırılmış fare serumları her bir kuyuya 50 μL olarak konuldu ve oda sıcaklığında iki saat bekletildi. Tween-PBS solusyonu ile üç kez birer dakikalık yıkamadan sonra antikor ölçümleri için 1:5000 oranında bloklama solusyonu ile dilüe edilen Horse radish peroxidase (HRP)- konjuge sekonder antikorlar (Keçi anti-fare IgG1, IgG2b, IgG3, IgM; bütün antikorlar Southern Biotech firmasından alındı) her bir kuyuya 50 μL olacak şekilde konuldu ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tabla, Tween-PBS solusyonu ile üç kez birer dakika yıkandı ve ardından HRP enziminin substratı olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) (BioLegend: TMB Substrate #42110) her kuyuya 50 μL olacak şekilde konuldu. Onbeş dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra reaksiyonu durdurma solusyonu olarak her bir kuyuya 50 μL olarak 1M HCl konuldu. Hemen ardından ELISA okuma işlemi 450 nm'de Promega GloMax Multi Reader cihazında gerçekleştirildi.

3.5. İstatistiki Değerlendirme

İstatistik analizleri, SPSS-15 ve GraphPad Prism-6 programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üç bağımsız grubun birbiriyle karşılaştırıldığı klinik değerlendirmeler (hastalık insidansı, ortalama MG skoru, başlangıca göre vücut ağırlığı yüzdesi), akım sitometrisi sonuçları ve ELISA ile çalışılan immunoglobulin sonuçları, parametrik koşullar sağlandığında ANOVA testi, parametrik şartlar sağlanmadığında ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiştir. Post-hoc analizler için, parametrik koşullarda Tukey testi, parametrik olmayan durumlarda ise Dunn multipl karşılaştırma testi kullanılmıştır.

Hasta fare gruplarının yedinci hafta ve 12. hafta immunoglobulin sonuçlarının, bir farenin iki değerinin birlikte incelemeye alınarak bağımlı olarak değerlendirilmesinde ise parametrik koşullar sağlandığı için, bağımlı t testi kullanılmıştır. $p \leq 0.05$ değerler anlamlı kabul edilmiştir. Sonuç grafiklerinde;

*: $p \leq 0.05$,

** : $p \leq 0.01$,

***: $p \leq 0.005$,

****: $p \leq 0.001$ 'i ifade etmektedir.

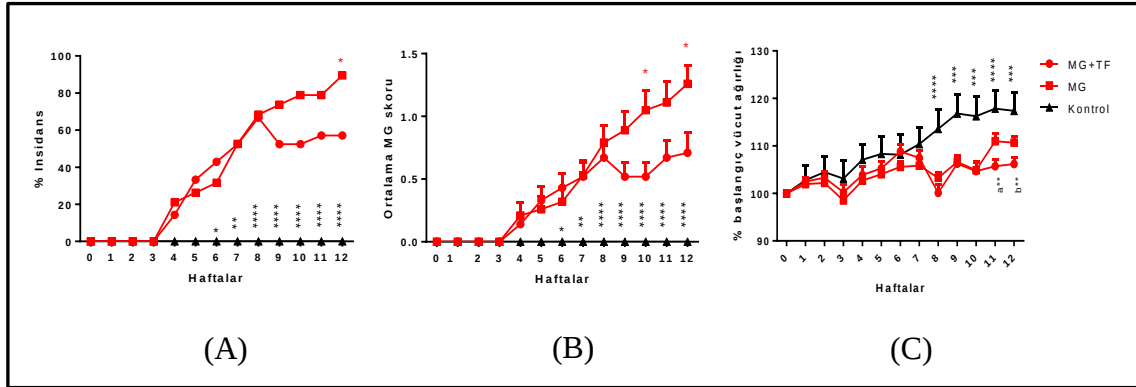
4. BULGULAR

4.1. Teriflunamid Kullanımının Farelerin Klinik Durumuna Etkileri

Myastenik farelerin ilaç alan ve almayan grupları ile sağlıklı farelerin haftalık olarak klinik bulguları istatistiksel olarak (tüm grupların toplu karşılaştırılması ve ardından her bir grubun birbiriyle karşılaştırmasını yapan posthoc analizler ile) karşılaştırıldığında, gruplar arası farklılığın hastalık gelişimi (insidansı) yüzdesi yönünden (Şekil 4.1A) ve ortalama MG hastalık skoru yönünden (Şekil 4.1B) altıncı haftadan itibaren başladığı bulunmuştur. Hasta gruplar ile sağlıklı kontrol fareleri arasında bu haftalardan başlayarak anlamlı farklılıklar meydana gelmiştir. AChR proteini yerine sadece adjuvant madde (Freund's adjuvant) enjeksiyonu yapılan farelerde (sağlıklı kontrol grubu) hastalık görülmezken, AChR proteini sc enjeksiyonu yapılan farelerde MG hastalığı gelişmiştir. Başlangıca göre vücut ağırlığı yüzdesi yönünden ise hasta gruplar ile sağlıklı kontrol fareleri arasında sekizinci haftadan anlamlı farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Yapılan detaylı analizde (posthoc testler) bu farklılığın, hasta farelerin sağlıklı kontrol farelerine göre sekizinci haftadan itibaren daha düşük orana sahip olması şeklinde gerçekleştiği anlaşılmıştır.

Yapılan detaylı analizin (posthoc testler) ilaç alan ve almayan fareler arasındaki karşılaştırmaları gözden geçirildiğinde, ilaç alan ve almayan hasta farelerin arasında onikinci haftada insidans yönünden, on ve onikinci haftalarda ortalama MG skoru yönünden anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu farklılık ilaç almayan gruba, ilaç alan gruba göre daha yüksek bir insidans ve daha yüksek bir MG klinik skoru şeklindedir (Şekil 4.1A, 4.1B).

Vücut ağırlığı yönünden ilaç alan ve almayan hasta grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Yalnız onuncu haftadan başlayarak ilaç alan grubun sağlıklı gruba göre ağırlığında anlamlı olarak daha az oranda bir artma görülürken ($p<0.01$), ilaç almayan grupta sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturan bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.1C).



Şekil 4. 1. İlaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) gruplarının klinik durumları: Toplu karşılaştırmalara ait istatistiksel önemlilik değerleri siyah yıldızlarla, ilaç alan ve ilaç almayan hasta farelerin post hoc testlerdeki karşılaştırmalarının istatistiksel önemlilik değerleri kırmızı yıldızlarla gösterilmiştir. (A) Üç çalışma grubunun hastalık insidans yüzdeleri ortalamaları yönünden karşılaştırılması, (B) Üç çalışma grubunun ortalama MG hastalık skoru±SEM lerinin birbirleriyle karşılaştırılması, (C) Üç çalışma grubunun son ölçülen ağırlıklarının, deney başlangıcındaki vücut ağırlıklarına oran yüzdelерinin ortalama±SEM lerinin birbirleriyle karşılaştırılması.

*: Siyah yıldızlar: Kontrol grubu hasta gruplardan anlamlı farklı

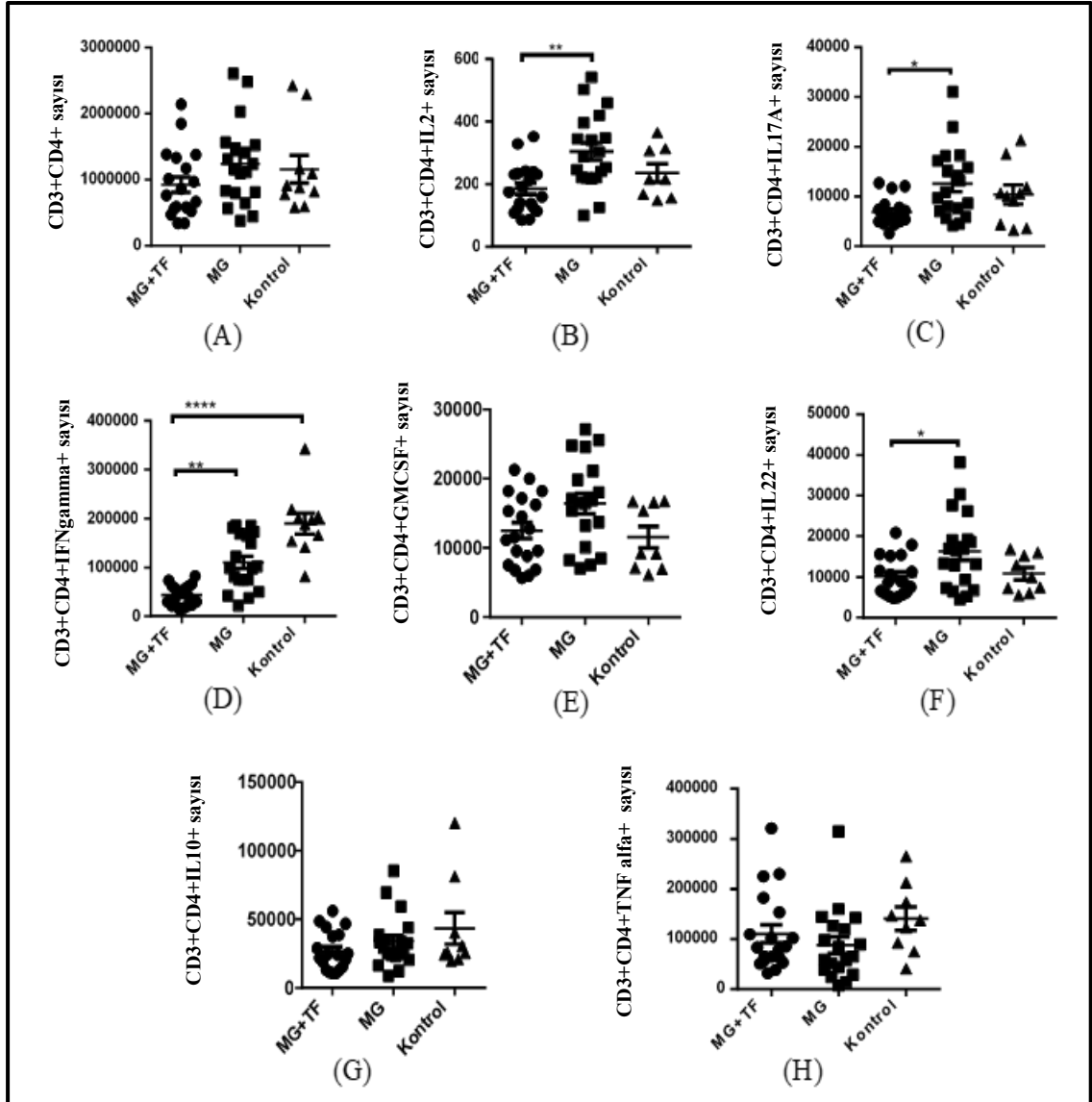
*: Kırmızı yıldızlar: MG+TF ile MG grubu birbirinden anlamlı farklı

a* ve b*: MG+TF ile sağlıklı kontrol grubu birbirinden anlamlı farklı

4.2. Teriflunamid Kullanımının Toplam T Hücre ve Tiplerinin Sayılarına Etkileri

Dalak dokusu hücrelerinde, CD3+CD4+ (T helper) (Şekil 4.2A), CD3+CD4+IL2+ (IL2 salgılayan T helper, (Şekil 4.2B), CD3+CD4+IL17A+ (IL17A salgılayan T helper), (Şekil 4.2C), CD3+CD4+IFN-gamma+ (IFN-gamma salgılayan T helper) (Şekil 4.2D), CD3+CD4+GM-CSF+ (GM-CSF salgılayan T helper) (Şekil 4.2E), CD3+CD4+IL22+ (IL22 salgılayan T helper) (Şekil 4.2F), CD3+CD4+IL10+ (IL10 salgılayan T helper), (Şekil 4.2G), CD3+CD4+TNF-alfa+ (TNF-alfa salgılayan T helper) (Şekil 4.2H) T helper hücreleri sayıları yönünden, teriflunamid alan (TG+MG) ve almayan hasta (MG) fareler ile sağlıklı kontrol grubunun birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırma değerlendirmelerinde:

- CD3+CD4+IL2+ (Şekil 4.2B), CD3+CD4+IL17A+ (Şekil 4.2C), CD3+CD4+IFN-gamma+ (Şekil 4.2D), CD3+CD4+IL22+ (Şekil 4.2F), T helper hücre sayıları yönünden ilaç alan ve almayan hasta fare grupları arasında anlamlı farklılık olduğu saptandı. İlaç alan gruplarda ilaç almayan gruplara göre bu tip T helper hücre sayılarının istatistiki olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu



Şekil 4. 2. Dalak dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) grupları toplam T helper (T4) ve sitokin salgılayan T helper hücre sayılarının ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması. (A) CD3+CD4+ hücre (T helper), (B) CD3+CD4+IL2+ hücre (IL2 salgılayan T helper), (C) CD3+CD4+IL17A+ hücre (IL17A salgılayan T helper), (D) CD3+CD4+IFN-gamma+ hücre (IFN-gamma salgılayan T helper), (E) CD3+CD4+GM-CSF+ hücre (GM-CSF salgılayan T helper), (F) CD3+CD4+IL22+ hücre (IL22 salgılayan T helper), (G) CD3+CD4+IL10+ hücre (IL 10 salgılayan T helper), (H) CD3+CD4+TNF-alfa+ hücre (TNF-alfa salgılayan T helper)

bulundu (CD3+CD4+IL17A+, CD3+CD4+IL22+ için $p < 0.05$; CD3+CD4+IL2+, CD3+CD4+IFN-gamma+ için $p < 0.01$).

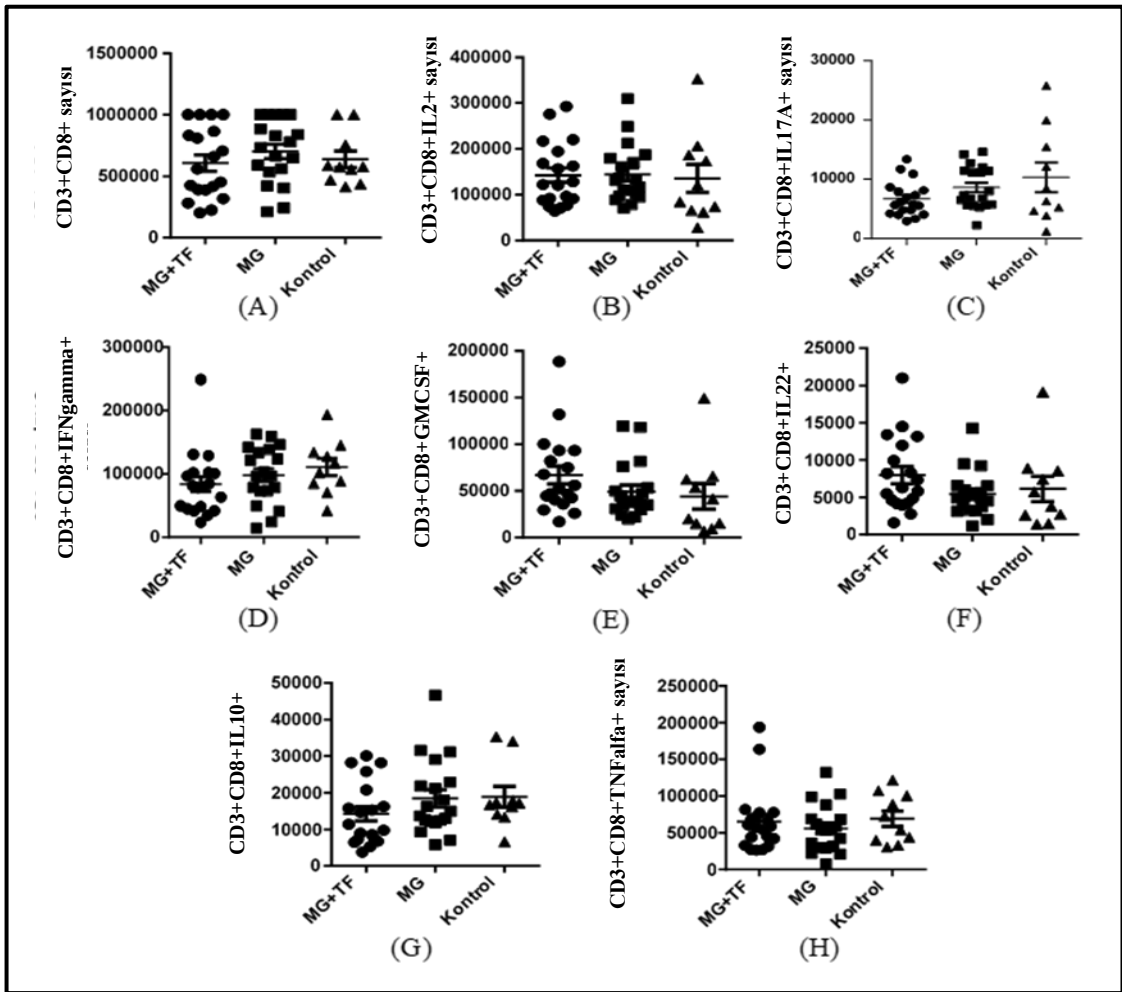
- Ayrıca CD3+CD4+IFN-gamma+ T helper hücre sayısı yönünden kontrol grubunun (Kontrol), teriflunamid alan hasta gruptan (MG+TF) anlamlı düzeyde yüksek değere sahip olduğu belirlendi ($p < 0.001$) (Şekil 4.2D) .

Dalak dokusu hücrelerinde, CD3+CD8+ (T sitotoksik) (Şekil 4.3A) CD3+CD8+IL2+ (IL2 salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.3B), CD3+CD8+IL17A+ (IL17A salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.3C), CD3+CD8+IFN-gamma+ (IFN-gamma salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.3D), CD3+CD8+GM-CSF+ (GM-CSF salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.3E), CD3+CD8+IL22+ (IL22 salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.3F), CD3+CD8+IL10+ (IL10 salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.3G), CD3+CD8+TNF-alfa+ (TNF-alfa salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.3H) T helper hücreleri sayıları yönünden, teriflunamid alan (TG+MG) ve almayan hasta (MG) fareler ile sağlıklı kontrol gruplarının birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırma değerlendirmelerinde:

- Teriflunamid alan (MG+TF) ve almayan hasta fare (MG) grupları ile sağlıklı kontrol grubunun (Kontrol) birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırma değerlendirmelerinde anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0.05$) (Şekil 4.3).

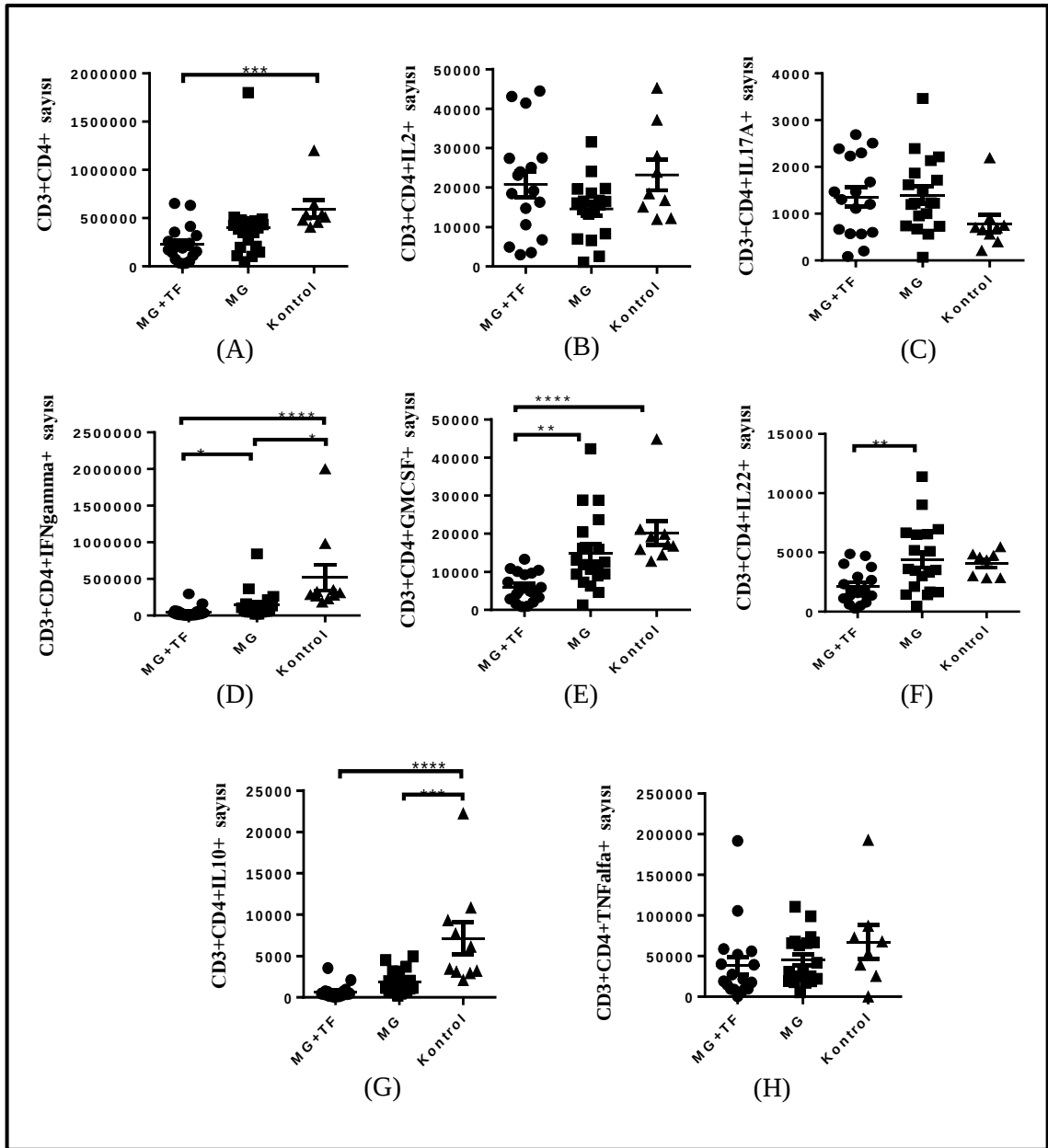
Lenf nodu dokusu hücrelerinde, CD3+CD4+ (T helper) (Şekil 4.4A), CD3+CD4+IL2+ (IL2 salgılayan T helper) (Şekil 4.4B), CD3+CD4+IL17A+ (IL17 salgılayan T helper) (Şekil 4.4C), CD3+CD4+IFN-gamma+ (IFN-gamma salgılayan T helper) (Şekil 4.4D), CD3+CD4+GM-CSF+ (GM-CSF salgılayan T helper) (Şekil 4.4E), CD3+CD4+IL22+ (IL22 salgılayan T helper) (Şekil 4.4F), CD3+CD4+IL10+ (IL10 salgılayan T helper) (Şekil 4.4G), CD3+CD4+TNF-alfa+ (TNF-alfa salgılayan T helper) (Şekil 4.4H), T helper hücreleri sayıları yönünden, teriflunamid alan (TG+MG) ve almayan hasta fareler (MG) ile sağlıklı kontrol grubunun birbirleriyle yapılan istatistiksel karşılaştırma değerlendirmelerinde:

- İlaç alan ve almayan hasta fare grupları arasında CD3+CD4+IFN-gamma+ (Şekil 4.4D), CD3+CD4+GM-CSF+ (Şekil 4.4E), CD3+CD4+IL22+ (Şekil 4.4F) T



Şekil 4. 3. Dalak dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) grupları toplam sitotoksik T (T8) ve sitokin salgılayan sitotoksik T hücre sayılarının ortalama±SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması. (A) CD3+CD8+ hücre (T sitotoksik), (B) CD3+CD8+IL2+ hücre (IL2 salgılayan T sitotoksik), (C) CD3+CD8+IL17A+ hücre (IL17A salgılayan T sitotoksik), (D) CD3+CD8+IFN-gamma+ hücre (IFN-gamma salgılayan T sitotoksik), (E) CD3+CD8+GM-CSF+ hücre (GM-CSF salgılayan T sitotoksik), (F) CD3+CD8+IL22+ hücre (IL22 salgılayan T sitotoksik), (G) CD3+CD8+IL10+ hücre (IL 10 salgılayan T sitotoksik), (H) CD3+CD8+TNF-alfa+ hücre (TNF-alfa salgılayan T sitotoksik)

helper hücre sayıları yönünden anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır. İlaç alan gruplarda ilaç almayan gruplara göre bu tip T helper hücre sayılarının istatistiki olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu bulundu (CD3+CD4+IFN-gamma+ için $p < 0.05$, CD3+CD4+GM-CSF+, CD3+CD4+IL22+ için $p < 0.01$) (Şekil 4.4D, 4.4E, 4.4F).



Şekil 4. 4. Lenf nodu dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) grupları toplam T helper (T4) ve sitokin salgılayan T helper hücre sayılarının ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması. (A) CD3+CD4+ hücre (T helper), (B) CD3+CD4+IL2+ hücre (IL2 salgılayan T helper), (C) CD3+CD4+IL17A+ hücre (IL17A salgılayan T helper), (D) CD3+CD4+IFN-gamma+ hücre (IFN-gamma salgılayan T helper), (E) CD3+CD4+GM-CSF+ hücre (GM-CSF salgılayan T helper), (F) CD3+CD4+IL22+ hücre (IL22 salgılayan T helper), (G) CD3+CD4+IL10+ hücre (IL 10 salgılayan T helper), (H) CD3+CD4+TNF-alfa+ hücre (TNF-alfa salgılayan T helper)

- Kontrol grubunun (Kontrol), CD3+CD4+IFN-gamma+ (Şekil 4.4D) ve CD3+CD4+IL10+ (Şekil 4.4G) T helper hücre sayıları yönünden diğer iki gruptan

anlamli farklılık gösterdiği bulundu. Bu farklılığın teriflunamid alan hasta gruptan (MG+TF) (her iki değerlendirme için $p<0.001$) ve teriflunamid almayan hasta gruptan (MG) anlamli düzeyde (IFN-gamma için $p<0.05$, IL-10 için $p<0.005$) yüksek değere sahip olma şeklinde olduğu belirlendi. (Şekil 4.4D ve 4.4G).

- Ayrıca istatistiki olarak kontrol grubunun ilaç alan hasta gruptan daha fazla CD3+CD4+ (Şekil 4.4A) ve CD3+CD4+GM-CSF+ (Şekil 4.4E) helper T hücrelerine sahip olduğu saptandı. Bu farklılığın anlamlilik düzeyi CD3+CD4+ için $p<0.005$, CD3+CD4+GM-CSF+ için $p<0.001$ şeklindeydi. (Şekil 4.4A ve 4.4E)

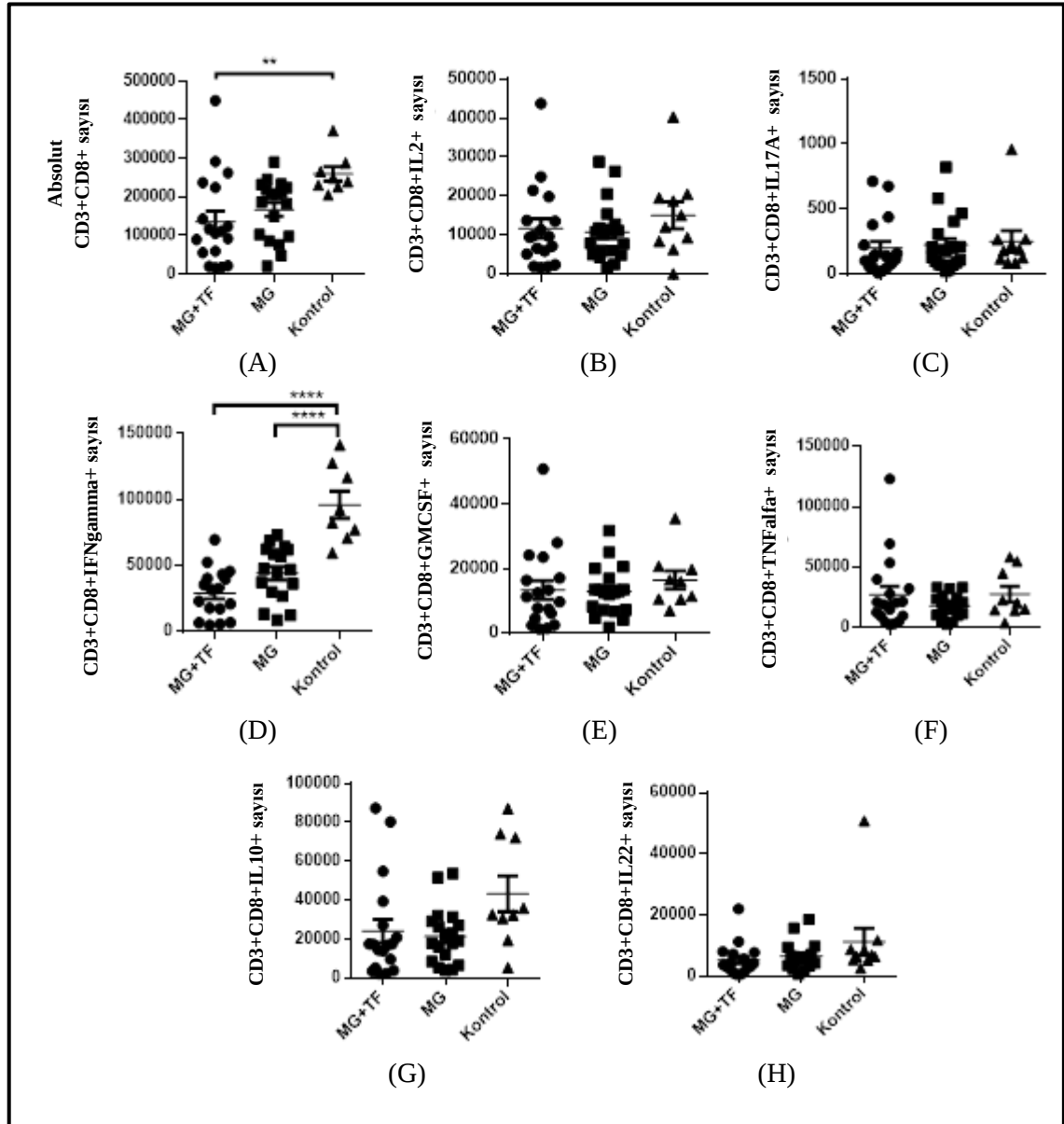
Lenf nodu dokusu hücrelerinde, CD3+CD8+ (T sitotoksik) (Şekil 4.5A), CD3+CD8+IL2+ (IL2 salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.5B), CD3+CD8+IL17A+ (IL17A salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.5C), CD3+CD8+IFN-gamma+ (IFN-gamma salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.5D), CD3+CD8+GM-CSF+ (GM-CSF salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.5E), CD3+CD8+IL22+ (IL22 salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.5F), CD3+CD8+IL10+ (IL10 salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.5G), CD3+CD8+TNF-alfa+ (TNF-alfa salgılayan T sitotoksik) (Şekil 4.5H) sitotoksik T hücreleri sayıları yönünden, teriflunamid alan (MG+TF) ve almayan hasta fareler (MG) ile sağlıklı kontrol grubunu (Kontrol) birbirleriyle karşılaştıran istatistiksel değerlendirmelerde;

- CD3+CD8+IL2+ (Şekil 4.5B), CD3+CD8+GM-CSF+ (Şekil 4.5E),
- Teriflunamid alan hasta fare grubu CD3+CD8+ sitotoksik T hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamli olarak daha düşük olduğu bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.5A).
- Kontrol grubu CD3+CD8+IFN-gamma+ sitotoksik T hücre sayısının diğer iki gruptan anlamli düzeyde yüksek olduğu (her iki karşılaştırma için $p<0.001$) saptandı (Şekil 4.5D).
- CD3+CD8+IL22+ (Şekil 4.5F), CD3+CD8+IL10+ (Şekil 4.5G), CD3+CD8+TNF-alfa+ (Şekil 4.5H) sitotoksik T hücre sayıları yönünden gruplar arasında anlamli bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Timus dokusunda total timosit (Şekil 4.6A), CD3+ (lenfosit) (Şekil 4.6B), CD4+ T hücre (Şekil 4.6C), CD3+CD4+ (T helper) (Şekil 4.6D), CD3+CD4+CD40L+ (CD40L+ T helper) (Şekil 4.6E), CD8+ (CD8+ T hücre) (Şekil 4.6F), CD3+CD8+ (T sitotoksik) (Şekil 4.6G), CD3+CD8+CD40L+ (CD40L+ sitotoksik T hücre) (Şekil 4.6H) T hücre

sayıları yönünden, teriflunamid alan (TG+MG) ve almayan fareler (MG) ile sağlıklı kontrol gruplarının birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırmalarında;

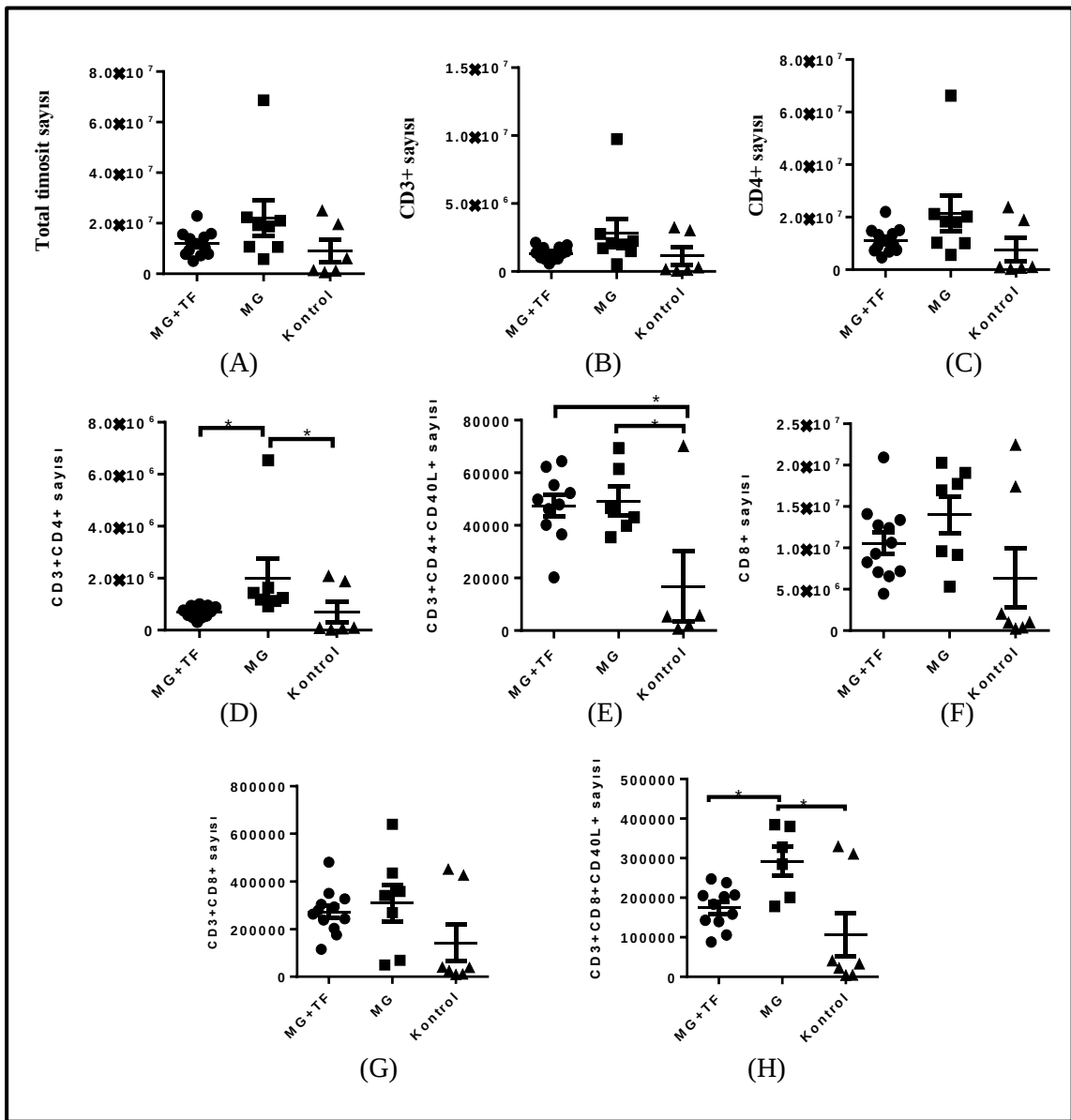
- İlaç almayan hasta fare grubu CD3+CD4+ ve CD3+CD8+CD40L+ hücre sayılarının diğer iki gruptan (ilaç alan hasta fare grubu ile kontrol grubu) anlamlı



Şekil 4. 5. Lenf nodu dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) grupları toplam T sitotoksik (T8) ve sitokin salgılayan T sitotoksik hücre sayılarının ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması. (A) CD3+CD8+ hücre (T sitotoksik), (B) CD3+CD8+IL2+ hücre (IL2 salgılayan T sitotoksik), (C) CD3+CD8+IL17A+ hücre (IL17A salgılayan T sitotoksik), (D) CD3+CD8+IFN-gamma+ hücre (IFN-gamma salgılayan T sitotoksik), (E) CD3+CD8+GM-CSF+ hücre (GM-CSF salgılayan T sitotoksik), (F) CD3+CD8+IL22+ hücre (IL22 salgılayan T sitotoksik), (G) CD3+CD8+IL10+ hücre (IL 10 salgılayan T sitotoksik) (H) CD3+CD8+TNF-alfa+ hücre (TNF-alfa salgılayan T sitotoksik)

derecede yükseklik gösterdiği (değerlendirmelerin hepsi için $p<0.05$) bulundu. (Şekil 4.6D ve Şekil 4.6H)

- Kontrol grubunun CD3+CD4+CD40L+ T hücre sayıları yönünden ise diğer iki gruptan (ilaç alan ve almayan hasta fare grubu) anlamlı derecede düşük değere sahip olduğu (her iki değerlendirmede $p<0.05$) saptandı. (Şekil 4.6E)
- Total timosit (Şekil 4.6A), CD3+ (Şekil 4.6B), CD4+ (Şekil 4.6C), CD8+(Şekil 4.6F) ve CD3+CD8+ (Şekil 4.6G) T hücre sayıları açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$).

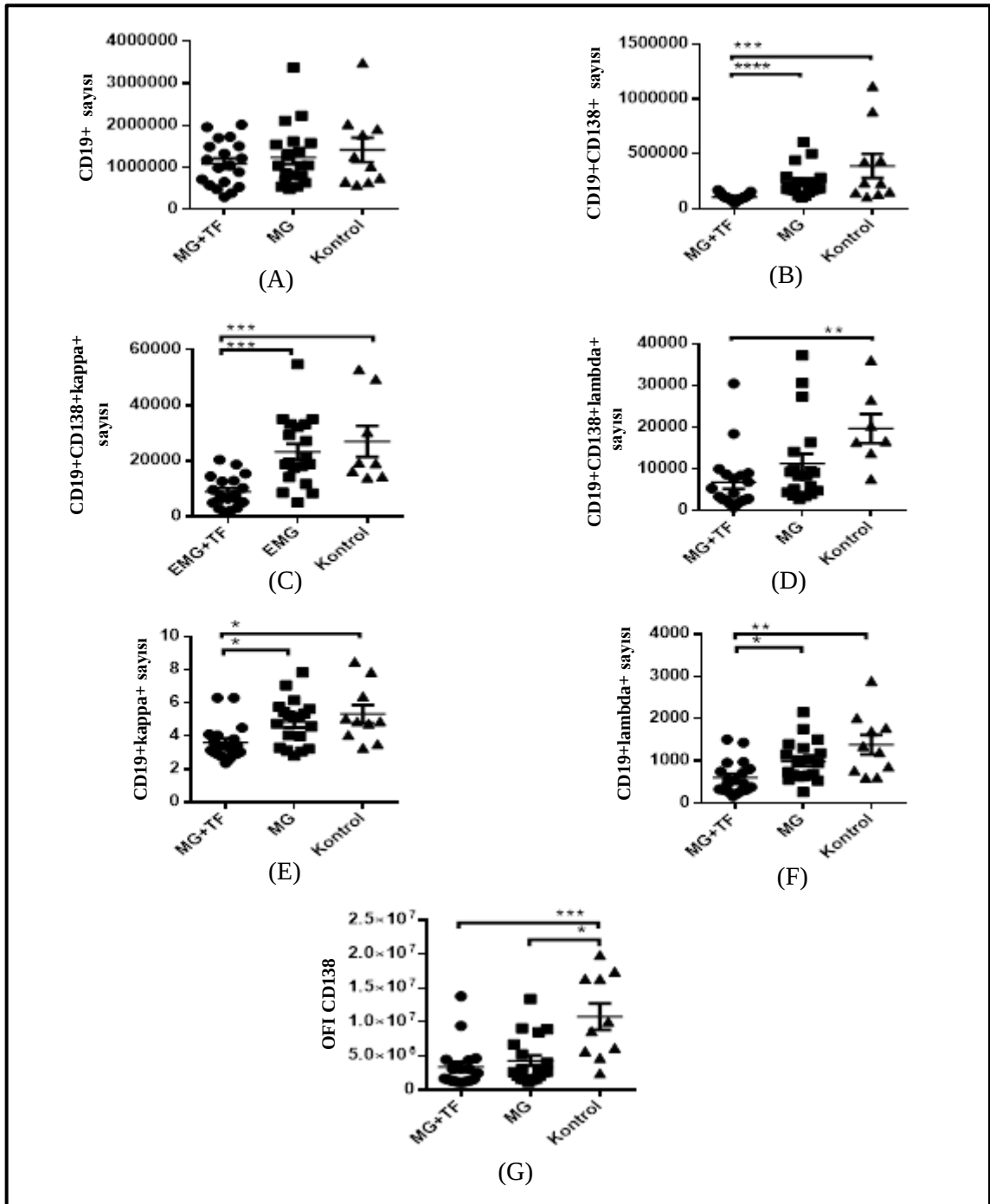


Şekil 4. 6. Timus dokusunda ilaç alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) gruplarının total timosit (A), lenfosit (B), CD4+ T hücre (C), T helper (D), CD40L+ T helper (E), CD8+ T hücre (F), T sitotoksik (G), CD40L+ sitotoksik T hücre (H) sayıları ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması.

4.3. Teriflunamid Kullanımının Toplam B Hücre ve Tiplerinin Sayılarına Etkileri

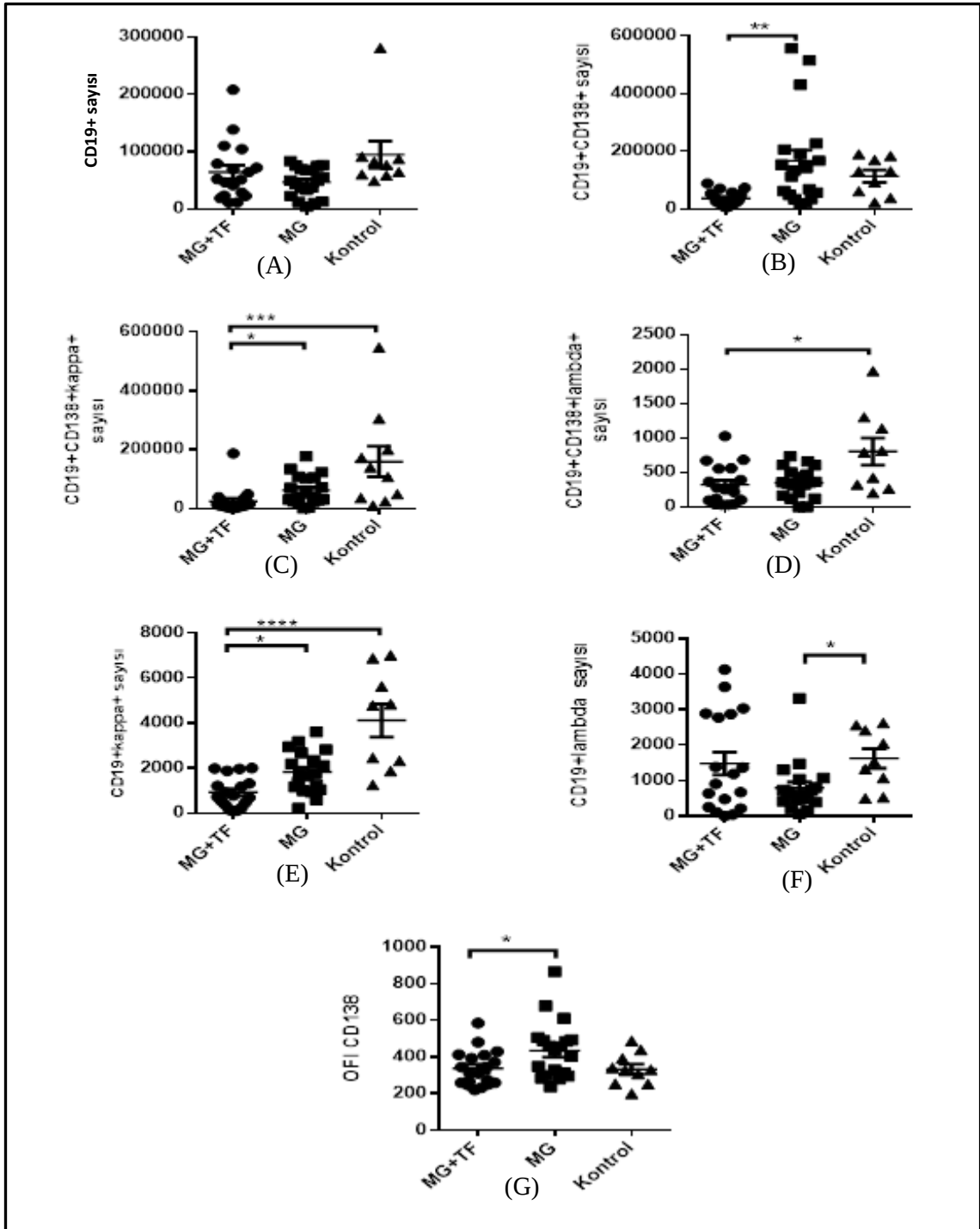
Dalak dokusunda CD19+ (B lenfosit) (Şekil 4.7A), CD19+CD138+ (plazma hücre) (Şekil 4.7B), CD19+CD138+kappa+ (kappa immunoglobulini üreten plazma hücresi) (Şekil 4.7C), CD19+CD138+lamba+ (lamba immunoglobulini üreten plazma hücresi) (Şekil 4.7D), CD19+kappa+ (kappa immunoglobulini üreten B lenfosit) (Şekil 4.7E), CD19+lamba+ (lamba immunoglobulini üreten B lenfosit) (Şekil 4.7F) hücrelerinin sayıları ve CD138 OFI (plazma hücresi ortalama floresan intensitesi) (Şekil 4.7G) yönlerinden, teriflunamid alan (MG+TF) ve almayan hasta (MG) fareler ile sağlıklı kontrol (Kontrol) gruplarının birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırmalarında;

- İlaç alan ve almayan hasta fareler arasında CD19+CD138+, CD19+CD138+kappa+, CD19+kappa+, CD19+lamba+ B hücre sayıları yönlerinden anlamlı farklılıklar olduğu saptandı. İlaç alan farelerin bu değerlerinin ilaç almayan farelere göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu bulundu. Anlamlılık düzeyleri CD19+CD138+ için $p<0.001$, CD19+CD138+kappa+ için $p<0.005$, CD19+kappa+ ve CD19+lamba+ B hücre sayıları için $p<0.05$ olarak belirlendi (Şekil 4.7B, 4.7C, 4.7E, 4.7F).
- İlaç alan fare grubunun CD19+CD138+, CD19+CD138+kappa+, CD19+kappa+, CD19+lamba+ B hücre sayıları yönlerinden ayrıca kontrol grubundan da anlamlı düzeyde düşük değer gösterdiği saptandı. Anlamlılık düzeyleri CD19+CD138+ ve CD19+CD138+kappa+ için $p<0.005$, CD19+kappa+ için $p<0.05$ ve CD19+lamba+ için $p<0.01$ olarak belirlendi (Şekil 4.7B, 4.7C, 4.7E, 4.7F).
- Kontrol grubunun CD19+CD138+lamba+ B hücre sayısı yönünden ilaç alan hasta grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek ($p<0.01$) değere sahip olduğu bulundu (Şekil 4.7D).
- Kontrol grubunun CD138 OFI yönünden hem ilaç alan hasta fare grubundan ($p<0.005$), hem de ilaç almayan fare grubundan daha yüksek ($p<0.05$) değere sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.7G).
- CD19+ B lenfosit sayıları yönünden gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 4.7A).



Şekil 4. 7. Dalak dokusunda teriflunamid ilacı alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) gruplarının, B lenfosit (A), plazma hücre (B), kappa immunoglobulini üreten plazma hücre (C), lambda immunoglobulini üreten plazma hücre (D), kappa immunoglobulini üreten B lenfosit (E), lambda immunoglobulini üreten B lenfosit sayıları (F) ile plazma hücresi ortalama floresan intensitelerinin (G) ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması.

Lenf nodu dokusunda CD19+ (B lenfosit) (Şekil 4.8A), CD19+CD138+ (plazma hücre) (Şekil 4.8B), CD19+CD138+kappa+ (kappa immunoglobulini üreten plazma hücresi)



Şekil 4. 8. Lenf nodu dokusunda teriflunamid ilacı alan hasta fare (MG+TF), ilaç almayan hasta fare (MG) ve sağlıklı fare (Kontrol) gruplarının, B lenfosit (A), plazma hücre (B), kappa immunoglobulini üreten plazma hücre (C), lambda immunoglobulini üreten plazma hücre (D), kappa immunoglobulini üreten B lenfosit (E), lambda immunoglobulini üreten B lenfosit sayıları (F) ile plazma hücresi ortalama floresan intensitelerinin (G) ortalama $\pm$ SEM'lerinin birbirleriyle karşılaştırılması.

(Şekil 4.8C), CD19+CD138+lamba+ (lambda immunoglobulini üreten plazma hücresi) (Şekil 4.8D), CD19+kappa+ (kappa immunoglobulini üreten B lenfosit) (Şekil 4.8E),

CD19+lamba+ (lamba immunoglobulini üreten B lenfosit) (Şekil 4.8F) hücrelerinin sayıları ve CD138 OFI (plazma hücresi ortalama floresan intensitesi) (Şekil 4.8G) yönlerinden, teriflunamid alan (MG+TF) ve almayan hasta (MG) fareler ile sağlıklı kontrol (Kontrol) gruplarının birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırmalarında;

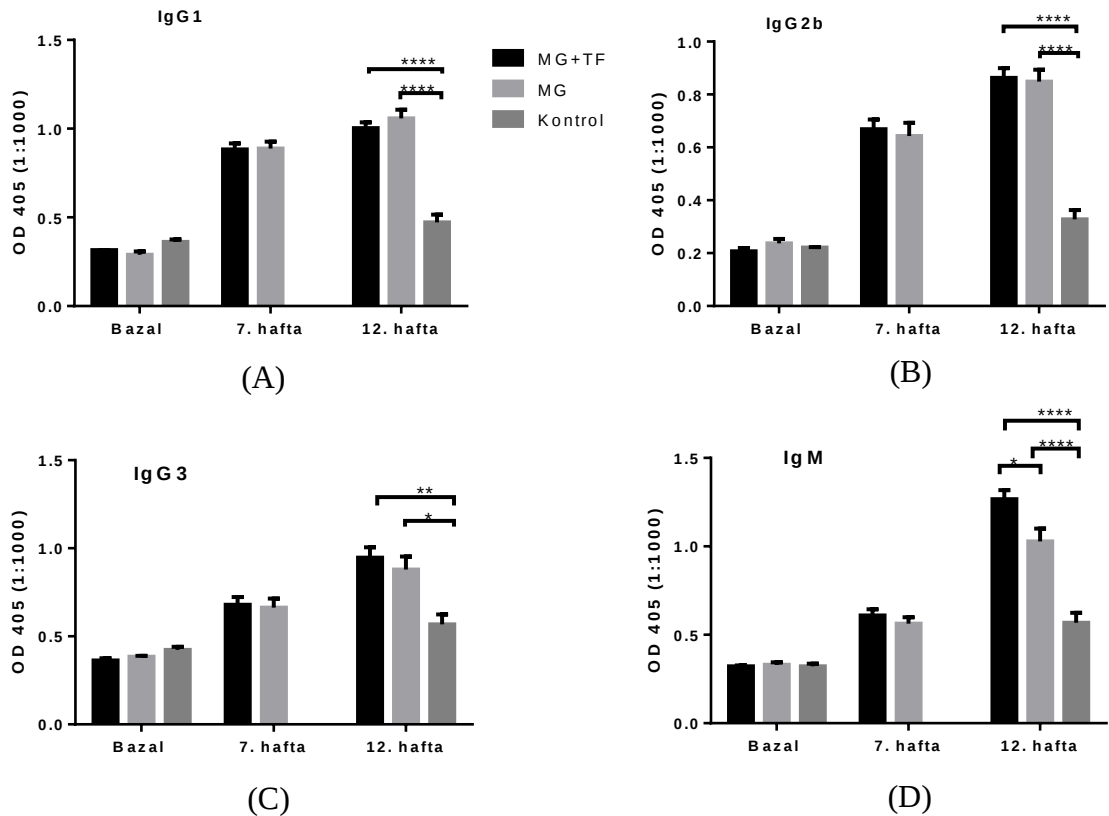
- Teriflunamid ilacı alan ve almayan hasta fareler arasında CD19+CD138+, CD19+CD138+kappa+, CD19+kappa+ B hücre sayıları ve OFI CD138 yönlerinden anlamlı farklılıklar olduğu saptandı. İlaç alan farelerde bu değerler ilaç almayan farelere göre anlamlı düzeyde daha düşük bulundu. Anlamlılık düzeyleri CD19+CD138+ B hücre sayıları için $p<0.01$ olarak belirlenirken, CD19+CD138+kappa+, CD19+kappa+ B hücre sayıları ile OFI CD138 değerleri için $p<0.05$ olarak bulundu (Şekil 4.8B, 4.8C, 4.8E, 4.8G).
- İlaç alan fare grubunun CD19+CD138+kappa+, CD19+kappa B hücre sayıları yönlerinden ayrıca kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük değer gösterdiği saptandı. Anlamlılık düzeyleri CD19+CD138+kappa+ B hücre sayıları için $p<0.005$, CD19+kappa+ B hücre sayıları için $p<0.001$ olarak belirlendi (Şekil 4.8C, 4.8E).
- Kontrol grubunun CD19+CD138+lamba+ B hücre sayısı yönünden ilaç alan hasta grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek ($p<0.05$) değere sahip olduğu bulundu (Şekil 4.8D).
- Kontrol grubunun CD19+ lambda B hücre sayısı yönünden ilaç almayan hasta fare grubundan daha yüksek ($p<0.05$) değere sahip olduğu saptandı (Şekil 4.8F).
- CD19+ B lenfosit sayıları yönünden gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 4.8A).

4.4. Teriflunamid Kullanımının AChR'e Karşı Gelişen Otoantikorlar Üzerine Etkisi

AChR'lerine karşı gelişen bazal dönem ile yedinci ve onikinci hafta immunoglobulin (IgG1, IgG2b, IgG3, IgM) değerleri, ilaç alan ve almayan hasta grupları ile sağlıklı kontrol fareleri arasında karşılaştırıldığında:

- IgG1 değeri açısından onikinci haftada, kontrol grubu değerinin hasta grupları değerlerinin her ikisinden de düşük olduğu gözlenmiştir. Bu değerlendirmelerin tümünde anlamlılık $p<0.001$ düzeyinde bulunmuştur (Şekil 4.9A).

- IgG2b değeri açısından onikinci haftada, kontrol grubu değerinin hasta grupları değerlerinin her ikisinden de düşük olduğu gözlenmiştir. Bu değerlendirmede anlamlılık $p<0.001$ düzeyinde bulunmuştur (Şekil 4.9B).
- IgG3 değerleri açısından yapılan karşılaştırmada, onikinci haftada kontrol grubu değerinin teriflunamid alan hasta grubu değerinden anlamlı düzeyde düşük olduğu bulundu ($p<0.01$) (Şekil 4.9C).
- IgG3 değerleri açısından yapılan karşılaştırmada, onikinci haftada kontrol grubu değerinin ilaç almayan hasta grubu değerinden anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.9C).
- Onikinci hafta sonuçlarında teriflunamid alan hasta grubunun IgM değerinin ilaç almayan hasta grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$) (Şekil 4.9D).



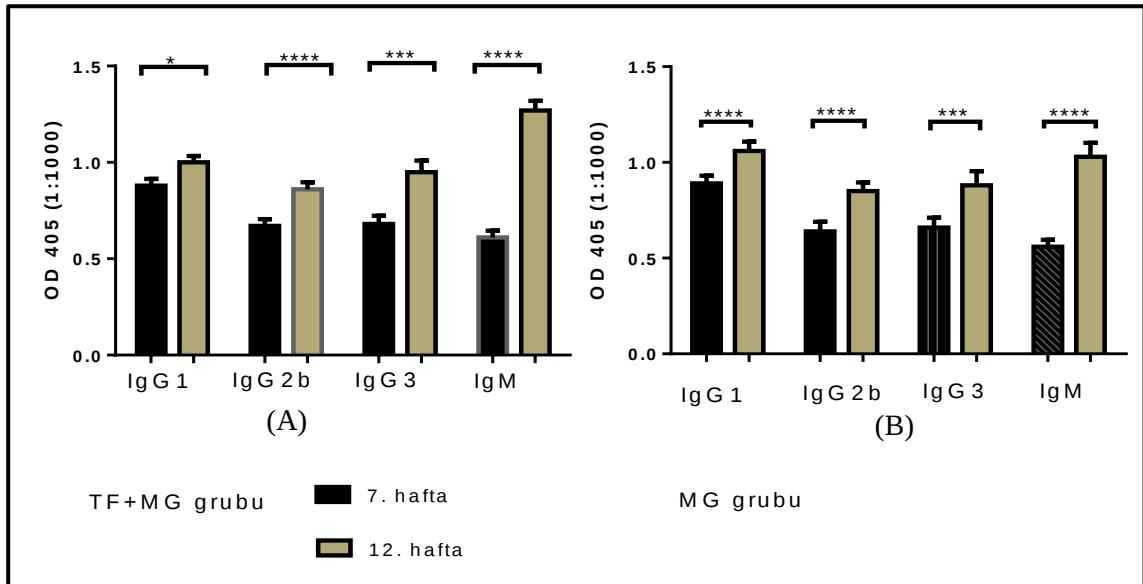
Şekil 4. 9. Teriflunamid alan ve almayan hasta fare grupları ile sağlıklı kontrol grubunun deney başlangıcındaki bazal IgG1 (A), IgG2b (B), IgG3 (C), IgM (D) ELISA sonuçları ile yedinci hafta ve onikinci hafta sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılması.

Not: Yedinci hafta sonunda (49. Gün) ELISA testi için kan alınmış, teriflunamid ilacının kullanımına 50. günde başlanmıştır.

- IgM değeri açısından onikinci haftada, kontrol grubu değerinin hasta grupları değerlerinin her ikisinden de düşük olduğu gözlenmiştir. Bu değerlendirmelerde anlamlılık $p < 0.001$ düzeyinde bulundu (Şekil 4.9D).

Bağımlı olarak (yani aynı farenin farklı zamanlardaki değerlerini birbiriyle karşılaştırarak) yedinci ve onikinci haftanın sonlarında yapılan AChR'lerine karşı gelişen IgG1, IgG2b, IgG3, IgM immunoglobulin seviyeleri değerlendirmelerinde:

- Teriflunamid alan ve almayan hasta gruplarında, onikinci hafta IgG1, IgG2b, IgG3, IgM değerlerinin yedinci hafta değerlerinden anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu anlamlılık, her iki grupta IgG2b ve Ig M için $p < 0.001$, IgG3 için ise $p < 0.005$ düzeyinde bulundu (Şekil 4.10A, 4.10B).
- Teriflunamid alan hasta grubunda, onikinci hafta sonunda yapılan incelemede IgM değerinin yedinci hafta sonundaki değerden $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı daha yüksek olduğu anlaşıldı (Şekil 4.10A).
- Teriflunamid almayan hasta grubunda, onikinci hafta sonunda yapılan incelemede IgM değerinin yedinci hafta sonundaki değerden $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.10B).



Şekil 4. 10. Teriflunamid ilacı alan (MG+TF) (A) ve almayan hasta (MG) fare gruplarında (B), aynı grup içinde yapılan bağımlı testlerle farelerin yedinci hafta ve onikinci hafta IgG1, IgG2b, IgG3, IgM ELISA sonuçlarının birbiriyle karşılaştırılması.

Not: Yedinci hafta sonunda (49. Gün) ELISA testi için kan alınmış, teriflunamid ilacının kullanımına 50. günde başlanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Farelerde MG hastalık modeli oluşturularak, teriflunamid adlı immunomodölatör ilacın etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada, klinik bulguların ilaç kullanan farelerde ilaç kullanmayanlara göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu durum ilacın hastalıkta iyileşmeye neden olduğunu düşündürmektedir. Bu iyileşmenin immunolojik mekanizmasını açıklamak üzere yaptığımız T hücre, sitokinler ve B hücrelerin akım sitometre çalışmaları ile ELISA yöntemi ile Ig G (G1, G2b, G3) ve IgM tipindeki AChR antikorlarının serum düzeyleri üzerine yaptığımız incelemelerde anlamlı bulgulara ulaştık.

Akım sitometri yöntemi kullanılarak T hücreleri, B hücreleri ile sitokin salgılayan T hücre tiplerinin sayılarının ve ELISA yöntemi ile serum immunoglobulin düzeylerinin değerlendirilmesi sayesinde klinik düzelmenin mekanizması üzerine açıklamalar getirebilecek önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlardan sağlıklı kontrol grubunun hem ilaç alan, hem de ilaç almayan hasta gruplarıyla gösterdiği anlamlı farklılığın daha çok hastalık mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülürken, özellikle ilaç alan ve almayan hasta grupları arasında belirlenen anlamlı farklılığın ilacın yararlı etkisine bağlı olabileceği şeklinde değerlendirme yapılmıştır.

Myastenik farelerin ilaç alan ve almayan grupları ile sağlıklı farelerin haftalık olarak klinik bulguları istatistiksel olarak karşılaştırıldığımızda (tüm grupların toplu karşılaştırılması ve ardından her bir grubun birbiriyle karşılaştırmasını yapan posthoc analizler ile), gruplar arası farklılığın hastalık gelişimi (insidansı) yüzdesi yönünden ve ortalama MG hastalık skoru yönünden altıncı haftadan itibaren başladığını bulduk. Bu

sonuçlara göre MG hastalık modeli geliştirmek için AChR protein enjeksiyonu yaptığımız farelerde istatistiki olarak altıncı haftada hastalık modelinin geliştiğini bildirebiliriz. Bir başka deyişle hastalık modelinin gelişmesi istatistiki olarak, farelere yaptığımız ikinci AChR enjeksiyonundan üç hafta sonra karşılık gelmektedir.

Yapılan detaylı analizin (posthoc testler) ilaç alan ve almayan fareler arasındaki karşılaştırmalarını gözden geçirdiğimizde, ilaç alan ve almayan hasta farelerin arasında onikinci haftada insidans yönünden, on ve onikinci haftalarda ortalama MG skoru yönünden anlamlı farklılık saptadık. Bu farklılığın ilaç almayan grupta, ilaç alan gruba göre daha yüksek bir insidans ve daha yüksek bir MG skoru şeklinde olduğunu gözledik. Bu durum teriflonamid ilacının üç haftalık kullanımdan sonra etkisini göstermeye başladığını, ilaç kullanımının beşinci haftası sonunda klinik düzeyde iyileştirici etkisini artırdığını göstermektedir. Nitekim beşinci hafta sonrası fareleri kurban etti ve deneyi sonlandırdık.

Myastenik farelerin ilaç alan ve almayan grupları ile sağlıklı farelerin haftalık olarak klinik bulguları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (tüm grupların toplu karşılaştırılması ve ardından her bir grubun birbiriyle karşılaştırmasını yapan posthoc analizler ile), sağlıklı kontrol grubu hastalık modeli geliştirilen gruplar arası farklılığın hastalık gelişimi (insidansı) yüzdesi yönünden onikinci ve ortalama MG hastalık skoru yönünden altıncı haftadan itibaren başladığı bulunmuştur (Şekil 4.1). Hasta grupları ile sağlıklı kontrol fareleri arasında bu haftalardan başlayarak anlamlı farklılıklar meydana gelmiştir. Kontrol farelerinde hastalık görülmezken AChR proteininin sc enjeksiyonu yapılan farelerde MG hastalığı gelişmiştir. Başlangıca göre vücut ağırlığı yüzdesi yönünden ise hasta grupları ile sağlıklı kontrol fareleri arasında sekizinci haftadan anlamlı farklılıklar olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı şekilde bu farklılığın, hasta farelerin sağlıklı kontrol farelerine göre sekizinci haftadan itibaren daha düşük orana sahip olması şeklinde ifade olduğu anlaşılmıştır.

Hayvan ağırlıkları yönünden yapılan değerlendirmelerde, ilaç alan ve almayan hasta grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Yalnız onuncu haftadan başlayarak ilaç alan grup sağlıklı gruba göre ağırlığında anlamlı olarak daha az oranda bir artma görülürken, ilaç almayan hasta grupta sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı farklı bir değişim görülmemiştir. Bu durum, orta ve yüksek dozlarda teriflunamidin kilo kaybına

neden olabilmesine bağılı olabilir (Committee for Medicinal Products for Human Use-CHMP, 2013).

T ve B lenfositleri etkileyerek immunomodülatör etki gösteren başka ilaçların MG modellerini inceleyen başka çalışmalar için literatürü incelediğimizde, fingolimod ile ilgili çalışmaların farklı sonuçlar verdiğini gördük. Bu çalışmaların birinde, farelere üç doz AChR injeksiyonu ile immunizasyon yapıldıktan bir hafta sonra fingolimod veya spinomid verilmeye başlanmış, her iki ilacın da klinik olarak bir fayda sağlamadığı görülmüştür (Pelz ve ark., 2018). Bu çalışmada bu ilaçlarla kanda B lenfosit, CD4+ and CD8+ T hücre sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşmesine ek olarak, IL-2, IFN gamma üreten CD4+T hücrelerinin sayısı da anlamlı olarak düşük bulunmuştur. IL-17 üreten CD4+T hücrelerin sayısı ise sınırda artmıştır. Fingolimod ve spinomid, bu çalışmada antikor salgılayan (ASC) hücreler ve plazma hücrelerin sayısını etkilememiştir. Ayrıca ilaçların antikor seviyelerini etkilemediği bulunmuştur.

Fingolimod üzerine yapılan başka bir çalışmada ise ratlar AChR ile ilk immunizasyondan onbeş gün sonra ilaç kullanmaya başlamış, daha sonra ikinci ve üçüncü doz immünizasyonu almışlardır. İki farklı ilaç dozunda gerçekleştirilen bu çalışmada ratların her iki dozda da, yüksek dozda daha belirgin olmak üzere, klinik semptomlarında düzelme oluşturduğu, ağırlıklarını yükselttiği bulunmuştur. Bu çalışmada ratların timus dokusu ve serumlarında, IL-2, IFN gamma, IL-4 ve IL-6 incelenmiştir. İlacın yüksek dozunda düşük dozuna göre daha belirgin olmak üzere, ilaç almayan hayvanlara göre timus dokusu ve serumda IL-2, IFN gamma, IL-6 'nın ifadesi azalmış, IL-4 yönünden ise anlamlı değişiklik olmamıştır. Bu çalışmada, Fingolimodun inflamatuvar faktörlerin salınmasını engelleyerek anti-inflamatuvar etki ile faydalı etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Huang ve ark., 2018).

Fingolimod ve spinomid, sfingosin 1-fosfat (SIP) reseptör antagonistleridir. SIP, lenf dokusu ve kanda yüksek oranda konsantredir ve immün hücrelerin yüzeyinde yer alan reseptörleri ile bağlanması, lenfositlerin lenfoid organlardan salınması için kesin gereklidir (Brinkmann, 2007). Fingolimod ve spinomid, SIP reseptörlerine bağlanarak bu reseptörlerin internalize olmalarına neden olur, lenfositlerin lenf nodlarında birikmesine ve lenfopeniye neden olur. Bu ilaçlar multipl skleroz hastalığı ve bazı başka otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Tsunemi ve ark., 2010).

Sonuç olarak birbiriyle klinik fayda yönünden ters sonuçlar bildiren bu iki çalışmaya daha analitik yaklaşırsak, fingolimodun MG hastalık modeli oluştuktan sonra başlandığında klinik olarak etkisiz, fakat daha klinik model tam oluşmadan ilk immunizasyon sonrası başlandığında etkili olduğu şeklinde değerlendirme yapabiliriz. Teriflunamid ile yaptığımız kendi çalışmamızda ise klinik model oluştuktan sonra dahi ilacın klinik olarak fayda sağladığını gördük.

Ekstrasellüler adenosin, immün reaksiyonlarda gerekli bir inhibituar düzenleyicidir, etkisini dört farklı adenosin reseptörü üzerinden göstermektedir. Adenosin reseptörleri pekçok immün hücre üzerinde yer almakta ve hem doğal (innate), hem de edinsel (adaptif) immün cevabı regüle etmektedir (Haskó ve ark., 2008). Bir çalışmada ratlarda MG modeli geliştirerek modelin oluşumu ve ilerlemesi sırasında adenosin reseptörlerinin değişimi izlenmiştir. MG hastası ratların, lenf nodu, dalak lenfositlerinde ve periferik kanda mononukleer hücrelerinde A_1 ve $A_{2A}AR$ 'nin (adenosin reseptörleri) mRNA ve protein seviyelerinin anlamlı olarak düştüğü saptanmıştır. $A_{2B}R$ seviyelerinin ise orta fakat anlamlı olmayan bir şekilde yükseldiği, $A_{3A}R$ seviyesinde ise bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Li ve ark., 2014).

Adenosin ile ilgili yukarıdaki bilgilerin doğrultusunda, CGS21680 kodlu adenosin $2A$ reseptörü ($A_{2A}AR$) agonistinin MG tedavisindeki etkinliği araştırılmıştır. Ratlar ile yapılan bir çalışmada MG modeli geliştirmeye başlamadan önce ve MG modeli geliştirdikten 29 gün sonra başlanan bu ilaçla her iki durumda da klinik bulgularda ilaç kullanmayanlara göre semptomlarda düzelme gözlemlendiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2012). Bu çalışmada normalde $A_{2A}AR$ ifadesinin T hücrelerinde B hücrelerinden daha fazla, $CD4^+$ T hücrelerinde $CD8^+$ T hücrelerinden daha fazla olduğu fakat MG geliştirilen ratlarda $A_{2A}AR$ dansitesinin, dalak ve lenf nodunda $CD4^+$ T, $CD8^+$ T ve B hücrelerinde kontrol ratlarına göre önemli şekilde düşük saptandığı bildirilmiştir. Araştırmacılar MG hastalığı progresyonu sırasındaki $A_{2A}AR$ ifadesindeki bu düşüşü, hastalığın süreci içerisinde ilacın önleyici etkisinin azalmasına yol açabilecek bir faktör şeklinde yorumlamıştır. Ayrıca AChR-spesifik lenfositlerin in-vitro ortamda $A_{2A}AR$ agonisti ile ön işlem sonucunda anti-AChR IgG değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. Bu ön çalışmalar sonrasında, hastalık gelişmeden önce ilacın başlanması şeklindeki koruyucu tedavi çalışmasında, ilacın çok başarılı olduğu, hastalığın ilerlemesini tamamen engellediği görülmüştür. Hastalık modeli geliştikten sonra ilacın başlanması şeklindeki terapötik protokolde ilacın hastalığın

gidişatını değiştirdiği, fakat etkisinin koruyucu tedaviden daha az olduğu saptanmıştır. Bu bulgular A_{2A}R agonistinin, MG modeli oluşumundaki erken olayları, örneğin T hücreleri ile ilgili olayları (Antijen tanıma, epitop yayılması, T hücrelerinin fazlalaşması), engellediğini göstermektedir. Fakat gelişmiş MG modelinde, otoimmün hafıza, T ve B cevapları (komplement aktivasyonu ile birlikte) ile nöromusküler kavşakta bir kez hasar geliştikten sonra, A_{2A}R agonisti ile tedavi fazla etkili olamamaktadır (Li ve ark., 2012). Bu çalışmada, dalak ve lenf nodundan elde edilen hücrelerde gerçekleştirilen akım sitometrisi ile ilacın B hücrelerinin proliferasyonunu değiştirmedeği ve B hücrelerince anti-AChR IgG salınımı üzerine bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Bu durumda ilacın MG üzerine yararlı etkisinin, CD4⁺ T hücrelerince tetiklenen mekanizmalarla (sitokinlerin aracılığıyla) ilgili antikorların sentezinin artırılması ve proinflamatuvar sitokinlerin salınmasının inhibisyonu şeklinde geliştiği biçiminde yorumlamışlardır. Nitekim A_{2A}R aktivasyonu ile Th1, Th2, Th17 hücre sayıları ve bu hücrelerce üretilen sitokinlerin miktarının düştüğünü, regülatuar T hücre sayıları ve sitokinlerinin arttığını bulmuşlardır. Th1, Th17 sitokinlerinin proinflamatuvar, Treg sitokinlerinin anti-inflamatuvar olması ile görülen bu değişiklikler MG'in inflamatuvar bir otoimmün hastalık olması ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Th2 sitokinlerinin anti-inflamatuvar olmasına rağmen MG modelinde düşük olması ilk bakışta hastalıkla uyumsuz bir tablo olarak görünmektedir. Bu durum Th2 hücrelerinin ayrıca B hücrelerinin büyümesi ve differansiyonunu stimüle etmeleri ve kompleman fikse etmeyen (farelerde IgG1 gibi) antikor üretimini indüklemeleri bulguları ile açıklanmaktadır (Wang W ve ark., 2007; Li ve ark., 2012).

Bir A vitamini metaboliti olan All-transretinoik asit (ATRA) bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan başka bir immunomodülatör ilaçtır. Retinoik asit (RA), retinoik asit reseptörlerine (RAR) ve retinoik X reseptörlerine (RXR) bağlanarak farklı immün sistem hücre tiplerini etkiler (Mora ve ark., 2008). ATRA ise RA' nın bir tipi olup major RAR ligandıdır ve lenfosit diferansiyonu ve fonksiyonunda önemli rol oynar. ATRA T helper (Th) hücreleri immün cevaplarının gidişatını, Th1'e bağlı inflamasyonu inhibe, Th2 anti-inflamasyonu artırarak değiştirirler (Iwata, 2003). ATRA, ayrıca Th17 (inflamatuvar) ve Threg (anti-inflamatuvar) diferansiyonlarını Threg lerin oluşumunu Th17' lerinkine üstünleyerek değiştirir (Mucida ve ark., 2007). Ek olarak A vitamin eksikliği olan farelerde antijen spesifik IgG1 cevaplarının bozulduğunu gösteren çalışmalar, ATRA'nın B hücrelerinin izotipleri ile antikor cevaplarını etkilediğini

göstermektedir (Smith ve Hayes, 1987; Chen ve ark., 2008). Yine ATRA'nın antijen prezente eden hücrelerin fonksiyonunu, maturasyonunu ve kapasitesini etkilediğine dair yayınlar bulunmaktadır (Geissmann ve ark., 2003; X. Wang ve ark., 2007). Bu bilgilerin ışığında, MG rat modelinde ATRA' nın in vitro ve in vivo etkilerinin çalışıldığı araştırmada klinik olarak fayda sağlandığı gözlenmiştir (Xie ve ark., 2013). Bu faydayı, ATRA ile ilgili daha önce literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu olarak Th1, Th17, Tfh (Foliküler helper T hücreleri, CD4+CXCR5ICOS^{high}, B hücre folikülü içinde yer alıp B hücrelerine IgG antikor yapımında en fazla yardım eden T helper hücre grubu) hücrelerini azaltarak; Th2, Treg, Tfr (folliküler regulatuar hücreler, B hücre folikülü içinde yer alıp, Tfh hücrelerini inhibe eden T helper hücre grubu) hücrelerini arttırarak gerçekleştirdiği bulunmuştur. Sonuç olarak ATRA alan ratların serumlarında almayan ratlara göre daha az miktarda anti-AChR IgG antikoru olduğu saptanmıştır.

Literatürdeki bir çalışmada teriflunamid isimli ilacın MuSK immunize MG modeli geliştirilmiş farelerde de klinik faydalı etki gösterdiği bildirilmektedir (Yılmaz ve ark., 2020). Bahsedilen bu çalışmada hastalık modeli geliştirilmiş evre 2 farelerin bir kısmına ilaç (30 µg teriflunamid ip/gün, PBS içinde çözünmüş şekilde), bir kısmına ise PBS verilmiş, fareler altı hafta süreyle izlenmiştir. Son aşamada ilaç kullanan sekiz farenin % 50'sinde, PBS alan dokuz farenin hepsinde MG hastalığı bulguları olduğu gözlenmiştir. Yine sadece PBS alan farelerde MG hastalığının şiddetinin arttığı farelerin üçünün evre 3'e, bir farede ise evre 4'e yükseldiği bildirilmiştir.

MuSK immunize MG modelinde teriflunamidin etkisini inceleyen, yukarıda belirttiğimiz çalışmada (Yılmaz ve ark., 2020), ikinci immünizasyon sonrası yedinci haftadan başlayarak MG modeli geliştirilen farelerde sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ağırlık düşüşü başlamış, sekizinci haftada yapılan üçüncü immünizasyon sonrası başlanan teriflunamid ilacının başlanmasının ardından dokuzuncu haftadan itibaren bu ilacı kullanan farelerin ağırlıklarında düzelme olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda teriflunamid kullanımı ile farelerin ağırlıklarında düzelme meydana gelmemiş, hatta onuncu haftadan başlayarak ilaç alan grubun sağlıklı gruba göre ağırlığında anlamlı olarak daha az oranda bir artma görülürken, ilaç almayan grupta ise sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturan bir değişim görülmemiştir. Bu durumun bizim

modelimizin AChR immunizasyonu ile gerçekleştirdiğimiz farklı bir model olmasının yanı sıra, teriflunamid dozumuzun daha yüksek olmasına bağlı olabileceğini düşünüyoruz.

MuSK ile immunize farelerde teriflunamidin etkinliğini araştıran bu çalışmada da yüzey boyaması yapılan LN dan alınan hücrelerde T lenfosit, T helper hücreler, T sitotoksik hücreler, B lenfositler, natural killer hücreler, fagositozla görevli doğal immunité hücreleri gibi bazal immün hücrelerin akım sitometresi ile oranı incelenmiş ve sonuçta tedavi ile bu hücrelerin oranlarında azalma eğilimi olmakla birlikte anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca hafıza (memory) T hücrelerinin oranında bir etkilenme saptanmamıştır. Plazmoblast oranı ise, tedavi ile azalma eğilimi göstermekle birlikte bu azalma istatistiki olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır. Fakat hafıza (memory) B hücrelerinin oranı, ilaç almayan hasta grupta ilaç alan gruba göre ve sağlıklı farelere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca farelerin serumlarında Ig G, Ig G1, Ig G2b, Ig G3 düzeyleri çalışılmış, ilaç almayan hasta grubun düzeylerinin ilaç alan hasta gruptan ve sağlıklı kontrol grubundan daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Biz ise çalışmamızda, teriflunamidin MG modeli geliştirilmiş farelerde klinik olarak tedavi edici etkisi olduğunu ve hastalığın progresyonunu engellediğini bulduk. Literatürde MG hastalığında kullanılan ilaçların tedavi edici etkisine paralel olarak hayvanların ağırlıklarında düzelmeye neden olduğunu belirten çalışmaların aksine, çalışmamızda ilaç kullanan ve kullanmayan hasta fareler arasında vücut ağırlıkları açısından anlamlı bir fark bulmadık (Li ve ark., 2012; Huang ve ark., 2018; Pelz ve ark., 2018; Yılmaz ve ark., 2020). Bu durumun, teriflunamidin orta ve yüksek dozlarda kullanıldığında, kilo kaybı yan etkisinin olabilmesine bağlı olabileceğini düşündük (Committee for Medicinal Products for Human Use-CHMP, 2013). Aşağıda daha detaylı olarak değerlendireceğimiz üzere bu tedavi edici etkisini, T hücreleri, B hücreleri ve antikor üretimi üzerine etkileriyle gerçekleştirmiş olabileceğini düşünerek birtakım incelemeler yaptık.

Dalak ve lenf nodunda farklı sitokin salgılayan tipleri içerir şekilde T helper hücre sayıları yönünden yapılan karşılaştırmalarda, dalakta T helper hücrelerinin IL2, IL17A, IFN-gamma, IL22 sitokinleri taşıyanları; lenf nodunda ise IFN-gamma, GM-CSF, IL22 sitokinleri yönünden ilaç alan hasta farelerde, ilaç almayan farelere göre anlamlı derecede daha düşük sayıda hücre olduğunu saptadık. IL2, IL17A, IFN-gamma, IL22, GM-CSF

sitokinlerinin inflamasyonda görevli ve inflamasyon durumunda artan sitokinler olduğu gözönüne alındığında teriflunamidin farelerde inflamatuvar süreçleri azaltmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir (Ray, 2016). Bu sitokinlerden en fazla anlamlı farklılık gösterenlerin, dalakta IFN-gamma (ayrıca lenf nodunda da anlamlı) ve IL2, lenf nodunda GM-CSF olduğunu bulduk. Bu sitokinleri immunomodülatör yönlerini de kapsayacak şekilde daha yakından inceleyecek olursak, immun olaylardaki etkilerini daha iyi anlayabiliriz.

IFN-gamma, akut inflamasyon sonrası bir yabancı antijenin uzun süreli vücutta bulunmasına cevap olarak T helper (T1 tipi) hücreleri tarafından üretilir ve kronik inflamatuvar yanıtı neden olur. Adaptif immun cevabı düzenleyici rolü olan IFN-gamma, kronik inflamatuvar yanıtta büyük rolü olan makrofajları aktive eder. Bu aktivasyon makrofajların ve antijen prezente edici hücrelerin antijen ekspresyonunu artırır. TNF-alfa ve IFN-gamma birlikte çalışarak intersellüler adezyon moleküllerinin ve Klas I MHC'in ekspresyonunu artırarak daha fazla sayıda lökositleri çağırır ve böylece kronik inflamatuvar cevabın oluşmasını sağlarlar (Ray, 2016). Sonuç olarak IFN- gamma ve TNF-alfa inflamasyonun akut döneminde görev alır ve inflamasyonun kronikleşmesine neden olurlar. Bu bilgiler ışığında sonuçlarımızı değerlendirirsek, farelerin üç kez antijen ile karşılaşması ve ardından beş hafta geçmesi sonucu olayın kronik sürece girdiği için hasta hayvanlarda sağlıklı kontrol farelerine göre T helper hücrelerinde IFN-gammanın, dalakta ve lenf nodunda ise anlamlı düşüş gösterdiğini düşünebiliriz. IFN- gammanın ilaç alan farelerde ilaç almayanlara göre daha düşük olması bu ilacın immun hücreler gibi hızlı çoğalan hücrelerin proliferasyonu ve aktivasyonu ile bu hücrelerin sinyalizasyonu olan sitokinlerin üretimi gibi enerji gerektiren fonksiyonlarını azaltma etkisine bağlı olduğu düşünülebilir. IFN-gammanın düşmesi, ayrıca adaptif immun cevabın oluşmasını engellemek yoluyla teriflunamid kullanımının oluşturduğu klinik yarara fayda sağlamış olabilir.

IFN-gamma, IFN- 2 grubuna ait bir interferondur. Interferonlar, antiviral, antitumor ve immunomodülatör etkili immun cevabın ana koordinatörleri olan sitokinlerdir (Gresser, 1990). IFN-gamma direk olarak viral replikasyonu engelleme ile immunstimulatuar, immunomodülatör, antitumor etkilerinden dolayı immun sistemde önemli bir interferondur. Doğal (innate) immunité mekanizmasında en fazla, natural killer (NK) hücreler, natural killer hücreler tarafından üretilirken; adaptif (edinsel) immunité

geliştiğinde ise en çok CD4 Th1 ve CD8 sitotoksik T lenfositleri tarafından üretilirler. Ayrıca non sitotoksik doğal lenfoid hücreler (innate lymphoid cells: ILC) tarafından da oluşturulurlar (Saha ve ark., 2010; Pott ve ark., 2011; Wack ve ark., 2015). IFN-gamma normal hücrelerdeki Klas 1 MHC molekülünün ve antijen prezente eden hücrelerdeki (APC) Klas 2 MHC molekülünün ifadesini artırarak doğal (innate) ve adaptif (edinsel) immunitiyi indükler (Amaldi ve ark., 1989; Shirayoshi ve ark., 1988). Ayrıca IFN-gamma, Th1 hücrelerinden salınır ve CD4+ (Th0) hücrelerinin Th1 hücrelerine dönüşmesini sağlayarak pozitif bir besleme zinciri oluşturur. Bu arada IFN-gamma, T hücrelerinin Th2, Th17 ve Threg hücrelerine dönmesini engeller (Luckheeram ve ark., 2012). Çalışmamızda hem dalak, hem de LN'unda, ilaç alan farelerde ilaç almayanlara göre IFN-gamma + T helper hücrelerinin azalması, Th1 hücrelerinin azalması demektir. Th1 hücrelerinin makrofaj ve sitotoksik T hücrelerini aktive ettiğini ve oluşan IFN-gammanın klas 2 MHC molekülünün ifadesini artırarak antijen prezentasyonunu indüklediğini gözönünde bulundurursak, IFN-gammada ilaçla oluşan azalmanın ilacın verdiği klinik faydaya katkı vermiş olabileceğini düşünebiliriz. Lenf nodunda ayrıca ilaç almayan hasta farelerde, sağlıklı kontrol farelere göre IFN-gammanın anlamlı düşük olması immunolojik olayın kronik fazda olması ile ve IFN-gammanın ise daha çok akut fazda rol alması ile LN'nun B hücrelerinin olgunlaşması ve antikor üretmesi gibi adaptif immunolojik olaylarının ileri evrelerinde rol almasına bağlı olarak IFN-gamma ile ilişkili fazla görev üstlenmemesi ile açıklanabilir.

Çalışmamızda ilaç alan hasta grubunun LN'unda granulosit makrofaj koloni (colony)-stimulizan faktörü (GM-CSF), ilaç almayan hasta grubuna göre ($p<0.01$) ve sağlıklı kontrol grubuna göre ($p<0.001$) daha düşük değerde bulduk. Dalakta ise anlamlı bir farklılık saptamamakla birlikte GM-CSF'nin ilaç alan grupta ilaç almayana göre daha düşük olma eğilimi içerisinde olduğunu gözledik.

GM-CSF, sitokin olarak görev alan bir glikoprotein olup kemik iliğinde beyaz kürelerin büyüme faktörü olarak görev yapar, kök hücrelerini granulosit (nötrofil, eosinofil, bazofil) ve monosit üretmesi için uyarır (Francisco-Cruz ve ark., 2014). Monositler, kan dolaşımına çıkar ve dokulara geçerek, makrofaj ve dendritik hücrelere dönüşür. Bu hücreler immun ve inflamatuvar olayların zincirinde yer alırlar. Dendritik hücreler, antijen prezente eden hücre olarak görev alarak doğal (innate) ve primer immun

mekanizmalarda yer alırlar. Ayrıca GM-CSF monosit ve makrofajları stimüle ederek onların pro-inflamatuvar sitokinler salgılamasına neden olur (Lee ve ark., 2020). Bu durumda ilaç alan farelerde GM-CSF'nin düşmesi primer immun olayları ve inflamasyonu azaltarak MG hastalığı üzerine iyileştirici etkide bulunmuş olabilir.

IL-2 nin immun sistemdeki T hücrelerinin daha çok lenfositler olmak üzere beyaz küre hücrelerinin (lökosit ve lenfositler) immun fonksiyonlarını düzenleme görevleri gibi etkileri gözününe alındığında dalakta ilaç kullanan farelerde kullanmayanlara göre anlamlı düşük saptanması ilacın klinikte görülen yararlı etkisine fayda sağlıyor olabilir. IL-2 ilk bulunduğunda T- hücre büyüme faktörü olarak adlandırılmış bir sitokindir. Bir immun cevap sırasında büyük oranda aktive CD4+ ve CD8+ T hücrelerinden salınır, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu indükler, CD4+ T helper hücrelerinin Th1 ve Th2 tipinde T helper hücrelerine ve T hafıza (memory) hücrelerine dönüşümünü stimüle ederken, Th17 ve foliküler Th hücrelerine dönüşümünü engeller (Liao et al., 2013). IL-2'nin T hafıza (memory) hücrelerine dönüşümü stimüle etmesi, hücrel immunitenin devamını sağlar. Ayrıca natural killer hücreler ile B lenfositlerinin proliferasyonu ile fonksiyonlarını ve makrofajların olgunlaşmasını indükler. IL-2 ile aktive olan B lenfositler membrana bağlı IgM'den ziyade, sekrete edilen IgM üretirler (Malek ve Castro, 2010). Bütün bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda ilaç kullanımının IL2 düşüklüğü ile aktif immunolojik olayları baskılamasının ilacın klinik faydasına katkı sağlamış olabileceğini düşünüyoruz.

Ayrıca dalak ve LN dokusunda teriflunamid alan farelerde almayanlara göre IL-22 taşıyan T helper hücre sayılarının anlamlı düşük olduğunu saptadık. IL-22' nin psoriasis ve kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi patolojik süreçlerde de yer alabildiğini gözönünde bulundurursak IL-22 nin ilaç alımıyla düşmesi klinik faydaya katkı sağlamış olabilir. Önceleri IL-22'nin Th17 hücrelerinden salındığı düşünülüyordu fakat yapılan çalışmalarla bunun böyle olmadığı anlaşıldı. IL-22 pek çok immunolojik hücre tarafından salınabilen ancak uygun reseptörü olan epithelial hücrelerle iletişime geçip fizyolojik olarak buradaki hasarı tedavi eden ve dokuyu koruyan bir sitokindir. Ancak inflamasyon bulunan yerlerde fazla olmaları rejeneratif etkilerinden başka patolojik inflamasyonu artırabilme etkilerine bağlanmaktadır. Nitekim otoimmun hastalık, enfeksiyon ve malignansi gibi süreçlere de katkı verdikleri belirlenmiştir (Perusina Lanfranca ve ark., 2016). Biz ise çalışmamızda anlamlı olmamakla birlikte dalakta ve LN'da hasta farelerde

IL-22'nin artma eğiliminde olduğunu bulduk. Teriflunamid alımı ile IL-22'nin hem dalak, hem de LN'da anlamlı hem düştüğünü saptadık. Bu durum belirttiğimiz üzere myastenik fareler üzerinde tedavi edici etki yapmış olabilir.

IL-17A taşıyan T helper hücre sayılarını ise dalak dokusunda ilaç alan farelerde almayanlara göre anlamlı olarak daha düşük sayıda olduğunu bulduk. Bu sonucun IL-17A'nın T helper T17 alt tipi hücrelerince üretilen bir sitokin olarak nötrofil ve makrofajların migrasyonundan sorumlu olduğu dikkate alınırse ilacın inflamasyonu azaltmak yoluyla MG hastalığındaki klinik faydalı etkisi ile ilişkili olduğunu düşünebiliriz (Zenobia ve Hajishengallis, 2015).

Lenf nodunda belirlediğimiz IL-10'un kontrol grubunda hasta fare gruplarına göre anlamlı yüksek olması bulgusu MG hastalığının etkisine bağlanabilir. IL-10'un T helper hücrelerinin alt grubu olan T reg hücrelerinden salınması ve immun cevabı pek çok yolla suprese etmesi şeklindeki etkileri düşünüldüğünde bu bulgu hastalıkta beklenen yönde bir bulgudur. B hücreleri, T hücreleri, monositler, natural killer hücreleri ve antijen prezente eden hücreler gibi çok farklı hücre çeşitlerince salınan bu sitokin proinflamatuvar sitokinlerin salınımını engeller. Ayrıca T helper hücrelerin Th1 ve Th2 alt gruplarının aktivasyonunu engelleyerek makrofajların ve B hücrelerinin aktivasyonunu inhibe etme görevi bulunmaktadır (Ray, 2016).

TNF-alfa sitokini yönünden gruplar arasında hiç anlamlı sonuç elde etmedik. TNF-alfa hakkındaki bilgileri gözden geçirecek olursak: Bu sitokin akut inflamasyonu yöneten ana sitokin olmakla birlikte primer rolü immun sistemin regülasyonudur. İmmun sistem hücrelerinin hepsinde üretilebilmekle birlikte çoğunluğu makrofajlardan üretilir. TNF-alfa etkisini TNFR1 (Tümör nekrozis faktör reseptörü) ve TNFR2 olmak üzere iki farklı reseptör üzerinden gösterir. TNFR1 pek çok hücrede ifade edilirken, TNFR2 primer olarak endotel hücreleri, epitel hücreleri ve bazı immun hücreler gibi belirli hücre gruplarında bulunur. TNFR1 sinyali proinflamatuvar ve apoptotik iken, TNFR2 sinyali anti-inflamatuvar ve hücre proliferasyonunu indükleyicidir (Gough ve Myles, 2020; Heir ve Stellwagen, 2020). Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda TNF-alfa yönünden bir farklılık bulmamamız bu sitokinin T hücrelerinden ziyade en çok makrofajlarda üretilmesine ve farklı reseptör tiplerine göre birbirinin tam tersi etkilere sahip olmaları nedenlerine bağlı olabilir.

Dalak ve lenf nodunda farklı sitokin salgılayan tipleri içerir şekilde sitotoksik T hücre sayıları yönünden yapılan karşılaştırmalarda, T helper hücrelerindeki gibi zengin bulgular saptamadık. Bu durum literatürde MG hastalığının T helper hücreleri ile regüle bir hastalık olarak bildirilmesiyle uyumluluk göstermektedir. Dalakta toplam sitotoksik T hücre sayısı ve bunun IL2, IL17A, IFN-gamma, GM-CSF, IL-22, IL-10, TNF-alfa sitokini üreten sayıları yönünden, çalışma gruplarımız arasında anlamlı bir farklılık saptamadık. Lenf nodunda yaptığımız benzer değerlendirmelerde ise, teriflunamid ilacının hızlı bölünen hücrelerin proliferasyonunu bozması özelliği ile uyumlu olarak bu ilacı kullanan hasta farelerin CD3+CD8+ yani sitotoksik T hücre sayılarının sağlıklı kontrol farelerine göre anlamlı düşük olarak bulduk. Ayrıca bir başka anlamlı bulgu olarak, IFN-gamma üreten sitotoksik T hücre (CD3+CD8+IFN-gamma+) sayılarının ilaç alan ve almayan hasta gruplarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düşük olduğunu tespit ettik. Bu bulgu lenf nodunda T helper hücrelerinde (CD4+) de gözlediğimiz bir bulgudur. T helper hücrelerinde olduğu gibi immunolojik olayın kronik fazda olması nedeniyle IFN-gammanın düşük olduğunu düşünmekteyiz.

Timusta yaptığımız değerlendirmeleri gözden geçirecek olursak, total timosit ve T hücre sayılarının genel olarak ilaç almayan hasta grupta sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olma eğiliminde, ilaç alan hasta grubunda ise ilaç almayan hasta gruba göre daha düşük olma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte bu eğilim sadece CD3+CD4+ yani T helper hücreleri için anlamlılık düzeyine ulaşmış; ilaç almayan hasta grubunda T helper hücrelerinin sayısı, ilaç alan hasta gruptan ($p<0.05$) ve sağlıklı kontrol grubundan anlamlı yüksek ($p<0.05$) olarak bulunmuştur. Bu bulgular MG'in T helper hücreleri ile medietik bir hastalık olması ve teriflunamidin hızlı bölünme özelliğine sahip hücreler olan T lenfositlerin proliferasyonunu bozma özelliği ile kolayca açıklanabilir.

Timusta ayrıca CD4+CD40L+ ve CD8+CD40L+ hücrelerinin sayıları yönünden çalışma gruplarımız arasında anlamlı farklılıklar saptadık. CD40L (CD40 ligand: CD154) nin primer olarak aktive olan T hücreleri üzerinde yer alıp, antijen prezente edici hücreler (APC) üzerinde bulunan CD40 proteini ile bağlanarak çok çeşitli humoral ve sellüler immun cevaplarda ana modülatörlerden biri olduğunu düşünürsek (Grewal ve Flavell, 1998; Chatzigeorgiou ve ark., 2009), CD4+CD40L+ hücre sayısının sağlıklı kontrol grubunda hasta gruplara göre anlamlı düşük, CD8+CD40L+ hücre sayısının ise ilaç

almayan hasta grupta, ilaç alan hasta grup ile sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek olması sonuçlarına bağlı olarak immün sistemin regülasyonunda MG hastalığı ve teriflunamid kullanımı ile timusta önemli oranda değişiklikler oluştuğunu düşünebiliriz.

Bir başka deyişle, CD40L taşıyan hücreler, antijen presente eden hücrelerin (dendritik hücreler, makrofajlar, Langerhans hücreleri, B lenfositler) aktivasyonunu sağlayarak hem humoral, hem de sellüler immün mekanizmalarda, doğal ve adaptif immün cevabın oluşturulmasında düzenleyici rol oynarlar. Klasik olarak CD40L ifadesinin sadece CD4+ T hücrelerinde yer aldığı bilgisi son zamanlarda CD8+ T hücrelerinin de bu ligandı içermesinin tespitinden sonra değişmiştir (Bourgeois, 2002). CD40L+ T helper hücrelerine, B hücrelerinden antijen sunulduğunda, bu B hücrelerinin aktivasyonuna, hızlıca çoğalarak germinal merkez oluşturmalarına ve bu germinal merkezde plazma hücrelerine ve memory B hücrelerine dönüşmelerine ilaveten antitopi izotip değişimlerine ve affinitelerini olgunlaştırmalarına neden olur. Bütün bu olayların sonucu, B hücrelerinin bir topluluk olarak bir antijenik hedefe yönelik özel antikorlar oluşturmaları sağlanır. Nitekim CD40 veya CD40L (CD154) eksik olan farelerde immünoglobulin sınıf değişimi veya germinal merkez oluşumu az düzeydedir, sonuçta immün cevaplar şiddetli bir biçimde hasarlanır. CD40L ile ilgili gendeki bir hasar, immünoglobulinlerde sınıf değişiminin yapılması yeteneğini yok eder ve sonuçta hiper IgM sendromu görülür (Grewal ve ark., 1995).

CD40 içeren dendritik hücreler, CD40L içeren CD4+ ve CD8+ T hücrelerine antijen sunumu yaptıklarında ise dendritik hücreler aktive olur ve IL-12 ile IFN-gamma salmak yoluyla CD8+ T hücrelerinin fazlalaşmasını ve memory (hafıza) T8 hücrelerine farklılaşmalarını sağlarlar (Tay ve ark., 2017).

CD40L hakkındaki bütün bu bilgileri gözönüne alarak sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde hasta farelerde CD4+CD40L+ hücre sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olması, bu farelerdeki aktif immünolojik olayları göstermesi yönünden akla uygun gelmektedir. CD8+CD40L+ hücre sayılarının ilaç kullanmayan hasta grupta sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olması aktif immünolojik olayı göstermesi açısından makul bir sonuç olmakla birlikte T helper hücreleri ile açıklanan MG patogenezi gözönüne alındığında oldukça ilginç bir bulgudur. Üstelik ilaç kullanan

hasta farelerde, CD8+CD40L+'nin ilaç kullanmayanlara göre anlamlı düşük bulunması, bu durumun teriflunamidin tedavi edici fonksiyonuna katkıda bulunuyor olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda, B hücre sayı, antikor üreten hücre sayı ve antikor üretme antijenine dair ortalama floresan düzeyi (ortalama CD138+ floresan intensitesi) yönünden, ilaç alan hasta fareler ile ilaç almayan hasta fareleri ve sağlıklı kontrol farelerini birbirleriyle karşılaştırıldığımızda, dalak ve lenf nodunda anlamlı bazı sonuçlara ulaştık. Bu sonuçlardan ilaç alan farelerle diğer iki grup arasında (ilaç almayan fareler ve sağlıklı kontrol fareleri) olanları, dalakta CD19+CD138+, CD19+CD138+kappa+, CD19+kappa+, CD19+lambda+ hücre sayıları idi. CD19+CD138+lambda+ hücre sayısı anlamlılığı ise sadece ilaç alan grupla sağlıklı kontrol grubu arasında bulundu. Ortalama CD138+ floresan intensitesi yönünden dalakta sağlıklı kontrol grubunun diğer iki gruptan anlamlı şekilde daha yüksek değere sahip olduğu bulundu. Lenf nodunda ise CD19+CD138+kappa+, CD19+kappa+ sayıları yönünden ilaç alan grup diğer iki gruptan anlamlı düşük değere sahip olarak belirlendi. Ayrıca yine lenf nodunda ilaç alan grup CD19+CD138+ hücre sayısı ve ortalama CD138+ floresan intensitesi yönünden ilaç almayan gruptan, CD19+CD138+lambda+ hücre sayısı yönünden sağlıklı kontrol grubundan anlamlı daha düşük değere sahipti. CD19+ hücre sayısı yönünden gruplar arasında dalakta ve lenf nodunda hiçbir anlamlı farklılık bulunmadı.

CD19+ hücrelerinin tüm B lenfositleri, CD138+ hücrelerinin ise antikor üretebilen B lenfositleri (plazma hücreleri) ve kappa ile lambdanın her immunoglobulinde üretilen tek tip hafif zinciri belirterek aktif antikor üreten hücreleri gösterdiğini göz önünde bulundurduğumuzda ve ayrıca ilaç alan grubun diğer gruplardan daha düşük değere sahip olmasını ilacın etkisine bağladığımızda; teriflunamidin etkisini total B lenfosit sayısını düşürmekten ziyade antikor üreten plazma hücre sayılarını düşürme suretiyle yaptığı düşünülebiliriz. Fakat ilaç kullanan ve kullanmayan fare grupları arasında immunoglobulinler açısından yaptığımız istatistiki incelemelerde bu bulguyla uyumlu bir farklılık bulmadık. Belki gözlem süremiz daha uzun olsaydı bu açıdan birbiriyle uyumlu bulgulara ulaşabilirdik.

Çalışmamızda, CD138+ ortalama floresan intensitesinin, dalakta ilaç alan ve almayan hasta fare gruplarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük ve lenf

nodunda ilaç almayan hasta grupta ilaç alana göre anlamlı daha yüksek olduğunu saptadık. CD138+ ortalama floresan intensitesinin bir hücrede görülen ortalama floresan aktivitesi olup ilgili antijenin ifadesini (ekspresyonunu) yansıttığını düşünerek ve son yıllarda yapılan yayınlara göre CD 138' in daha uzun yaşam süresine sahip plazma hücrelerinde, yeni gelişen plazma hücrelerine göre daha fazla ifade edildiğini aklımızda tutarak elde ettiğimiz bulguları değerlendirirsek, genel olarak hasta gruplarda yaşlı plazma hücre ifadesinin daha düşük (dalak) ve özellikle ilaç alan hasta grupta almayana göre daha düşük (lenf nodu) olduğu sonucuna varabiliriz (Mittag ve Tárnok, 2009; McCarron ve ark., 2017; Mizrahi ve ark., 2018). Kısa ömürlü, genç yani daha yeni üretilmiş plazma hücrelerinin IgM, tam olgunlaşmış, yaşlı olanların ise IgG ürettiği göz önüne alındığında bu sonuçların immunoglobulin tiplerine de yansıyabileceğini düşünüyoruz (Bortnick ve Allman, 2013; Nutt ve ark., 2015).

Nitekim farelerin serumlarında çalıştığımız anti-AChR antikorlarını deney modelimizin geliştiğini kanıtlama aracı olarak kullanmanın yanısıra immunoglobulin tiplerindeki değişiklikleri incelemek için de kullandık. Çalışma gruplarının immunoglobulin değerlerinin topluca grup düzeyinde gösterdiği değişiklikleri ve gruplardaki her bir farenin immunoglobulin değerlerinin zamansal değişimini incelediğimiz istatistiki değerlendirmeler sonucu ilginç verilere ulaştık.

Farelerin gruplar bazında immunoglobulin değerlerinin topluca değerlendirilip karşılaştırılmasında, hastalık modeli oluşturma işlemleri aşamasından sonra ilaç alan ve almayan hasta gruplarının her ikisinde de incelediğimiz tüm immunoglobulinler (IgG1, IgG2b, IgG3, IgM) yönünden sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik olduğunu saptamamız MG hastalık modelimizin geliştiğinin biyokimyasal olarak kanıtıdır. İlaç kullanımı öncesi immunoglobulinler yönünden hasta grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken beş haftalık ilaç kullanımı sonrası deneyimizin sonlanması ile yaptığımız incelemede, Ig G tipleri yönünden ilaç alan ve almayan hasta grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken; Ig M yönünden ilaç alan grupta, almayan gruba göre istatistiki olarak daha yüksek değerler saptanmıştır.

Her bir farenin immunoglobulin değerlerinin zamansal değişimini incelediğimiz istatistiki değerlendirmeler sonucunda ise zaman içerisinde (ilaç kullanma döneminin başı ve deneyin sonlandırılma aşaması arasında) iki gruptaki hasta farelerde son bakılan

immunoglobulin değerlerinin ilk bakılan değere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu. Ayrıca bu anlamlılık değerlerinin Ig G2b, IgG3 ve IgM yönünden her iki hasta grubunda aynı düzeylerde olduğu belirlendi. Fakat IgG1 düzeyi yönünden yapılan değerlendirmede ilaç kullanmayan hasta grubundaki değişikliğin, ilaç alan gruba göre daha fazla anlamlı olduğunu bulduk (ilaç alan grupta $p<0.05$, ilaç almayan grupta $p<0.001$). Başka bir deyişle teriflunamid kullanımı farelerde Ig G1 üretimini azaltır görünmektedir.

IgM düzeyindeki yükselmenin, daha önce bahsettiğimiz CD 138+ ortalama floresan intensitesinin hasta gruplarda ve özellikle ilaç alan hasta grupta saptanan düşüklüğünü yani daha fazla genç (başka deyişle daha az hafıza-memory plazma hücresi) ve dolayısıyla IgM üreten plazma hücre kapasitesi ile uyumluluk gösterdiğini düşünmekteyiz (Bortnick ve Allman, 2013; Nutt ve ark., 2015; Khodadadi ve ark., 2019). İlaç alan grupta ilaç almayan gruba göre saptadığımız daha iyi klinik durumun, ilaç alan grupta IgG1'in daha az düzeyde yükselmesine bağlayabiliriz. Ig G1 farelerde kompleman bağlamayan bir immunoglobulin olmakla birlikte, immunoglobulinlerin MG'de immunolojik etkilerini AChR'e direk bağlanmakla da gösterebildiği gözönünde bulundurulduğunda bu sonuca varmamızın akla yatkın olduğunu düşünüyoruz (Ey ve ark., 1979). Nitekim bu düşüncemiz MG patogeneğinde IgG1'in en önemli immunoglobulin olması ile uyumluluk göstermektedir (Lefvert ve ark., 1981; Rødgaard A ve ark., 1987).

Sonuç olarak çalışmamızda teriflunamidin farelerde MG hastalığında klinik olarak tedavi edici etkisi olduğunu ve hastalığın progresyonunu engellediğini bulduk. MG hastalığına neden olan aktif immun mekanizmanın AChR'ini hasarlayan antikorlar olduğu şeklindeki bilgilerimize dayanarak teriflunamidin daha çok reseptörlere karşı oluşan immunoglobulin tipini değiştirerek etki gösterdiğini bulduk. Teriflunamid kullanımı ile oluşan antikorların IgG tipinden IgM tipine kaydığını gözlemledik. Bir başka deyişle, teriflunamid Ig G oluşumu ile giden sekonder immuniteden, IgM oluşumu ile karakterize primer immuniteye doğru immunolojik cevapları değiştirmekte, yani sekonder immunitenin gelişmesini engellemektedir. Bu durumu ise muhtemelen yaşam süresi kısa plazma hücrelerinin antikor üretmesini sağlayarak, yani uzun yaşamış plazma (hafıza plazma) hücrelerinin oluşumunu veya aktifliğini azaltarak yaptığını düşünmekteyiz.

Nitekim anti MuSK antikoru ile geliştirilen MG modeli çalışmasında bildirilen, teriflunamidin etkisini memory B hücresi üzerine yaptığı inhibitor etkiyle gerçekleştirdiği sonucu ile bizim sonucumuz uyumluluk içerisinde (Yılmaz ve ark., 2020).

Ayrıca teriflunamid, dalak ve lenf nodu dokusunda inflamatuvar sitokinleri üreten T helper hücre sayılarını azaltıp sitokinleri etkileyerek edinsel (adaptif) immunité cevaplarının gelişimini azaltan bir zemin oluşturuyor gibi gözükmektedir. Bu sonuçlar MG’de etkilerini önceki sayfalarda tartıştığımız fingolimod, ATRA ve adenosin reseptörü agonisti ilaçla benzerdir (Li ve ark., 2012; Xie ve ark., 2013; Huang ve ark., 2018). Teriflunamid kullanımı ile dalak dokusunda IL-2, IL17A, IL22, IFN- gammanın, lenf nodu dokusunda ise GM-CSF, IL-22, IFN-gamma ifadelerinin anlamlı olarak azaldığını belirledik. Bu sitokinlerden IFN- gammayı en yaygın olarak etkilenmiş olarak bulduk. Bu sitokinin azalmasının, inflamatuvar ortamı azaltarak ve MHC-2 molekülü vasıtasıyla gerçekleşen antijen prezentasyonunu azaltarak MG hastalığında tedavi edici etkiye fayda sağlamış olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca yine IFN-gamma ile ilgili olarak fare modelimizde lenf nodu dokusunda IFN-gamma üreten sitotoksik T hücrelerinin düşmesi, hem IFN-gammanın, hem de sitotoksik T hücrelerinin MG hastalığı ile ilişkisini gösteren ilginç bir bulgu olduğu kanısındayız.

Timus dokusunda ise teriflunamid, T helper hücre sayısını düşürerek ve antijen prezentasyonunda görevli ligandları sunan hücre sayısını düşürerek etki gösterir gözükmektedir. Burada sitotoksik T hücrelerinde de bahsettiğimiz bu ligandı prezente eden hücre sayısındaki azalmanın, T helper hücreleri ile medire bir hastalık olarak bilinen MG’de sitotoksik T hücrelerinin de rolü olabileceğini göstermesi açısından ilginç bir bulgu olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamız, teriflunamidin inflamasyonu azaltmak, sitokin üreten T hücrelerinin sayılarını azaltıp immün cevapları baskılamak, antikor üreten plazma hücrelerinin sayısını azaltmak ve AChR’ye karşı oluşan antikor profilini değiştirmek gibi farklı mekanizmalarla MG fare modelinde klinik olarak fayda sağladığını göstererek insanlarda MG tedavisinde potansiyel bir ilaç olduğunu işaret etmesi açısından önemlidir. Bununla birlikte izlem süresinin uzatılması ve antikorların daha uzun süre takip edilmesi ile daha fazla bilgi edinmemiz mümkün olabilirdi. Ayrıca yine çalışmamız timus dokusunda daha ayrıntılı çalışma yapılması, hafıza (memory) B ve T hücrelerinin özellikle çalışılması gibi

parametrelerle daha güçlendirilebilirdi. Bütün bunlarla birlikte çalışmamız dalak, lenf nodu ve timus gibi üç farklı dokuda T ve B hücreler, sitokinler ve antikorları içeren incelemeleri kapsayan oldukça detaylı bir araştırma profiline sahiptir.

Çalışmamızın işaret ettiği üzere, teriflunamid immun sistemde yaygın etkisi ve yan etkilerinin düşüklüğü nedeniyle MG hastalarında kullanım için uygun bir aday olabilir. Bu ilacın etkinliği ve mekanizması ile ilgili yapılacak çalışmaların, ilacın klinikte kullanımını konusunda daha fazla bilgi verme açısından faydalı olacağını düşünüyoruz.

6. KAYNAKLAR

- Ademokun, A. A., & Dunn-Walters, D. Immune Responses: Primary and Secondary. In ELS. John Wiley & Sons, Ltd. 2010: 1-10. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000947.pub2>
- Ahrendt, M., Hammerschmidt, S. I., Pabst, O., Pabst, R., & Bode, U. Stromal Cells Confer Lymph Node-Specific Properties by Shaping a Unique Microenvironment Influencing Local Immune Responses. *J Immunol*, 2008; 181(3): 1898–1907. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1898>
- Almon, R. R., Andrew, C. G., & Appel, S. H. Serum Globulin in Myasthenia Gravis: Inhibition of agr-Bungarotoxin Binding to Acetylcholine Receptors. *Science*, 1974; 186(4158): 55–57. <https://doi.org/10.1126/science.186.4158.55>
- Amaldi I, Reith W, Berte C, & Mach B. Induction of HLA class II genes by IFN-gamma is transcriptional and requires a trans-acting protein. *J Immunol*, 1989; 142(3): 999–1004.
- Anderson, D., Phan, C., Johnston, W. S., & Siddiqi, Z. A. Rituximab in refractory myasthenia gravis: a prospective, open-label study with long-term follow-up. *Ann Clin Transl Neur*, 2016; 3(7): 552–555. <https://doi.org/10.1002/acn3.314>
- Baggi, F., Antozzi, C., Toscani, C., & Cordiglieri, C. Acetylcholine Receptor-Induced Experimental Myasthenia Gravis: What Have We Learned from Animal Models After Three Decades? *Arch Immunol Ther Exp*, 2012; 60(1): 19–30. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0158-6>
- Berman, P. W., & Patrick, J. Experimental myasthenia gravis. A murine system. *J Exp Med*, 1980a; 151(1): 204–223. <https://doi.org/10.1084/jem.151.1.204>

- Berman, P. W., & Patrick, J. Linkage between the frequency of muscular weakness and loci that regulate immune responsiveness in murine experimental myasthenia gravis. *J Exp Med*, 1980b; 152(3): 507–520. <https://doi.org/10.1084/jem.152.3.507>
- Berrih-Aknin, S., & le Panse, R. Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*, 2014; 52: 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.011>
- Biesecker G, & Gomez C M. Inhibition of acute passive transfer experimental autoimmune myasthenia gravis with Fab antibody to complement C6. *J Immunol*, 1989; 142(8): 2654–2659.
- Binks, S., Vincent, A., & Palace, J. Myasthenia gravis: a clinical-immunological update. *J Neurol*, 2016; 263(4): 826–834. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7963-5>
- Bortnick, A., & Allman, D. What Is and What Should Always Have Been: Long-Lived Plasma Cells Induced by T Cell–Independent Antigens. *J Immunol*, 2013; 190(12): 5913–5918. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300161>
- Bourgeois, C. A Role for CD40 Expression on CD8+ T Cells in the Generation of CD8+ T Cell Memory. *Science*, 2002; 297(5589): 2060–2063. <https://doi.org/10.1126/science.1072615>
- Brinkmann, V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther*, 2007; 115(1): 84–105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.006>
- Bronte, V., & Pittet, M. J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*, 2013; 39(5): 806–818. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.010>
- Buettner, M., & Bode, U. Lymph node dissection - understanding the immunological function of lymph nodes. *Clin Exp Immunol*, 2012; 169(3): 205–212. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04602.x>
- Cai, X., Li, Z., Xi, J., Song, H., Liu, J., Zhu, W., Guo, Y., & Jiao, Z. Myasthenia gravis and specific immunotherapy: monoclonal antibodies. *Ann N Y Acad Sci*, 2019; 1452(1): 18–33. <https://doi.org/10.1111/nyas.14195>
- Cardona, A., Pritsch, O., Dumas, G., Bach, J.-F., & Dighiero, G. Evidence for an antigen-driven selection process in human autoantibodies against acetylcholine receptor. *Mol Immunol*, 1995; 32(16): 1215–1223. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(95\)00101-8](https://doi.org/10.1016/0161-5890(95)00101-8)
- Carr, A. S., Cardwell, C. R., McCarron, P. O., & McConville, J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol*, 2010; 10(1): 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-46>

- Cetin, H., Beeson, D., Vincent, A., & Webster, R. The Structure, Function, and Physiology of the Fetal and Adult Acetylcholine Receptor in Muscle. *Front Mol Neurosci*, 2020; 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.581097>
- Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 125(2): S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chatzigeorgiou, A., Lyberi, M., Chatzilymperis, G., Nezos, A., & Kamper, E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *BioFactors*, 2009; 35(6): 474–483. <https://doi.org/10.1002/biof.62>
- Chen, X., Esplin, B. L., Garrett, K. P., Welner, R. S., Webb, C. F., & Kincade, P. W. Retinoids Accelerate B Lineage Lymphoid Differentiation. *J Immunol*, 2008; 180(1): 138–145. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.138>
- Christadoss, P., Poussin, M., & Deng, C. Animal Models of Myasthenia Gravis. *Clin Immunol*, 2000; 94(2): 75–87. <https://doi.org/10.1006/clim.1999.4807>
- Christadoss, P., Tüzün, E., Li, J., Saini, S. S., & Yang, H. Classical Complement Pathway in Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 2008; 1132(1): 210–219. <https://doi.org/10.1196/annals.1405.009>
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2013). Assessment report AUBAGIO International non-proprietary name: TERIFLUNOMIDE Procedure No. EMEA/H/C/002514/0000. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/aubagio-epar-public-assessment-report_en.pdf Erişim Tarihi: 12.05.2021
- Compston, D. A. S., Vincent, A., Newsom-Davis, J., & Batchelor, J. R. Clinical, Pathological, Hla Antigen And Immunological Evidence For Disease Heterogeneity In Myasthenia Gravis. *Brain*, 1980; 103(3): 579–601. <https://doi.org/10.1093/brain/103.3.579>
- Conti-tronconi, B. M., McLane, K. E., Raftery, M. A., Grando, S. A., & Protti, M. P. The Nicotinic Acetylcholine Receptor: Structure and Autoimmune Pathology. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1994; 29(2): 69–123. <https://doi.org/10.3109/10409239409086798>
- Cosi, V., Romani, A., Lombardi, M., Raiola, E., Bergamaschi, R., Piccolo, G., Citterio, A., & Berzuini, C. Prognosis of myasthenia gravis: a retrospective study of 380 patients. *J Neurol*, 1997; 244(9): 548–555. <https://doi.org/10.1007/s004150050142>
- Danikowski, K. M., Jayaraman, S., & Prabhakar, B. S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J Neuroinflammation*, 2017; 14(1): 117. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0892-8>

- Drachman, D. B., Angus, C. W., Adams, R. N., Michelson, J. D., & Hoffman, G. J. Myasthenic Antibodies Cross-Link Acetylcholine Receptors to Accelerate Degradation. *N Engl J Med*, 1978; 298(20): 1116–1122. <https://doi.org/10.1056/NEJM.197805182982004>
- Engel A G, Lambert E H, & Howard F M. Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clin Proc*, 1977; 52(5): 267–280.
- Engel, A. G., Sakakibara, H., Sahashi, K., Lindstrom, J. M., Lambert, E. H., & Lennon, V. A. Passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis: Sequential and quantitative study of the motor end-plate fine structure and ultrastructural localization of immune complexes (IgG and C3), and of the acetylcholine receptor. *Neurology*, 1979; 29(2): 179–179. <https://doi.org/10.1212/WNL.29.2.179>
- Ey, P. L., Prowse, S. J., & Jenkin, C. R. Complement-fixing IgG1 constitutes a new subclass of mouse IgG. *Nature*, 1979; 281(5731): 492–493. <https://doi.org/10.1038/281492a0>
- Fichtner, M. L., Jiang, R., Bourke, A., Nowak, R. J., & O'Connor, K. C. Autoimmune Pathology in Myasthenia Gravis Disease Subtypes Is Governed by Divergent Mechanisms of Immunopathology. *Front Immunol*, 2020; 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00776>
- Francisco-Cruz, A., Aguilar-Santelises, M., Ramos-Espinosa, O., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Barrios-Payan, J., & Hernandez-Pando, R. Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Oncol*, 2014; 31(1): 774. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0774-6>
- Fuchs, S., Nevo, D., Tarrab-Hazdai, R., & Yaar, I. Strain differences in the autoimmune response of mice to acetylcholine receptors. *Nature*, 1976; 263(5575): 329–330. <https://doi.org/10.1038/263329a0>
- Geha, R., & Notarangelo, L. Case Studies in Immunology: A Clinical Companion (C. Simpson, Ed.; 7th edition). W. W. Norton & Company. 2016: 227-231.
- Geissmann, F., Revy, P., Brousse, N., Lepelletier, Y., Folli, C., Durandy, A., Chambon, P., & Dy, M. Retinoids Regulate Survival and Antigen Presentation by Immature Dendritic Cells. *J Exp Med*, 2003; 198(4): 623–634. <https://doi.org/10.1084/jem.20030390>
- Gilhus, N. E., Romi, F., Hong, Y., & Skeie, G. O. Myasthenia gravis and infectious disease. *J Neurol*, 2018; 265(6): 1251–1258. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8751-9>

- Gilhus, N. E., Skeie, G. O., Romi, F., Lazaridis, K., Zisimopoulou, P., & Tzartos, S. Myasthenia gravis — autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol*, 2016; 12(5): 259–268. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.44>
- Gilli, F., Li, L., Royce, D. B., DiSano, K. D., & Pachner, A. R. Treatment of Theiler's virus-induced demyelinating disease with teriflunomide. *J Neurovirol*, 2017; 23(6): 825–838. <https://doi.org/10.1007/s13365-017-0570-8>
- Gotterer, L., & Li, Y. Maintenance immunosuppression in myasthenia gravis. *J Neurol Sci*, 2016; 369: 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.08.057>
- Gough, P., & Myles, I. A. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Front Immunol*, 2020; 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585880>
- Gradolatto, A., Nazzari, D., Truffault, F., Bismuth, J., Fadel, E., Foti, M., & Berrih-Aknin, S. Both Treg cells and Tconv cells are defective in the Myasthenia gravis thymus: Roles of IL-17 and TNF- α . *J Autoimmun*, 2014; 52: 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.015>
- Graus Y F, de Baets M H, Parren P W, Berrih-Aknin S, Wokke J, van Breda Vriesman P J, & Burton D R. Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived phage display libraries from myasthenia gravis patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies. *J Immunol*, 1997; 158: 1919–1929.
- Gregersen, P. K., Kosoy, R., Lee, A. T., Lamb, J., Sussman, J., McKee, D., Simpfendorfer, K. R., Pirskanen-Matell, R., Piehl, F., Pan-Hammarstrom, Q., Verschuuren, J. J. G. M., Titulaer, M. J., Niks, E. H., Marx, A., Ströbel, P., Tackenberg, B., Pütz, M., Maniaol, A., Elsaï, A., ... Seldin, M. F. Risk for myasthenia gravis maps to a ¹⁵¹ Pro→Ala change in TNIP1 and to human leukocyte antigen-B*08. *Ann Neurol*, 2012; 72(6): 927–935. <https://doi.org/10.1002/ana.23691>
- Gresser, I. Biologic Effects of Interferons. *Journal of Investigative Dermatology*, 1990; 95(6): 66–71. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12874776>
- Grewal, I. S., & Flavell, R. A. CD40 and CD154 In Cell-Mediated Immunity. *Annu Rev Immunol*, 1998; 16(1): 111–135. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.111>
- Grewal, I. S., Xu, J., & Flavell, R. A. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*, 1995; 378(6557): 617–620. <https://doi.org/10.1038/378617a0>

- Grob, D., Brunner, N., Namba, T., & Pagala, M. Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 2008; 37(2): 141–149. <https://doi.org/10.1002/mus.20950>
- Güner, U. (2012). Flow Sitometrinin Hidrobiyolojide Kullanımı. *Journal of Fisheries Sciences.Com.*, 2012; 6(1): 9-17. <https://doi.org/10.3153/jfscm.2012002>
- Ha, J. C., & Richman, D. P. Myasthenia gravis and related disorders: Pathology and molecular pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2015; 1852(4): 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.022>
- Hajjar, M., Markowitz, J., Darras, B. T., Kissel, J. T., Srinivasan, J., & Jones, H. R. Lambert-Eaton Syndrome, an Unrecognized Treatable Pediatric Neuromuscular Disorder: Three Patients and Literature Review. *Pediatr Neurol*, 2014; 50(1): 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.009>
- Hara H, Hayashi K, Ohta K, Itoh N, Nishitani H, & Ohta M. Detection and characterization of blocking-type anti-acetylcholine receptor antibodies in sera from patients with myasthenia gravis. *Clin Chem*, 1993; 39: 2053–2057.
- Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2008; 7(9): 759–770. <https://doi.org/10.1038/nrd2638>
- Heir, R., & Stellwagen, D. TNF-Mediated Homeostatic Synaptic Plasticity: From in vitro to in vivo Models. *Front Cell Neurosci*, 2020; 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.565841>
- Higuchi, O., Hamuro, J., Motomura, M., & Yamanashi, Y. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 2011; 69(2): 418–422. <https://doi.org/10.1002/ana.22312>
- Hoch, W., McConville, J., Helms, S., Newsom-Davis, J., Melms, A., & Vincent, A. Autoantibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*, 2001; 7(3): 365–368. <https://doi.org/10.1038/85520>
- Hohlfeld, R., & Wekerle, H. The role of the thymus in myasthenia gravis. *Adv Neuroimmunol*, 1994; 4(4): 373–386. [https://doi.org/10.1016/09605428\(94\)00040-U](https://doi.org/10.1016/09605428(94)00040-U)
- Howard, J. F. Myasthenia gravis: the role of complement at the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci*, 2018; 1412(1): 113–128. <https://doi.org/10.1111/nyas.13522>
- Huang, J., Zhang, T., Wang, H., & Zhao, Y. Treatment of experimental autoimmune myasthenia gravis rats with FTY720 and its effect on Th1/Th2 cells. *Mol Med Rep*, 2018; 17(5): 7409-7414. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8768>

- Hughes, B., de Casillas, M., & Kaminski, H. Pathophysiology of Myasthenia Gravis. *Semin Neurol*, 2004; 24(01): 21–30. <https://doi.org/10.1055/s-2004-829585>
- Iwata, M. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol*, 2003; 15(8): 1017–1025. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg101>
- Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., & Hiepe, F. The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Front Immunol*, 2019; 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00721>
- Kusner, L. L., le Panse, R., Losen, M., & Phillips, W. D. Animal Models of Myasthenia Gravis for Preclinical Evaluation. *Myasthenia Gravis and Related Disorders* 2018: 61–70. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73585-6_4
- Kusner, L. L., Losen, M., Vincent, A., Lindstrom, J., Tzartos, S., Lazaridis, K., & Martinez-Martinez, P. Guidelines for pre-clinical assessment of the acetylcholine receptor-specific passive transfer myasthenia gravis model—Recommendations for methods and experimental designs. *Exp Neurol*, 2015; 270: 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.025>
- Lee, K. M., Achuthan, A. A., & Hamilton, J. A. <p>GM-CSF: A Promising Target in Inflammation and Autoimmunity</p>. *ImmunoTargets and Therapy*, 2020; 9: 225–240. <https://doi.org/10.2147/ITT.S262566>
- Lefvert, A. K., Cuénoud, S., & Fulpius, B. W. Binding properties and subclass distribution of anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 1981; 1(1): 125–135. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(81\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0165-5728(81)90015-1)
- le Panse, R., Cizeron-Clairac, G., Cuvelier, M., Truffault, F., Bismuth, J., Nancy, P., de Rosbo, N. K., & Berrih-Aknin, S. Regulatory and Pathogenic Mechanisms in Human Autoimmune Myasthenia Gravis. *Ann N Y Acad Sci*, 2008; 1132(1): 135–142. <https://doi.org/10.1196/annals.1405.019>
- Lewis, S. M., Williams, A., & Eisenbarth, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol*, 2019; 4(33): eaau6085. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>
- Liao, W., Lin, J.-X., & Leonard, W. J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*, 2013; 38(1): 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>
- Lindstrom, J. Experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Ps*, 1980; 43(7): 568–576. <https://doi.org/10.1136/jnnp.43.7.568>

- Lindstrom, J. M., Seybold, M. E., Lennon, V. A., Whittingham, S., & Duane, D. D. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*, 1976; 26(11): 1054–1054. <https://doi.org/10.1212/WNL.26.11.1054>
- Link, H., & Xiao, B.-G. Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol Rev*, 2001; 184(1): 117–128. <https://doi.org/10.1034/j.1600065x.2001.1840111.x>
- Li, N., Mu, L., Wang, J., Zhang, J., Xie, X., Kong, Q., Tang, W., Yao, X., Liu, Y., Wang, L., Wang, G., Wang, D., Jin, L., Sun, B., & Li, H. Activation of the adenosine A2A receptor attenuates experimental autoimmune myasthenia gravis severity. *Eur J Immunol*, 2012; 42(5): 1140–1151. <https://doi.org/10.1002/eji.201142088>
- Li, N., Wang, G., Yao, X., Kong, Q., Shang, X., Xie, X., Wang, J., Kang, X., Jin, L., Wang, G., Li, H., Mu, L., & Sun, B. Adenosine receptor expression in a rat model of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Cell Immunol*, 2014; 290(2): 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.07.005>
- Losen, M., Martínez-Martínez, P., Phernambucq, M., Schuurman, J., Parren, P. W. H. I., & de Baets, M. H. Treatment of Myasthenia Gravis by Preventing Acetylcholine Receptor Modulation. *Ann N Y Acad Sci*, 2008; 1132(1): 174–179. <https://doi.org/10.1196/annals.1405.034>
- Loutrari, H., Kokla, A., & Tzartos, S. J. Passive transfer of experimental myasthenia gravis via antigenic modulation of acetylcholine receptor. *Eur J Immunol*, 1992; 22(9): 2449–2452. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220939>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Develop Immunol*, 2012; 2012: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Malek, T. R., & Castro, I. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity*, 2010; 33(2): 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.004>
- Mantegazza, R., Cordiglieri, C., Consonni, A., & Baggi, F. Animal models of myasthenia gravis: utility and limitations. *Int J Gen Med*, 2016; 9: 53–64. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S88552>
- Martino, G., DuPont, B. L., Wollmann, R. L., Bongioanni, P., Anastasi, J., Quintans, J., Arnason, B. G. W., & Grimaldi, L. M. E. The human-severe combined immunodeficiency myasthenic mouse model: A new approach for the study of myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 1993; 34(1): 48–56. <https://doi.org/10.1002/ana.410340110>

- Marx, A., Pfister, F., Schalke, B., Saruhan-Direskeneli, G., Melms, A., & Ströbel, P. The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmun Rev*, 2013; 12(9): 875–884. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.007>
- Marx, A., Porubsky, S., Belharazem, D., Saruhan-Direskeneli, G., Schalke, B., Ströbel, P., & Weis, C.-A. Thymoma related myasthenia gravis in humans and potential animal models. *Exp Neurol*, 2015; 270: 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.010>
- McCarron, M. J., Park, P. W., & Fooksman, D. R. CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. *Blood*, 2017; 129(20): 2749–2759. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-761643>
- Mittag, A., & Tárnok, A. Basics of standardization and calibration in cytometry - a review. *J Biophotonics*, 2009; 2(8–9): 470–481. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910033>
- Mizrahi, O., Ish Shalom, E., Baniyash, M., & Klieger, Y. (2018). Quantitative Flow Cytometry: Concerns and Recommendations in Clinic and Research. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 94(2), 211–218. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21515>
- Mora, J. R., Iwata, M., & von Andrian, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8(9): 685–698. <https://doi.org/10.1038/nri2378>
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., & Cheroutre, H. Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science*, 2007; 317(5835): 256–260. <https://doi.org/10.1126/science.1145697>
- Nicolle, M. W. Myasthenia Gravis and Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Muscle Neuromuscle Junc Dis*, 2016; 22(6): 1978–2005. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000415>
- Nolte, M. A., 't Hoen, E. N. M., van Stijn, A., Kraal, G., & Mebius, R. E. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. *Eur J Immunol*, 2000; 30(2): 626–634. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200002\)30:2<626::AID-IMMU626>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200002)30:2<626::AID-IMMU626>3.0.CO;2-H)
- Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*, 2015; 15(3): 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>

- Olson, R. J., Zettler, E. R., & Anderson, O. K. Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1989; 10(5): 636–643. <https://doi.org/10.1002/cyto.990100520>
- Patrick, J., Lindstrom, J., Culp, B., & Mcmillan, J. Studies on Purified Eel Acetylcholine Receptor and Anti-Acetylcholine Receptor Antibody. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1973; 70(12): 3334–3338. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3334>
- Pelz, A., Schaffert, H., Diallo, R., Hiepe, F., Meisel, A., & Kohler, S. S1P receptor antagonists fingolimod and siponimod do not improve the outcome of experimental autoimmune myasthenia gravis mice after disease onset. *Eur J Immunol*, 2018; 48(3): 498–508. <https://doi.org/10.1002/eji.201747187>
- Perusina Lanfranca, M., Lin, Y., Fang, J., Zou, W., & Frankel, T. Biological and pathological activities of interleukin-22. *J Mol Med*, 2016; 94(5): 523–534. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1391-6>
- Phillips, W. D., & Vincent, A. Pathogenesis of myasthenia gravis: update on disease types, models, and mechanisms. *F1000Research*, 2016; 5: 1513. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8206.1>
- Piddlesden, S. J., Jiang, S., Levin, J. L., Vincent, A., & Morgan, B. P. Soluble complement receptor 1 (sCR1) protects against experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 1996; 71(1–2): 173–177. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(96\)00144-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(96)00144-0)
- Pott, J., Mahlakoiv, T., Mordstein, M., Duerr, C. U., Michiels, T., Stockinger, S., Staeheli, P., & Hornef, M. W. IFN- determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2011; 108(19): 7944–7949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100552108>
- Ray, A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol*, 2016; 4(2): 121–130. <https://doi.org/10.15406/moji.2016.04.00121>
- Renton, A. E., Pliner, H. A., Provenzano, C., Evoli, A., Ricciardi, R., Nalls, M. A., Marangi, G., Abramzon, Y., Arepalli, S., Chong, S., Hernandez, D. G., Johnson, J. O., Bartoccioni, E., Scuderi, F., Maestri, M., Gibbs, J. R., Errichiello, E., Chiò, A., Restagno, G., ... Traynor, B. J. A Genome-Wide Association Study of Myasthenia Gravis. *JAMA Neurol*, 2015; 72(4): 396. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.4103>
- Rødgaard A, Nielsen F C, Djurup R, Somnier F, & Gammeltoft S. Acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: predominance of IgG subclasses 1 and 3. *Clin Exp Immunol*, 1987; 67(1): 82–88.

- Romi, F., Hong, Y., & Gilhus, N. E. Pathophysiology and immunological profile of myasthenia gravis and its subgroups. *Curr Opin Immunol*, 2017; 49: 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.006>
- Roxanis, I. Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis. *J Neuroimmunol*, 2002; 125(1–2): 185–197. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00038-3)
- Ruff, R. L., & Lennon, V. A. How myasthenia gravis alters the safety factor for neuromuscular transmission. *J Neuroimmunol*, 2008; 201–202: 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jneu.roim.2008.04.038>
- Sadegh-Nasseri, S., Chen, M., Narayan, K., & Bouvier, M. The convergent roles of tapasin and HLA-DM in antigen presentation. *Trends Immunol*, 2008; 29(3): 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.01.001>
- Safar, D., Berrih-Aknin, S., & Morel, E. In vitro anti-acetylcholine receptor antibody synthesis by myasthenia gravis patient lymphocytes: Correlations with thymic histology and thymic epithelial-cell interactions. *J Clin Immunol*, 1987; 7(3): 225–234. <https://doi.org/10.1007/BF00915728>
- Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B., & Nandi, D. Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon γ . *Cytokine*, 2010; 50(1): 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.11.021>
- Sainte-Marie, G. The Lymph Node Revisited: Development, Morphology, Functioning, and Role in Triggering Primary Immune Responses. *The Anatomical Record: Adv Integ Anat Evol Biol*, 2010; 293(2): 320–337. <https://doi.org/10.1002/ar.21051>
- Schaffert, H., Pelz, A., Saxena, A., Losen, M., Meisel, A., Thiel, A., & Kohler, S. IL-17-producing CD4⁺ T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol*, 2015; 45(5): 1339–1347. <https://doi.org/10.1002/eji.201445064>
- Shirayoshi, Y., Burke, P. A., Appella, E., & Ozato, K. Interferon-induced transcription of a major histocompatibility class I gene accompanies binding of inducible nuclear factors to the interferon consensus sequence. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1988; 85(16): 5884–5888. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.5884>
- Silvestri, N. J., & Wolfe, G. I. Treatment-Refractory Myasthenia Gravis. *J Clin Neuromuscular Disease*, 2014; 15(4): 167–178. <https://doi.org/10.1097/CND.000000000000034>
- Sims, G. P., Shiono, H., Willcox, N., & Stott, D. I. Somatic Hypermutation and Selection of B Cells in Thymic Germinal Centers Responding to Acetylcholine Receptor in

- Myasthenia Gravis. *J Immunol*, 2001; 167(4): 1935–1944. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1935>
- Skeie, G. O., Apostolski, S., Evoli, A., Gilhus, N. E., Illa, I., Harms, L., Hilton-Jones, D., Melms, A., Verschuuren, J., & Horge, H. W. Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol*, 2010; 17(7): 893–902. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03019.x>
- Smith, S. M., & Hayes, C. E. Contrasting impairments in IgM and IgG responses of vitamin A-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1987; 84(16): 5878–5882. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.16.5878>
- Sonkar, K. K., Bhoi, S. K., Dubey, D., Kalita, J., & Misra, U. K. Direct and indirect cost of myasthenia gravis: A prospective study from a tertiary care teaching hospital in India. *J Clin Neurosci*, 2017; 38: 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2016.11.003>
- Staber F G, Fink U, & Sack W. Letter: B lymphocytes in the thymus of patients with myasthenia gravis. *N Engl J Med*, 1975; 292(19): 1032–1033.
- Stathopoulos, P., Kumar, A., Nowak, R. J., & O'Connor, K. C. Autoantibody-producing plasmablasts after B cell depletion identified in muscle-specific kinase myasthenia gravis. *JCI Insight*, 2017; 2(17): e94263. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94263>
- Stickler, D. E., Massey, J. M., & Sanders, D. B. MuSK-antibody positive myasthenia gravis: Clinical and electrodiagnostic patterns. *Clin Neurophysiol*, 2005; 116(9): 2065–2068. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.06.003>
- Tay, N. Q., Lee, D. C. P., Chua, Y. L., Prabhu, N., Gascoigne, N. R. J., & Kemeny, D. M. CD40L Expression Allows CD8⁺ T Cells to Promote Their Own Expansion and Differentiation through Dendritic Cells. *Front Immunol*, 2017; 8: 1484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01484>
- Thapa, P., & Farber, D. L. The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thorac Surg Clin*, 2019; 29(2): 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.12.001>
- Toyka, K., Brachman, D., Pestronk, A., & Kao, I. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science*, 1975; 190(4212): 397–399. <https://doi.org/10.1126/science.1179220>
- Tsunemi, S., Iwasaki, T., Kitano, S., Imado, T., Miyazawa, K., & Sano, H. Effects of the novel immunosuppressant FTY720 in a murine rheumatoid arthritis model. *Clin Immunol*, 2010; 136(2): 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.03.428>
- Turley, S. J. Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells. *Science*, 2000; 288(5465): 522–527. <https://doi.org/10.1126/science.288.5465.522>

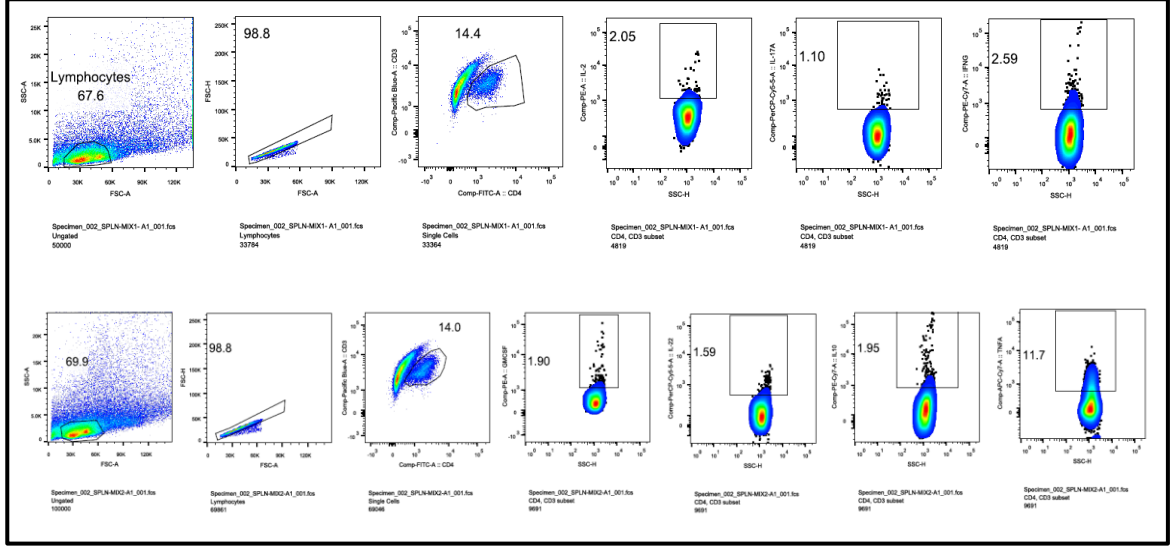
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *BBA-Mol Cell Res*, 2014; 1843(11): 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Tüzün, E. Musk-ilişkili myasthenia gravis'te antikor ve sitokin profili. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2017; 7(14): 39–49.
- Tuzun, E., Berrih-Aknin, S., Brenner, T., Kusner, L. L., le Panse, R., Yang, H., Tzartos, S., & Christadoss, P. Guidelines for standard preclinical experiments in the mouse model of myasthenia gravis induced by acetylcholine receptor immunization. *Exp Neurol*, 2015; 270: 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.009>
- Tüzün, E., & Christadoss, P. Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*, 2013; 12(9): 904–911. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.003>
- Tüzün, E., Scott, B. G., Yang, H., Wu, B., Goluszko, E., Guigneaux, M., Higgs, S., & Christadoss, P. Circulating Immune Complexes Augment Severity of Antibody-Mediated Myasthenia Gravis in Hypogammaglobulinemic RIIS/J Mice. *J Immunol*, 2004; 172(9): 5743–5752. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5743>
- Tzartos, S., Hochschwender, S., Vasquez, P., & Lindstrom, J. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol*, 1987; 15(2): 185–194. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(87\)90092-0](https://doi.org/10.1016/0165-5728(87)90092-0)
- Tzartos S J, Morel E, Efthimiadis A, Bustarret A F, D'Anglejan J, Drosos A A, & Moutsopoulos H A. Fine antigenic specificities of antibodies in sera from patients with D-penicillamine-induced myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol*, 1988; 74(1): 80–86.
- Verschuuren, J. J. G. M., Huijbers, M. G., Plomp, J. J., Niks, E. H., Molenaar, P. C., Martinez-Martinez, P., Gomez, A. M., de Baets, M. H., & Losen, M. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmun Rev*, 2013; 12(9): 918–923. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.001>
- Vincent, A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol*, 2002; 2(10): 797–804. <https://doi.org/10.1038/nri916>
- Vincent, A., & Willcox, N. Characterization of specific T cells in myasthenia gravis. *Immunol Today*, 1994; 15(1): 41–42. [https://doi.org/10.1016/01675699\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/01675699(94)90027-2)

- Vincent A, & Newsom-Davis J. Disorders of Neuromuscular Transmission. In *Texto baseado no livro-texto Cecil (Medicina, 2007) 2007*; pp 1-16.
- Wack, A., Terczyńska-Dyla, E., & Hartmann, R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat Immunol*, 2015; 16(8): 802–809. <https://doi.org/10.1038/ni.3212>
- Wang, L., Huan, X., Xi, J.-Y., Wu, H., Zhou, L., Lu, J.-H., Zhang, T.-S., & Zhao, C.-B. Immunosuppressive and monoclonal antibody treatment for myasthenia gravis: A network meta-analysis. *CNS Neurosci Ther*, 2019; 25(5): 647–658. <https://doi.org/10.1111/cns.13110>
- Wang, W., Milani, M., Ostlie, N., Okita, D., Agarwal, R. K., Caspi, R., & Conti-Fine, B. M. C57BL/6 Mice Genetically Deficient in IL-12/IL-23 and IFN- γ Are Susceptible to Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis, Suggesting a Pathogenic Role of Non-Th1 Cells. *J Immunol*, 2007; 178(11): 7072–7080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.7072>
- Wang, X., Allen, C., & Ballow, M. Retinoic Acid Enhances the Production of IL-10 While Reducing the Synthesis of IL-12 and TNF- α from LPS-Stimulated Monocytes/Macrophages. *J Clin Immunol*, 2007; 27(2): 193–200. <https://doi.org/10.1007/s10875-006-9068-5>
- Wang, Z.-Y., Karachunski, P. I., Howard, J. F., & Conti-Fine, B. M. Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: Role of CD4 and CD8 cells. *Neurology*, 1999; 52(3): 484–484. <https://doi.org/10.1212/WNL.52.3.484>
- Whiting, P., Vincent, A., & Newsom-Davis, J. Monoclonal antibodies to Torpedo acetylcholine receptor. Characterisation of antigenic determinants within the cholinergic binding site. *Eur J Biochem*, 1985; 150(3): 533–539. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09054.x>
- Wolfe, G. I., Kaminski, H. J., Aban, I. B., Minisman, G., Kuo, H.-C., Marx, A., Ströbel, P., Mazia, C., Oger, J., Cea, J. G., Heckmann, J. M., Evoli, A., Nix, W., Ciafaloni, E., Antonini, G., Witoonpanich, R., King, J. O., Beydoun, S. R., Chalk, C. H., ... Cutter, G. R. Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*, 2016; 375(6): 511–522. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602489>
- Wu, B., Goluszko, E., & Christadoss, P. (2001). Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in the Mouse. *Curr Prot Immunol*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1508s21>
- Xie, X., Mu, L., Yao, X., Li, N., Sun, B., Li, Y., Zhan, X., Wang, X., Kang, X., Wang, J., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, G., Wang, D., Liu, X., Kong, Q., & Li, H. ATRA alters humoral responses associated with amelioration of EAMG symptoms by

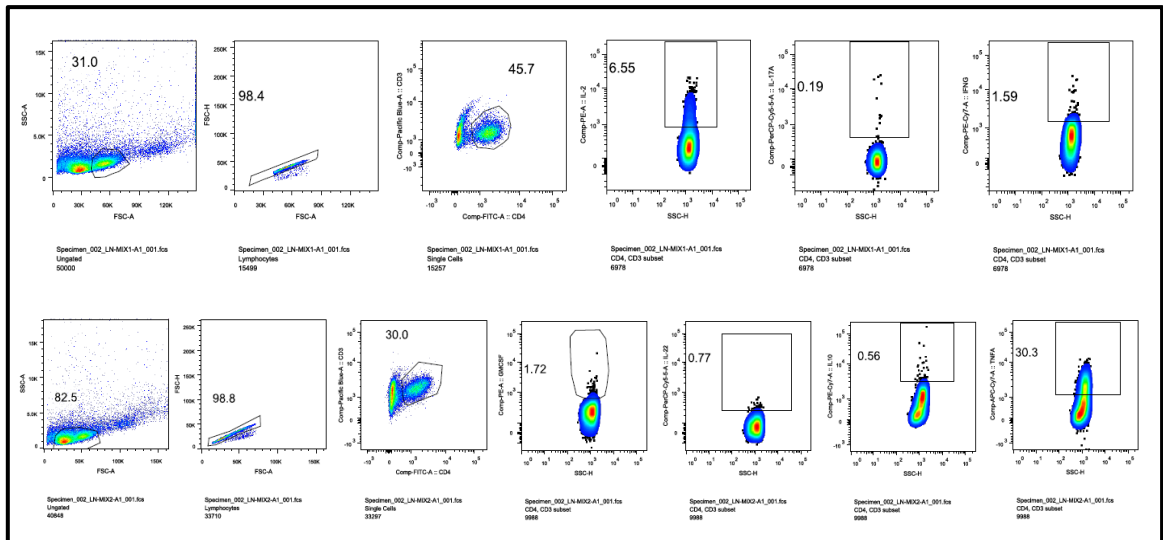
- balancing Tfh/Tfr helper cell profiles. *Clin Immunol*, 2013; 148(2): 162–176. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.05.009>
- Yilmaz, V., Ulusoy, C., Hajtovic, S., Turkoglu, R., Kurtuncu, M., Tzartos, J., Lazaridis, K., & Tuzun, E. Effects of Teriflunomide on B Cell Subsets in MuSK-Induced Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis and Multiple Sclerosis. *Immunol Invest*, 2020; 1–14. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1785491>
- Zenobia, C., & Hajishengallis, G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontology* 2000, 69(1): 142–159. <https://doi.org/10.1111/prd.12083>
- Zinkernagel, R. M., & Doherty, P. C. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today*, 1997; 18(1): 14–17. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)80008-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)80008-4)
- Zisimopoulou, P., Evangelakou, P., Tzartos, J., Lazaridis, K., Zouvelou, V., Mantegazza, R., Antozzi, C., Andreetta, F., Evoli, A., Deymeer, F., Saruhan-Direskeneli, G., Durmus, H., Brenner T., Vaknin A., Berrih-Aknin S., Frenkian Cuvelier M., Stojkovic T., DeBaets M., ..., Tzartos S. J. A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. *J Autoimmun*, 2014; 52: 139-145.

EKLER

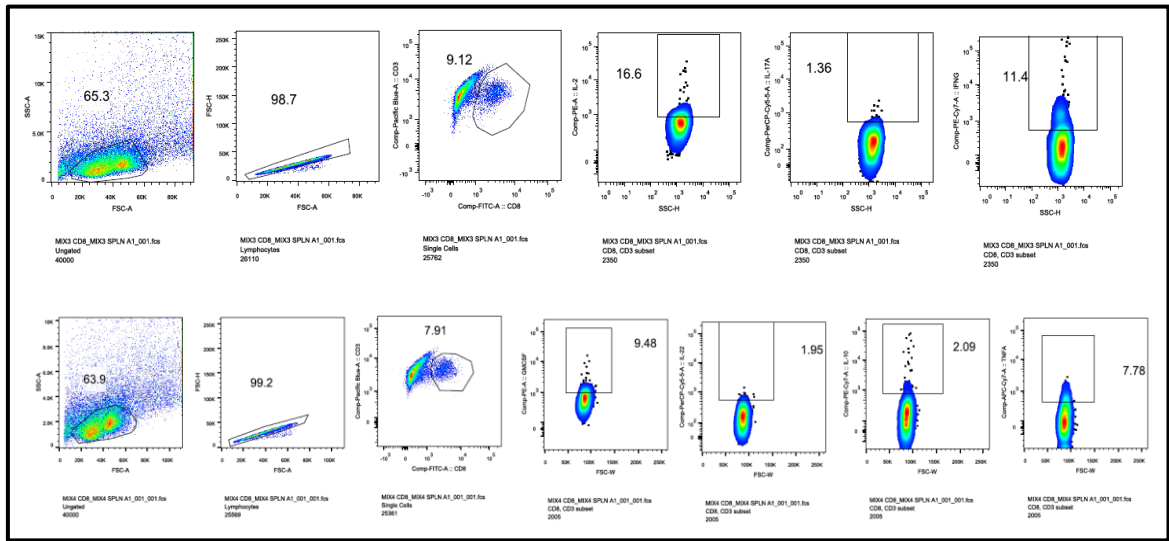
EK1. AKIM SİTOMETRİ CİHAZI VERİLERİ



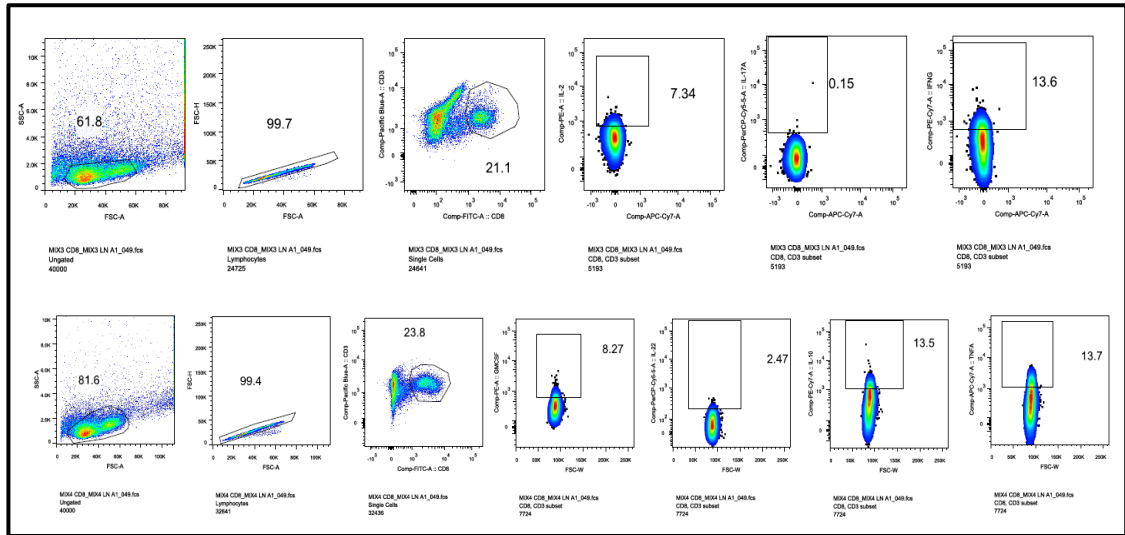
Şekil Ek.1. 1. Dalak dokusunda bir fareye ait toplam T helper (T4) ve çeşitli sitokin salgılayan T helper hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler



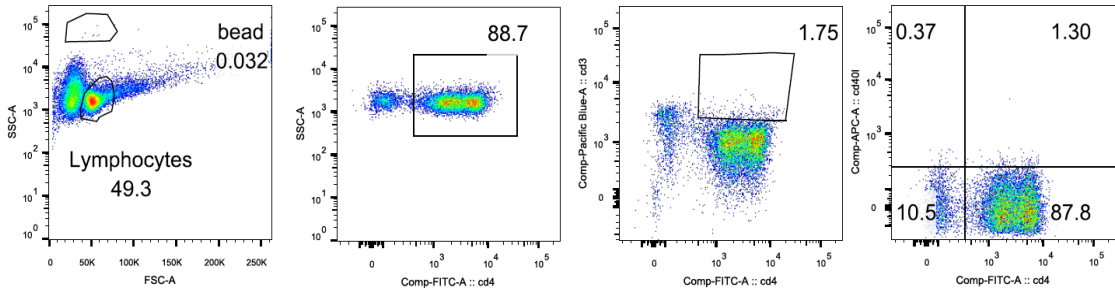
Şekil Ek.1. 2. Lenf nodu dokusunda bir fareye ait toplam T helper (T4) ve çeşitli sitokin salgılayan T helper hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler



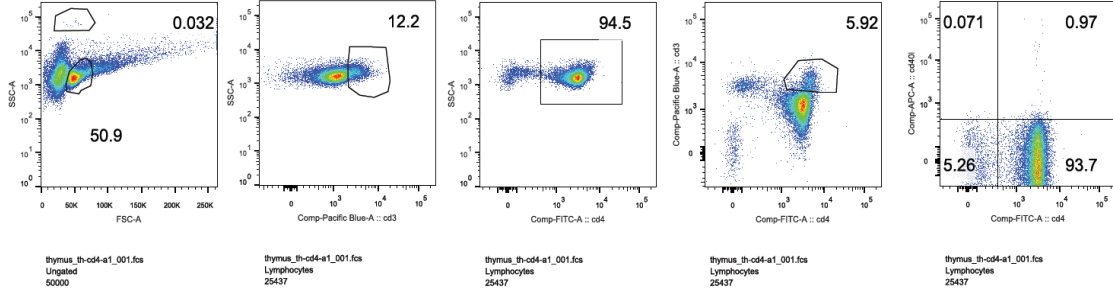
Şekil Ek.1. 3. Dalak dokusunda bir fareye ait toplam sitotoksik T (T8) ve çeşitli sitokin salgılayan sitotoksik T hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler



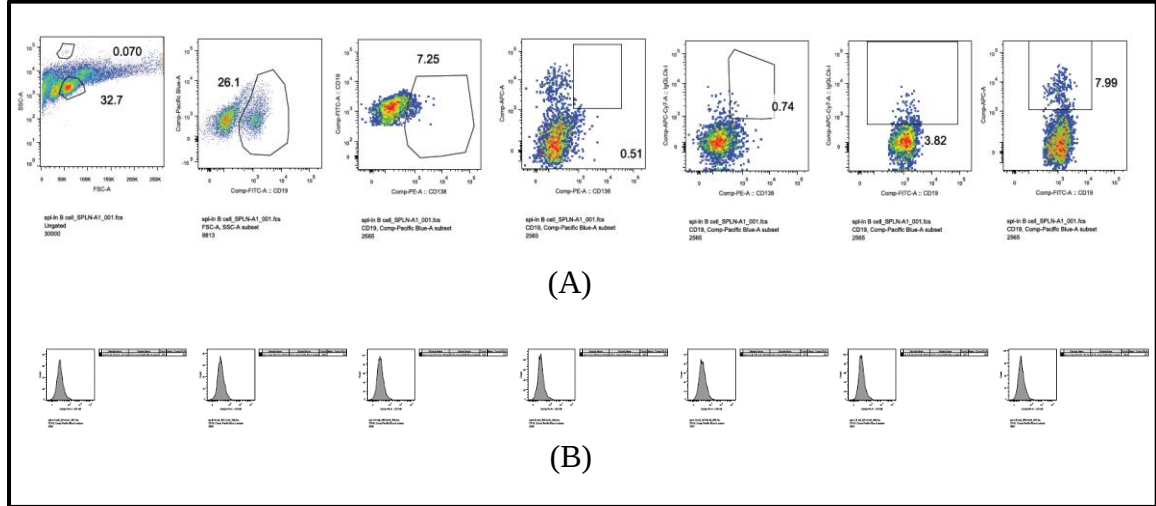
Şekil Ek.1. 4. Lenf nodu dokusunda bir fareye ait toplam sitotoksik T (T8) ve çeşitli sitokin salgılayan sitotoksik T hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler



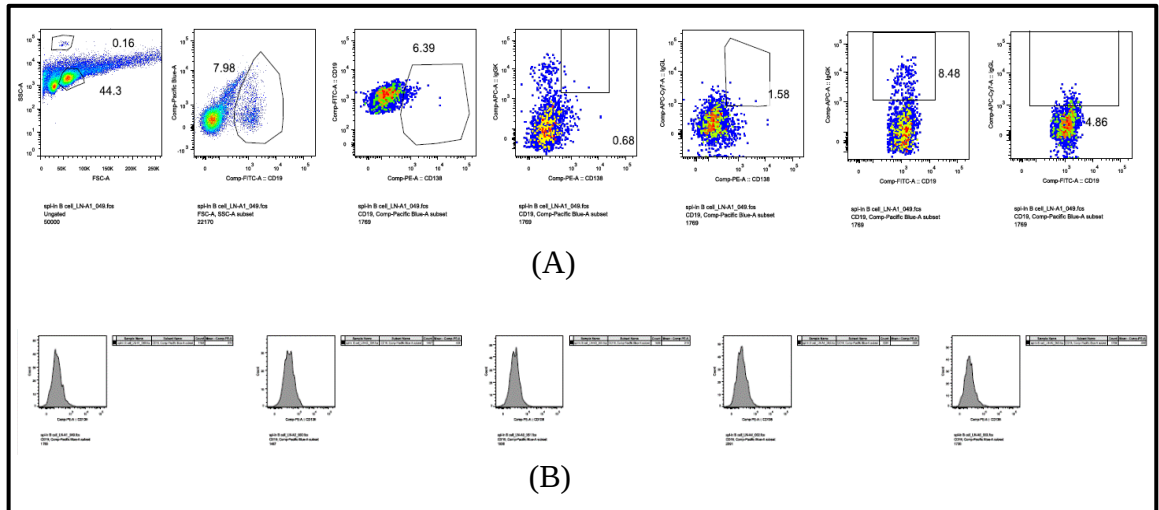
Şekil Ek.1. 5. Timus dokusunda bir fareye ait toplam sitotoksik T hücreleri (T8) ve çeşitli tipte sitotoksik T hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler



Şekil Ek.1. 6. Timus dokusunda bir fareye ait toplam T helper (T4) ve çeşitli tipte T helper hücrelerini gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler



Şekil Ek.1. 7. Dalak dokusunda bir fareye ait toplam B hücreleri, çeşitli tipleri (A) ve CD138+ B hücreleri ortalama floresan intensitesini (B)gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler



Şekil Ek.1. 8. Lenf nodu dokusunda bir fareye ait toplam B hücreleri, çeşitli tipleri (A) ve CD138+ B hücreleri ortalama floresan intensitesini (B)gösteren akım sitometri sonuçları, kapılama stratejilerini gösteren örnek grafikler.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emel KÖSEOĞLU
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : Ankara
Medeni Durumu : Evli
E-mail : emelk@erciyes.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tar.
Profesör	Erciyes Üniversitesi	2010
Doçent	YÖK, ÜAK	2005
Uzmanlık	Erciyes Üni. Tıp Fak.	1998
Yüksek Lisans	Hacettepe Üni. Tıp Fak. (İngilizce)	1993
Lise	19 Mayıs Lisesi, Samsun	1986

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2010-2019	Erciyes Üni. Tıp Fak. Nöroloji AD.	Prof. Dr.
2005-2010	Erciyes Üni. Tıp Fak. Nöroloji AD.	Doç. Dr.
2000-2005	Erciyes Üni. Tıp Fak. Nöroloji AD.	Yrd. Doç. Dr.
1998-2000	Erciyes Üni. Tıp Fak. Nöroloji AD.	Öğrt. Gör. Dr.
1994-1998	Erciyes Üni. Tıp Fak. Nöroloji AD.	Araştırma Gör. Dr.

YABANCI DİL

İngilizce (İleri düzey), Almanca (Orta düzey)

YAYINLAR

Publications in SCI indexed journals

1. Mirza M, Tutuş A, Erdoğan F, Kula M, Tomar A, Silov G, **Koseoglu E**, “Interiktal SPECT with Tc-99m HMPAO Studies in Migraine Patients,” *Acta Neurol Belg.*, **98**, 190-194 (1998).

2. **Koseoglu E**, Karaman Y, “Auditory Event Related Potentials Relate with The Clinical Progression in Idiopathic Generalized Epilepsy,” *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.*, **41**, 53-57 (2001).
3. **Koseoglu E**, Akboyraz A, Soyuer A, Ersoy AÖ, “Aerobic Exercise and Plasma Beta Endorphin Levels in Patients with Migrainous Headache without Aura,” *Cephalalgia*, **23**, 972-976 (2003).
4. **Koseoglu E**, Naçar M, Talaslıoğlu A, Çetinkaya F, “Epidemiological and Clinical Characteristics of Migraine and Tension Type Headache in 1146 Females in Kayseri, Turkey,” *Cephalalgia*, **23**, 381-388 (2003).
5. Köseoğlu, R, **Koseoglu E**, Köksal F, “Electron Paramagnetic Resonance of some γ -Irradiated Drugs,” *Appl. Radiat. Isot.*, **58**, 63-68 (2003).
6. Karaman Y, Erdoğan F, **Koseoglu E**, Turan T., Ersoy A. Ö., “A 12-Month Study of the Efficacy of Rivastigmine in Patients with Advanced Moderate Alzheimer’s Disease,” *Dement Geriatr Cogn Disord*, **19**, 51-56 (2005).
7. Külahlı İ, Balcı K, **Koseoglu E**, Yüce İ., Çağlı S., Şentürk M., “Audio-vestibular disturbances in Behcet’s patients: report of 62 cases,” *Hearing Research*, **203**, 28-31 (2005).
8. **Koseoglu E**, Karaman Y, Küçük S and Arman F, “SUNCT syndrome associated with compression of trigeminal nerve,” *Cephalalgia*, **25**, 473-475 (2005).
9. Kulahlı I, Balci K, **Koseoglu E**, Yuce I, Cagli S, Senturk M, “Audio-vestibular disturbances in Behcet’s patients: report of 62 cases,” *Hearing Research*, **203**, 28-31 (2005).
10. Koseoglu R, **Koseoglu E**, Koksall F, Basaran E, Demirci D, “EPR of some irradiated renal stones”, *Radiation Measurements*, **40** (1), 65-68 (2005).
11. **Koseoglu E**, Karaman Y, “Relations between homocysteine, folate and vitamin B12 in vascular dementia and in Alzheimer disease”, *Clinical Biochemistry*, **40**, 859–863 (2007).
12. Ascioglu M, Arslan M, Suer C, Ozesmi C, Borlu M, Ascioglu O, Coskun A, Gonul AS, **Koseoglu E**, “P50 variations in Behçet’s patients without neurologic findings”, *Neurosciences*, **12**(1), 50-52 (2007).
13. **Koseoglu E**, Talaslioglu A, Gonul AS, Kula M, “The effects of magnesium prophylaxis in migraine without aura”, *Magnesium Research*, **21**(2), 101-108 (2008).

14. Dunder M, Erkiliç K, Argun M, Caglayan AO, Comeglio P, **Koseoglu E**, Matyas G, Child AH, “*Scoliosis, blindness and arachnodactyly in a large Turkish family: Is it a new syndrome?* ”, *Genetic Counseling*, **19 (3)**, 319-330 (2008).
15. **Koseoglu E**, Yazar S, Koç I, “Is Toxoplasma gondii a causal agent in migraine?”, *The American Journal of the Medical Sciences*, **338 (2)**, 120-122, (2009).
16. **Koseoglu E**, S. Kuçuk, F. Arman, A.O. Ersoy, “Factors that affect interictal cardiovascular autonomic dysfunction in temporal lobe epilepsy: Role of hippocampal sclerosis”, *Epilepsy and Behavior*, **16**, 617-621, (2009).
17. **Koseoglu E**, A. Yildirim, M.Borlu, “Headache and silent neurologic involvement in Behçet Disease”, *Clinical and Experimental Rheumatology*, **Suppl 67**; S32-37, (2011).
18. **Turnep Study Group including Koseoglu E**, “Prevalance of peripheral neuropathy and painful peripheral neuropathy in Turkish diabetic patients”, *Journal of Clinical Neurophysiology*, **28 (1)**: 51-54, (2011).
19. Mrabet H, Borhani-Haghighi A, **Koseoglu E**, Mutlu M, Baydemir R, Nafissi S, Eschebbi S, Delibas E, Samangoie S, Yetkin F, Mraber A, Parman Y, Heydarari ST, Akman-Demir G. “Association of amyotrophic lateral sclerosis and Behcet’s disease: Is there a relationship? A multinational case series”, *Clinical Rheumatology*, **31 (4)**: 733-8, (2012).
20. Canpolat M, Kumandas S, Yıkılmaz A, Gumus H, **Koseoglu E**, Poyrazoglu HG, Kose M, Per H. “Transverse myelitis and acute motor sensory axonal neuropathy due to Legionella pneumophila: A case report”, *Pediatric International*, **55 (6)**: 778-82, (2013).
21. **Koseoglu E**, Yetkin MF, Ugur F, Bilgen M. “The role of exercise in migraine treatment”, *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, **55 (9)**:1029-36 (2015).
22. Ertekin T, N. Acer, **Koseoglu E**, G. Zararsız, A. Sonmez, K. Gümüş, E. Kurdoglu. “Total cranial and lateral ventricle volume measurement in Alzheimer’s Disease: A methodological study”, *Journal of Clinical Neuroscience*, **34**: 133-139 (2016).
23. **Koseoglu E**, R. Koseoglu, M. Kendirci, R. Saraymen, B. Saraymen, “Trace metal concentrations in hair and nails from Alzheimer's disease patients: relations with clinical severity”, *Trace Elements in Biology and Medicine*, **39**: 124-128 (2017).

24. **Koseoglu, E**, F. Tepgec, MF Yetkin, O Uyguner, A Ekinici, U Abdulrezzak, H Hanagasi. “Nasu Hakola Disease: A Rare Cause of Dementia and Cystic Bone Lesions, Report of a New Turkish Family” *Arch. Neuropsychiatry*, **55**: 98-102 (2018).
25. Gokyigit, MC., H. Ekmekci, H. Durmus, N. Karli, **Koseoglu E**, F. Aysal and the other members of Turkish Study Group for Late Onset Pompe Disease. “A database for screening and registering late onset Pompe disease in Turkey” *Neuromuscular Disorders*, **28** (3): 262-267 (2018).
26. Allard DE, Wang Y, Li JJ, Conley B, Xu EW, Sailer D, Kimpston C, Notini R, Smith CJ, **Koseoglu E**, Starmer J, Zeng XL, Howard JF Jr, Hoke A, Scherer SS, Su MA. “Schwann cell-derived periostin promotes autoimmune peripheral polyneuropathy via macrophage recruitment” *J Clin Invest.*, 128 (10): 4727-4741 (2018).
27. Salt O, Baykan N, Kaymaz ND, Yakar S, Donmez S, Donmez H, **Koseoglu E**, Durukan P. “Evaluation of Patients with Ischemic Stroke Receiving iv t-PA in the Emergency Department”. *Eurasian J Emerg Med.*, 17: 50-54 (2018).
28. Kocaman H, Acer N, **Koseoglu E**, Gültekin M, Dönmez H. “Evaluation of intracerebral ventricles volume of patients with Parkinson's disease using the atlas-based method: A methodological study”. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 98: 124-130 (2019).
29. **Koseoglu E**. “New treatment modalities in Alzheimer's disease” *World J Clin Cases*, 7(14): 1732-1907 (2019).
30. **Koseoglu E**, Kutuk B, Nalbantoglu OU, Koseoglu R, Kendirci M. “Arsenic and selenium measurements in nail and hair show important relationships to Alzheimer’s Disease in the elderly”. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 64:126684 Doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126684 (2020).

Uluslararası Kitap Bölüm Yazarlığı

1. **Koseoglu E**. The Mechanisms of Vascular Thrombosis in Behcet’s Disease. SMGroup Books. Behcet’s Disease - A Compilation of Recent Research and Review Studies. www.smgebooks.com, 2016, pages 1-10.
2. **Koseoglu E**. The relations between the vitamins and Alzheimer Disease, Editor: Suzanne M.De La Monte, “Alzheimer’s Disease Pathogenesis-Core Concepts,

Shifting Paradigms and Therapeutic Targets. InTech-Open Access Publisher, **2011**, Chapter 21, pp 497-519. Hard copy ISBN: 978-953-307-690-4.

3. **Koseoglu E.** What are the roles of vitamins in vascular dementia? Editor: Sarah R. Jacobsen. "Vascular Dementia: Risk factors, Diagnosis and Treatment". Novapublisher, **2011**, Chapter 5, pp 129-149. ISBN: 978-1-61122-313-2.