

HANDE YÜCEER

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019



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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NARKOLEPSİYE ÖZGÜ OTOANTİKORLARIN
İMMÜNOPRESİPİTASYON VE KÜTLE
SPEKTROFOTOMETRE İLE TANIMLANMASI VE
VALİDASYONU**

HANDE YÜCEER

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. CEM İSMAİL KÜÇÜKALİ**

**SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
SİNİRBİLİM TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, Sinirbilim Programında Yüksek Lisans öğrencisi Hande YÜCEER tarafından Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ'nin danışmanlığında hazırlanan "Narkolepsiye Özgü Otoantikorların İmmünopresipitasyon ve Kütle Spektrofotometre İle Tanımlanması ve Validasyonu" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 18/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri-Danışman

Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı



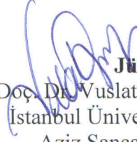
Jüri

Prof. Dr. Erdem TÜZÜN
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Vuslat YILMAZ
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Sinirbilim Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Erdinç DURSUN
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Gülçin BENBİR
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı
Uyku Laboratuvarı



BEYAN**BEYAN**

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

Hande YÜCEER



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Hayatımın her alanında desteğini hep yanımda hissettiğim, yaşamıma yön veren, bilimsel kariyerimin önünü açan, enerjisiyle bölümümüze ve hayatıma renk katan, ömür boyu minnet borcu taşıyacağım, biricik danışman hocam Doç. Dr. Cem İsmail Küçükali'ye ne kadar teşekkür etsem azdır.

Tez çalışmamın işleyişinde, elde ettiğim sonuçların yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen, aklımıza takılan tüm bilimsel soruları “harika” bir şekilde yanıtlayan ve bize akademik anlamda her daim ilham veren bölüm başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Erdem Tüzün'e çok teşekkür ederim.

Tezimin validasyon deneylerinin planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi başta olmak üzere her aşamasında bana destek olan, yoğun programına rağmen her daim sorularımızı cevaplayan ve tecrübelerini paylaşan sayın hocam Doç. Dr. Vuslat Yılmaz'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Çalışmamın immünopresipitasyon kısmındaki destekleri ve tez sürecim boyunca paylaştıkları deneyimleri için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyoloji bölümünden hocalarım sayın Doç. Dr. Erdiñ Dursun ve Doç. Dr. Duygu Gezen Ak'a teşekkür ederim.

Tezimde çalışılacak hastaların seçiminde ve hastalarla ilgili verilerin toplanmasındaki yardımları için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Uyku Laboratuvarı'ndan sayın Doç. Dr. Gülçin Benbir Şenel'e teşekkür ederim.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyoloji öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Murat Kasap ve Doç. Dr. Gürler Akpınar'a tezimin kütle spektrofotometre aşamasındaki destekleri için teşekkür ederim.

Sinirbilim yolculuğumun başlamasına öncü olan, bilimsel hayallerimi filizlendiren, akademik anlamda yaşayan bir efsane olmasının yanında incelikli ruhuyla hayran bıraktıran, tüm sorularımı her daim alçak gönüllülükle yanıtlayan, tanımaktan dolayı her zaman onur duyacağım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Öget Öktem'e sonsuz minnetlerimi sunarım.

Tez sürecimde ve bölümde karşılaştığım her türlü problemin çözümünde yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen Sinirbilim ailesinin sevgili üyeleri Zerrin Karaaslan, Ece Akbayır, Berrak Yetimler, Canan Ulusoy ve akademik hayatımın en başından itibaren her anını paylaştığım, nice maceralar yaşadığım ve daha nicelerine birlikte atılmayı umduğum yol arkadaşım Elif Şanlı'ya teşekkür ederim.

Tez dönemimde verdiği destek için tatlı ve düşünceli arkadaşım Merve Mavral'a ve her koşulda yanımda olan, bana değer veren, hayatıma anlam katan tüm sevdiklerime özel teşekkürlerimi sunarım.

Başarabileceklerimle ilgili bana cesaret veren, bütün eğitim hayatım boyunca koşulsuz maddi ve manevi destek sağlayan, tüm başarılarımı benimle coşkuyla yaşayıp hayal kırıklıklarımı ve üzüntülerimi hafifleten, bana dünyanın en güvenli, şefkatli ve huzurlu ortamını sunan, hayattaki en büyük şansım olan canım annem, babam, abim, anneannem ve dedeme sonsuz teşekkür ederim.

TÜBİTAK 2211 Yurtiçi Lisansüstü Burs Programına desteği için teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33590

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	7
TABLolar LİSTESİ.....	10
ŞEKİLLER LİSTESİ	11
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	13
ÖZET	18
ABSTRACT.....	19
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	20
2. GENEL BİLGİLER	23
2.1. Narkolepsi	23
2.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji.....	23
2.2. Narkolepsinin Klinik Özellikleri.....	24
2.2.1. Uyku Hali ve Artmış Gündüz Uykuluğu	24
2.2.2. Katapleksi.....	24
2.2.3. Hipnagogik ve Hipnapompik Halüsinasyonlar	26
2.2.4. Uyku Paralizisi.....	26
2.2.5. Kesintili Gece Uykusu	26
2.2.6. Diğer Semptomlar	27
2.3. Narkolepsi Tanısı	27
2.3.1. Tanısal Değerlendirme	27
2.3.1.1. Polisomnografi ve Çoklu Uyku Latansı Testleri.....	27
2.3.1.2. BOS Hipokretin Düzeyi Ölçümü	28
2.3.1.3. HLA-DQB1*06:02 Analizi.....	28
2.3.2. Tanı Kriterleri ve Hastalık Altıpleri.....	28
2.4. Narkolepsi Tedavisi	30
2.5. Narkolepsi Etyopatogenezi	31
2.5.1. Uyku-Uyanıklık Mekanizmaları	31

2.5.1.1. Uyku Evreleri	31
2.5.1.2. Uyku Nörobiyolojisi.....	33
2.5.2. Hipokretin/Oreksin.....	35
2.5.3. Genetik Mekanizmalar	39
2.5.4. Çevresel Faktörler	39
2.5.5. İmmün Mekanizmalar	40
2.5.5.1. Doğal İmmünite	40
<i>Kompleman Sistemi</i>	41
2.5.5.2. Edinsel İmmünite	44
<i>B Lenfositleri ve Antikorlar</i>	44
<i>T Lenfositleri</i>	45
2.5.5.3. Narkolepsi ve İmmünite	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
3.1. Olguların Seçimi	50
3.2. Numune Alımı	51
3.3. İmmünopresipitasyon.....	51
3.3.1. Hücre Kültürü	51
3.3.2. Bead Hazırlanması	52
3.3.3. Ön Temizleme İşlemi.....	52
3.3.4. İP Protokolü	52
3.4. Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS)	52
3.4.1. Proteinlerin Ekstraksiyonu.....	53
3.4.2. Konsantrasyon Tayini	53
3.4.3. Solüsyon Tripsin Kesimi ve Guanidizasyon.....	53
3.4.4. Sıvı Kromatografisi (LC)	53
3.4.5. Veri Analizi ve Protein Tanımlama	54
3.5. Aday Protein Validasyon Çalışmaları.....	55
3.5.1. Serumda C4BPA Protein Düzeyinin Belirlenmesi	55
3.5.2. Serumda Anti-C4BPA Antikorlarının Gösterilmesi	56
3.6. İstatistik.....	58
4. BULGULAR.....	59
4.1. Demografik ve Klinik Bilgiler	59
4.2. Aday Molekülün Tanımlanması	61

4.3. Hasta ve Sağlıklı Olgularda Aday Molekülün Validasyonu.....	62
4.3.1. C4BPA Protein Düzeyi	62
4.3.2. Anti-C4BPA Antikor Düzeyinin Belirlenmesi için Yapılan Optimizasyon Deneyleri.....	63
4.3.3. Anti-C4BPA Antikor Düzeyi Analizi	69
4.3.4. C4BPA Protein ve Anti-C4BPA Antikor Düzeylerinin Korelasyon Analizi ...	71
5. TARTIŞMA	72
KAYNAKLAR	77
ETİK KURUL KARARI	88
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	94
ÖZGEÇMİŞ	95

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Narkolepsi ICSD-3 tanı kriterleri.....	29
Tablo 3-1: Full MS spektrum ve HCD parametreleri.....	55
Tablo 4-1: Çalışmada değerlendirilen narkolepsi ve sağlıklı kontrol olgularının demografik bilgileri	60
Tablo 4-2: Çalışmada değerlendirilen NT1 ve NT2 olgularının demografik ve klinik bilgileri.....	60
Tablo 4-3: LC-MS/MS analizinde sadece narkolepsi hastalarında bulunan antikor negatif grupta bulunmayan proteinler	62
Tablo 4-4: Narkolepsi ve sağlıklı kontrol grupları için C4BPA protein düzeyi analizinin betimsel istatistik sonuçları.....	63
Tablo 4-5: Antikor pozitif ve negatif olduğu bilinen hastalara ait ortalama C4BPA protein ve anti-C4BPA antikor düzeyleri	68
Tablo 4-6: 1:10000 dilüsyon oranı için narkolepsi ve sağlıklı kontrol antikor düzeylerinin betimsel istatistik verileri.....	70
Tablo 4-7: 1:20000 dilüsyon oranı için narkolepsi ve sağlıklı kontrol antikor düzeylerinin betimsel istatistik verileri.....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kısmi kas tonusu kaybı ile başlayıp paralizi ile sonuçlanan katapleksi gelişimi.....	25
Şekil 2-2: Non-REM ve REM uyku fazlarına ait dalga formları.....	32
Şekil 2-3: Narkolepsi hastalarında görülen REM disregülasyonuna ait örnek EEG, EMG ve EOG bulgusunun sağlıklı birey ile karşılaştırılması.	33
Şekil 2-4: Uyku-uyanıklık döngüsünde görevli nöroanatomik bölgeler.	34
Şekil 2-5: REM-on ve REM-off hücrelerinin uyku sırasındaki aktivite değişimi.....	35
Şekil 2-6: Narkolepsi hastalarında hipokretinerjik nöronların kaybı.....	36
Şekil 2-7: Uyanıklık artırıcı (a) ve katapleksi baskılayıcı (b) oreksin yolları.....	37
Şekil 2-8: Hipokretin/oreksinlerin uyku-uyanıklık döngüsündeki rolü.....	38
Şekil 2-9: Doğal ve edinsel immün sistem elemanları.	40
Şekil 2-10: Alternatif, klasik ve lektin kompleman yolları.....	42
Şekil 2-11: Kompleman sisteminde C4BP'nin rolü.....	43
Şekil 2-12: İmmünoglobülin G (IgG) antikor yapısı.	45
Şekil 2-13: CD4+ T hücrelerinin narkolepsi etyopatogenezindeki rolü.....	47
Şekil 3-1: Mobil faz A ve mobil faz B'nin zamana göre değişen elüsyon profili.....	54
Şekil 4-3: İP metoduyla antikor pozitif olarak belirlenmiş bir narkolepsi olgusunun LC-MS/MS tüm iyon kromatogramı.....	62
Şekil 4-4: Narkolepsi olgularındaki C4BPA düzeyinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	63
Şekil 4-5: Birinci basamak optimizasyon deneyi sonucu.....	64
Şekil 4-6: İkinci basamak optimizasyon deneyi sonucu.....	65
Şekil 4-7: Üçüncü basamak optimizasyon deneyi sonucu.....	65
Şekil 4-8: Isı inaktivasyonu yapılan ve yapılmayan anti-C4BPA pozitif olduğu düşünülen narkolepsi ve sağlıklı kontrol olgu serumları için karşılaştırmalı antikor düzeyi sonuçları.....	66
Şekil 4-9: Isı inaktivasyonu yapılan ve yapılmayan anti-C4BPA negatif olduğu varsayılan olgu serumu için karşılaştırmalı antikor düzeyi sonuçları.....	67
Şekil 4-10: Son basamak optimizasyon deneyi sonucu.....	67

- Şekil 4-11: 1:10000 ve 1:20000 dilüsyon oranlarında narkolepsi (A) ve sağlıklı kontrol (B) gruplarına ait C4BPA'ya karşı oluşmuş antikor düzeylerinin dağılımı. 68
- Şekil 4-12: Narkolepsi (A) ve sağlıklı kontrol (B) gruplarının kendi içinde farklı dilüsyon oranlarıyla anlamlı olarak değişen antikor düzeylerinin dağılımı. 70



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AASM: Amerikan Uyku Tıbbı Akademisi

AcH: Asetilkolin

AGC: Otomatik Kazanım Kontrolü

AH: Anterior hipotalamus

APC: Antijen sunucu hücreler

ASO: Anti-streptolizin O

AQP4: Akuaporin-4

BF: Bazal ön beyin

BOS: Beyin omurilik sıvısı

C4BP: Kompleman komponent 4 bağlayıcı protein

C4BPA: Kompleman komponent 4 bağlayıcı protein alfa

cc: “cubic centimeter”, santimetre küp

ÇULT: Çoklu Uyku Latans Testi

Da: Dalton, atomik kütle birimi

DA: Dopamin

DH: Dorsal hipotalamus

DMNT1: DNA metiltransferaz 1

DMEM: “Dulbecco's Modified Eagle Medium”

DMH: Dorsomedial hipotalamik çekirdek

DNA: Deoksiribonükleik asit

DRN: Dorsal rafe çekirdeği

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EEG: Elektroensefalografi

ELISA: “enzyme linked immunosorbent assay”

EMG: Elektromiyografi

EOG: Elektrookülografi

ESS: Epworth Uykululuk Ölçeği

FASP: “filter aided sample preparation”

FBS: fetal bovine serum

GABA: Gama-aminobütrik asit

GWAS: genom boyu ilişkilendirme çalışmaları

HCD: Yüksek enerjili kollizyon ayırımı

HESI: Isıtılmış elektrosprey iyonizasyon kaynağı

His: Histamin

HLA: “human leucocyte antigens”, insan lökosit antijenleri

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HRP: “horseradish” peroksidaz

Hz: Hertz

ICSD-3: Uluslararası Uyku Hastalıkları Sınıflandırması, 3. Baskı

İİ: Isı ile kompleman inaktivasyonu

Ig: İmmünoglobulin

IL: İnterlökin

ILC: Doğal lenfoid hücreler

İP: İmmünopresipitasyon

IVIG: İntravenöz immünoglobulin

kV: Kilovolt

LC: Lokus seruleus

LC-MS: Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi

LDT: Laterodorsal tegmental çekirdek

LH: Lateral hipotalamus
LHA: Lateral hipotalamik alan
MAC: Membran atak kompleksi
MBL: Manoz bağlayıcı lektin
MHC: majör histokompatibilite kompleksi
MG: Miyastenia Gravis
mg/mL: Miligram/mililitre
ml: Mililitre
mm: Milimetre
mPFC: Medial prefrontal korteks
ms: Milisaniye
m/z: Kütle/yük oranı
n: Örneklem büyüklüğü
NE: Norepinefrin
NK: Doğal öldürücü hücreler
NKT: Doğal öldürücü T hücreleri
NT1: Narkolepsi tip 1
NT2: Narkolepsi tip 2
ng/mL: Nanogram/mililitre
nm: Nanometre
OD: Optik densite
OKB: Oligoklonal bant
Ort: Ortalama değer
PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PB/PC: Prabrakial çekirdek/preceruleus
pg/mL: Pikogram/mililitre

PH: Posterior hipotalamus

PIK: Protein inhibitör kokteyli

PMN: Polimorfonükleer lökositler

POA: Preoptik alan

PPT: Pedünkülopontin tegmental çekirdek

PSG: Polisomnografi

PSQI: Pittsburgh Uyku Kalite İndeksi

REM: “rapid eye movement”, hızlı göz hareketleri

rpm: “revolutions per minute”, dakikadaki dönme sayısı

SCN: Suprakiazmatik çekirdek

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SH: Standart hata

SLD: Sublaterodorsal çekirdek

SS: Standart sapma

SH-SY5Y: İnsan nöroblastoma hücre soyu

SLE: Sistemik lupus eritematozus

SOREM: REM ile başlayan uyku epizodu

SSRI: Seçici serotonin geri alım inhibitörleri

SNRI: Serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri

SK: Sağlıklı Kontrol

TCR: T hücre reseptörü

TIC: Tüm iyon kromatogramı

THR α : T hücre reseptör alfa lokusu

TMB: Tetrametilbenzidin

TMN: Tüberomamiller çekirdek

TLR: Toll benzeri reseptörler

TNF: Tümör nekroz faktör

TRIB: Tribbles homolog

U: Mann Whitney U testi anlamlılık değeri

vM: Ventral medulla

VLPO: Ventrolateral preoptik çekirdek

vIPAG/LPT: Ventrolateral periakuaduktal gri madde/lateral pontin tegmentum

vPAG: Ventral periakuaduktal gri madde

v/v: Hacim/hacim oranı

w/v: Kütle/hacim oranı

5HT: Serotonin

μl: Mikrolitre

°C: Santigrat derece

+: Pozitif

-: Negatif

%: Yüzde

ÖZET

Yüceer, H. (2019). Narkolepsiye Özgü Otoantikörlerin İmmünopresipitasyon ve Kütle Spektrofotometre ile Tanımlanması ve Validasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Narkolepsi, “rapid eye movement” (REM) uykuya anormal geçiş ile karakterize ani başlayan artmış gündüz uykuluğunun, kesintili gece uykusunun, katapleksinin ve hipnagogik/hipnopompik halüsinasyonların görülebildiği kronik bir uykuya bozukluğudur. Yaklaşık 2000’de 1 görülen bu hastalığın ilk semptomları ergenlik ve genç yetişkinlik dönemlerinde başlamaktadır. Uyanıklık durumuyla ilgili hipokretin hormonunu üreten nöronların kaybı en temel etiyolojisidir. Ayrıca, insan lökosit antijenleri (HLA) ile bilinen bağlantısı, narkolepsinin otoimmün bir bozukluk olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında narkolepsi patogenezinin etki edebilecek immün mekanizmaların, hastalığa özgü aday molekül/moleküllerin tespit edilmesi ve validasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Böylece, narkolepsinin otoimmün bir hastalık olarak değerlendirilmesi yönünde önemli veri elde edilmesi ve yeni tedavi hedeflerine öncülünmesi amaçlanmıştır.

Narkolepsi hasta grubu serumları ile immünopresipitasyon ve Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi (LC-MS) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre, narkolepsi olgularında kompleman komponent 4 bağlayıcı protein alfa (C4BPA) aday antijen olarak belirlenmiştir. Validasyon çalışmalarında C4BPA düzeyinin ve C4BPA’ya karşı gelişen antikörlerin hasta ve sağlıklı kontrol serumlarında gösterilmesi hedeflenmiştir. Çalışmaya 41 narkolepsi hastası ve toplam 19 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Narkolepsi ve sağlıklı kontrol örnekleri karşılaştırıldığında C4BPA düzeyi sağlıklı kontrollerde narkolepsiye kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Anti-C4BPA düzeyi karşılaştırılmasında ise anlamlı olmamakla beraber narkolepsi hastalarında antikör seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür. Anti-C4BPA ve C4BPA düzeyleri arasında korelasyon tespit edilememiştir. Doğrulama çalışmalarının spesifik olarak anti-C4BPA oluşumu yerine immün kompleks varlığını değerlendirdiği düşünülmekle birlikte, çalışma sonuçları narkolepsi etyopatogenezinde otoimmüniteye sebep olabilecek doğal immünite mekanizmalarının etkin olabileceğini göstermiştir. Bu sebeple hastalığa özgü otoantikör tespiti için ileri validasyon incelemeleri gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Narkolepsi, otoimmünite, immünopresipitasyon, kütle spektrofotometre, otoantikörler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33590

ABSTRACT

Yuceer, H. (2019). Identification and Validation of Narcolepsy-Specific Autoantibodies with Immunoprecipitation and Mass Spectrophotometry. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Neuroscience. Masters Thesis. İstanbul.

Narcolepsy is a chronic sleep disorder characterized by abnormal transition to rapid eye movement (REM) phase with sudden onset of excessive daytime sleepiness, disrupted nighttime sleep, cataplexy and hypnagogic/hypnopompic hallucinations. The first symptoms of this disease (approximately 1 in 2000) begin in adolescence and young adulthood. The most important etiology is the loss of neurons producing hypocretin hormone related to wakefulness. Furthermore, the connection with human leukocyte antigens (HLA) suggests that narcolepsy may be an autoimmune disorder.

In this thesis, it was aimed to detect and validate the immune mechanisms, disease-specific candidate molecule/molecules that may affect the pathogenesis of narcolepsy. Thus, the goal was to obtain important data for the evaluation of narcolepsy as an autoimmune disease and to pioneer new treatment goals.

Immunoprecipitation and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) studies were carried out with narcolepsy group sera. According to the results of the analysis, complement component 4 binding protein alpha (C4BPA) was detected as a candidate antigen in narcolepsy. In the validation studies, it was aimed to show the levels of C4BPA and antibodies developed against C4BPA in the patient and healthy control sera. 41 patients with narcolepsy and 19 healthy controls were included. When narcolepsy and healthy control samples were compared, the level of C4BPA was found significantly higher in healthy controls than narcolepsy patients. Anti-C4BPA levels were also compared. Although no significant difference was detected, narcolepsy cases seemed to have higher levels of anti-C4BPA compared to healthy subjects. Even though validation studies were considered to evaluate the presence of immune complexes instead of anti-C4BPA formation, the results of the study showed that the mechanisms of innate immunity, which may cause autoimmunity, might have an effective role in the etiopathogenesis of narcolepsy. For this reason, further validation studies are required for the detection of disease specific autoantibodies.

Key Words: Narcolepsy, autoimmunity, immunoprecipitation, mass spectrophotometry, autoantibodies

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 33590

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Narkolepsi, hızlı göz hareketlerinin (rapid eye movements: REM) görüldüğü uyku fazına anormal geçiş, ani başlayan artmış gündüz uykuluğu ve vakaların çoğunda katapleksi yani kas tonusunun ani kaybı ile karakterize kronik nörolojik bir uyku bozukluğudur. Kesintili gece uykusu, uyku paralizi ve hipnagogik/hipnopompik halüsinasyonlar hastalığın diğer önemli belirtileri arasındadır. Katapleksili narkolepsi prevalansı farklı toplumlar arasında değişkenlik gösterse de yaklaşık 100.000'de 25-50 kişi olarak belirlenmiştir¹. Hastalığın ilk semptomları ergenlik ve genç yetişkinlik dönemlerinde başlamaktadır. Bununla beraber pediatrik ve geriatrik narkolepsi olguları da literatürde tanımlanmıştır^{2,3}. Cinsiyet açısından belirgin fark olmasa da narkolepsinin erkeklerde kadınlara kıyasla daha sık görüldüğü söylenebilir⁴.

Uluslararası Uyku Hastalıkları Sınıflandırması'nın (International Classification of Sleep Disorders: ICSD) 3. baskısına göre narkolepsi, önceden katapleksili ve katapleksisiz olarak tanımlanırken günümüzde tip 1 ve tip 2 olarak ayrılmıştır. Bu ayrım temelde hastalık tanısında önemli bir biyobelirteç olan hipokretin (oreksin) azlığı ile ilişkilidir. Narkolepsi tip 1 (NT1) katapleksi ve beyin omurilik sıvısında (BOS) hipokretin-1 düşüklüğü ile seyredirken narkolepsi tip 2 (NT2) tanısı için katapleksi görülmemelidir⁴.

Günümüzde tedavi anlamında gündüz uykuluğu için modafinil, katapleksi için seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) ve dual serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI) gibi antidepresanlar ve bu iki semptomun birlikte tedavisi için sodyum oksibat kullanılmaktadır. Yakın gelecekte hastalık etyopatogenizinin daha detaylı anlaşılmasıyla yeni nesil uyku baskılayıcı veya uyanıklık tetikleyici ilaçlar, hipokretin eksikliğine yönelik yeni tedaviler ve önemi gittikçe artan immün mekanizmalar ile bağlantısının ortaya çıkarılmasıyla özellikle erken aşamalarda uygulanacak immünoterapi seçenekleri narkolepsi tedavisi için söz konusu olacaktır⁵.

Uyku bozuklukları arasında moleküler anlamda en çok araştırılmış rahatsızlık olan narkolepsi ile ilgili çalışmalar, hipokretinerjik nöronların kaybına bağlı hipokretin/oreksin eksikliğinin hastalığın temel etiyolojisi olduğunu göstermiştir. Bu nöronların ürettiği hipokretin hormonunun uyku-uyanıklık döngüsünü düzenlemek, uyanık kalmayı sağlamak ve REM uyku fazına geçişi baskılamakta görevli olduğu

sanılmaktadır⁶⁻¹⁰. Narkolepsi hayvan modelleri de hipokretin/oreksin sistemindeki bozulmayı desteklemektedir. Narkoleptik köpeklerde hastalığa karakterize semptomlar (azalmış uyku latansı ve katapleksi) gözlenmiş ve oreksin reseptör 2 mutasyonu saptanmıştır¹¹. Knock-out ve transgenik fare modellerinde de oreksin hormonu eksik farelerde narkolepsi fenotipi insana benzer bulunmuştur^{12,13}. Yaklaşık son 20 sene içinde yapılan genetik çalışmalar, narkolepsinin insan lökosit antijenleri (HLA) -DR2 ve HLA-DQ1 allelleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Majör histokompatibilite kompleksi (MHC) DQ bölgesinde yerleşimli DQA1*01:02, DQB1*06:02, DRB1*15:01 ve DRB5*01:01 allelleri narkolepsi için yatkınlık genleri olarak bulunmuştur^{14,15}. Özellikle DQB1*06:02 allelinin varlığının narkolepsinin ayırıcı tanısı için önemli olduğu literatürde vurgulanmıştır¹⁶. Ayrıca genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), HLA moleküllerine bağlı antijenlerin tanımlanmasında rol alan T hücre reseptör alfa lokusunda (THR α) ve sitotoksik T lenfositlerde (CD8+) yüksek düzeyde eksprese edilen pürinerjik reseptör alttip P2Y11 geninde polimorfizm saptanmıştır^{17,18}. Bunun dışında immün sistemde fazlasıyla eksprese edildiği bilinen, katapleksiyle ilişkili olduğu düşünülen ve nöronal sağkalımda rolü olan DNMT1 (Deoksiribonükleik asit (DNA) metiltransferaz 1) geninde narkoleptik hastalarda mutasyon görülmüştür^{19,20}. HLA allelleri ile birlikte bu bulgular, narkolepsinin patogenezinde farklı immün sistem hücrelerinin yer alabileceğini ve hastalığın otoimmün bir temeli olabileceğini düşündürmektedir.

Narkolepsinin immünite mekanizmaları ile ilgili sitokin düzeyindeki araştırmalar, interlökin (IL) 6 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF α) gibi proinflatuvar sitokinlerin uyku-uyanıklık döngüsünde etkin olduğunu ve narkolepsi hastalarında bu sitokinlerin sağlıklı kontroller ile karşılaştırdığında daha yüksek seviyelerde bulunduğunu göstermektedir^{21,22}. Ek olarak, literatürde NT1 hasta serumlarında artmış hipokretin-1 reaktif total immünoglobulin (Ig) G ve IgM otoantikörlerinin tespit edilmesi narkolepsinin otoimmün bir hastalık olarak değerlendirilmesi yönündeki şüpheleri artırmıştır^{23,24}.

Narkolepsinin tam olarak aydınlatılamamış olan immünopatogenezi hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak amacıyla, çalışmamızda narkolepsiye özgü aday molekül/moleküllerin immünopresipitasyon (İP) ve Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) ile tanımlanması ve tanımlanan adayların validasyonunun

yapılması hedeflenmiştir. Bu araştırma, narkolepsiye yönelik aday antijenlerin belirlenmesinde yüksek duyarlılığa sahip analitik bir yöntem olan LC-MS/MS metodunun ilk kez kullanılacak olması yönüyle önem taşımaktadır. Olası molekül/moleküllerin saptanması ve tanımlanması ile narkolepsinin otoimmün bir hastalık olarak ele alınması yönünde önemli çıkarımlar yapılması ve yeni terapötik seçeneklerin değerlendirmeye alınabilmesi hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Narkolepsi

2.1.1. Tanım ve Epidemiyoloji

Narkolepsi; uyku atakları, ani başlayan artmış gündüz uykuluğu ve kesintili gece uykusu ile karakterize kronik bir uyku bozukluğudur. Narkolepsi hastalarında temel bozulma hızlı göz hareketleri (REM) uyku fazına geçiş mekanizmasında olmakla birlikte bu bozulmaya bağlı olarak uyku felci, hipnagogik/hipnopompik halüsinasyonlar ve vakaların çoğunda kas tonusunun ani kaybı olan katapleksi görülmektedir⁴. Obstruktif uyku apne sendromlu hastalardan sonra artmış gündüz uykululuğu en çok narkolepside görülmektedir²⁵.

Narkolepsi ve katapleksi benzeri tablolardan ilk kez Willis'in 1672 yılına ait raporunda bahsedilmiştir. Bu raporda Willis, gündelik işlerini yerine getirebilen; ancak konuşurken, gülerken, yürürken, yemek sırasında ağızlarında lokma varken dahi ani bir şekilde uykuya dalan olgulardan söz etmiştir. 1842 yılında Binnis ise gündüz uyuklamaları sırasında görülen uyku paralizi durumundan ilk kez bahsetmiş ve bunu adeta gündüz vakti yaşanan kabus olarak nitelemiştir. Willis'in ardından Westphal 1877 yılında narkolepsi benzeri olguları raporlamıştır. Narkolepsiye dair ilk kapsamlı tanım ise 1880 yılında Fransız doktor Jean Baptiste Edouard Gelineau tarafından yapılmıştır. Bu sebeple narkolepsi Gelineau sendromu olarak da bilinir. Narkolepsi tanımını ilk kez kullanan da Gelineau olmuştur^{26,27}. Bu tanım Yunanca kökenli *ναρκωσις*, “narke” yani “uyku, uyuşma, uyuşukluk” ve epilepside de geçen “lepsi” yani “atak, nöbete tutulma” kelimelerine dayanarak koymuştur. Epilepsi ile kelime ortaklığı dışında Gelineau, adını koyduğu narkolepsi hastalığını epileptik nöbetlere benzeyen katapleksi sendromu sebebiyle epilepsiden ayırmakta zorlanmıştır²⁸.

Narkolepsi tip 1 (NT1) için prevalans 100.000’de 25-50 kişi iken narkolepsi tip 2 (NT2) için 100.000’de 20-34 kişidir. Bu oranlar farklı toplumlara göre farklılık göstermektedir. Örneğin; Avrupa ülkeleri için 100.000 kişide 19-56 iken, 100.000 kişide 2 ile İsrail için en düşük ve 1000 kişide 18 ile Japonya için en yüksek olarak bulunmuştur^{1,29,30}. En düşük prevalansa sahip İsrail’de DQB1*0602 alleline ait taşıyıcı frekansının da ülkeler arasında en düşük seviyede olduğu gösterilmiştir³¹.

Hastalık insidansı yaşa bağımlı olup Avrupa ülkelerinde en düşük insidans oranı 0.13/100.000 olarak 5 yaşın altındaki çocuklarda; en yüksek insidans oranı ise 1.06/100.000 olarak 20–59 yaş arası yetişkinlerde bulunmuştur³². Narkolepsi bu oranlara göre nadir hastalık kategorisinde görülmesine rağmen hastalık tanısının halen konulamaması veya semptom başlangıcından çok sonra konulabilmesi sebebiyle bu insidans oranları tartışmalıdır²⁷.

Cinsiyet açısından belirgin fark bulunmamasına rağmen narkolepsi, 1,6:1 olarak erkeklerde kadınlara kıyasla daha sık görülmektedir^{4,30}. Genellikle genç yetişkinlik dönemlerinde görülmekle birlikte, nadir olarak pediatrik ve geriatrik narkolepsi olguları da literatürde tanımlanmıştır^{2,3}. Narkolepsi hastaları günlük yaşantıda özellikle akademik hayat ve iş ortamında hastalığın yarattığı ciddi negatif psikososyal etkilerle karşılaşmaktadır. Hastaların yaşadıkları katapleksi ve uyku ataklarına bağlı iş ve trafik kazası geçirme riski sağlıklı popülasyona kıyasla 3-4 kat daha fazladır. Tedavi ile kontrol altına alındığında bu riskin azaldığı literatürde gösterilmiştir^{33,34}.

2.2. Narkolepsinin Klinik Özellikleri

2.2.1. Uyku Hali ve Artmış Gündüz Uykuluğu

Narkolepsi için uyku hali özellikle gündüz vaktinde görülmektedir. Artmış gündüz uykuluğu narkolepsi tanısı için en temel semptomdur³⁵. Rahat veya sedanter durumlarda kolayca uykuya dalma, başını sallama, uyuma eğilimi yaşama veya bu durumlarda uyumadan kaçınmak için ekstra çaba gösterme ihtiyacı olarak kendini göstermektedir²⁵. Ayrıca, hastalarda “uyku atakları” olarak adlandırılan uyanık dönemde ani, şiddetli ve karşı konulmaz uyku ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Bu ataklar genelde 1-2 dakika sürmekle beraber bazen yarım saate kadar uzayabilmektedir. Hastalar atak sonrası uyandıklarında dinlenmiş ve uykusunu almış hissetseler de kısa zaman sonra şiddetli uyku ihtiyacı tekrar doğabilir ve yeni bir atak gerçekleşebilir³⁶. Ataklar hastalık seyri içinde bazı dönemlerde düzelme gösterse de çoğunlukla ömür boyu görülür. Ek olarak narkolepsili hastalardaki bu uyku hali; hafızada kötüleşme, dikkat ve konsantrasyonda azalma ve çabuk öfkelenmeye sebep olabilmektedir²⁵.

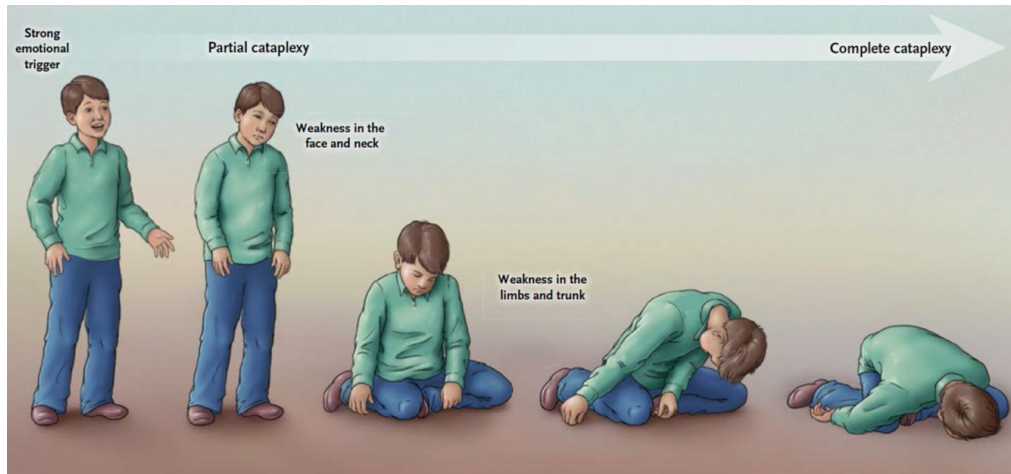
2.2.2. Katapleksi

Narkolepsi vakalarının tamamına yakın bir kısmında görülen katapleksi, bilateral kas tonusunun kısmi veya bütün olarak kaybıdır²⁵. REM uyku fazına ani ve

zamansız geçiş ile ilgili mekanizma bozulmasından kaynaklı, REM fazında görölen atoni benzeri tablonun narkolepside katapleksi olarak ortaya çıktığı düşünölmektedir³⁷. NT1 tanısında katapleksi semptomu ayırıcı olmaktadır. Derin tendon ve monosinaptik H refleksleri katapleksi durumunda kaybolduğu için bu reflekslerin kontrolü klinik tanı için önemlidir³⁸. Çoğu vakada artmış gündüz uykululuğu ile aynı zamanda başlasa da hastalık başlangıcından yıllar sonra da ortaya ıkabilir³⁴.

Güçlü duygusal uyaranlar katapleksiye tetikler. Özellikle gülme ve kakhaha atma gibi pozitif duygusal tepkiler en yaygın katapleksi uyaranlarıdır³⁹. Kas tonusu kaybı, birkaç saniye ile 2 dakika arasında sürebilir. Bazı durumlarda bu süre uzayabilmekte ve nadir de olsa “status kataplektikus” denen saatlerce tekrarlayan kataplektik ataklar görölebilmektedir³¹. Katapleksi durumu sırasında hasta cevap veremez durumda olsa da bilinci korunmaktadır³⁴. Kas tonusundaki azalma çoğunlukla minimal düzeyde olur ve genellikle yüz ve boyun kaslarında başlar. Bilateral pitosiz, çenenin gevşemesi, başın kısa bir süre düşmesi, dizartri ve elde tutulan nesnenin düşürölmesi ile kendini gösterir. Bununla birlikte uzuv ve gövde kasları etkilenirse paralizi veya kişinin yere yığılması ile sonuçlanabilmektedir (Şekil 2.1)⁴⁰.

Hastalar gün içinde 1-2 kez veya senede birkaç atak olacak şekilde değişen sıklıkla katapleksi durumuyla karşılaşabilmektedir. Stres, fiziksel yorgunluk ve yetersiz uyku durumları katapleksi tablosunu kötüleştirmektedir²⁵. Ayrıca, yaşla beraber muhtemelen kişilerin duygu durumunu daha iyi kontrol etmesine bağlı olarak hastalarda katapleksi atak sayısı azalmaktadır³¹.



Şekil 2-1: Kısmi kas tonusu kaybı ile başlayıp paralizi ile sonuçlanan katapleksi gelişimi⁴⁰.

2.2.3. Hipnagojik ve Hipnapompik Halüsinasyonlar

Narkolepsiye özgü bir durum olmamakla birlikte, narkolepsi hastalarında uyku öncesi, uykuya dalma sürecinde (hipnagojik) veya uykudan uyanıklığa geçiş sırasında (hipnapompik) varsanılar ortaya çıkabilmektedir. Bu varsanılar görsel, işitsel, kinestetik veya çoklu duyulara yönelik durumlar olabilir. Örneğin, hastalar genelde eve bir yabancıya girmesi veya bir hayvan tarafından saldırıya uğramak gibi korku dolu deneyimler yaşar. Bilinç düzeyi ile uyku fazını bir araya getiren bu halüsinasyonlar, hastaların gerçeklik algısını bozabilmekte ve rahatsız edici olabilmektedir^{25,41}.

Bu halüsinasyonların yine hızlı göz hareketlerinin görüldüğü REM uyku fazına geçişteki bozulmayla ilgili olarak ortaya çıkan rüya ve halüsinasyon benzeri tablolarla ilişkili olduğu düşünülmektedir³¹. Narkolepsiye komorbid olarak görülebilecek şizofreni gibi tablolarda da bu tip halüsinasyonlara rastlanabileceğinden ve görülen halüsinasyonların narkolepside sıkça rastlanan kabus görmeden ayırt edilmesinin zor olmasından dolayı hipnagojik ve hipnapompik halüsinasyonlar narkolepsi için tanıda ayırıcı olarak değerlendirilememektedir²⁷.

2.2.4. Uyku Paralizi

Uyku paralizi narkolepsi hastalarının yaklaşık % 20-50'sinde görülmektedir⁴². Narkolepside hipnagojik ve hipnapompik halüsinasyonlar ile ilişkili olarak uyku paralizi; uyku sırasında, gece uyanmalarında veya sabah saatlerinde gerçekleşir. Hastanın bilinci yerindedir; ancak istemli hiçbir hareket gerçekleştiremez. Yorgunluk halinden farklı olarak hastalar parmaklarını dahi hareket ettiremeyecek durumdadırlar. Birkaç dakika sürebilecek uyku paralizi ses veya dokunma gibi dış uyaranlar ile sonlanabilir³¹. Uyku deprivasyonu, stres ve düzensiz uyku-uyanıklık döngüsü uyku paralizisine neden olabilmektedir. Narkolepsiden bağımsız durumlarda uyku paralizi REM uykusundan uyanmanın ardından atoni durumu olarak görülmektedir. Bu bilgi, narkolepsideki REM uyku fazı ile ilgili geçiş bozukluğunu destekler niteliktedir²⁷.

2.2.5. Kesintili Gece Uykusu

Narkolepsi hastaları günün büyük bir çoğunluğunda uykulu halde olsa da gece uykusu sırasında sıkıntı yaşamaktadır. Bu hastalar uyku ve uyanıklık durumunu sürdürmekte zorlandığından noktürnal uykuları kesintilidir ve çoğu zaman uyku arttırıcı ilaç kullanmak zorunda kalırlar⁴⁰. Ayrıca hastalığın patofizyolojisine ek olarak gelişen uyku bozuklukları, uykunun bu hastalarda bölünmesine yol açmıştır. Kesintili gece

uykusu hastalarının % 80 kadarında görülmekte olup hastalık tanısı için önem taşımaktadır^{27,43}.

2.2.6. Diğer Semptomlar

Belirtilen semptomlara ek olarak insomnia, obstruktif uyku apnesi, REM uyku davranış bozukluğu, kabus görme, non-REM uykusu parasomnileri, uyku terörü, noktürnal miyoklonus, somnambulizm (uyurgezerlik) gibi uyku bozuklukları narkolepsi hastalığında sağlıklı popülasyona göre daha sık olarak rastlanmaktadır⁴⁴.

Ayrıca narkolepsi hastaları, hipotalamik bozulmaya bağlı metabolizma hızında düşüş yaşadığından vücut-kitle indeksleri sağlıklı popülasyonun % 15 üzerindedir. Özellikle çocuk yaştaki hastalar, hastalık başlangıcında 18 kilografa kadar kilo alabilmektedir⁴⁰.

Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, depresyon ve anksiyete bozukluklarına narkolepsi hastalarında toplumun geneline göre oldukça sık rastlanır⁴⁵. Narkolepsi hastalarının davranışsal fenotipi birçok psikiyatrik rahatsızlığa yönelik davranış ve kişilik bozukluklarını kapsamaktadır. Narkolepsiye komorbid olarak gelişen en temel psikiyatrik rahatsızlık şizofrenidir. Şizofrenide görülen psikoz ve narkolepsinin psikotik formlarını ayırtırmak önem arz etmektedir. Ayırıcı tanı ve uygun tedavi sağlanması amacıyla narkolepsinin refrakter ve atipik ayrı bir psikiyatrik hastalık olarak değerlendirilmesi son yıllarda tartışılmaktadır^{46,47}.

2.3. Narkolepsi Tanısı

2.3.1. Tanısal Değerlendirme

2.3.1.1. Polisomnografi ve Çoklu Uyku Latansı Testleri

Noktürnal polisomnografi (PSG) gece uykusu sırasında uygulanmaktadır. Kandaki oksijen seviyesi, uyku ilişkili beyin dalga aktivitesi ve uyku sırasındaki göz ve bacak hareketlerini ölçmektedir. PSG, narkolepsinin diğer uyku hastalıklardan ayırıcı tanısında önemli olup kesintili gece uykusu ve REM uyku fazına erken girişin hastalarda gösterilmesini sağlamak açısından değerlidir. Gece çalışılan PSG sonuçları çoklu uyku latans testi (ÇULT) ile gündüz vakti için de doğrulanmalıdır^{25,41}

Artmış gündüz uykululuğunun düzeyi ise Epworth Uykululuk Ölçeği (ESS) gibi subjektif şiddet ölçekleri ve nesnel olarak ÇULT ile ölçülebilir. ÇULT testi sessiz ve karanlık ortamda kişilerin uykuya dalma yatkınlıklarını Amerikan Uyku Tıbbı

Akademisi (American Academy of Sleep Medicine: AASM) tarafından belirtilen standartlara uygun olarak ölçmelidir⁴. Hastalardan test öncesindeki hafta boyunca özellikle geceleri mümkün olduğunca uzun süre uyumaları, uyku günlüğü tutmaları ve mümkün oldukça aktigrafi ile ÇULT öncesindeki en az 24 saati kaydetmeleri istenir.

ÇULT'taki ortalama 5 dakikanın altındaki uyku latansları uykululuk halini, 10 dakika üzeri gecikmeler ise normal uyanıklığı gösterir. 8 dakikanın altındaki uyku latansı narkolepsi tanısı için önemlidir. Narkolepsili hastaların %90'ı bu gecikme değerinin altında kalmakta ve hızlıca uykuya dalmaktadır. Ek olarak test sırasında REM ile başlayan uyku epizodu (SOREM) görülmesi narkolepsi için oldukça ayırt edicidir. Bu yöntemler her zaman tutarlı sonuçlar vermeyip uygun klinik değerlendirme ile kullanılmalıdır⁴.

2.3.1.2. BOS Hipokretin Düzeyi Ölçümü

Narkolepsi patogeneğinde önemli bir biyobelirteç olan hipokretin (oreksin) azlığı ICSD-3 son narkolepsi tanı kriterlerine eklenmiştir. Hipokretin-1 azlığı narkolepsiye özgü olmamakla ve bu ölçüm tanı için zorunluluk taşımamakla beraber, immünoreaktif testlerle belirlenen düşük BOS hipokretin düzeyi ÇULT kadar doğru tanı için önem taşımaktadır.

2.3.1.3. HLA-DQB1*06:02 Analizi

Katapleksinin eşlik ettiği NT1'in, HLA-DQB1*06:02 alleli ile güçlü ilişkisi bilinmektedir; ancak bu allel genel popülasyonda oldukça rastlanır olduğundan narkolepsinin ayırıcı tanısı için yüksek duyarlılıklı HLA-DQB1*06:02 analizi tanı kriterleri arasında yer almamaktadır²⁵.

2.3.2. Tanı Kriterleri ve Hastalık Altıpleri

ICSD'nin 3. baskısına göre narkolepsi, katapleksili ve katapleksisiz narkolepsi tanımlaması yerine tip 1 ve tip 2 olarak ayrılmıştır. Bu ayrım temelde hipokretin azlığı ile ilişkilidir. Katapleksisi olmayan bazı hastalarda da beyin-omurilik sıvısı (BOS) hipokretin-1 düzeyi düşük bulunabildiğinden katapleksili narkolepsi - katapleksisiz narkolepsi tanımlamaları uygunluğunu yitirmiştir. Narkolepsi tip 1 (NT1) tanısı için katapleksi ve BOS hipokretin-1 düşüklüğü olması gerekirken narkolepsi tip 2 (NT2) tanısı için katapleksi görülmemelidir⁴. Narkolepsi için ICSD-3 kriterleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Aynı şekilde rutin klinik uygulama için daha pratik olan Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM) 5. baskısında da hipokretin eksikliği tanı kriterlerinde yerini almıştır^{48,49}

Tablo 2-1: Narkolepsi ICSD-3 tanı kriterleri⁴

Narkolepsi Tip 1 (NT1)	Narkolepsi Tip 2 (NT2)
Kriter A ve B mutlaka karşılanmalıdır.	Kriter A ve E mutlaka karşılanmalıdır.
A. Hasta en az 3 aydır günlük dayanılmaz uyku ihtiyacı periyotları veya gündüz uykuya dalma eğilimi yaşamalıdır ^a .	A. Hasta en az 3 aydır günlük dayanılmaz uyku ihtiyacı periyotları veya gündüz uykuya dalma eğilimi yaşamalıdır.
B. Aşağıdaki durumlardan en az biri olmalıdır: 1. Katapleksi görülmelidir ve ÇULT testinde ortalama uyku latansı puanı 8 ve altında olmalıdır. Aynı testte 2 veya daha fazla SOREM periyotlarının görülmesi gerekmektedir. Nokturnal polisomnografi sırasında, uyku başlangıcının ilk 15 dakikasında görülen bir SOREM, ÇULT testinde görülmesi beklenen bir SOREM olarak sayılabilir ^b . 2. BOS hipokretin-1 konsantrasyonu 110 pg/mL ve altı veya aynı testteki normal/kontrol örneklerin ortalama konsantrasyon değerlerinin 1/3'ünün altında olmalıdır ^b .	B. ÇULT testinde ortalama uyku latansı puanı 8 ve altında olmalıdır. Aynı testte 2 veya daha fazla SOREM periyotlarının görülmesi gerekmektedir. Nokturnal polisomnografi sırasında, uyku başlangıcının ilk 15 dakikasında görülen bir SOREM, ÇULT testinde görülmesi beklenen bir SOREM olarak sayılabilir. C. Katapleksi görülmemelidir ^c . D. BOS hipokretin-1 konsantrasyonu 110 pg/mL ve üstü veya aynı testteki normal/kontrol örneklerin ortalama konsantrasyon değerlerinin 1/3'ünün üstünde olmalıdır ^d . E. Hipersomni ve/veya ÇULT bulguları; yetersiz uyku, obstruktif uyku apnesi, gecikmiş uyku fazı bozukluğu, veya ilaç/madde kullanımı ve yoksunluğu kaynaklı açıklanamamalıdır.

^aKüçük çocuklarda narkolepsi kendini aşırı uzamış gece uykuları veya ortaya çıkan kesintili kısa gündüz uykuları ile gösterebilir. ^bEğer Tip 1 narkolepsiden klinik olarak güçlü bir şekilde şüpheleniyor ancak ÇULT kriteri gerçekleşmiyorsa ÇULT'un tekrarı önerilir. ^cKatapleksinin sonradan görülmesi durumunda bozukluk NT1 olarak sınıflandırılır. ^dEğer sonradan BOS hipokretin-1 düzeyi ölçülürse ve 110 pg/mL ve altı veya aynı testteki normal/kontrol örneklerin ortalama konsantrasyon değerlerinin 1/3'ünün altında bulunursa bozukluk NT1 olarak sınıflandırılır.

2.4. Narkolepsi Tedavisi

Narkolepsi etyopatogenezi halen net olarak bilinmediğinden terapötik yöntemlerde amaç hastalık yönetimini sağlamaktır. Günümüzde narkolepsi tedavisi için kullanılan ilaçlar katapleksi, artmış gündüz uykululuğu, uyku atakları ve diğer semptomların kontrol altına alınmasını gerçekleştirir⁵⁰.

Katapleksi ve REM uykusunun baskılanmasına yönelik tedavi temelde seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) ve dual serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI) gibi antidepresanlar ve sodyum oksibat ile düzenlenmektedir⁵¹. Artmış gündüz uykululuğu için tedavi anlamında en çok gama-aminobütrik asit (GABA) inhibisyonu ve dopamin eksitasyonunu etkilediği düşünülen modafinil kullanılmaktadır. Bunun dışında sodyum oksibat, metilfenidat, pitolisant, mazindol ve amfetamin türevleri de tercih edilebilmektedir^{52,53}. Uyku atakları ise amfetamin benzeri olan mazindol, pemolin gibi ilaçlarla tedavi edilmektedir⁵. Kesintili gece uykusu durumunda uyku kalitesini arttırmak amacıyla SXB kullanılmakta olup klonazepam ve triazolam gibi benzodiazepin türleri ile zopiklon ve zolpidem gibi hipnotik ilaçların uyku bölünmesini düzeltici etkisi gösterilmiştir⁵⁴. REM uyku disregülasyonuna bağlı hipnagojik/hipnapompik halüsinasyonlar ile uyku paralizisinde hastalara antidepresanlar ve SXB reçetelenmektedir. Narkolepsiyle birlikte görülmesi olası olan REM uyku bozukluğu için ise melatonin ve SXB kullanılabilmektedir⁵. Tüm ilaçlar içerisinde sodyum oksibatın en güvenli ve tüm narkolepsi semptomları üzerinde en etkili ilaç olduğu düşünülmektedir⁵⁵.

Farmakolojik yöntemlere ek olarak; psikolojik tedaviler düzenlenmeli ve hastalar uyku molaları planlamak, uyku hijyeni sağlamak, düzenli fiziksel aktivite yapmak, ileri düzey dikkat gerektiren işlerden kaçınmak gibi yaşamsal değişikliklerin gerekliliği hakkında bilgilendirilmelidir⁵⁰. Yakın gelecekte hastalık etyopatogeninin daha detaylı anlaşılmasıyla da yeni nesil uyku baskılayıcı veya uyanıklık tetikleyici ilaçlar, hipokretin eksikliğine yönelik yeni tedaviler ve önemi gittikçe artan immün mekanizmalar ile bağlantısının ortaya çıkarılmasıyla özellikle erken aşamalarda uygulanacak immünoterapi seçenekleri narkolepsi tedavisi için söz konusu olabilecektir⁵.

2.5. Narkolepsi Etiyopatogenezi

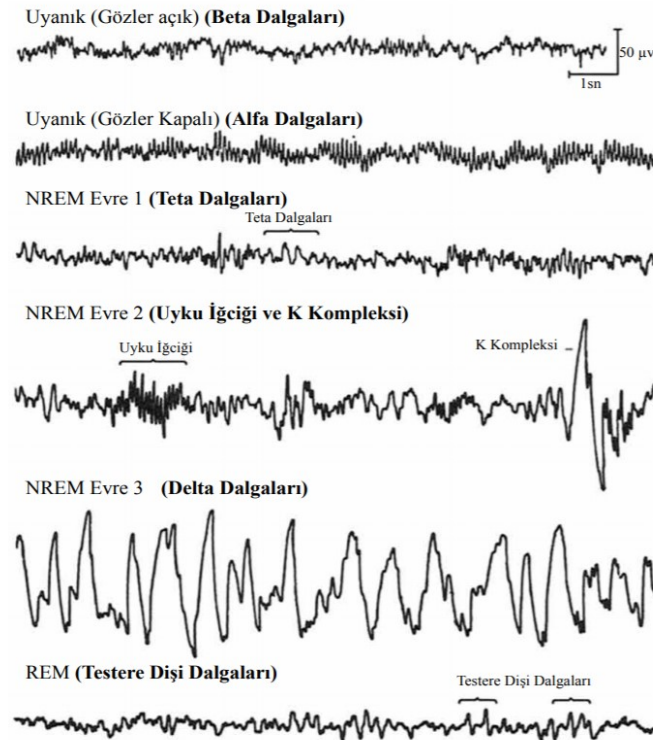
2.5.1. Uyku-Uyanıklık Mekanizmaları

2.5.1.1. Uyku Evreleri

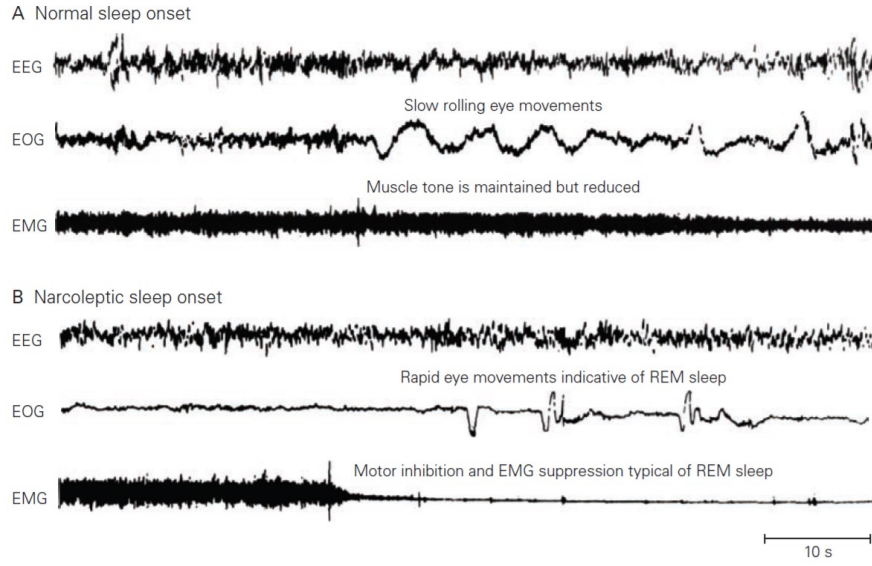
Ortalama hayatımızın yaklaşık 25 yılını kapsayan uykunun varoluş sebebi halen açıklanamasa da; tüm bedeni ve mental fonksiyonlar, hormonal regülasyon, kas tonusu, nefes alıp-verme hızı gibi birçok önemli işlevimiz üzerinde uyku oldukça önemli etkiye sahiptir. Beynin elektriksel aktivitesi uyku sırasında oldukça değişmektedir. Uyanıklık sırasında elektroensefalografi (EEG) verileri aktif serebral kortekse işaret eden düşük voltajlı, yüksek frekanslı beta dalga boyundayken; gözleri kapatma ve gevşeme haliyle özellikle görsel kortekste alfa dalgaları görülmeye başlar. EEG, elektromiyografi (EMG) ve elektrookülografi (EOG) verilerine dayanarak uyku beş aşamaya ayrılmıştır. İlk dört aşama hızlı göz hareketlerinin (REM) görülmediği non-REM evresi, beşinci aşama ise REM uyku evresidir^{5,56}.

İlk non-REM aşaması uykunun henüz gelişmediği, kortikal aktivitede azalmayı gösteren yüksek frekanslı dalga aktivitesinde düşüşün görüldüğü, teta dalgalarına geçişin başladığı, uyku-uyanıklık arası dönemdir (Şekil 2.2). Kas tonusu ve göz hareketleri bu evrede azalmaya başlar. İkinci aşama, EEG’de 7-15 Hz’lik ani osilasyonlar ile kendini gösteren uyku içciklerinin ve ani 1-2 saniye süren artışlarla belirlenen K komplekslerinin görüldüğü evredir (Şekil 2.2). K kompleksleri ve uyku içciklerinin ortaya çıkması, gevşeme ve nöronların hiperpolarizasyonu ile talamus ve serebral korteksteki yavaşlamış nöronal ve sinaptik aktiviteye işaret eder. Bu evrede kas tonusu ve göz hareketlerinin yavaşlamasına ek olarak vücut sıcaklığı düşmekte ve solunum düzenli ve yavaş hale gelmektedir. Üçüncü aşamada, 0.5–4 Hz delta dalga osilasyonları görülmeye başlar (Şekil 2.2). Bu dalgalar uyanıklık mekanizmalarında ve bilinç düzeyinde ileri azalmaya ve talamik-kortikal senkronizasyonda artışa işaret eder. Delta dalgalarının baskın olarak görülmesiyle kişi en derin uyku evresi olan dördüncü non-REM uyku aşamasına geçer (Şekil 2.2). Narkolepside de görülebilen somnambulizm, uyku terörü gibi parasomniler bu evrede gerçekleşir. Ayrıca bu evre sırasında günlük yaşanan olaylara yönelik, basit içerikli rüyalar görülebilmektedir. Normal bir gece uykusunda, uyanıklık durumundan dördüncü non-REM uyku aşamasına geçiş yaklaşık yarım saatlik bir sürede gerçekleşir^{5,56}.

Non-REM uyku aşamalarının ardından kişi uyanmak yerine testere dişi paternli dalgaların görüldüğü özgün bir evre olan REM uyku fazına geçer (Şekil 2.2). REM uyku fazı ilk olarak, Kleitman ve Aserinsky tarafından 1953 yılında uyku sırasında uyanıklığa benzer yüksek frekanslı ve düşük amplitüdlü osilasyonların varlığı olarak tanımlanmıştır⁵⁷. Hızlı göz hareketlerinin görülmesi ile karakterize olan REM uykusu sırasında beyin sapındaki göz hareketlerinin kontrolünü sağlayan motor nöronlar hariç efferent yoldaki diğer motor nöronların inhibisyonuna bağlı kas tonusunun tamamen kaybı veya atoni tablosu görülür. Narkolepsinin en karakteristik özelliklerinden olan katapleksi REM uykusuna anormal geçiş bu atoni durumu ile ilişkilidir⁵⁸. Narkolepsi hastalarında bu REM uyku fazına geçişte bozulmaya yönelik örnek EEG, EMG ve EOG bulgusu Şekil 2.3'te gösterilmiştir. Yetişkinlerde REM uykusu toplam uyku süresinin yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadır. Gece uykusu boyunca 4-5 kez gözlenebilir. Rüyaların büyük çoğunluğu bu evrede görülmektedir. Non-REM uyku fazında görülen rüyalardan farklı olarak bu evrede daha tuhaf ve kompleks içerikli, Freud'un tanımladığı şekilde biliçdışına yönelik rüyalar görülmektedir⁵⁹. Bu durum narkolepsideki REM disregülasyonuna bağlı oluşan rüya benzeri hipnagojik ve hipnapompik halüsinasyonları açıklamaktadır^{56,60}.



Şekil 2-2: Non-REM ve REM uyku fazlarına ait dalga formları⁶¹.



Şekil 2-3: Narkolepsi hastalarında görülen REM disregülasyonuna ait örnek EEG, EMG ve EOG bulgusunun sağlıklı birey ile karşılaştırılması⁶⁰.

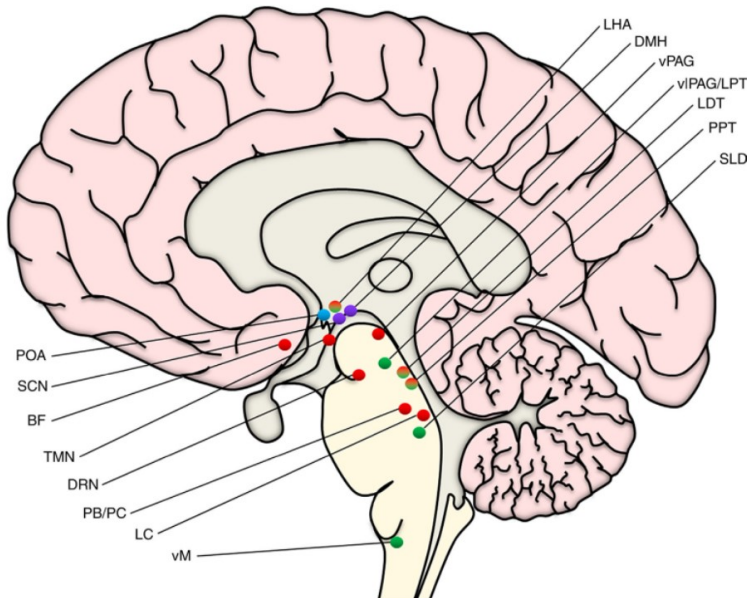
2.5.1.2. Uyku Nörobiyolojisi

Uyku, sirkadiyen ve ultradiyen ritimlere bağlı oluşan döngüsel bir süreçtir. Sirkadiyen ritim yaklaşık 24 saat olup gece-gündüz değişimini temel alır. Uyku ve uyanıklık döngüsü vücudumuzdaki birçok sirkadiyen ritimden biridir. Bu ritim, ışık uyarısını algılayan retinal ganglion hücrelerinin bu uyarıyı hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdeğe ilemesiyle ortaya çıkar. Suprakiazmatik çekirdekteki nöronlar bu ışık uyarısı ile vazopressin salgılayarak vücuttaki uyku-uyanıklık döngüsünü düzenleyen süreci başlatır. Sürecin moleküler temelinde BMAL1 ve CLOCK isimli iki transkripsiyonel aktivatör yer almaktadır. Bu aktivatörler PER ve CRY proteinlerinin hücre içi konsantrasyon düzeyinin artıp azalmasını sağlayarak uyku-uyanıklık döngüsünü düzenler. Bu iletide sorun olması veya hipotalamusun ventral subparaventricüler alanı gibi uyku-uyanıklığı düzenleyen bölgelerinde hasar olması durumunda kişiler uykudan uyanıklığa geçişte bozulma, gündüz vakti uyku ve gece vaktinde uyanıklık eğilimi yaşama gibi problemlerle karşılaşabilmektedir^{60,62}.

Uykunun sirkadiyen ritim özelliğine ek olarak, non-REM ve REM uyku fazları arasında günde birden çok döngünün ve farklılaşmış osilasyonların görüldüğü ultradiyen ritmik özelliği de mevcuttur. Bu yönüyle uyku ve uyanıklık durumlarının ortaya çıkması; hipotalamus dışında beyin sapı, talamus, pineal bez, bazal ön beyin ve

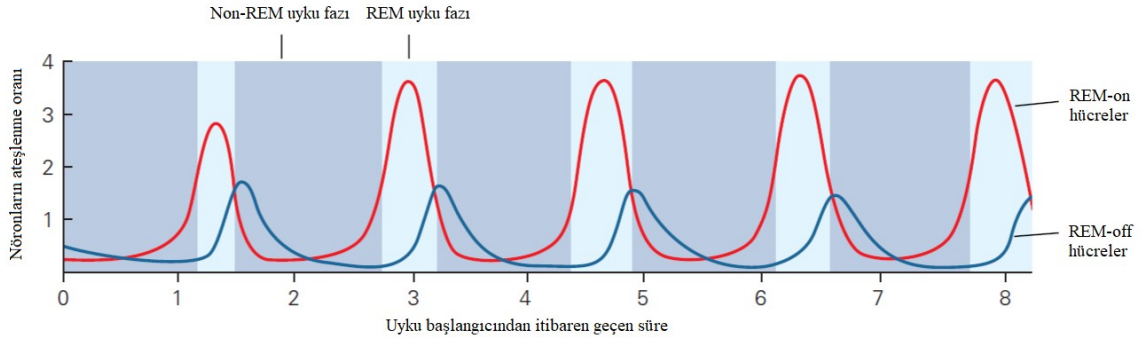
amigdala gibi yapıların da dahil olduğu işbirliği ile oluşan karmaşık bir süreçtir. Uyku ve uyanıklıkta görevli nöroanatomik bölgeler detaylı olarak Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

Bu yapılar arasında beyin sapı, REM uykusu ve uyanıklık halinin kontrolünde öne çıkmaktadır. Anterior hipotalamusun ventrolateral preoptik çekirdeği ise uyanıklık ile ilişkili mekanizmaları inhibe ederek uykunun başlamasını kontrol etmektedir. Beyin sapında, hipotalamusta ve bazal ön beyinde bulunan kolinerjik nöronlar uyanıklık hali ve REM uykusunun ortaya çıkmasında önemli bir role sahiptir. Bu kolinerjik nöronlar; ön beyin, hipokampus ve talamus gibi yapılara projekte olarak salgıladıkları asetilkolin (ACh) ile bu bölgeleri depolarize etmektedir. ACh dışında; gama-aminobütrik asit (GABA), glisin ve glutamat üreten nöronlar da REM uyku fazını başlatmada görev alabilmektedir. REM uykusu sırasında maksimum aktiflik gösterme özelliğine dayanarak bu kolinerjik, GABAerjik, glisinerjik ve glutamaterjik nöronlara “REM-on” hücreleri de denilmektedir^{60,63}. Hipotalamustaki histaminerjik nöronlar ile beyin sapındaki norepinefrin ve serotonin salınımından görevli nöronlar ise REM uykusu sırasında minimum aktivite göstermeleri ve REM fazının sonlanmasında görevli olmaları sebebiyle “REM-off” hücreleri olarak adlandırılmıştır^{60,63}. REM-on ve REM-off hücrelerinin uyku sırasındaki aktivite değişimi Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Uyku-uyanıklık döngüsünde görevli nöroanatomik bölgeler⁶⁴.

Renkler anatomik bölgelerin görevlerini yansıtmaktadır (kırmızı: uyanıklık hali, mavi: uyku hali, yeşil: REM uyku fazı, mor: sirkadiyen regülasyon, iki renkli: çoklu işlevler). POA: Preoptik alan, SCN: Suprakiazmatik çekirdek, BF: Bazal ön beyin, TMN: Tüberomamiller çekirdek, DRN: Dorsal rafe çekirdeği, PB/PC: Prabrakial çekirdek/preceruleus, LC: Lokus seruleus, vM: Ventral medulla, LHA: Lateral hipotalamik alan, DMH: Dorsomedial hipotalamik çekirdek, vPAG: Ventral periakvaduktal gri madde, vlPAG/LPT: Ventrolateral periakvaduktal gri madde/lateral pontin tegmentum, LDT: Laterodorsal tegmental çekirdek, PPT: Pedünlöpontin tegmental çekirdek, SLD: Sublaterodorsal çekirdek.



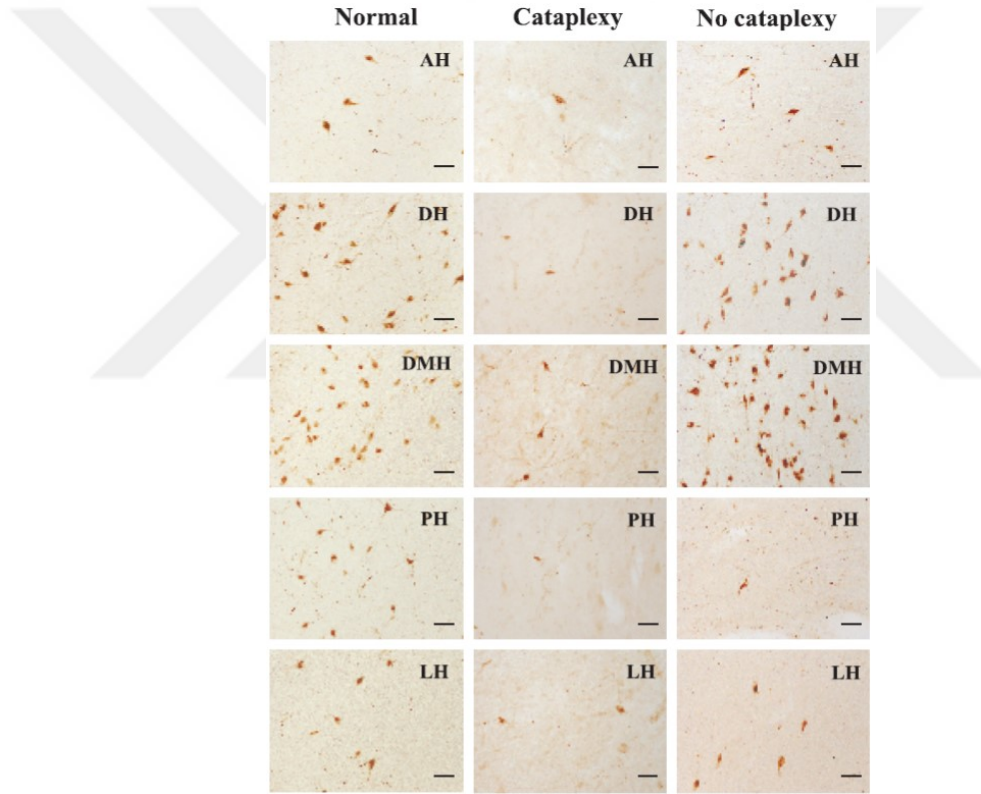
Şekil 2-5: REM-on ve REM-off hücrelerinin uyku sırasındaki aktivite değişimi⁶⁰.

Narkolepsideki uyku nörobiyolojisi mekanizmalarına yönelik yapılan hayvan modeli çalışmalarında, lokus seruleus kaynaklı serotonerjik aktivitenin uyanıklık sırasında maksimum düzeyde iken REM uyku fazında olduğu gibi katapleksi sırasında da bu aktivitenin durduğu gözlenmiştir^{65,66}. Bu sebeple, narkolepside katapleksi tedavisi SSRI ve SNRI gibi serotonini artırmaya yönelik antidepresanlar ile gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, REM uyku atonisinin görülmesinde etkin rol oynayan ventral medulladaki GABAerjik ve glisinerjik nöronların ateşlenme oranının katapleksi sırasında da arttığı bulunmuştur⁵⁸. Ek olarak, görüntüleme çalışmalarında duyguların işlendiği merkez olarak bilinen amigdalanın, bu işlevinin yanında REM uyku regülasyonunda, REM uyku fazındaki kas atonisinde rolü olduğu ve narkolepsi hastalarında amigdala hacminin azaldığı gösterilmiştir^{58,67}. Bu durum narkolepsi hastalarının yaşadığı katapleksi tablosunun güçlü duygusal uyaranlar ile neden tetiklendiğini açıklamaktadır.

2.5.2. Hipokretin/Oreksin

Narkolepsinin etyopatogenezi 1998 yılında hipotalamik nöropeptitler olan hipokretin-1, hipokretin-2 ve G protein eşikli reseptörleri OX-1, OX-2'nin

keşfedilmesiyle daha iyi anlaşılmaya başlamıştır^{6,68,69}. Hipokretin veya bir diğer adıyla oreksin sentezleyen lateral hipotalamustaki nöronların dejenerasyonu ile narkolepsi tablosunun ortaya çıktığı görülmüştür. Narkolepsi için hipokretin mekanizmasıyla ilgili olarak yapılan hayvan çalışmalarında ise hipokretin ve hipokretin reseptör ablasyonu yapılarak narkolepsi hayvan modeli oluşturulabilmiştir^{13,70}. Sağlıklı insanda bulunan hipokretinerjik nöronların tamamına yakınının narkolepsi hastalarında yok olduğu post-mortem çalışmalarda açıklanmıştır⁷¹. Narkolepsi vakalarında görülen bu hipokretin üreten nöronların dramatik kaybı Şekil 2.6'da gösterilmiştir. ICSD-3 kriterleri arasında da yer alan BOS hipokretin düzeyi, özellikle NT1 hastalarında kliniği önemli ölçüde belirlemektedir⁴.

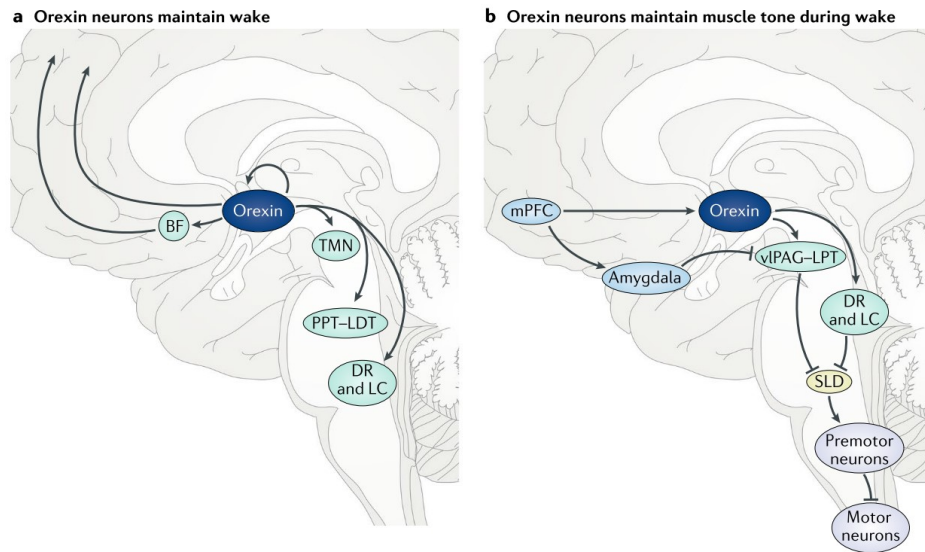


Şekil 2-6: Narkolepsi hastalarında hipokretinerjik nöronların kaybı⁶⁰.

Sağlıklı olgularda hipokretinerjik hücre gövdeleri AH, DH, DMH, PH ve LH bölgelerinde lokalize olmuştur. Katapleksili narkolepsi olgularında ise aynı bölgelerde hücre kaybı görülür. Katapleksinin görülmediği narkolepsi olgularında ise hücre kaybı daha çok PH ve LH bölgelerinde görülmektedir. AH: Anterior hipotalamus, DH: Dorsal hipotalamus, DMH: Dorsomedial hipotalamus, PH: Posterior hipotalamus, LH: Lateral hipotalamus.

Hipokretin nöronlarının temel işlevi uyanıklılık halini sürdürmektir. Bu işlevi uyanıklık ile ilgili rafe çekirdekleri, lokus seruleus, retiküler formasyon, tuberomamiller çekirdek gibi bölgelere eksitator projeksiyonlar göndererek ve uykuya geçişten sorumlu

ventrolateral preoptik çekirdekteki (VLPO) nöronları norepinefrin, serotonin ve ACh salınımı ile inhibe ederek sağlamaktadır. Bunun yanında, bazal ön beyindeki kolinerjik nöronlar (REM-on hücreleri) ile oreksin nöronları karşılıklı olarak birbirlerini uyarak uyanıklık ve REM uyku fazının kontrolünü gerçekleştirirler⁷². Hipokretinerjik nöronların uyanıklık sırasında aktif olduğu, özellikle REM uyku fazları sırasında ise çok daha az sayıda ateşlendiği narkoleptik hayvan modellerinde de gösterilmiştir¹⁰. Aynı şekilde oreksin ve oreksin agonistlerinin intaserebraventriküler olarak farelere enjeksiyonu ile uyanıklık hali ortaya çıkmış ve REM uykusu baskılanmıştır⁷³. Oreksin nöronlarının uyanıklık sırasında paralizisi durumunu engellemesi ise REM uyku fazını baskılayıcı bölgeleri (lokus seruleus, dorsal raphe çekirdeği, ventrolateral periakvaduktal gri madde ve lateral pontin tegmentum) aktiflemesine dayanmaktadır. Aktiflenen bu bölgeler, GABAerjik premotor nöronlar yoluyla efferent motor yolları inhibe ederek kas atonisine sebep olan sublateralodorsal çekirdeği inhibe etmektedir. Güçlü duygusal uyaran mevcut olduğunda medial prefrontal korteksten gelen uyarı oreksini aktifleyerek kas tonusunun kaybolmasına engel olan süreci başlatmaktadır. Narkolepsi olgularında ise oreksin nöronlarının eksitator etkisi söz konusu olmadığından, güçlü duygusal uyaranlar amigdala üzerinden geçerek REM baskılayıcı bölgelerin inhibisyonuna ve dolayısıyla kas atonisine yol açan sublateralodorsal çekirdeğin aktivasyonuna yol açarak katapleksi durumunu oluşturmaktadır¹⁰. Oreksinin uyanıklık artırıcı ve katapleksi baskılayıcı rolü Şekil 2.7’de özetlenmiştir.



Şekil 2-7: Uyanıklık artırıcı (a) ve katapleksi baskılayıcı (b) oreksin yolları¹⁰.

Kesikli çizgiler homeostatik süreçlerin ve sirkadiyen ritmin hipokretin/oreksin mekanizması üzerindeki doğrudan olmayan etkisini göstermektedir. VLPO: Ventrolateral preoptik çekirdek, SCN: Suprakiazmatik çekirdek, DMH: Dorsomedial hipotalamik çekirdek, NE: Norepinefrin, 5HT: Serotonin, ACh: Asetilkolin, His: Histamin, DA: Dopamin.

2.5.3. Genetik Mekanizmalar

Narkolepsi patogenezi için kritik bir gelişme olan hipokretinlerin keşfinin hemen ardından narkoleptik hayvan çalışmalarında hipokretin mutasyonunun tespit edilmesi hastalığın genetik yönüne dikkatleri yöneltmiştir⁷⁸. Literatürde insan narkolepsi olgularının % 95'inin sporadik, % 5'inin ise familyal vakalardan oluştuğu belirtilmiştir⁷⁵. Hastaların birinci derece yakınlarının 20-40 kat risk taşıdığı tanımlanmıştır⁷⁹. Sporadik vakalar çoğunlukta görülmekle beraber narkolepsi için yaklaşık son 20 yılı kapsayan genetik çalışmalar, narkolepside insan lökosit antijenleri (HLA) -DR2 ve HLA-DQ1 allellerinin rolünü göstermiştir. Majör histokompatibilite kompleksi (MHC) DQ bölgesinde bulunan DQA1*01:02, DQB1*06:02, DRB1*15:01 ve DRB5*01:01 allelleri narkolepsiye yatkınlık genleri olarak bulunmuştur^{14,15}. Bu allellerin içerisinde özellikle DQB1*06:02, katapleksi tablosu ile ilişkili bulunduğu narkolepsi tanısı için önem taşımaktadır¹⁶. DQB1*06:02 alleli katapleksili hastaların % 85-95'inde sağlıklı olguların ise % 20-25'inde pozitif olarak bulunmuştur⁸⁰. Ancak bu allel genel popülasyonda rastlanır olduğundan ICSD-3 tanı kriterleri arasında yer almamaktadır.

Narkolepsi için yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), T hücre reseptör alfa lokusunda (THRA), pürinerjik reseptör alttip P2Y11 geninde, tümör nekroz faktör alfa (TNFA) ve tümör nekroz faktör reseptör II genlerinde polimorfizmler tanımlamıştır^{17,18,81}. Bunun dışında, katapleksiyle ilişkili olduğu düşünülen ve nöronal sağkalımda rolü olan Deoksiribonükleik asit (DNA) metiltransferaz 1 (DMNT1) geninde narkoleptik hastalarda mutasyon tespit edilmiştir^{19,20}. HLA allelleri ile birlikte bu bulgular, narkolepsinin patogenezinde farklı immün sistem hücrelerinin yer alabileceğini ve hastalığın otoimmün bir temeli olabileceğini düşündürmektedir.

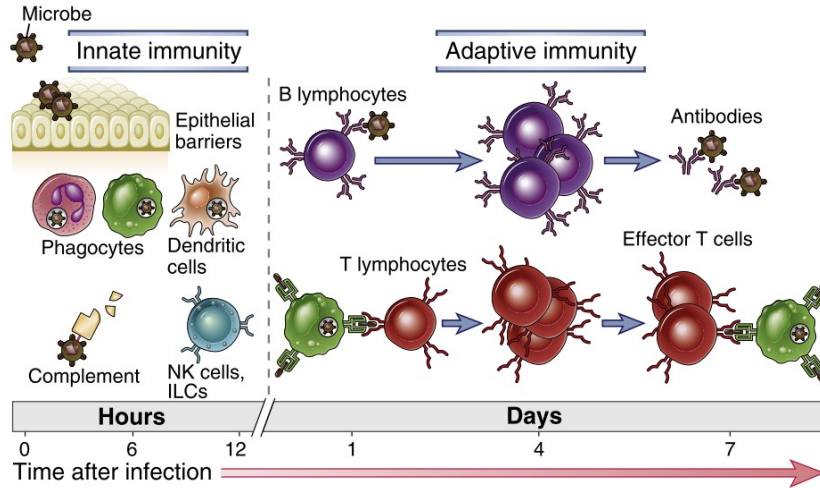
2.5.4. Çevresel Faktörler

Narkolepsinin genetik faktörlere ek olarak çevresel faktörlerin etkisiyle oluştuğu tahmin edilmektedir. Monozigot ikizlerin % 25-31'inde narkolepsinin uyumlu olarak

görülmesi çevresel faktörlerin hastalık etyopatogenezindeki önemini göstermektedir⁵⁵. Bu çevresel faktörlerin prenatal koşullar, mevsim değişimleri, beslenme, toksik madde alımı, kafa travması, serebrovasküler infarkt, geçirilen üst solunum yolu enfeksiyonu ve diğer enfeksiyonel durumlar olabileceği varsayılmaktadır^{41,50,82}

2.5.5. İmmün Mekanizmalar

Temel görevi vücudu mikrobiyal enfeksiyonlardan ve homeostatik dengeyi bozan patojenlerden korumak olan immün sistem, bu görevini gerçekleştirmek için gerekli moleküler ve hüresel süreçleri başlatmaktadır. Bu koruma işlevini belirli molekül, hücre, doku ve organlar aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Vücutta immün sistem hücreleri temel immün sistem organları olan kemik iliği ve timusta fonksiyonel özelliklerini kazanmaktadır. İmmün sistem, daha az spesifik ve doğuştan sahip olduğumuz doğal immünite ile daha özelleşmiş ve adaptif olarak gelişen edinsel immünite olarak birbirini tamamlayan iki mekanizmaya ayrılmaktadır⁸³. Doğal ve edinsel immün sistem elemanları Şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2-9: Doğal ve edinsel immün sistem elemanları⁸⁴.

NK: Doğal öldürücü hücreler, ILC: Doğal lenfoid hücreler.

2.5.5.1. Doğal İmmünite

Doğal immün sistem vücuttaki ilk savunma hattını oluşturur. Belirli bir patojene özgün olmamakla beraber dakikalar içerisinde hızlı immün cevap oluşturabilmekte ve

ilk 12 saat içerisinde etkinliği maksimum düzeye çıkmaktadır. Bu sistemin hafıza özelliği bulunmadığından uzun süreli immünite sağlanamamaktadır. Dört temel bileşeni bulunmaktadır: doğal bariyerler (deri, mukoz membran gibi), hücresel savunma elemanları (nötrofiller, makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreler, mast hücreleri gibi), çözünür araçlar (sitokinler, kompleman sistemi gibi) ve patern tanıma reseptörleri (toll benzeri reseptörler (TLR) gibi)^{84,85}.

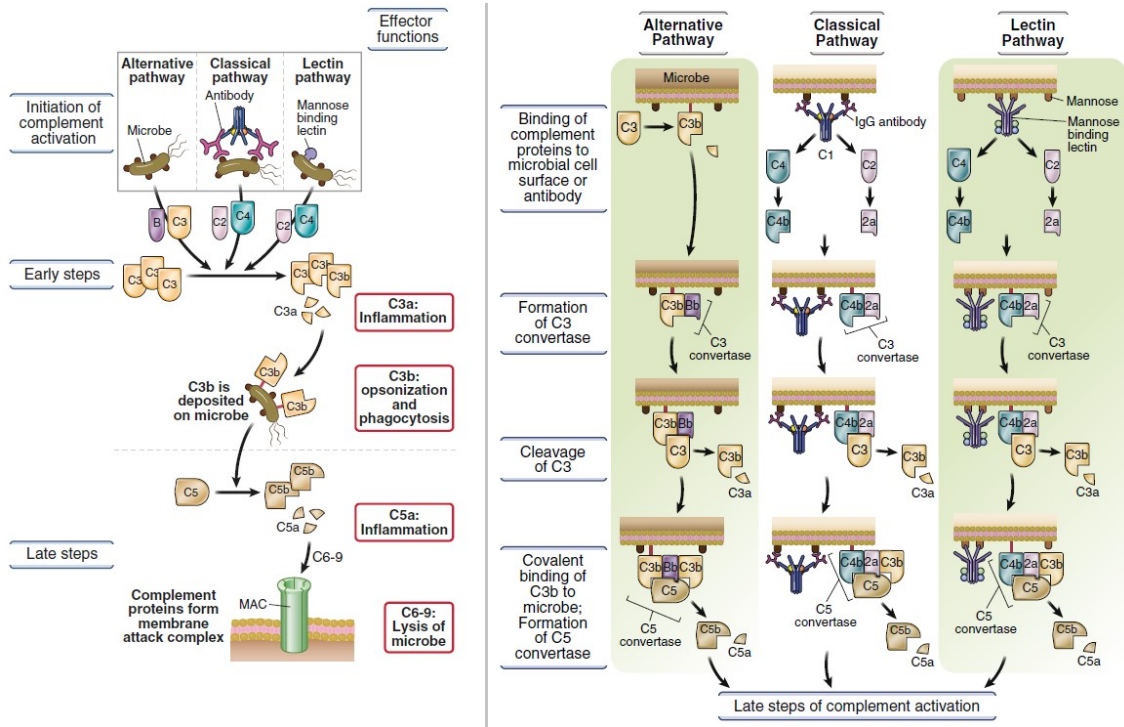
Kompleman Sistemi

Doğal bağışıklığın bir elemanı olarak kompleman sistemi, çok hücreli organizmalar için var olan en eski immün mekanizmalardan biridir. Membrana bağlı 60 protein ve çözünür plazma proteinlerinden oluşan bu sistem patojenlere karşı savunma hattının ilk basamağı olup antikor üretimi ve T hücre aracılı immün yanıtı tetiklemektedir. Kompleman proteinleri proteolitik enzimlerden oluşmakta ve kompleman aktivasyonu bu enzimlerin sıralı aktiflenmesi ile gerçekleşmektedir. Kompleman kaskadını aktive edebilen üç yolak mevcuttur. Bu yollar alternatif yolak, klasik yolak ve lektin yolağı olarak isimlendirilir^{84,86}.

Alternatif yolak doğal immünitenin bir komponentidir. Kompleman regülatör proteinleri olmayan patojenik ajanların yüzeyinde kontrol edilemeyen bir şekilde başta C3 olmak üzere kompleman proteinlerinin aktiflenmesi ile tetiklenmektedir. Klasik yolak, patojenlere veya diğer antijenlere bağlanan antikorlar ile başlatılmaktadır. Bu yönüyle klasik kompleman yolağının humoral ve edinsel immünite elemanı olduğu söylenebilir. Başlıca klasik yolak elemanı yüzey IgG ve IgM'lerine bağlanan C1q, C1r ve C1s elemanlarının oluşturduğu C1 kompleksidir. Lektin yolağı, karbonhidrat bağlayan bir plazma proteini olan manoz bağlayıcı lektinin (MBL) patojenlerin yüzeyindeki terminal mannoz kalıntılarına bağlanmasıyla tetiklenmektedir. Lektin klasik kompleman yolak proteinlerini aktifliyor olsa da antikor yokluğunda mikrobial ürünler ile başlatıldığından doğal immünitenin bir komponenti olarak değerlendirilmektedir. Bu üç yolağın kompleman aktivasyonunun başlatılması aşaması farklı olsa da ileri dönem kompleman aktivasyonu süreçleri ortaktır^{84,86}. Alternatif, klasik ve lektin kompleman yolları Şekil 2.10'da gösterilmiştir.

Proteolitik enzim işlevi gösteren aktiflenen kompleman proteinleri bir diğer kompleman proteininin substratı olduğundan sistemin aktiflenmesi ile enzimatik bir kaskat başlamaktadır. Kompleman sisteminin temel elemanı bir plazma proteini olan

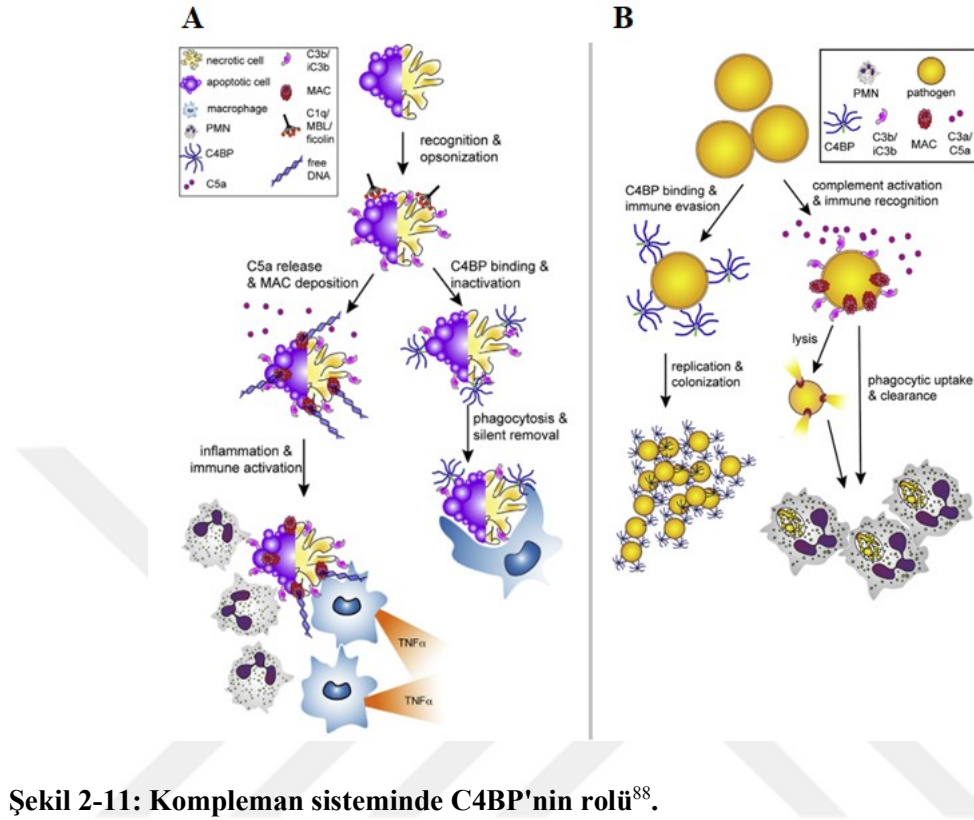
C3'tür. C3 erken dönem kompleman kaskadında enzimatik bölünmeye uğrayarak ana proteolitik fragmanı olan C3b'ye dönüşmektedir. C3b kovalent olarak mikroplara bağlanarak, patojenlerin lizisine sebep olan membran atak kompleksini (MAC) oluşturmakta ve geç dönem kompleman süreçlerini başlatmaktadır^{84,86}.



Şekil 2-10: Alternatif, klasik ve lektin kompleman yolları⁸⁴.

Aktiflenen kompleman sistemiyle vücudun kendi sağlıklı hücre ve dokularına zarar vermesinin önüne geçmek için kompleman aktivitesi yüzeye bağlı ve çözünür bazı kompleman proteinleri ile inhibe edilmelidir. Kompleman 4 b bağlayıcı protein (C4BP) kompleman sistemini inhibe eden başlıca proteindir. C4BP, apoptotik ve nekrotik hücrelerin makrofajlar tarafından ortadan kaldırılma sürecini başlatmaktadır. Klasik ve lektin kompleman yollarının inhibitörü olan C4BP, C3 konvertaz olarak da bilinen C4bC2a kompleksinin oluşumunu önlemekte ve parçalanmasını hızlandırmaktadır. C4BP bir yandan otoimmün süreçleri engellerken bir yandan da patojenlerin kompleman aktivitesiyle eliminasyonunu önleyerek enfeksiyöz durumlara yol açabilmektedir. Bu özelliği ile C4BP mekanizması immünolojik hastalıkların

etyopatogenezinde kritik bir önem taşımaktadır^{87,88}. Şekil 2.11, C4BP'nin kompleman sistemindeki rolünü özetlemektedir.



Şekil 2-11: Kompleman sisteminde C4BP'nin rolü⁸⁸.

A. Apoptotik ve nekrotik hücreler C1q, MBL veya fikolin ile tanınmakta ve opsonizasyon süreci başlamaktadır. Sağlıklı kişilerde C4BP bu hücelere bağlanarak kompleman faktör I ile C3b'yi inaktive etmektedir. Bu durumda, makrofajlar ortama gelerek sessiz bir şekilde inflamasyona sebep olmadan bu C4BP ile işaretlenmiş hücreleri yok etmektedir. C4BP'nin ortamda bulunmadığı durumda kompleman sistemi inhibe olmamakta, membran atak kompleksinin oluşması ile hücreler lize uğramakta ve DNA dahil hücre içi materyal ekstrasellüler ortama çıkmaktadır. Sonrasında fagositler bu materyallere saldırarak TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açmaktadır. B. Vücuda giren patojenler C4BP'yi yüzeylerine çekip bağlanarak kompleman sistemi aktivitesinin eliminasyonundan kurtulabilmektedir. Böylelikle çoğalan patojenler enfeksiyona neden olabilmektedir. Bu patojenler C4BP'ye bağlanamadığında büyük çoğunluğu C3b ve C5a etkinliğiyle oluşturulan MAC ile lize uğramakta, kalan patojenler ise sonraki immün mekanizmalarla yok edilmek üzere işaretlenmektedir.

PMN: Polimorfonükleer lökositler, MAC: Membran atak kompleksi, MBL: Manoz bağlayıcı lektin.

Kompleman sistemi vücutta opsonizasyon/fagositoz, inflamasyon ve hücre lizisi olmak üzere üç temel işleve sahiptir. İlk işlevi, fagosit reseptörleri tarafından tanınan C3b ile patojenlerin kaplanması aşaması olan opsonizasyondur. Kompleman proteinleri ile kaplanan bu patojenler ise hızlıca fagositoza uğramaktadır. İkinci işlev, C3a ve C5a gibi kompleman proteinlerinin proteolitik kısımları lökositler için kemoatraktan olduğundan kompleman aktivasyonunun görüldüğü bölgelere lökosit göçünün

gerçekleştirilmesi ve böylece inflamasyonun başlatılmasıdır. Son işlevi ise, patojenik ajan membranına bağlanan polimerik protein komplekslerinin patojen membran bariyerini zedelemesiyle ozmotik lizise veya patojenin apoptozuna yol açmasıdır^{84,86}.

2.5.5.2. Edinsel İmmünite

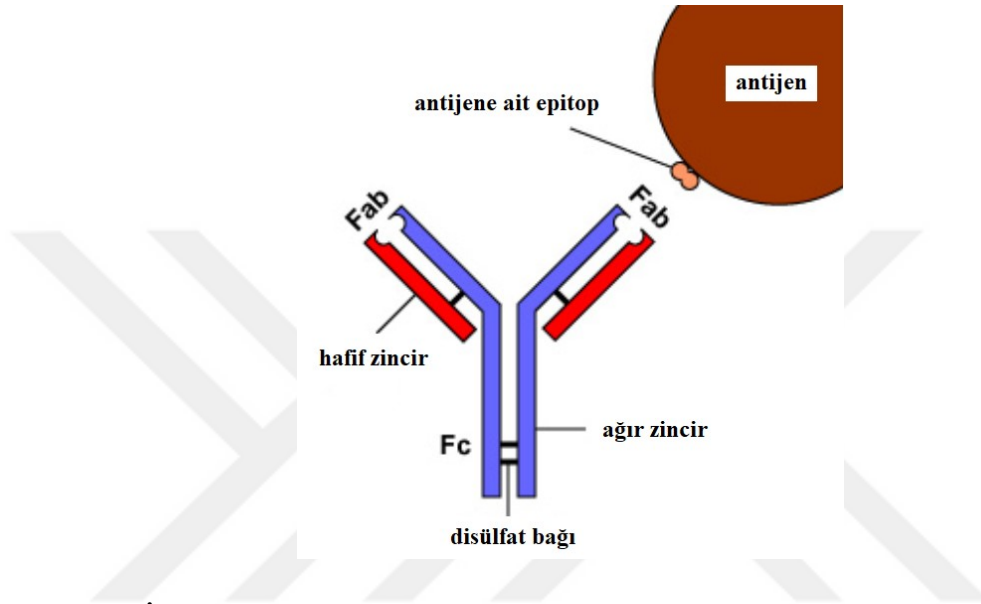
Edinsel veya adaptif immünite belirli bir patojene özgün olarak kazanılmaktadır. Sadece omurgalı canlılarda görülmektedir. Yabancı bir organizmaya maruz kalındıktan sonra ilk savunmayı gerçekleştiren doğal immün sistem, edinsel immün sistemi uyarmaktadır. Ardından edinsel immünite elemanları patojeni ortadan kaldıran veya nötralize eden efektör cevabı başlatmaktadır. Edinsel immün cevabın tam kapasitesine ulaşması günler alabilmektedir. Aynı patojenik ajana tekrar maruz kalındığında, patojeni ortadan kaldıran ve hastalığı önleyen daha hızlı bir bağışıklık reaksiyonunun oluşması için hafıza oluşturmaktadır. Edinsel immün sistem hüморal ve hücrel immünite olarak ikiye ayrılmaktadır. Hüморal immünite B lenfositleri ve ürettikleri antikorlar ile düzenlenirken, hücrel immünite cevabı T lenfositleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Ayrıca efektör hücreler ve antijen sunucu hücreler (APC) diğer edinsel immünite elemanlarıdır^{84,85}.

B Lenfositleri ve Antikorlar

Hücre dışı patojenlerin tanınması, elimine edilmesi ve kompleman sisteminin aktiflenmesi görevlerine sahip B lenfositleri antikor üretebilmektedir. Kemik iliğinde olgunlaşan bu lenfositler, antijen ile lenfoid organlarda karşılaştığı zaman aktiflenmektedir. Olgunlaşma öncesi ve sırasında dönüşecekleri hücre tipine bağlı olarak bu hücreler çeşitli yüzey belirteci ekspresyonu gerçekleştirmektedir. Matürasyon öncesi dönemde B lenfositleri, antijen tanıma işlemi yüzeylerinde eksprese edilen IgD ve IgM izotopları ile yapmaktadır. Antijen ile karşılaşmasının ardından bu hücreler klonal şekilde sayıca artarak aktif hale geçmektedir. Bu aşamadan sonra IgA, IgE veya IgG ekspresyonu yapabilen hafıza hücresi veya plazma hücresi olarak farklılaşmaktadır. B lenfositlerinin antikor üretebilmesi için plazma hücresi olması gerekmektedir^{84,89}.

B hücresi tarafından üretilen antikorlar multimerik glikoproteinlerdir. İki ağır ve iki hafif yapıda iki tip zincirden oluşmuşlardır. Zincirler simetrik olarak Y harfi şeklinde bir araya gelirler. Bu dört glikoprotein zinciri birbirlerine disülfid bağı ile bağlanmıştır. Ağır ve hafif tipteki bu zincirlerde Fab kısmı antijenlerin epitopuna bağlanan bölümdür. Fc kısmı ise Fab kısmının antijeni tanıyıp bağlanmasının ardından

aktiflenen ve antikorların biyolojik aktivitesinden sorumlu olan bölümdür (Şekil 2.11). İnsan antikorları IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM olarak beş farklı izotipte görülmektedir. Bu Ig sınıfları yapıcı birbirine benzemekle beraber değişik antijenleri tanımakta ve Fab bölgeleri farklı immünolojik mekanizmaları aktiflemektedir. Örneğin; IgG ve IgM antikorları klasik kompleman yolağını, IgA ise lektin ve alternatif kompleman yolaklarını aktive etmektedir^{84,89}.



Şekil 2-12: İmmünoglobülin G (IgG) antikor yapısı.

Otoantikor tanımı ise organizmanın kendi sağlıklı hücre ve dokularına karşı geliştirdiği abnormal immün yanıt olan otoimmünite durumunda otoreaktif hale gelen lenfositleri ifade etmektedir⁸⁴. Narkolepsi için reaktif total immünoglobulin IgG ve IgM otoantikorlarının tespit edilmiş olsa da hastalığa spesifik olarak gelişen otoantikorlar henüz tanımlanmamıştır⁹⁰.

T Lenfositleri

T lenfositleri hücresel immünitenin temel elemanları olarak intasellüler patojenik ajanları tanımaktadır. T hücre yüzeyinde Ig yerine T hücre reseptörü (TCR) bulunmaktadır. Her T lenfositi tek tür TCR taşımaktadır. Patojenik antijenlerin bu TCR'lere bağlanmasıyla antijene özgü T hücrelerinin oluşması tetiklenmektedir⁸⁹. Yüksek antikor bağlama kapasitesine sahip olan T lenfositleri işlevlerine göre farklılaşmıştır. Bu T lenfosit tipleri bağışıklık cevabının supresyonunda ve otoimmüniteyi engellemede görevli regülatör T lenfositleri (CD4+, CD25+ gibi),

patojenik antijen eliminasyonunu gerçekleştiren sitotoksik T lenfositleri (CD8+, CD4- gibi), sitokin aracılığı ile immün süreci regüle eden yardımcı T lenfositleri (CD3+, CD4+ gibi), karşılaşılan patojenlere karşı antikor üretimini hızlandırmak amacıyla hafıza oluşturan bellek T lenfositleri ve doğal immün sistem elemanları arasında da yer alan doğal öldürücü T (NKT) lenfositleri olarak sınıflandırılmaktadır⁸⁴.

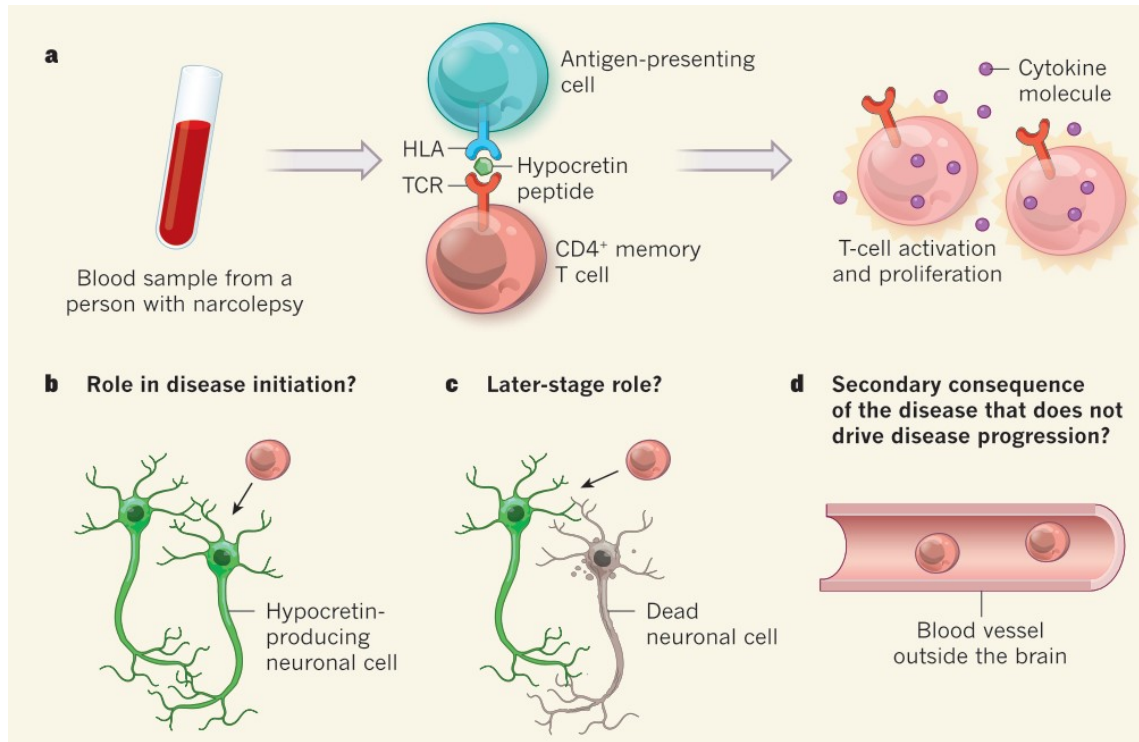
T lenfositleri, antijenleri doğal formunda tanıyan B lenfositlerinin aksine antijenleri daha spesifik olarak MHC bağlı peptit formunda tanıyabilmektedir. Bu sebeple, antijenlerin peptitlere dönüştürülerek T lenfosit sunumunun gerçekleştirilmesi APC tarafından gerçekleştirilmektedir. APC hücreleri arasında dendritik hücreler, makrofajlar, B lenfositleri ve mikroglialar yer almaktadır. Özellikle CD8+ ve CD4+ T lenfositleri bu APC'lerin sunduğu MHC epitoplarına bağlanmakta ve sitokin aracılı hücrel immünite mekanizmalarını başlatmaktadır^{84,89}.

2.5.5.3. Narkolepsi ve İmmünite

İlk olarak hipokretinlerin keşfi ile birlikte narkolepsi hastalarında sadece hipokretinerjik nöronlarda görülen seçici dejenerasyon, hastalığın otoimmün bir ataktan kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Sonrasında otoimmün hastalıklarla güçlü ilişkisi bilinen HLA genlerinin narkolepsideki rolünün keşfedilmesi, hastalığın otoimmün olma ihtimalini güçlendirmiştir. HLA genlerinin T hücrelerine antijen sunan proteinleri kodladığı ve spesifik antijenlere karşı immün cevabın başlatılmasında etkin olduğu bilinmektedir. HLA dışında immün sistem ilişkili HLA moleküllerine bağlı antijenlerin tanımlanmasında rol alan THRA, sitotoksik T lenfositlerde (CD8+) yüksek düzeyde eksprese edilen P2Y11, proinflamatuvar süreçlerde rolü olan TNFα ve TNF reseptör II genlerinde polimorfizm ve immün sistemde fazlasıyla eksprese edildiği bilinen DMNT1 geninde mutasyon tespit edilmesi hastalığın immün mekanizmalardan kaynaklanabileceği görüşünü desteklemiştir^{17-20,81}.

Narkolepsinin ile ilgili sitokin düzeyindeki araştırmalar, IL-6 ve TNFα gibi proinflamatuvar sitokinlerin uyku-uyanıklık döngüsünde etkin olduğunu ve narkolepsi hastalarında bu sitokinlerin sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında daha yüksek seviyelerde bulunduğunu göstermektedir^{21,22}. Ayrıca, narkolepsi hastalarında CD4+ hafıza T hücrelerinin hipokretin protein fragmanlarına karşı sitokin aracılı immün yanıt oluşturduğu ve bu CD4+ T hücrelerinin sağlıklı kontrollere kıyasla narkolepsi hastalarında sayıca çok daha yüksek oranda bulunduğu raporlanmıştır (Şekil 2.13)⁹¹. Bir

diğer T hücresi CD8+ ile ilgili olarak yapılan bir hayvan çalışmasında ise bu hücrelerin hipokretinerjik nöronların eksprese ettiği hipokretin antijenini tanıyarak buna karşı immün yanıt başlatıp hücrelerin ölümüne sebep olabileceğinden bahsedilmiştir⁹². T hücre aracılı immün mekanizmalar ile ilgili çalışmalar bu T hücrelerinin narkolepsi hastalarında bulunan hipokretin dışındaki proteinleri ne şekilde tanıyıp cevap verdiğini veya mekanizmanın detaylarını açıklayamasa da hipokretine karşı artmış T hücre reaktivitesi narkolepside otoimmünitenin yeri olabileceğini göstermiştir⁹³.



Şekil 2-13: CD4+ T hücrelerinin narkolepsi etyopatogenezindeki rolü⁹³.

Narkolepsi hasta kan örneklerinde CD4+ T hücrelerinin HLA bağlı antijen sunucu hücreler ile uyarılması sonucu artan T hücre proliferasyonu ve sitokin aracılı immün yanıt oluşmaktadır (a). Artan T hücre reaktivitesi hastalık başlangıcında hipokretinerjik nöron dejenerasyonuna sebep olabilir (b). Artan T hücre reaktivitesi hastalığın ilerleyen dönemlerinde dejeneratif süreci kötüleştirebilir (c). Artan T hücre reaktivitesi hastalığın ikincil bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir (d). HLA: İnsan lökosit antijeni, TCR: T hücre reseptörü.

Diğer nöroimmünolojik hastalıklarda olduğu gibi narkolepside de viral ve bakteriyel enfeksiyon durumları hastalık başlangıcı ve süreci için önem taşımaktadır. Bu konuyla ilgili narkolepsi için ratlanan en önemli durum 2009-2010 senelerinde görülen H1N1 influenza virüs salgını ile artan narkolepsi vakalarıdır. Salgın sonrası özellikle

AS03 adjuvanlı Pandemrix aşısı olmuş HLA-DQB1*602 pozitif İskandinav çocuklarında narkolepsi gelişim riski 6-9 kat artmıştır⁹⁴. Aynı tarihlerde aşı olmamış Çin’de yaşayan çocuklarda da H1N1 enfeksiyonuna bağlı artmış narkolepsi vakaları görülmüştür⁹⁵. H1N1 enfeksiyonu dışında streptokok (*streptococcus pyogenes*) ve *helicobakter pylori* gibi bakteriyel enfeksiyonlar hastalık başlangıcını tetikleyebilmekte ve anti-streptolizin O (ASO), anti-DNAaz B ve anti-*helicobakter pylori* gibi enfeksiyon belirteçleri erken dönem HLA-DQB1*602 pozitif narkolepsi hastalarında artmış düzeylerde gözlenebilmektedir⁸¹. Bu enfeksiyonel durumlar narkolepsi immünopatogenezi için önemli olmakla beraber henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Bu süreçte iki temel mekanizmanın rol aldığı düşünülmektedir. Bunlardan ilki, virüs veya bakteriye karşı spesifik bir immün cevabın moleküler taklit mekanizması ile gerçekleştiği veya viral enfeksiyon için bağışıklık sisteminin aşıda bulunan adjuvan ile tetiklenerek jeneralize immün yanıt oluşturarak otoimmün süreci başlatmasıdır. İkinci açıklama; viral/bakteriyel veya mevsimsel enfeksiyonların, spesifik olmayan immün aktivasyon ile hastalık yatkınlığı taşıyan bireylerde önceden var olan otoreaktif T hücre gruplarını uyarak sitokin/kemokinler aracılığı ile hipokretinerjik nöron ölümüne sebep olan sitotoksik CD8+ T hücrelerinin veya mikrogial hücrelerin aktiflemesine ve otoimmüniteye sebep olmasıdır^{20,96}.

Literatürde NT1 hasta serumlarında artmış hipokretin-1 reaktif total immünoglobulin IgG ve IgM otoantikorlarının tespit edilmesi narkolepsinin otoimmün bir hastalık olarak değerlendirilmesi yönündeki şüpheleri artırmıştır^{23,24,97}. Ancak, narkolepsi hastalarındaki hipokretin veya reseptörlerine karşı spesifik olarak gelişen herhangi bir antikor henüz literatürde henüz belirtilmemiştir. 2010 yılında yapılan bir çalışmada katapleksili hastalarda yüksek oranda tribbles homolog (TRIB) 2 antikorunun varlığı gösterilmiştir ancak bu antikorun hastalık patogenezindeki rolü net olarak belirtilmemiştir⁹⁸. Bununla birlikte, NT1 tanısı için hastalık başlangıcında TRIB2 artmış seviyelerde tespit edilmektedir⁹⁹. TRIB2 ile narkolepsi hayvan modeli oluşturulabilmektedir¹⁰⁰. Ayrıca, narkolepsi için hastalığa spesifik olmayan Ma1, Ma2 ve nöromiyelitis optika hastalarında bulunan Aquaporin 4 (AQP4) gibi antikorlar saptanmasına rağmen narkolepsi hastalarının BOS’unda oligoklonal bant (OKB) tespit eden çalışma bulunmamaktadır¹⁰¹. İmmün terapilerin narkolepsideki etkinliğini gösteren çok çalışma olmasa da otoantikor aktivitesinin inhibisyonunu sağlayan intravenöz

immünoglobulin (IVIG) tedavisinin hastalık başlangıcında yüksek dozda uygulanması BOS hipokretin-1 seviyesinin normalleşmesi adına pozitif sonuçlar vermektedir¹⁰².

Son yıllardaki tüm bu araştırmalar narkolepside immünitinin rolüne odaklansa da, narkolepsi için Witebsky'nin otoimmün hastalık kriterleri henüz karşılanamamaktadır^{20,103}. Kompleman sistemi, lenfosit alt grupları ve inflamasyon belirteçleri gibi immün mekanizmalar narkolepsi için literatürde detaylı değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda narkolepsinin tam olarak aydınlatılamamış olan immünopatogenezi hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak amacıyla, narkolepsiye özgü aday molekül/moleküllerin tanımlanması ve tanımlanan adayların validasyonunun yapılması hedeflenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Seçimi

Bu çalışma için 2013/1739 protokol numaralı “Narkolepsi Hastalığında İmmünopatolojik Özelliklere Yeni Bir Bakış: Pürünerjik ve Monaminerjik Sistemlerin Otoimmünite Üzerine Etkileri” başlıklı etik kurul onayı alınmış, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Uyku Laboratuvarı birimi tarafından seçilmiş, gönüllü olur formu imzalatılmış narkolepsi olgularının numuneleri kullanılmıştır.

Narkolepsi grubu için; 18-55 yaş aralığında, gönüllülük esasını kabul eden, Amerikan Uyku Tıbbı Derneği’nce belirlenen olguların seçildiği yıldaki güncel Uluslararası Uyku Hastalıkları Sınıflandırılmasına göre katapleksili veya katapleksisiz narkolepsi sendromu tanısı almış, polisomnografi ve Çoklu Uyku Latans Test sonuçları narkolepsi ile uyumlu olan olgular seçilmiştir¹⁰⁴. İlgili yaş aralığında olmayan, gönüllülük esasını kabul etmeyen, anamnezinde eşlik eden nörofizyolojik fonksiyonları etkileyen nörolojik hastalığı olan (ensefalit, inme, multiple skleroz, nöromusküler hastalık, madde kötüye kullanımı, epilepsi, baş travması, inme, beyin tümörü veya menenjit gibi santral sinir sistemi enfeksiyonları), primer diğer uyku bozukluğu saptanan, polisomnografi ve Çoklu Uyku Latans Test sonuçları narkolepsi ile uyumlu olmayan olgular çalışmadan dışlanmıştır.

Sağlıklı gönüllülere ait numuneler ise İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı tarafından toplanmıştır. Bu grup için; narkolepsi grubu ile yaş ve cinsiyet açısından uyumlu, 18-55 yaş aralığında, gönüllülük esasını kabul eden, son 3 aydır enfeksiyonel bir hastalığı olmamış, immün baskılayıcı ilaç kullanmayan, herhangi bir immünolojik veya nörolojik rahatsızlığı bulunmayan, primer uyku bozukluğu tanısı almamış olan gönüllüler çalışmaya dahil edilmiştir. Yaş ve cinsiyet açısından narkolepsi grubu ile uyumlu olmayan, belirtilen yaş aralığı dışında olan, gönüllü olmayan, bahsedilen hastalıklara sahip olan veya immünsupresif ilaç kullanan gönüllüler araştırmaya dahil edilmemiştir.

Bu tez çalışması, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 28.12.2018 tarihli ve 22 sayılı toplantısında, 5 sayılı yazı ile uygun bulunmuştur.

3.2. Numune Alımı

Narkolepsi olgularından ve sağlıklı kontrol grubu gönüllülerinden venöz olarak 1 düz/kuru tüp (10 cc) kan alınmıştır. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Heraeus, Amerika) edilerek serum ayırıştırılmıştır. Her tüpte 1 ml olacak şekilde iki farklı steril tüpe porsiyonlanarak deneyin yapılacağı zamana kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.3. İmmünopresipitasyon

Çalışmanın bu protokolü İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyoloji bölümünde gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Hücre Kültürü

İmmünopresipitasyon (İP), protein saflaştırma yöntemi, için insan nöroblastoma hücre soyu olan SH-SY5Y (ATCC, ABD) kullanılmıştır. Hücre kültüründe medyum olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tercih edilmiştir. Tüm işlemler laminar hava akımlı steril kabinde gerçekleştirilmiştir.

SH-SY5Y hücreleri, 100 mm'lik petrilere, her petride yaklaşık 5×10^6 hücre olacak şekilde, örnek başına 2-4 adet petri hazırlanarak büyütülmüştür. % 5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde hücreler inkübe edilmiştir. Hücrelerin sıkışık hale geldiği ve besiyerinin yetersiz kaldığı durumda, hücrelerin bulunduğu petrilere buz üzerine konulmuştur ve medyum pipet ile çekilmiştir. Medyum çekme işlemi sırasında vakum kullanılmamıştır.

Ardından, hücreler soğuk 1x konsantrasyonundaki fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Lizis tampon, filtre edilmiş 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5 mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), % 1 Triton X-100 ve 1:100 oranda protein inhibitör kokteyli (PİK) ile pH değeri 7,4 olacak şekilde hazırlanmıştır. 100 mm'lik petrilereki hücrelerin üzerine 1 ml hazırlanmış bu lizis tampon çözeltisinden eklenmiş ve hücreler +4°C'de 30 dakika shaker üzerinde inkübe edilmiştir.

Bu işlemden sonra, petri yüzeyine adhere olmuş hücreler buz üzerinde kaldırılmıştır. Soğuk tüplere alınan hücreler en yüksek g değerinde 15 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminde süpernatantlar temiz soğuk tüplere aktararak buzda beklemeye alınmıştır. Ardından bead hazırlama işlemine geçilmiştir.

3.3.2. Bead Hazırlanması

Bu aşamada “P-3296 Protein G on Sepharose 4B fast flow” bead’ler (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) kullanılmıştır. % 20’lik etanol içinde bulunan bu bead’lerin içerisinde istenilen miktar alınmadan önce çalkalayıcıda bead-alkol süspansiyonu olana kadar karıştırılmıştır. Süspansiyonun içerisinde 1 ml hücre lizatı için 120 µl bead temiz bir falkona ucu kesik pipet ucu ile alınmıştır. Alınan bead’lerin üzerine 4 katı miktarda su konularak pipetaj yapmadan karıştırılmıştır.

Sonrasında, etanolü bead’lerden ayırmak amacıyla bead’ler +4°C’de 5 dakika 8000 x g hızda santrifüj edilmiştir ve üst sıvı bead’lerden ayrılmıştır. Bunun ardından, PBS ve lizis tampon çözeltisi ile 3’er kez yıkama yapılmıştır. Yıkamada kullanılan bu lizis tamponu PİK içermemektedir. Son yıkama işlemi içerisinde PİK olan PBS ile 3 kez yapıldıktan sonra lizis tamponu (PİK içeren) ilave edilmiştir.

3.3.3. Ön Temizleme İşlemi

Her bir petri için 30 µl bead hücre lizatına eklenerek bir saat +4°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde 5 dakika yine +4°C’de 8000 x g hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst sıvı, soğuk tüplere alınmıştır. Bu işlem soğuk bir odada gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. İP Protokolü

“Pre-clear” işlemi gerçekleştirildikten sonra hücre lizatlarına 20 µl hasta grubuna ait serumlar eklenmiş ve gece boyu +4°C’de shaker üzerinde serumlar inkübe edilmiştir. Sonrasında petri başına 60 µl bead’ler ucu kesilmiş pipet ucu ile eklenmiş ve +4°C’de 1 saat shaker’da inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon bitiminde, 3 dakika +4°C’de 6000 x g’de örnekler santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından üst sıvı atılmıştır. PBS ile yapılan 1 kez yıkama sonrasında üst sıvı uzaklaştırılmıştır ve pellet - 80°C’ye kaldırılmıştır. Protokolün soğuk odada uygulanması önem taşımaktadır.

3.4. Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS)

Çalışmanın bu aşaması Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Proteinlerin Ekstraksiyonu

“Bottom-up shotgun” kütle spektrometre işleminin ilk aşaması olarak proteinlerin ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla FASP (Filter Aided Sample Preparation) protokolü uygulanmıştır. Bu protokol kapsamında öncelikle % 4 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS), 0,1 M dithiothreitol (DTT), 100 mM Tris-HCl ve içeren SDT lizis tampon çözeltisi doku veya hücre pelletinin 10 katı ağırlıkta hazırlanarak örneklerin üstüne eklenmiştir. Bunun ardından, 10 dakika ara ile 95°C’de örneklerin vortekslenerek ısıtılması gerçekleşmiştir. Isıtılan örnekler, 5 dakika süresince su banyosunda sonikasyona maruz bırakılmıştır. Sonikasyon işlemi sonrasında örnekler, 4°C’de 15000 x g’de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminde üst sıvı, temiz tüplere alınmıştır.

3.4.2. Konsantrasyon Tayini

Ekstrakte edilmiş protein örnekleri 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde çözüldükten sonra peptit konsantrasyonlarının ölçümü Lowry metoduyla, NanoDrop1000 (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.4.3. Solüsyon Tripsin Kesimi ve Guanidizasyon

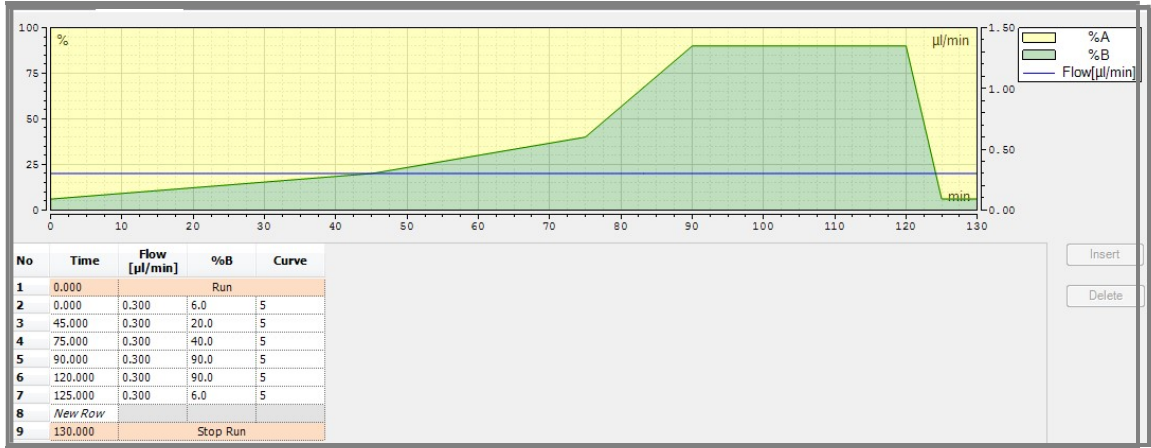
Solüsyon içi tripsin kesimi ve guanidizasyonu protokolü 100 ng örnek için uygulanmıştır. Örneklerin olduğu beadlerden ekstraksiyonu yapılmış proteinlerin tripsin kesiminden sonra ilgili peptit ayrımı işlemine geçilmiştir.

3.4.4. Sıvı Kromatografisi (LC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile peptit ayırma işlemi için donanım olarak nano-LC pompası (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 RSLC, ABD), otomatik örnekleyici (Dionex UltiMate 3000 Series RS, Thermo Fisher Scientific, ABD) ve termostatl kolon (Thermo Scientific Ultimate 3000 Series TCC-3000RS, ABD); yazılım olarak ise Xcalibur 4.0 (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile çalışılmıştır. Ayrıca, peptit iyonizasyonu için 50 ünite sheet gaz ve 30 ünite auxiliary gaz akışlı, kapiler sıcaklığı 300°C, +2.3 kV ve RF-S lens düzeyleri 50 olarak ayarlanmış ısıtılmış elektrosprey iyonizasyon kaynağı (HESI) kullanılmıştır.

C18 yakalama kolonunun (5 mm × 300 µm ID, 5 µm dp) sıcaklığı 40°C olarak belirlenmiştir. Olgulara ait örneklerin enjeksiyonu her analizde 2 µl miktarda yapılmıştır. Akış 0,3 µl/dakika hızla toplam 130 dakikalık akış süresinde mobil faz

gradyanında gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A ve B olarak peptit elüsyonu yapılmıştır. Mobil faz A % 0,1 (v/v) formik asit ve HPLC'ye uygun su, mobil faz B ise % 0,1 (v/v) trifloroasetik asit ve asetronitril içermektedir. Elüsyon profili Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Ayırıştırılan peptitler Q Exactive model kütle spektrometre orbitrap cihazında (Thermo Fisher Scientific, ABD) analiz edilmiştir.



Şekil 3-1: Mobil faz A ve mobil faz B'nin zamana göre değişen elüsyon profili.

3.4.5. Veri Analizi ve Protein Tanımlama

Q Exactive model MS orbitrap cihazı ile veri tarama işlemi Full MS spektrum ve sonrasında seçilen 10 en yüksek prekürsör iyon ile yüksek enerjili kollizyon ayırımı (HCD) modlarında yapılmıştır. İlgili parametreler Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Dinamik dışlama ile otomatik olarak tek yüklü veya eşleştirilmeyen iyonlar MS/MS analizinden dışlanmıştır. Standart kalibrasyon solüsyonu (Thermo Scientific, ABD) ile Q Exactive MS cihazının kalibrasyonu her bir örnek enjeksiyonu öncesinde ayarlanmıştır.

Tablo 3-1: Full MS spektrum ve HCD parametreleri

	Full-MS	HCD
Çözünürlük	70.000	17.500
Tarama Aralığı	400-200 m/z	2 m/z
Otomatik Kazanım Kontrolü (AGC)	3×10^6	1×10^5
Maksimum Enjeksiyon Zamanı	60 ms	100 ms
Data Tipi	Sentroid	Sentroid

Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific, ABD) programı ile ham veriler değerlendirilmiştir. Protein tanımlaması için yapılan bu değerlendirmede MS/MS kütle toleransı 0,2 Da, peptit kütle toleransı 10 ppm ve kütle doğruluk değeri 2 ppm kabul edilmiştir. En fazla 1 yanlış kesim tolere edilmiştir. Sabit olmayan değişimler asparajin deaminasyonu ve metionin oksidasyonu, sabitlenmiş değişim ise sistein karbamidometilasyonudur. Tanımlama için en düşük peptit değeri 2 iken peptit uzunluk sayısı en düşük 6 amino asit olarak belirlenmiştir.

The Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB) Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org>) kapsamlı protein dizilerine ait veri tabanında çalışmada tanımlanan proteinler incelenmiştir. Ayrıca, Proteome Discoverer 2.2 yazılımının eklentisi olan Gene Ontology programıyla bulunan bu proteinler fonksiyonelliğine göre gruplandırılmıştır.

3.5. Aday Protein Validasyon Çalışmaları

İP ve LC-MS/MS analizleri sonucunda narkolepsi olguları için tanımlanan C4BPA proteinine ait validasyon çalışmaları “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) yöntemi ile (ticari ELISA kiti ve homemade ELISA) gerçekleştirilmiştir.

Bu aşama İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı’nda tamamlanmıştır.

3.5.1. Serumda C4BPA Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Belirlenen C4BPA protein düzeyinin serumda tespiti, ticari C4BPA ELISA kiti (KTE63068, Abbkine, Çin) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan kitin deteksiyon aralığı 2,5 ng/mL - 40 ng/mL, minimum tespit edilebilir dozu ise <0,1 ng/mL’dir. Kit, iki taraflı sandviç ELISA olarak tasarlanmıştır.

Deneyde 41 narkolepsi olgu serumu ve 26 sağlıklı kontrol serumu çalışılmıştır. Üreticinin talimatları doğrultusunda, deney öncesinde standartlar 80 ng/mL, 40 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL ve 2,5 ng/mL olarak seri dilüsyonla hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu C4BPA ile kaplı mikropolağa uygun şekilde hazırlanan standartlar (50 µl) ve örnekler (40 µl dilüent ve 10 µl serum örneği) eklenmiştir. Standartlar çift, olgu örnekleri tek kuyu olarak çalışılmıştır. Negatif kontrol amaçlı kalan kuyular (blank) boş bırakılmıştır. 45 dakika 37°C’de plak inkübe edilmiştir.

Kuyular 5 defa kuyu başı 250 µl önceden hazırlanan 1:30 yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Yıkamalar arasında plak 1-2 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Sonrasında, her kuyuya 50 µl “horseradish” peroksidaz (HRP) konjuge belirleyici (detection) antikor eklenmiştir. 30 dakika 37°C’de inkübasyondan sonra plak tekrar 5 defa 250 µl yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

Her kuyuya 50 µl kromojen A ve 50 µl kromojen B eklenmiştir. Bu aşama karanlıkta gerçekleştirilmiştir. 15 dakika 37°C’de inkübasyondan sonra her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu (H₂SO₄) konulmuştur. Renk değişimi spektrofotometre cihazında (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, ABD) 450 nm dalga boyunda okunmuş ve değerlendirmeler pg/mL ve optik densite (OD) cinsinden yapılmıştır.

3.5.2. Serumda Anti-C4BPA Antikorlarının Gösterilmesi

Serumdaki olası C4BPA’ya karşı gelişen otoantikorların gösterilmesi önem taşımaktadır. Halihazırda mevcut bir ticari kit bulunmaması sebebiyle ölçüm için rekombinan C4BPA antijeni (0,1 ml, 1,5 mg/mL, Novus NPB1-88263PEP, Novus Biologicals, ABD) kullanılarak homemade ELISA metodu uygulanmıştır. Bu yöntem için maxisorp plak kullanılmıştır. Serum dilüsyonları seri olarak gerçekleştirilmiştir. Planlanan her homemade ELISA deneyinde bir önceki deney sonuçları dikkate alınarak optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir.

İlk basamakta, plak rekombinan insan C4BPA antijeni ve kaplama solüsyonu (bikarbonat solüsyonu, pH 8,6) ile kuyu başına 0,5 µg antijen ve total hacim 100 µl olacak şekilde kaplanmıştır. Gece boyu 4°C’de inkübe edilmiştir. Ertesi gün plak bir kez % 0,5 Tween 20-PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. PBS içinde % 5 “fetal bovine serum” (FBS) (ATCC 30-2025, ABD) olan FBS-PBS solüsyonu ile bir kuyuda total hacim 100 µl olacak şekilde 4°C’de 2 saat bloklama işlemi yapılmıştır. Ardından 1:250

ve 1:500 dilüe edilen C4BPA'ya karşı olası antikor geliştiği varsayılan tek bir narkolepsi olgusuna ait dilüe edilmiş serumlar her kuyuya 100 µl olarak konulmuştur ve 90 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. % 0,5 Tween 20-PBS solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra antikor ölçümleri için 1:5000 oranında sulandırılmış % 5 FBS-PBS içinde HRP-konjuge sekonder antikor (keçi anti-insan IgG-HRP, ab97165, Abcam) her bir kuyuya 100 µl konulmuştur. 90 dakika 37°C'de inkübasyonun ardından, plak % 0,5 Tween 20-PBS solüsyonu ile 3 kez yıkanmış ve substrat olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) her kuyuya 100 µl eklenmiştir. 10 dakika sonra reaksiyonu durdurma solüsyonu olarak 2M H2SO4 kullanılmış ve hemen 450 nm'de ELISA okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

İkinci basamakta, aynı protokol uygulanmak ile birlikte serum dilüsyon oranları 1:500 ve 1:1000 olarak denenmiştir. C4BPA'ya karşı olası antikor geliştiği varsayılan 5 narkolepsi olgusunun serumları, anti-C4BPA antikoru negatif olduğu varsayılan 2 hastanın serumları ve 3 sağlıklı kontrol serumu kullanılmıştır.

Üçüncü basamakta, antijen miktarı kuyu başı 0,4 µg olacak şekilde plak kaplanmıştır. Bloklama solüsyonu % 5 FBS-PBS yerine spesifik olmayan bağlantıları azaltmak adına % 20'lik olarak hazırlanmıştır. Serum dilüsyon oranları 1:5000, 1:10000, 1:20000 ve 1:50000 olarak çalışılmıştır. Anti-C4BPA antikoru pozitif olduğu varsayılan 2 narkolepsi olgu serumları, anti-C4BPA antikoru negatif olduğu varsayılan 1 hasta serumu ve 1 sağlıklı kontrol serumu kullanılmıştır. % 0,5 Tween 20-PBS solüsyonu ile yapılan yıkama sayısı 5'e yükseltilmiştir.

Dördüncü basamakta, bir önceki deneyde kullanılan serum örnekleri kullanılmıştır ve kompleman inaktivasyonu işlemi ısıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için, serumlar 250 µl alikotlanmış ve parafilm ile kaplanmıştır. 56°C'de su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Serumların bulunduğu tüplerin komplemanların dibe çökmesi sebebiyle düz tutulmasına özen gösterilmiştir. Sonrasında serumlar oda ısısında gece boyu beklemeye alınmıştır. Bir önceki deneyin protokolü aynen uygulanarak ısıyla inaktive edilmiş serumlar 1:5000, 1:10000, 1:20000 ve 1:50000 oranlarında sulandırılarak çalışılmıştır.

Son basamakta, tüm narkolepsi olgularına ait 41 serum ve 19 sağlıklı kontrole ait serumların 1:10000, 1:20000 seri dilüsyon oranlarıyla çalışılmasına karar verilmiştir. Isı inaktivasyonu yapılmamıştır. Kuyu başı 0,4 µg C4BPA antijeni ile plaklar kaplanmıştır. % 20 FBS-PBS çözeltisi bloklama için kullanılmıştır. Yıkamalar % 0,5

Tween 20-PBS ile 5'er kez yapılmıştır. 1,5 saat olan inkübasyon süreleri 2 saate uzatılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikor diğer deneylerde olduğu gibi 1:5000 oranında kullanılmıştır. Kuyu başı 100 µl TMB ve sonrasında 2M H₂SO₄ ile reaksiyonun durdurulmasının ardından 450 nm'de okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6. İstatistik

İki grubun karşılaştırıldığı (narkolepsi-sağlıklı kontrol veya iki farklı serum dilüsyonuna ait değerlerin karşılaştırması) durumlarda 2-tailed t test uygulanmıştır. Beklenen farkın anlamlı olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla güvenilir antikor düzeyi (cut off değeri) her dilüsyon değeri için “(standart sapma x 2) + ortalama değer” formülü ile hesaplanmıştır ve Fisher kesin ki-kare testi uygulanmıştır. Pearson korelasyon testi ile C4BPA protein düzeyi ve anti-C4BPA antikor düzeyi arasında korelasyon analizi yapılmıştır. Sağlıklı ve hasta gruplarına ait parametrelerin standart sapma, standart hata, ortalama ve ortanca değerleri hesaplanmıştır.

Deney parametrelerinin anlamlılık düzeyi $p < 0,05$, güven aralığı % 95 olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler ve grafikler GraphPad Prism 5 programı ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Demografik ve Klinik Bilgiler

Araştırmada 42 narkolepsi olgusu çalışıldı. Yaş ve cinsiyet olarak narkolepsi grubuyla uyumlu toplam 26 sağlıklı kontrol örneği de araştırma kapsamında değerlendirilmiştir. Hastaların uykululuk durumu Epworth Uykululuk Ölçeği (ESS) ve uyku kalitesi Pittsburgh Uyku Kalite İndeksi (PSQI) ölçekleri ile ölçülmüştür.

Yapılan değerlendirmede hasta ve sağlıklı kontrol olguları arasında yaş ve cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel fark saptanmamıştır (Tablo 4.1). Narkolepsi alt tipleri; cinsiyet, uyku skorları (REM uyku latansı, uyanıklık, N1, N2, N3, REM ortalama uyku latansı, SOREM, ESS, PSQI), C4BPA protein ve ortalama Anti-C4BPA düzeyleri açısından incelendiğinde ise iki alt tip NT1 ve NT2 arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.2). Yaş ve uyku etkinliği değerleri iki narkolepsi alt tipi için $p < 0,05$ 'in altında bulunmuştur. NT2 alt tipi için, uyku etkinliği ile C4BPA protein düzeyi arasında negatif korelasyon ($R = -0,677$, $p = 0,002$), uyanıklık yüzdesi ile C4BPA protein düzeyi arasında pozitif korelasyon ($R = 0,724$, $p = 0,001$), REM evresinde geçirilen süre yüzdesi ile anti-C4BPA 1:20000 antikor düzeyi arasında negatif korelasyon ($R = -0,497$, $p = 0,043$) ve PSQI skorları ile C4BPA protein düzeyi arasında pozitif korelasyon ($R = 0,54$, $p = 0,014$) tespit edilmiştir. NT1 olguları için klinik/demografik veriler ile protein ve antikor düzeyi arasında yapılan korelasyon analizinde anlamlı sonuç elde edilememiştir. Sağlıklı kontroller için yaş, cinsiyet, protein ve antikor düzeyleri arasında yapılan analizde yaş ile C4BPA protein düzeyi arasında istatistiksel anlam olmamakla birlikte negatif korelasyon saptanmış olup ($R = -0,377$, $p = 0,058$), diğer değerler için anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 4-1: Çalışmada değerlendirilen narkolepsi ve sağlıklı kontrol olgularının demografik bilgileri

	Narkolepsi (n = 42)	Sağlıklı Kontrol (n = 26)	p değeri
Cinsiyet (K/E)	16/26	9/17	0,772
Yaş (yıl, SS)	32,29±11,82	41±13,25	0,324

N: Örneklem büyüklüğü, K: Kadın, E: Erkek, SS: Standart sapma, ort: Ortalama, dk: Dakika, kg/m2: Kilogram/metrekaare, NT1: Narkolepsi tip 1, NT2: Narkolepsi tip 2, SOREM: REM ile başlayan uyku epizodu, ESS: Epworth Uykululuk Ölçeği puanları, PSQI: Pittsburgh Uyku Kalite İndeksi puanları. Ortalama değer ± standart sapma değerleri belirtilmiştir. Hasta ve sağlıklı kontroller arasında cinsiyet dağılımı ki kare testi ile, yaş dağılımı ise Student's t-test ile değerlendirilmiştir.

Tablo 4-2: Çalışmada değerlendirilen NT1 ve NT2 olgularının demografik ve klinik bilgileri

	NT1 (n = 18)	NT2 (n = 20)	p değeri
Cinsiyet (K/E)	8/10	7/13	0,877
Yaş (yıl, SS)	32,31±14,33	35,5±7,25	0,003
REM Uyku Latansı (dk)	57,75±110,77	76±80,04	0,108
Uyku Etkinliği %	86,21±7,96	93,66±5,71	0,027
Uyanıklık %	13,24±8,29	5,54±5,28	0,088
N1 %	9,16±4,36	5,21±2,42	0,21
N2 %	43,68±5,92	41,89±9,79	0,094

N3 %	17,51±6,09	25,6±6,71	0,765
REM %	16,4±7,15	21,75±8,1	0,958
SOREM (ort)	2±0,76	2,25±1,06	0,374
Uyku Latansı (dk, ort)	2,27±2,04	2,8±2,33	0,885
ESS (ort)	15,5±3,37	15,89±3,53	0,654
PSQI (ort)	11,11±5,07	6,72±4	0,548

Ortalama değer ± standart sapma değerleri belirtilmiştir. NT1 ve NT2 arasında cinsiyet dağılımı ki kare testi ile, yaş dağılımı ise Student's t-test ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren klinik parametreler için Student's t test, parametrik olmayan değerler için Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

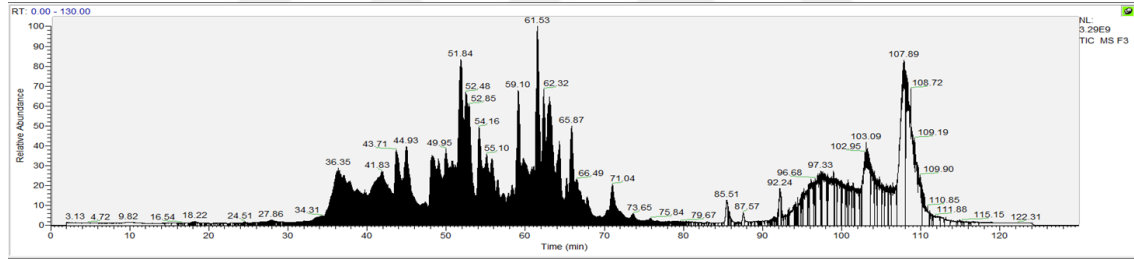
4.2. Aday Molekülün Tanımlanması

Narkolepsi olgu serumları ile inkübe edilen nöroblastoma hücre kültüründe anti-nöronal antikorlar araştırılmıştır. 5 narkolepsi örneğinde boyanma ve nöronlara bağlanma saptanmıştır. Sonrasında antikor-antijen kompleksleri, İP metodunda kullanılan sefaroze beadler aracılığı ile ayrıştırılmıştır.

LC-MS/MS analizi ile anti-nöronal antikor boyanma paterni pozitif olarak saptanan bu 5 narkolepsi olgusu, antikor negatif olduğu bilinen narkolepsi hastası olmayan 2 olgu ile protein düzeyinde karşılaştırılmıştır. Negatif grupta bulunmayan sadece narkolepsi hastalarında bulunan proteinlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. İnceleme yapıldığında narkolepsi olguları için C4BPA aday protein olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Şekil 4.1'de LC-MS/MS analizi gerçekleştirilen bir narkolepsi olgu ekstraktına ait tüm iyon kromatogramı (TIC) gösterilmiştir.

Tablo 4-3: LC-MS/MS analizinde sadece narkolepsi hastalarında bulunan antikor negatif grupta bulunmayan proteinler

UniprotKB Protein Erişim Numarası	Tanım
P04003	C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens GN=C4BPA PE=1 SV=2
B4E1D8	cDNA FLJ51597, highly similar to C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens PE=2 SV=1
B4E1E1	cDNA FLJ51598, highly similar to C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens PE=2 SV=1

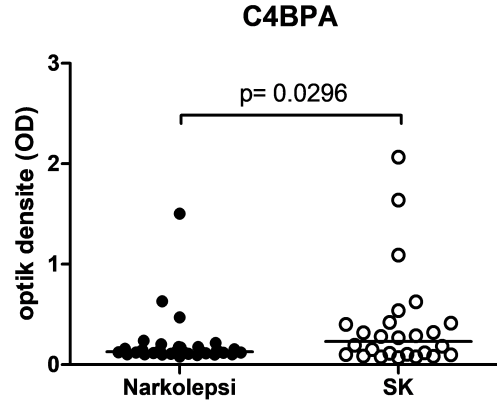


Şekil 4-1: İP metoduyla antikor pozitif olarak belirlenmiş bir narkolepsi olgusunun LC-MS/MS tüm iyon kromatogramı.

4.3. Hasta ve Sağlıklı Olgularda Aday Molekülün Validasyonu

4.3.1. C4BPA Protein Düzeyi

Narkolepsi hastalarında C4BPA protein seviyesinin belirlenmesi ve aday proteinin sağlıklı grup ile düzeyinin karşılaştırılması amacıyla 42 narkolepsi ve 26 sağlıklı kontrol olgusu değerlendirilmiştir. Yapılan unpaired 2-tailed t test sonucu, narkolepsi olgularında sağlıklı kontrollere göre C4BPA protein seviyesinin anlamlı olarak düşük olduğunu göstermiştir ($p = 0,0296$; narkolepsi ve sağlıklı kontrol; ortanca değer 0,129 ve 0,232 sırasıyla) (Şekil 4.2). Çalışma gruplarına ait C4BPA protein düzeyi analizinin betimsel istatistik sonuçları Tablo 4.2’de belirtilmiştir.



Şekil 4-2: Narkolepsi olgularındaki C4BPA düzeyinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması.

SK: Sağlıklı kontrol.

Tablo 4-4: Narkolepsi ve sağlıklı kontrol grupları için C4BPA protein düzeyi analizinin betimsel istatistik sonuçları

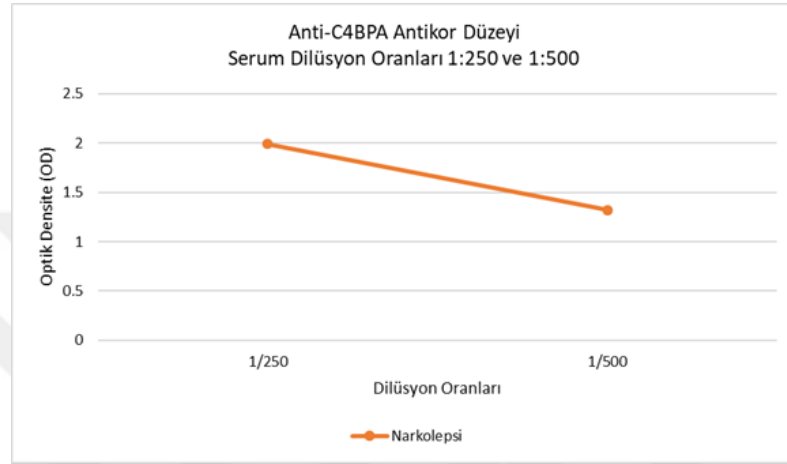
% 95 Güven Aralığı (Ort için)								
	N	Ort	SS	SH	Alt Sınır	Üst Sınır	Minimum	Maksimum
Narkolepsi	42	0,19	0,235	0,037	0,115	0,265	0,082	1,504
Sağlıklı Kontrol	26	0,39	0,49	0,096	0,192	0,588	0,071	2,066

4.3.2. Anti-C4BPA Antikor Düzeyinin Belirlenmesi için Yapılan Optimizasyon Deneyleri

Narkolepsi olgu serumlarındaki C4BPA'ya karşı gelişen antikorların gösterilmesi amacıyla homemade ELISA metodu uygun optimizasyonlar gerçekleştirilerek uygulanmıştır.

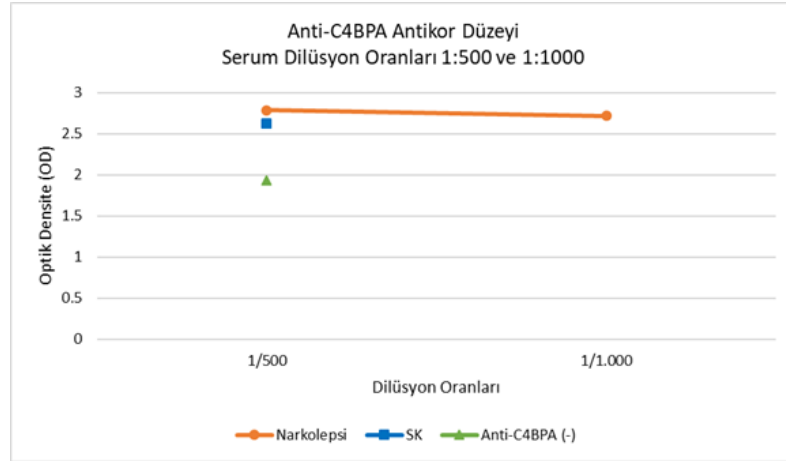
Birinci basamakta 0,5 µg antijen ile 1:250 ve 1:500 dilüsyonları için ortalama antikor düzeyleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Anti-C4BPA pozitif olduğu düşünülen bir

narkolepsi olgusuna ait serum belirtilen oranlarda sulandırılmış ve üçlü olarak çalışılmıştır. Üçlüler birbiriyle uyumlu olup 1:250 ve 1:500 dilüsyonları arasında antikor düzeyi açısından fark bulunmuştur. Ancak OD değerinin 1:500 dilüsyonuyla halen çok yüksek saptanması sebebiyle bu dilüsyon katsayılarının düşük olduğuna ve daha yüksek dilüsyon ile çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4-3: Birinci basamak optimizasyon deneyi sonucu.

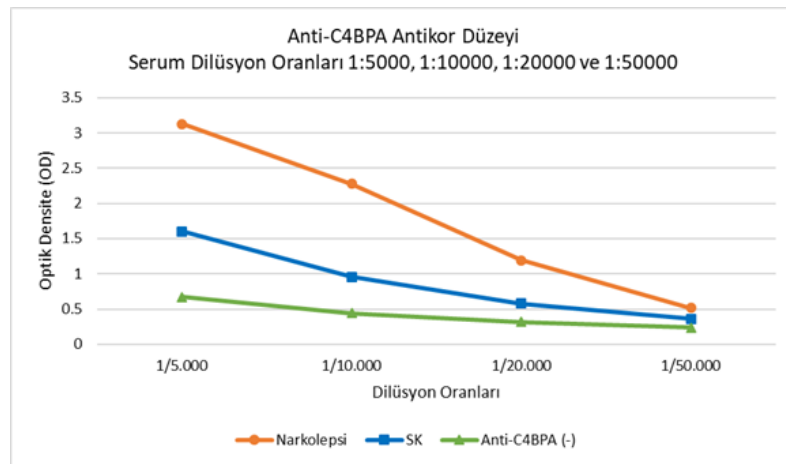
İkinci basamakta anti-C4BPA antikoru pozitif olduğu varsayılan 5 narkolepsi olgusunun serumları 1:500 ve 1:1000 dilüsyonları ile, anti-C4BPA antikoru negatif olduğu düşünülen 2 hastanın serumları 1:500 dilüsyonu ve 3 sağlıklı kontrol serumu 1:500 dilüsyonu ile tüm örnekler ikili olacak şekilde çalışılmıştır. 0,5 µg antijen ile 1:500 ve 1:1000 dilüsyonları için değişen ortalama antikor düzeyleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. İkili çalışılan örneklerin uyumlu sonuç göstermesine rağmen dilüsyonlar arası fark görülmemiştir. Deney işleyişinden kaynaklı olabilecek bu sonuç sebebiyle daha yüksek katsayılı dilüsyonlar ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4-4: İkinci basamak optimizasyon deneyi sonucu.

SK: Sağlıklı Kontrol, Anti-C4BPA (-): C4BPA'ya karşı antikor gelişmediği varsayılan olgular.

Üçüncü basamak optimizasyonda 0,4 µg antijen ile 1:5000, 1:10000, 1:20000 ve 1:50000 dilüsyonları için ortalama antikor düzeyleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Bu basamakta 2 anti-C4BPA pozitif olduğu varsayılan narkolepsi serumu, 1 anti-C4BPA negatif olduğu varsayılan olgu serumu ve 1 sağlıklı kontrol serumu kullanılmıştır. Tüm örnekler ikili olarak çalışılmıştır ve ikililerin sonuçları uyumlu çıkmıştır. Serum dilüsyon oranları bir önceki deneye göre yükseltilmiş ve dilüsyon katsayısı arttıkça antikor düzeylerinde düşüş görülmüştür. Optimal olarak antikor seviyesi açısından en iyi farkın görüldüğü 1:10000 ve 1:20000 dilüsyon oranlarının ileri basamaklarda kullanılmasına karar verilmiştir.

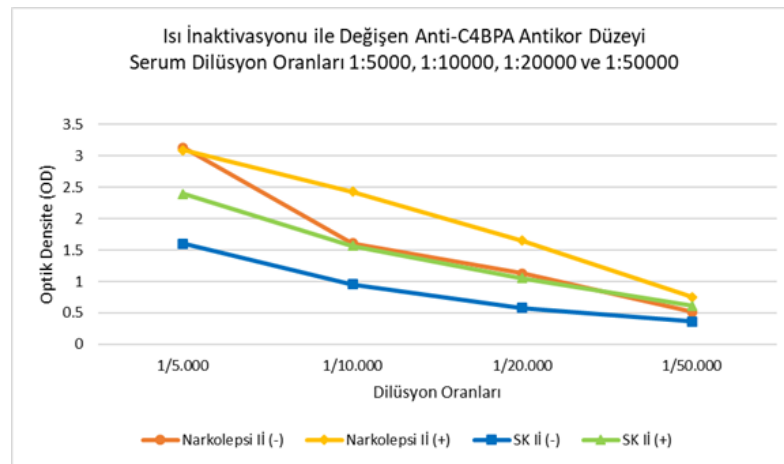


Şekil 4-5: Üçüncü basamak optimizasyon deneyi sonucu.

SK: Sağlıklı Kontrol, Anti-C4BPA (-): C4BPA'ya karşı antikor gelişmediği varsayılan olgular.

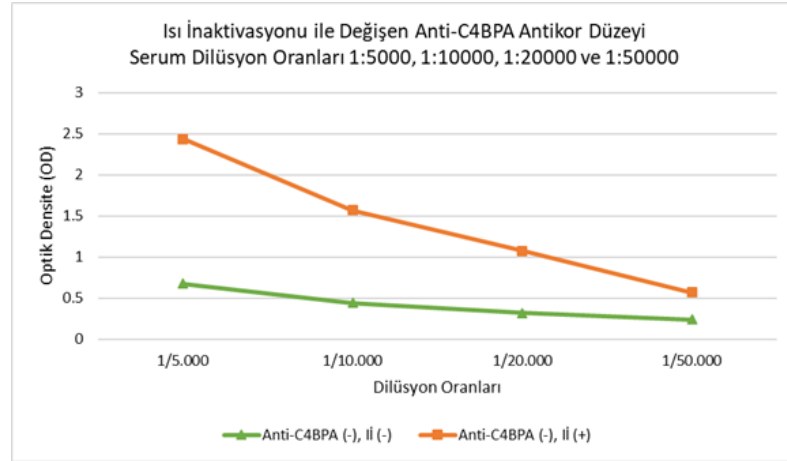
Dördüncü basamakta bir önceki deneyde kullanılan aynı örnekler için olası kompleman aktivasyonunu dışlamak amacıyla ısı inaktivasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler tek olarak çalışılmıştır. Isı inaktivasyonu gerçekleştirilmiş ve gerçekleştirilmemiş narkolepsi ve sağlıklı olguların 1:5000, 1:10000, 1:20000 ve 1:50000 dilüsyonları için karşılaştırmalı ortalama antikor düzeyleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Anti-C4BPA negatif olduğu düşünülen olguya ait ısı inaktivasyonu öncesi ve sonrası antikor düzeyi ise Şekil 4.7'de belirtilmiştir. Tüm olgular için ısı inaktivasyonu ile artan antikor düzeyi gözlenmiştir.

Ayrıca, ısı ile kompleman inaktivasyonu gerçekleştirilmiş narkolepsi örnekleriyle inaktivasyon yapılmamış aynı örnekler paired-t testi ile karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır ($p = 0,13$; ısı inaktivasyonu yapılmış narkolepsi ve ısı inaktivasyonu yapılmamış narkolepsi; ortanca değer 1,040 ve 1,371 sırasıyla). Isı ile kompleman inaktivasyonu gerçekleştirilmiş sağlıklı kontrol örnekleri inaktivasyon yapılmamış aynı sağlıklı örneklerle karşılaştırıldığında ise antikor düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p = 0,0190$; ısı inaktivasyonu yapılmış sağlıklı kontrol ve ısı inaktivasyonu yapılmamış sağlıklı kontrol; ortanca değer 1,311 ve 0,767 sırasıyla).



Şekil 4-6: Isı inaktivasyonu yapılan ve yapılmayan anti-C4BPA pozitif olduğu düşünülen narkolepsi ve sağlıklı kontrol olgu serumları için karşılaştırmalı antikor düzeyi sonuçları.

II (+): Isı inaktivasyonu yapılmış, II (-): Isı inaktivasyonu yapılmamış. SK: Sağlıklı Kontrol.

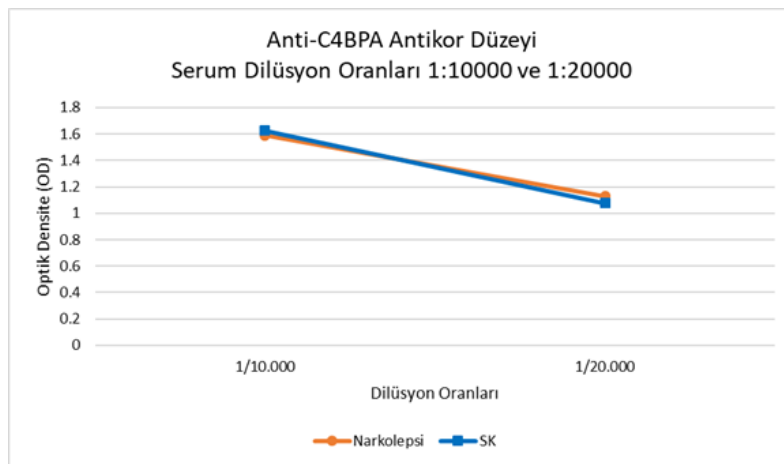


Şekil 4-7: Isı inaktivasyonu yapılan ve yapılmayan anti-C4BPA negatif olduğu varsayılan olgu serumu için karşılaştırmalı antikör düzeyi sonuçları.

Anti-C4BPA (-): C4BPA'ya karşı antikör gelişmediği varsayılan olgular, İİ (+): Isı inaktivasyonu yapılmış, İİ (-): Isı inaktivasyonu yapılmamış.

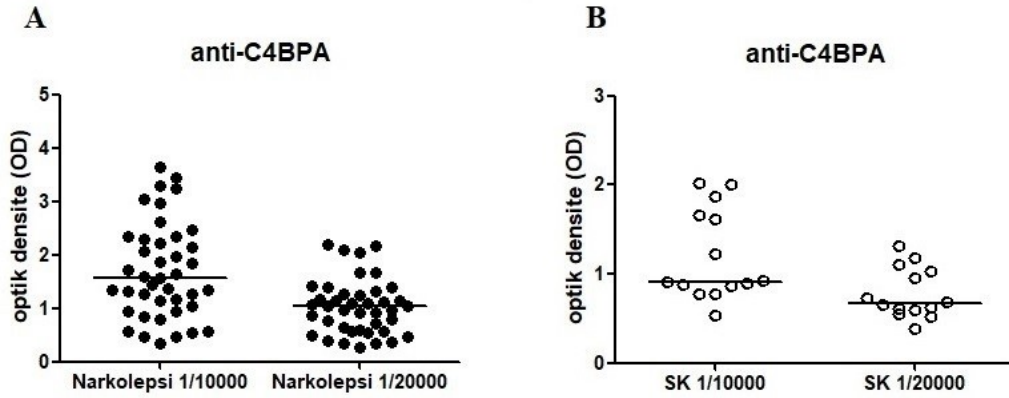
Planlanan son basamakta ise 42 narkolepsi ve 19 sağlıklı kontrol örneği çalışılmıştır. 0,4 µg antijen ile önceki optimizasyon basamaklarına göre kullanılması belirlenen 1:10000 ve 1:20000 dilüsyonları için değişen ortalama antikör düzeyleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Örneklerin önceki basamaklarda ikili çalışma sonuçları uyumlu olduğundan son basamakta tüm örnekler tek çalışılmıştır.

Çalışma gruplarının kendi içinde 1:10000 ve 1:20000 dilüsyonları ile anlamlı olarak antikör düzeylerinin değiştiği görülmüştür ($p < 0,0001$) (Şekil 4.9).



Şekil 4-8: Son basamak optimizasyon deneyi sonucu.

SK: Sağlıklı Kontrol



Şekil 4-9: 1:10000 ve 1:20000 dilüsyon oranlarında narkolepsi (A) ve sağlıklı kontrol (B) gruplarına ait C4BPA'ya karşı oluşmuş antikor düzeylerinin dağılımı.

SK: Sağlıklı kontrol.

Optimizasyon deneylerinde çalışılan 5 anti-nöronal antikor boyanması pozitif olan narkolepsi hastaları ile anti-nöronal antikor boyanması negatif olduğu bilinen 2 hastaya ait farklı dilüsyonlarda çalışılan ortalama C4BPA protein ve anti-C4BPA antikor düzeyleri sonuçları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4-5: Antikor pozitif ve negatif olduğu bilinen hastalara ait ortalama C4BPA protein ve anti-C4BPA antikor düzeyleri

Örnek Kodu	Ort C4BPA Protein Düzeyleri (OD)	Ortalama Anti-C4BPA Antikor Düzeyleri (OD)						
		Dilüsyon Oranları						
		1:250	1:500	1:1000	1:5000	1:10000	1:20000	1:50000
N20	0,177	-	3,426	3,749	-	2,296	1,663	-
N34	0,216	-	1,218	1,015	-	0,475	0,379	-
N35	0,113	-	3,985	3,913	3,974	3,139	1,828	0,567
N36	0,159	1,990	1,599	1,167	-	0,478	0,34	-

N37	0,101	-	3,823	3,735	2,708	1,342	0,684	0,459
F5	-	-	1,851	-	-	-	-	-
F11	-	-	2,013	-	0,674	0,442	0,318	0,238

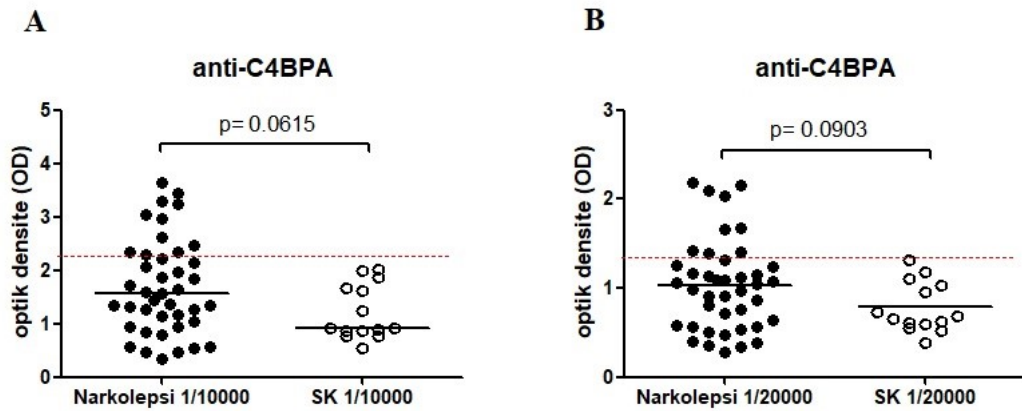
N20, N34, N35, N36, N37: Anti-C4BPA antikor pozitif olduğu düşünülen narkolepsi örnekleri. F5, F11: Anti-C4BPA antikor negatif olduğu varsayılan örnekler.

4.3.3. Anti-C4BPA Antikor Düzeyi Analizi

1:10000 dilüsyon oranı için, narkolepsi hastalarının anti-C4BPA düzeyi sağlıklı kontrol örneklerinden daha yüksek bulunmuştur ($p = 0,0615$; narkolepsi ve sağlıklı kontrol; ortanca değer 1,567 ve 0,912 sırasıyla) gösterilmiştir (Şekil 4.10A). 1:10000 oranı için betimsel istatistik verileri ise Tablo 4.4'te belirtilmiştir.

1:20000 dilüsyon oranı için de narkolepsi ve sağlıklı kontrol gruplarının antikor düzeylerinin farklılığı ($p = 0,0903$; narkolepsi ve sağlıklı kontrol; ortalama değer 1,04 ve 0,674 sırasıyla) gösterilmiştir (Şekil 4.10B). 1:20000 dilüsyonu için betimsel istatistik verileri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Çalışılan iki dilüsyon değeri için de antikor düzeyleri açısından bulunan farklılık değeri $p < 0,05$ olmadığı için istatistiksel anlam elde edilememiştir.



Şekil 4-10: Narkolepsi (A) ve sağlıklı kontrol (B) gruplarının kendi içinde farklı dilüsyon oranlarıyla anlamlı olarak değişen antikor düzeylerinin dağılımı.

Çalışma gruplarında kaç olgunun pozitif olarak değerlendirilebileceği belirlemek için Fisher kesin ki kare testi yapılmıştır. Narkolepsi ve sağlıklı kontrol olguları arasında 1:10000 ($p = 0,0118$) ve 1:20000 ($p = 0,0463$) dilüsyon oranları için antikor düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur, $p < 0,05$. 1:10000 dilüsyon için güvenilir anti-C4BPA pozitifliği narkolepsi için 11, sağlıklı kontrol için 0; 1:20000 dilüsyonu için güvenilir anti-C4BPA pozitifliği narkolepsi için 9, sağlıklı kontrol için 0 olarak bulunmuştur. Kesikli çizgi (cut-off) üzerindeki değerler güvenilir antikor pozitif değerleri göstermektedir. Beklenen farkın anlamlı olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla güvenilir antikor düzeyi (cut off değeri) her dilüsyon değeri için “(standart sapma x 2) + ortalama değer” formülü ile hesaplanmıştır ve Fisher kesin ki-kare testi uygulanmıştır. SK: Sağlıklı kontrol.

Tablo 4-6: 1:10000 dilüsyon oranı için narkolepsi ve sağlıklı kontrol antikor düzeylerinin betimsel istatistik verileri

% 95 Güven Aralığı (Ort için)								
	N	Ort	SS	SH	Alt Sınır	Üst Sınır	Minimum	Maksimum
Narkolepsi	42	1,693	0,892	0,139	1,412	1,975	0,347	3,651
Sağlıklı Kontrol	19	1,211	0,513	0,137	0,915	1,507	0,54	2,018

Tablo 4-7: 1:20000 dilüsyon oranı için narkolepsi ve sağlıklı kontrol antikor düzeylerinin betimsel istatistik verileri

% 95 Güven Aralığı (Ort için)								
	N	Ort	SS	SH	Alt Sınır	Üst Sınır	Minimum	Maksimum
Narkolepsi	42	1,032	0,512	0,08	0,871	1,194	0,276	2,192
Sağlıklı Kontrol	19	0,783	0,284	0,0758	0,619	0,947	0,378	1,32

4.3.4. C4BPA Protein ve Anti-C4BPA Antikor Düzeylerinin Korelasyon Analizi

Çalışma gruplarında bulunan C4BPA protein ve C4BPA'ya karşı oluşmuş antikor düzeyleri arasında 1:10000 ve 1:20000 dilüsyonları için korelasyon analizi yapıldığında anlamlı korelasyon tespit edilememiştir.



5. TARTIŞMA

Narkolepsi, lateral hipotalamusta hipokretinerjik nöron dejenerasyonu ile gelişen, klinik olarak artmış gündüz uykuluğu ile karakterize, REM uyku fazına abnormal geçişin görüldüğü ve bununla ilintili olarak vakaların çoğunda katapleksi tablosunun eşlik ettiği nörolojik bir uyku bozukluğu olarak tanımlanmaktadır^{4,33}. Hastalığın etyopatogenezi tam olarak anlaşılamamış olsa da narkolepsi ile ilgili otoimmün hipotez; güçlü HLA DQB1*06:02 gen ilişkisi, belirlenen TCR α , P2RY11 ve DNMT1 gen polimorfizmleri, hipokretin reaktif total IgG ve IgM antikorları ve spesifik anti-hipokretin antikorların tespit edilmesi, NT1 hastalarında hipokretinerjik nöronlarda bulunan TRIB-2 antijenine karşı gelişmiş antikorların görülmesi, H1N1 influenza salgını için yapılan AS03 adjuvanlı Pandemrix aşısıyla artan narkolepsi vakaları gibi sebeplerle ilgi çekici hale gelmiştir^{16-18,20-24,105}. Bununla beraber narkolepsi olgularında hücrel immünite elemanlarından hipokretin hedefli T hücrelerinin varlığı, humoral immünite mekanizmalarıyla ilgili IL-6 ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin hipokretinerjik nöron dejenerasyonundaki rolünün gösterilmesi, TRIB-2 pasif immünizasyonu ile narkolepsi hayvan modeli geliştirilebilmesi, AQP-4, Ma 1 ve Ma 2 gibi hastalığa spesifik olmayan antikorların keşfedilmesi, erken IVIG tedavisi ile BOS hipokretin düzeylerinin normalleşmesi, literatürde üst solunum yolu enfeksiyonları gibi çevresel etmenlerin narkolepsiyi tetiklediği vakalardan bahsedilmesi gibi gelişmeler narkolepsinin immünopatogenezi ile ilgili bilgilerimizi arttırmıştır^{93,96,101,106,107}. Son yıllardaki bu nörolojik araştırmalar immünitenin rolüne giderek daha çok odaklansa da, narkolepsi için Witebsky'nin otoimmün hastalık kriterlerini sağlamaya yönelik yeterli veri henüz mevcut değildir^{20,103}.

Bu çalışma ile narkolepsi olgularında öncelikle anti-nöronal otoantikorlar araştırılmıştır ve sonrasında bulunan antijen-antikor kompleksleri ayrıştırılmıştır. Anti-nöronal antikor tespit edilen narkolepsi hasta örnekleriyle antikor negatif olduğu bilinen hastalar protein düzeyinde karşılaştırıldığında narkolepsi için aday antijen olarak kompleman sisteminin klasik ve lektin yolak inhibitörü olarak bilinen kompleman bağlayıcı protein 4'ün alfa alt birimi (C4BPA) belirlenmiştir. Bu aday proteinin düzeyi ve bu proteine karşı oluşan antikor düzeyleri validasyon çalışmalarıyla sağlıklı ve narkolepsi olgularında karşılaştırıldığında protein seviyesinin narkolepsi hastalarında

sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak düşük olduğu, C4BPA antikor düzeyinin ise narkolepside sağlıklılara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da görece olarak yüksek olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlara göre istatistiksel anlamlılığın antikor seviyesi için gösterilememesinin sebebi, LC-MS/MS yönteminin aday olarak önerdiği anti-C4BPA'nın bağlandığını düşündüğümüz bölgede kompleman sisteminin diğer elemanlarının özellikle C1q ve C4'ün bağlandığı immün komplekslerin yer alma ihtimali olabilir. Kompleman sistem işleyişine bakıldığında, antikora bağlanma özelliğine sahip C1q'nun C4B'yi aktifleyerek kanda bulunan C4bC2a kompleksine bağlandığı ve bu kompleksin de C4BPA proteinine bağlanarak immün kompleks oluşturduğu bilinmektedir ⁸⁷. İP metodu ile sefaroze bead'ler aracılığı ile ortamdaki tüm antikor-antijen kompleksleri ayrıştırıldığı için anti-C4BPA antikorları yanında C4BPA moleküllerinin bağlandığı immün kompleksler de işlem sırasında çekilmiş olabilir. Özellikle nöroblastoma hücrelerinin C4BPA ürettiği yönünde bir veri olmaması bu görüşü desteklemektedir. ELISA testlerinde de benzer bir durum söz konusudur. ELISA plaklarını kaplamak için kullanılan C4BPA proteinine, anti-C4BPA antikorları dışında C4B bağlı IgG immün komplekslerinin de bağlanıyor olması mümkündür. Bu immün kompleksler sağlıklı kontrol serumlarında da görülebileceğinden C4b bağlı IgG komplekslerinin karıştırıcı etkisi çalışma grupları arasında anlamlı fark elde edilmesini engelliyor olabilir. Dolayısıyla yapılan validasyon çalışmalarının sonuçları, olgulardaki olası antikorların spesifik olarak immün komplekse mi spesifik bir antikora mı bağlandığını yorumlamakta yetersiz kalmaktadır.

Diğer bir olasılık ise, kullandığımız ELISA testinin arzu edildiği şekilde sadece anti-C4BPA antikorlarını gösteriyor olması ancak bu antikorların narkolepsi olgularının küçük bir alt grubunda pozitif saptanması sebebiyle hasta ve sağlıklı grupları arasında anlamlı fark saptanmamasıdır. Bununla birlikte narkolepsi olgularında sağlıklı kontrollere kıyasla güvenilir antikor pozitiflik düzeyi açısından anlamlılığa yakın fark olması, narkolepsi patogeneğinde kompleman aracılı immün mekanizmaların rol oynadığını ve narkolepsi hastalarında C4BPA proteinine konjuge IgG'lerin olabileceğini göstermek açısından önem taşımaktadır. C4BPA proteininin antikorun hangi kısmına (Fab veya Fc) bağlandığının anlaşılması veya narkolepsi serumunda C4b bağlı immün komplekslerin yüksek düzeyde bulunduğu gösterilmesi için ek analizler gerekmektedir.

Isı ile kompleman inaktivasyonu gerçekleştirildiğinde indirekt ELISA ile elde edilen OD değerlerinin düzeyinde azalma olmaması sonuçların immün kompleks aktivitesinden çok C4BPA'ya karşı gelişmiş antikor seviyesini işaret ettiğini düşündürmektedir. İleriki çalışmalarda ısı inaktivasyonu yapılan örneklerde komplemanın gerçekten inaktif olduğu ve immün kompleks bağlanmasının olmadığı incelenmelidir. Bunun için aynı olgularda C4, C3 ve C1q düzeylerine bakılabilir.

Narkolepsi için İP metoduyla anti-nöronal antikorlara bakıldığında 5 narkolepsi örneği için nöronlara bağlanma saptanmıştır. LC/MS-MS yöntemiyle bu antikor pozitif narkolepsi örnekleri anti-nöronal bağlanma olmayan örneklerle karşılaştırıldığında C4BPA aday antijen olarak tespit edilmiş olsa da çalışmamızda bu proteinin nöronlardaki anlatımının validasyonu yapılmamıştır. Bir sonraki çalışmada nöroblastoma hücrelerinde C4BPA proteininin varlığı uygun yöntemlerle konfirme edilmelidir.

C4BP eksikliği genel anlamda oldukça nadir görülmekle birlikte, bir araştırmada yapılan ekspresyon analizinde obstruktif uyku apne sendromlu hastalarda azalmış C4BPA ekspresyonu raporlanmıştır. Bu durum, C4BPA'nın ligandı olan inflamatuvar yolaklardaki önemli moleküllerden CD40 ve C-reaktif proteinin hastalıkla birlikte katkıda bulunduğu inflamatuvar duruma adaptif olarak gelişmiş bir yanıt olarak yorumlanmıştır^{108,109}. Ayrıca, inflamatuvar süreçlerin aktif olduğu narkolepsiye komorbid olarak görülebilen şizofreni hastalığı için azalmış C4BP protein düzeyinin hastalık riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir¹¹⁰. Ayrıca, immün mekanizmaların etkin olduğu bilinen bir nörolojik hastalık olan Nöro-Behçet için literatürde C4BP düzeyinin azlığı gösterilmiştir¹¹¹. Bu durumda hastalarda C4BPA proteini tüketilmektedir. C4BPA'nın tüketiminin hastalarda doğrulanması için kompleman kaskadında C4BPA ile etkileşim içinde olan C3 protein düzeyi ileride değerlendirilebilir.

Narkolepsi hastalarında azalan C4BPA'nın neden tüketildiğine dair iki ihtimal söz konusu olabilir. İlk ihtimal C4BPA'ya karşı oluşmuş antikorların neden geliştiğini anlamaya yöneliktir. Otoimmün hastalıklarda görülebileceği üzere klasik kompleman yolağını ve C4'ü aktifleyen antikorlar ile immün komplekse bağlı C4BPA'nın fazla tüketimi görülebilir. Fazla oranda kullanılan immün sistem elemanlarına karşı immün yanıt olarak antikor geliştiği literatürde belirtilmiştir. Otoimmün hastalıklar olan sistemik lupus eritematozus (SLE) ve Miyastenia Gravis'te (MG) C1q düzeyi çok

tüketime bağlı olarak total düzeyde düşük iken anti-C1q düzeyi bu hastalarda yüksek bulunmuştur^{112,113}.

Diğer ihtimal ise antikor dışında mikroorganizma veya farklı ajanlarla bu proteinin azalmasıdır. Mikroorganizmalarla C4BPA'nın aktiflendiği, kullanıldığı ve bakteri ile degrade olduğu bilinmektedir⁸⁸. Literatürde bakteri gibi patojenlerin kompleman eliminasyonundan kurtulmak için yüzeylerinde IgG benzeri molekül taşıdıkları gösterilmiştir¹¹⁴. *Neisseria meningitidis* bakterisinin sebep olduğu santral ve periferik sinir sistemi zarlarının enfeksiyonu olan menenjit için yapılan bir çalışmada, C4BP bağlanması *Neisseria meningitidis* bakterisine kompleman aktivasyonundan kaçması yönünde yardımcı olduğu gözlenmiştir¹¹⁵. Narkolepsi için de membranlarında IgG benzeri molekül bulunduran bakterilerin olması, bu bakteri IgG'lerine C4BPA'nın bağlanarak tüketilmesi söz konusu olabilir. Ancak çalışmamızda anti-C4BPA ve C4BPA düzeyleri arasında korelasyon bulunamaması klasik kompleman yolu aşırı aktivasyonuna bağlı C4BPA tüketimi savının yanlış olduğunu düşündürmüştür.

Ayrıca, antikor tayini için kullanılan ELISA deneylerinde *E. coli* bakteri tabanlı pürifiye proteinin kaplama amaçlı kullanılması spesifik olmayan pozitifliğe sebep olmuş olabilir. Deneylerde kullanılan oldukça düşük serum dilüsyon oranlarında (1:10000 ve 1:20000) dahi anti-C4BPA antikorunun gösterilebilmesi ise narkolepsi hastalarında immün işleyişin etkilerini görmek açısından anlamlıdır. Gelecek çalışmalarda, olgu sayıları artırılarak ve sağlıklı olgular seçilirken olası antikor pozitifliği durumlarını elimine etmek amacıyla enfeksiyöz durum riskleri CRP düzeyleri değerlendirilip çalışmaya dahil edilerek sonuçlar tekrar değerlendirilmelidir. Ek olarak, narkolepsi olguları için proteinlerin 3-boyutlu yapısına bağlı olarak tanınmayı ölçebilecek daha özelleşmiş yöntemler, protein-protein etkileşimlerini gösterebilmek adına protein yolak analizi ve AlphaLISA gibi metodlar kullanılabilir.

Bunun dışında C4BPA düzey düşüklüğü immünolojik olmayan sebeplere de bağlı olabilir. Narkolepsi olgularında genetik kökenli düşük C4BPA üretimi özelliği bulunması ve buna bağlı gelişen aşırı kompleman aktivasyonu ve kompleman aracılı oreksinerjik nöron hasarı sonucunda uyku sorunları ortaya çıkıyor olması muhtemeldir. Bu bağlamda C4BPA'nın uyku fizyolojisinde henüz bilinmeyen bir işlevinin bulunması ve düşük C4BPA düzeylerinin narkolepsi patogenezine katkıda bulunuyor olması da mümkündür.

Çalışmamızda hasta ve sağlıklı olguların klinik/demografik bilgileri ile yapılan korelasyon analizi sonuçları ise NT2 hastalarında C4BPA protein düzeyinin uyku etkinliği arttıkça azaldığını, uyanıklık seviyesiyle ve uyku kalitesiyle birlikte arttığını göstermektedir. Literatürde otoimmün mekanizmaların tip 2 narkolepsi vakarında daha etkin olduğundan ve inflamatuvar rahatsızlıkların NT2’de görülme oranının daha yüksek olduğundan bahsedilmektedir^{116,117}. Bulgularımız bu anlamda etyopatogenezi NT1’e göre daha az aydınlatılmış olan NT2 ile ilgili bilgilerimizi genişletmektedir. Ayrıca korelasyon analizinde, sağlıklı olgularda artan yaş ile beraber C4BPA protein seviyesinin anlamlılığa yakın olarak düşmesi de immün sistem etkinliğinin azalmaya başlamasıyla C4BPA’nın tüketiminin arttığını ve immün regülasyonda bozulma yaşayan narkolepsi hastalarında tespit edilen düşük C4BPA düzeyi için de bu durumun geçerli olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Çalışmamız literatürde ilk kez narkolepsi için C4BPA antijen - anti-C4BPA antikor düzeylerinin gösterilmesi, ilgili optimizasyon çalışmalarının yapılması ve narkolepside olası kompleman aracılı doğal immünite mekanizmalarının İP ve LC-MS/MS yöntemleriyle araştırılması açısından önem taşımaktadır. Narkolepsinin otoimmün bir hastalık olarak ele alınması yönünde sağlanan verilerin ileri validasyon çalışmalarıyla değerlendirilmesi gerekmekte olup böylelikle yeni terapötik seçeneklerin değerlendirilmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Longstreth WT, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, Belle G van. The Epidemiology of Narcolepsy. *Sleep*. 2007;30(1):13-26. doi:10.1093/sleep/30.1.13
2. Chakravorty SS, Rye DB. Narcolepsy in the older adult: Epidemiology, diagnosis and management. *Drugs and Aging*. 2003;20(5):361-376.
3. Rocca FL, Pizza F, Ricci E, Plazzi G. Narcolepsy during childhood: An update. *Neuropediatrics*. 2015;46(3):181-198.
4. American Academy of Sleep Medicine. *International Classification of Sleep Disorders – Third Edition (ICSD-3)*. 3rd Ed. Darien, U.S.A.; 2014. doi:10.1378/chest.14-0970
5. Barateau L, Lopez R, Dauvilliers Y. Treatment Options for Narcolepsy. *CNS Drugs*. 2016;30(5):369-379. doi:10.1007/s40263-016-0337-4
6. Siegel JM. Narcolepsy: A Key Role for Hypocretins (Orexins). *Cell*. 1999;98(4):409-412.
7. Van Den Pol AN. Narcolepsy: A neurodegenerative disease of the hypocretin system? *Neuron*. 2000;27(3):415-418. doi:10.1016/S0896-6273(00)00050-7
8. Wurtman RJ. Narcolepsy and the hypocretins. *Metabolism*. 2006;55(SUPPL. 2):60-63. doi:10.1016/j.metabol.2006.07.011
9. Sakurai T. Orexin deficiency and narcolepsy. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23(5):760-766. doi:10.1016/j.conb.2013.04.007
10. Mahoney CE, Cogswell A, Koralnik IJ, Scammell TE. The neurobiological basis of narcolepsy. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20(2):83-93. doi:10.1038/s41583-018-0097-x
11. Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*. 1999;98(3):365-376.
12. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 1999;98(4):437-451.
13. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in

- mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. 2001;30(2):345-354.
14. Mignot E, Lin X, Arrigoni J, et al. *DQB1 *0602 and DQA1 *0102 (DQ1) Are Better Markers Than DR2 for Narcolepsy in Caucasian and Black Americans*. Vol 17.; 1994.
 15. Mignot E. Genetics of narcolepsy and other sleep disorders. *Am J Hum Genet*. 1997;60(6):1289-1302. doi:10.1086/515487
 16. Manni R, Capittini C, Pasi A, et al. Correlation between HLA-DQB1*06:02 and narcolepsy with and without cataplexy: approving a safe and sensitive genetic test in four major ethnic groups. A systematic meta-analysis. *Sleep Med*. 2018;52:150-157. doi:10.1016/j.sleep.2018.08.024
 17. Hallmayer J, Faraco J, Lin L, et al. Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet*. 2009;41(6):708-711. doi:10.1038/ng.372
 18. Kornum BR, Kawashima M, Faraco J, et al. Common variants in P2RY11 are associated with narcolepsy. *Nat Genet*. 2011;43(1):66-71. doi:10.1038/ng.734
 19. Winkelmann J, Lin L, Schormair B, et al. Mutations in DNMT1 cause autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness and narcolepsy. *Hum Mol Genet*. 2012;21(10):2205-2210. doi:10.1093/hmg/dds035
 20. Singh AK, Mahlios J, Mignot E. Genetic association, seasonal infections and autoimmune basis of narcolepsy. *J Autoimmun*. 2013;43:26-31. doi:10.1016/j.jaut.2013.02.003
 21. Okun ML, Giese S, Lin L, Eiden M, Mignot E, Coussons-Read ME. Exploring the cytokine and endocrine involvement in narcolepsy. *Brain Behav Immun*. 2004;18(4):326-332. doi:10.1016/j.bbi.2003.11.002
 22. Vgontzas AN, Bixler EO, Lin HM, Prolo P, Trakada G, Chrousos GP. IL-6 and its circadian secretion in humans. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12(3):131-140. doi:10.1159/000084844
 23. Deloumeau A, Bayard S, Coquerel Q, et al. Increased immune complexes of hypocretin autoantibodies in narcolepsy. *PLoS One*. 2010;5(10). doi:10.1371/journal.pone.0013320

24. Kornum BR, Faraco J, Mignot E. Narcolepsy with hypocretin/orexin deficiency, infections and autoimmunity of the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2011;21(6):897-903. doi:10.1016/j.conb.2011.09.003
25. Black JE, Brooks SN, Nishino S. Narcolepsy and syndromes of primary excessive daytime somnolence. *Semin Neurol.* 2004;24(3):271-282. doi:10.1055/s-2004-835069
26. Pearce JM. Willis on narcolepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(1):76. doi:10.1136/jnnp.74.1.76
27. Millichap JG. Diagnosis and Management of Narcolepsy Reviewed. *Pediatr Neurol Briefs.* 2016;22(11):84. doi:10.15844/pedneurbriefs-22-11-4
28. Zeman A. Lesson of the week: Narcolepsy mistaken for epilepsy. *BMJ.* 2001;322(7280):216-218. doi:10.1136/bmj.322.7280.216
29. Hale L. Epidemiology of narcolepsy. In: *Narcolepsy: A Clinical Guide.* Vol 30. ; 2010:47-53. doi:10.1007/978-1-4419-0854-4_4
30. Slowik JM, Yow AG. *Narcolepsy.* StatPearls Publishing; 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083681>. Accessed June 12, 2019.
31. Nishino S, Mignot E. *Narcolepsy and Cataplexy.* Vol 99. 1st ed. Elsevier B.V.; 2011. doi:10.1016/B978-0-444-52007-4.00007-2
32. Wijnans L, Lecomte C, de Vries C, et al. The incidence of narcolepsy in Europe: Before, during, and after the influenza A(H1N1)pdm09 pandemic and vaccination campaigns. *Vaccine.* 2013;31(8):1246-1254. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.015
33. Scammell TE. The neurobiology, diagnosis, and treatment of narcolepsy. *Ann Neurol.* 2003;53(2):154-166. doi:10.1002/ana.10444
34. Golden EC, Lipford MC. Narcolepsy: Diagnosis and management. *Cleve Clin J Med.* 2018;85(12):959-969. doi:10.3949/ccjm.85a.17086
35. Wise MS. Narcolepsy and other disorders of excessive sleepiness. *Med Clin North Am.* 2004;88(3):597-610. doi:10.1016/j.mcna.2004.02.001
36. Leschziner G. Narcolepsy: A clinical review. *Pract Neurol.* 2014;14(5):323-331.

doi:10.1136/practneurol-2014-000837

37. Aldrich MS. The neurobiology of narcolepsy. *Trends Neurosci.* 1991;14(6):235-239. doi:10.1016/0166-2236(91)90121-A
38. Pintwala S, Peever J. Circuit mechanisms of sleepiness and cataplexy in narcolepsy. *Curr Opin Neurobiol.* 2017;44:50-58. doi:10.1016/j.conb.2017.02.010
39. Reading P. Cataplexy. *Pract Neurol.* 2019;19(1):21-27. doi:10.1136/practneurol-2018-002001
40. Scammell TE. Narcolepsy. *N Engl J Med.* 2015;373(27):2654-2662. doi:10.1056/NEJMr1500587
41. Yılmaz K. Güncel Bilgiler Işığında Narkolepsi. *Narcolepsy, Along with an Updat.* 2015;2(1):1-6.
42. Roth B. *Narcolepsy and Hypersomnia : Translated by M. Schierlova (Prague). Revised and Edited by Broughton, R. (Ottawa).* S. Karger; 1980.
43. Roth T, Dauvilliers Y, Mignot E, et al. Disrupted nighttime sleep in narcolepsy. *J Clin Sleep Med.* 2013;9(9):955-965. doi:10.5664/jcsm.3004
44. Frauscher B, Ehrmann L, Mitterling T, et al. Delayed diagnosis, range of severity, and multiple sleep comorbidities: A clinical and polysomnographic analysis of 100 patients of the innsbruck narcolepsy cohort. *J Clin Sleep Med.* 2013;9(8):805-812. doi:10.5664/jcsm.2926
45. Ruoff CM, Reaven NL, Funk SE, et al. High rates of psychiatric comorbidity in narcolepsy: Findings from the Burden of Narcolepsy Disease (BOND) study of 9,312 patients in the United States. In: *Journal of Clinical Psychiatry.* Vol 78. ; 2017:171-176. doi:10.4088/JCP.15m10262
46. Konishi S, Kishi Y, Kurosawa H, Koizumi S, Kathol RG, Kudo Y. Schizophrenia and narcolepsy: A review with a case report. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2004;58(2):117-124. doi:10.1111/j.1440-1819.2003.01204.x
47. Morse A, Sanjeev K. Narcolepsy and Psychiatric Disorders: Comorbidities or Shared Pathophysiology? *Med Sci.* 2018;6(1):16. doi:10.3390/medsci6010016

48. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th editio. Washington, DC; 2013.
49. Ruoff C, Rye D. The ICSD-3 and DSM-5 guidelines for diagnosing narcolepsy: clinical relevance and practicality. *Curr Med Res Opin*. 2016;32(10):1611-1622. doi:10.1080/03007995.2016.1208643
50. Ozdemir P, Selvi Y, Gulec T, Gulec M. The pathophysiological, clinical, and therapeutic aspects of narcolepsy. *Psikiyatr Guncel Yaklasimlar - Curr Approaches Psychiatry*. 2014;6(3):1. doi:10.5455/cap.20140115073522
51. Vignatelli L, Alessandro RD, Candelise L. Antidepressant drugs for narcolepsy (Review). *Library (Lond)*. 2005;(4).
52. Brooks S, Black J. Novel therapies for narcolepsy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;11(12):1821-1827. doi:10.1517/13543784.11.12.1821
53. Mignot EJM. A Practical Guide to the Therapy of Narcolepsy and Hypersomnia Syndromes. *Neurotherapeutics*. 2012;9(4):739-752. doi:10.1007/s13311-012-0150-9
54. Thorpy MJ, Snyder M, Aloe FS, Ledereich PS, Starz KE. Short-Term Triazolam Use Improves Nocturnal Sleep of Narcoleptics. *Sleep*. 1992;15(3):212-216. doi:10.1093/sleep/15.3.212
55. Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology*. 2012;50(Issue 2, Supplement 1):S16-S22. doi:10.1212/wnl.50.2_suppl_1.s16
56. American Academy of Sleep Medicine. *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events*. Version 2. (Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, et al., eds.). Darien, U.S.A; 2018. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
57. Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*. 1953;118(3062):273-274. doi:10.1126/SCIENCE.118.3062.273
58. Peever J, Fuller PM. The Biology of REM Sleep. *Curr Biol*. 2017;27(22):R1237-R1248. doi:10.1016/j.cub.2017.10.026
59. Freud S. *The Interpretation of Dreams*. 3rd ed. New York: The Macmillan Company; 1913. doi:10.1046/j.1440-1614.2001.0907a.x

60. Kandel ER. Sleep and Dreaming. In: Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum AJH, ed. *Principles of Neural Science*. 5th ed. New York, ABD: McGraw Hill ; 2013:1140-1158.
61. Köktürk O. Uyku Kayıtlarının Skorlanması. *Solunum*. 2013;15(2):14-29. doi:10.5152/solunum.2013.031
62. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005;437(7063):1257-1263. doi:10.1038/nature04284
63. Siegel JM. The neurobiology of sleep. *Semin Neurol*. 2009;29(4):277-296. doi:10.1055/s-0029-1237118
64. Schneider L. Anatomy and Physiology of Normal Sleep. In: *Sleep and Neurologic Disease*. ; 2017:1-28. doi:10.1016/B978-0-12-804074-4.00001-7
65. Wu MF, Gulyani SA, Yau E, Mignot E, Phan B, Siegel JM. Locus coeruleus neurons: cessation of activity during cataplexy. *Neuroscience*. 1999;91(4):1389-1399.
66. Luppi PH, Clément O, Sapin E, Garcia S V., Peyron C, Fort P. Animal models of REM dysfunctions: What they tell us about the cause of narcolepsy and RBD? *Arch Ital Biol*. 2014;152(2-3):118-128. doi:10.12871/000298292014237
67. Brabec J, Rulseh A, Hořínek D, et al. *Volume of the Amygdala Is Reduced in Patients with Narcolepsy-a Structural MRI Study*. Vol 53.; 2011.
68. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(1):322-327. doi:10.1073/pnas.95.1.322
69. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998;92(4):573-585.
70. Tsunematsu T, Yamanaka A. *The Role of Orexin/Hypocretin in the Central Nervous System and Peripheral Tissues*. Vol 89. 1st ed. Elsevier Inc.; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-394623-2.00002-0
71. Liblau RS, Vassalli A, Seifinejad A, Tafti M. Hypocretin (orexin) biology and the pathophysiology of narcolepsy with cataplexy. *Lancet Neurol*.

- 2015;14(3):318-328. doi:10.1016/S1474-4422(14)70218-2
72. Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303(1):120-129. doi:10.1016/s0006-291x(03)00299-7
 73. Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Tominaga H, et al. Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(22):5731-5736. doi:10.1073/pnas.1700499114
 74. Taheri S, Zeitzer JM, Mignot E. The Role of Hypocretins (Orexins) in Sleep Regulation and Narcolepsy. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25(1):283-313. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142826
 75. Nishino S, Okuro M, Kotorii N, et al. Hypocretin/orexin and narcolepsy: New basic and clinical insights. *Acta Physiol.* 2010;198(3):209-222. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02012.x
 76. Baumann CR, Bassetti CL, Scammell TE, eds. *Narcolepsy: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment.* New York, ABD: Springer; 2011. doi:10.1007/978-1-4419-8390-9
 77. Dantz B, Edgar DM, Dement WC. Circadian rhythms in narcolepsy: studies on a 90 minute day. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1994;90(1):24-35.
 78. Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 1999;98(3):365-376.
 79. Chabas D, Taheri S, Renier C, Mignot E. The Genetics of Narcolepsy. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003;4(1):459-483. doi:10.1146/annurev.genom.4.070802.110432
 80. Rogers AE, Meehan J, Guilleminault C, Grumet FC, Mignot E. HLA DR15 (DR2) and DQB1*0602 typing studies in 188 narcoleptic patients with cataplexy. *Neurology.* 1997;48(6):1550-1556. doi:10.1212/WNL.48.6.1550
 81. Fontana A, Gast H, Reith W, Recher M, Birchler T, Bassetti CL. Narcolepsy: autoimmunity, effector T cell activation due to infection, or T cell independent, major histocompatibility complex class II induced neuronal loss? *Brain.* 2010;133(5):1300-1311. doi:10.1093/brain/awq086

82. Mahlios J, Herrán-arita AK De, Mignot E. NIH PMahlios, J., Herrán-arita, A. K. De, & Mignot, E. (2014). NIH Public Access, 23(5), 1–13. doi:10.1016/j.conb.2013.04.013.Theublic Access. 2014;23(5):1-13. doi:10.1016/j.conb.2013.04.013.
83. Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM. *Immunology, Infection, and Immunity*. ASM Press; 2004.
84. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Elsevier; 2017.
85. Waller DG, Sampson AP. The immune response and immunosuppressant drugs. In: *Medical Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier; 2017:439-449. doi:10.1016/b978-0-7020-7167-6.00038-5
86. Lambris JD (John D., Morikis D. *Structural Biology of the Complement System*. Taylor & Francis; 2005. https://books.google.com.tr/books/about/Structural_Biology_of_the_Complement_Sys.html?id=VDTMBQAAQBAJ&redir_esc=y. Accessed June 19, 2019.
87. Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol.* 2009;30(2):83-90. doi:10.1016/j.it.2008.11.003
88. Ermert D, Blom AM. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett.* 2016;169:82-92. doi:10.1016/j.imlet.2015.11.014
89. Cota AM, Midwinter MJ. The immune system. *Anaesth Intensive Care Med.* 2015;16(7):353-355. doi:10.1016/j.mpaic.2015.04.006
90. Szabo ST, Thorpy MJ, Mayer G, Peever JH, Kilduff TS. Neurobiological and immunogenetic aspects of narcolepsy: Implications for pharmacotherapy. *Sleep Med Rev.* 2019;43:23-36. doi:10.1016/j.smr.2018.09.006
91. Latorre D, Kallweit U, Armentani E, et al. T cells in patients with narcolepsy target self-antigens of hypocretin neurons. *Nature.* 2018;562(7725):63-68. doi:10.1038/s41586-018-0540-1
92. Bernard-Valnet R, Yshii L, Quériault C, et al. CD8 T cell-mediated killing of

- orexinergic neurons induces a narcolepsy-like phenotype in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(39):10956-10961. doi:10.1073/pnas.1603325113
93. Liblau RS. Put to sleep by immune cells. *Nature*. 2018;562(7725):46-48. doi:10.1038/d41586-018-06666-w
 94. Wijnans L, Lecomte C, de Vries C, et al. The incidence of narcolepsy in Europe: Before, during, and after the influenza A(H1N1)pdm09 pandemic and vaccination campaigns. *Vaccine*. 2013;31(8):1246-1254. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.015
 95. Han F, Lin L, Warby SC, et al. Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in china. *Ann Neurol*. 2011;70(3):410-417. doi:10.1002/ana.22587
 96. Mahlios J, De la Herrán-Arita AK, Mignot E. The autoimmune basis of narcolepsy. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23(5):767-773. doi:10.1016/j.conb.2013.04.013
 97. Tanaka S, Honda Y, Inoue Y, Honda M. Detection of autoantibodies against hypocretin, hcrtr1, and hcrtr2 in narcolepsy: Anti-hcrt system antibody in narcolepsy. *Sleep*. 2006;29(5):633-638. doi:10.1093/sleep/29.5.633
 98. Cvetkovic-Lopes V, Bayer L, Dorsaz S, et al. Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. *J Clin Invest*. 2010;120(3):713-719. doi:10.1172/JCI41366
 99. Kawashima M, Lin L, Tanaka S, et al. Anti-Tribbles Homolog 2 (TRIB2) Autoantibodies in Narcolepsy are Associated with Recent Onset of Cataplexy. *Sleep*. 2010;33(7):869-874. doi:10.1093/sleep/33.7.869
 100. Tanaka S, Honda Y, Honda M, et al. Anti-Tribbles Pseudokinase 2 (TRIB2) - Immunization Modulates Hypocretin / Orexin Neuronal Functions. 2018;2(February):1-10.
 101. Akyıldız UO. Narkolepsi ve Diğer Uyku Hastalıklarında İmmün Sistem ve Enflamasyonun Rolü. *J Turkish Sleep Med*. 2017;4(Suppl 1):140.
 102. Seong MJ, Hong SB. Autoimmunity and Immunotherapy in Narcolepsy. *Sleep Med Res*. 2017;8(1):1-7. doi:10.17241/smr.2017.00052

103. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today*. 1993;14(9):426-430. doi:10.1016/0167-5699(93)90244-F
104. American Academy of Sleep Medicine. *The International Classification of Sleep Disorders : Diagnostic & Coding Manual*. 2nd ed. Westchester IL: American Academy of Sleep Medicine; 2005.
105. Partinen M, Kornum BR, Plazzi G, Jennum P, Julkunen I, Vaarala O. Narcolepsy as an autoimmune disease: The role of H1N1 infection and vaccination. *Lancet Neurol*. 2014;13(6):600-613. doi:10.1016/S1474-4422(14)70075-4
106. Overeem S, Black JL, Lammers GJ. Narcolepsy: Immunological aspects. *Sleep Med Rev*. 2008;12(2):95-107. doi:10.1016/j.smrv.2007.07.010
107. Taheri S. The Immune Basis of Narcolepsy. *Sleep Med Clin*. 2017;12(3):279-287. doi:10.1016/j.jsmc.2017.03.004
108. Morgan BP, Harris AL. *Deficiencies of Complement Regulators*. Academic Press; 1999. doi:10.1016/B978-012506965-6/50007-6
109. Jurado-Gamez B, Gomez-Chaparro JL, Muñoz-Calero M, et al. Serum proteomic changes in adults with obstructive sleep apnoea. *J Sleep Res*. 2012;21(2):139-146. doi:10.1111/j.1365-2869.2011.00955.x
110. Wang S, Lu H, Ni J, et al. An evaluation of association between common variants in C4BPB/C4BPA genes and schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2015;590:189-192. doi:10.1016/j.neulet.2015.02.005
111. Trapp RG, Fletcher M, Forristal J, West CD. C4 binding protein deficiency in a patient with atypical Behcet's disease. *J Rheumatol*. 1987;14(1):135-138.
112. Tüzün E, Saini SS, Ghosh S, Rowin J, Meriggioli MN, Christadoss P. Predictive value of serum anti-C1q antibody levels in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord*. 2006;16(2):137-143. doi:10.1016/j.nmd.2005.11.005
113. Orbai AM, Truedsson L, Sturfelt G, et al. Anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2015;24(1):42-49. doi:10.1177/0961203314547791
114. Nordenfelt P, Waldemarson S, Linder A, et al. Antibody orientation at bacterial

- surfaces is related to invasive infection. *J Exp Med*. 2012;209(13):2367-2381. doi:10.1084/jem.20120325
115. Jarva H, Ram S, Vogel U, Blom AM, Meri S. Binding of the Complement Inhibitor C4bp to Serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Immunol*. 2014;174(10):6299-6307. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6299
116. Barateau L, Lopez R, Arnulf I, et al. Comorbidity between central disorders of hypersomnolence and immune-based disorders. *Neurology*. 2017;88(1):93-100. doi:10.1212/WNL.0000000000003432
117. Fernandes GB, Cremaschi RC, Tufik S, Coelho FM. Grey zone between narcolepsy type 1 and type 2. *Arq Neuropsiquiatr*. 2017;75(9):682-683. doi:10.1590/0004-282x20170106

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 10

Tarih : 02.01.2014

Konu : Uzm. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ

Sayın Uzm. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı

İlgi : DETAE Sinirbilim Anabilim Dalının 09/12/2013 gün ve 276 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2013/1739 dosya numaralı "Narkolepsi Hastalığında İmmünopatolojik Özelliklere Yeni Bir Bakış: Pürünerjik ve Monoaminerjik Sistemlerinin Otoimmünite Üzerine Etkileri" başlıklı çalışma kurulumuzun 13/12/2013 gün ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	02/12/2013		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	■		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	□		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	□		
	SIGORTA	□		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■	Güncel bütçe formu	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	□		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	□		
	İLAN	□		
	YILLIK BİLDİRİM	□		
	SONUÇ RAPORU	□		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	□		
Diğer:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:21	Tarih: 13/12/2013		
İstanbul Üniversitesi DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı'nda görevli Uzm. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ'nin sorumluluğunda yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI			19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ■	K □	E □	H ■	E ■	H □	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E □	K ■	E □	H ■	E ■	H □	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K □	E □	H ■	E ■	H □	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K □	E □	H ■	E □	H ■	KATILMADI
Dr. Sevdâ ÖZEL	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E □	K ■	E □	H ■	E ■	H □	

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a .maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli izin alınması gerekmektedir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Narkolepsi Hastalığında İmmünopatolojik Özelliklere Yeni Bir Bakış: Pürünerjik ve Monoaminerjik Sistemlerinin Otoimmünite Üzerine Etkileri"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Uzm. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Nöroloji			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	----			
ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz : Deneysel Klinik Araştırma			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 5

Konu: Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ hk.

Tarih :

Sayın Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ
Sinirbilim Anabilim Dalı

İlgi: Sinirbilim Anabilim Dalının 24/10/2018 gün ve 301628 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Arş. Gör. Hande YÜCEER' in yürüteceği 2018/1 "Narkolepsiye Özgü Otoantikörlerin İmmünopresipitasyon ve Kütle Spektrofotometre ile Validasyonu" başlıklı çalışma kurulumuzun 28/12/2018 tarih ve 22 sayılı toplantısında görüşülen bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRE
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORM

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Narkolepsiye Özgü Otoantikörlerin İmmünopresipitasyon ve Spektrofotometre İle Tanımlanması ve Validasyonu"
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	21.12.2018		Türkçe ☒ İngilizce ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☒		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, İlgili Eleman Belge, CV, CD
	Karar No:22	Tarih: 28/12/2018		
KARAR BİLGİLERİ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ'nin sorumluluğunda ve Arş. Gör. Hande YÜCEER'in yürüteceği yukarıda belirtilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilme sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		K	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	

* :Araştırma ile ilişki

** :Toplantıda Bulunma

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORM

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUS KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Narkolepsiye Özgü Otoantikorların İmmün ve Kütle Spektrofotometre İle Tanım Validasyonu"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Nöroloji			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İ Anabilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz :			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NARKOLEPSİYE ÖZGÜ OTOANTİKORLARIN İMMÜNOPRESİPİTASYON VE KÜTLE SPEKTROFOTOMETRE İLE TANIMLANMASI VE VALİDASYONU

ORJİNALLIK RAPORU

% 1	% 1	% 0	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
2	Submitted to Bahcesehir University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	openaccess.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	"Abstracts", Journal of Sleep Research, 2014. Yayın	<% 1
7	Submitted to University of Kent at Canterbury Öğrenci Ödevi	<% 1
8	megep.meb.gov.tr	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hande	Soyadı	Yüceer
Doğ.Yeri	Bakırköy	Doğ.Tar.	25.11.1993
Email	yuceerh@gmail.com handeyuceer@istanbul.edu.tr	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, ASDETAE, Sinirbilim	-
Lisans	İstanbul Bilgi Üniversitesi, Psikoloji	2015
Lise	Hasan Polatkan Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi, ASDETAE, Sinirbilim ABD	2018-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		92.50 (YDS)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80,91942		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
GraphPad Prism	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Bakırcıoğlu-Duman, E., Acar, Z., Benbir, G., Yüceer, H., Acar, H., Baştan, B., Petek-Balcı, B., Karadeniz, D., Çokar, Ö., Tüzün, E. (2019). Insomnia and Dysautonomia with Contactin-Associated Protein 2 and Leucine-Rich Glioma

- Inactivated Protein 1 Antibodies: A “Forme Fruste” of Morvan Syndrome?, Case Reports In Neurological Medicine, 11, 80-86.
2. Yüceer, H., Ulusoy, C. A., Tüzün, E. (2017). Musk-İlişkili Myastenia Gravis’te Antikor ve Sitokin Profili, Deneysel Tıp Dergisi, 7(14), 39-49.
 3. Küçükali, C. İ., Bilgiç B., Hanağası H. A. (2018, Kasım-Aralık). Parkinson Hastalığında SUMO Gen Variantlarının İncelenmesi. 54. Ulusal Nöroloji Kongresi, Antalya, Türkiye.
 4. “Parkinson Hastalığında SUMO Gen Variantlarının İncelenmesi” Başlıklı Sözel Çalışmamız 54. Ulusal Nöroloji Kongresinde Üçüncülük Ödülüne Layık Görüldü (2018).
 5. Küçükali, C. İ., Yüceer, H., Tüzün, E. (2017, Kasım). Topiramatin Fare Frenik Sinir-Hemidiyafram Preparatı Üzerine Etkileri. 53. Ulusal Nöroloji Kongresi, Antalya, Türkiye.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

