

ZERRİN KARAASLAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

SERONEGATİF NÖROMİYELITİS OPTİKA
HASTALARINDA TANIMLANMAMIŞ ANTİJENİK
HEDEFLERİN ARAŞTIRILMASI

ZERRİN KARAASLAN

DANIŞMAN
PROF.DR.CEM İSMAİL KÜÇÜKALİ

SİNİRBİLİM ANA BİLİM DALI
İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2023

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.

Zerrin Karaaslan

İTHAF

Bugün olduğum yere gelmemde çok emeği olan, COVID-19 nedeniyle kaybettiğim
anneanneme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince desteğini benden esirgemeyen, akademik kariyerimi kişisel ilgilerime göre şekillendirmem konusunda her zaman arkamda olan ve bana yön veren danışman hocam Cem İsmail KÜÇÜKALİ'ye,

Eğitim hayatım boyunca tecrübeleri ve bilgileri ile bana her zaman destek olan bu çalışmanın gerçekleşmesinde oldukça emek harcayan Erdem TÜZÜN, Vuslat YILMAZ'a,

Bu çalışmaya örneklerinin sağlanması ve klinik tecrübeleri ile gösterdikleri destek için Murat KÜRTÜNCÜ ve Tuncay GÜNDÜZ'e,

Çalışmamızda deneysel süreç ve analiz konusunda yardımlarını esirgemeyen Ahmet Tarık BAYKAL ve Özlem TİMİRCİ-KAHRAMAN'a

Teknik bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşarak bu çalışmada bana destek olan Ece ERDAĞ ve Büşra ŞENGÜL'e

Yarattıkları harika çalışma ortamı ile zor ve stresli günleri dahi kolay kılan ve çalışmalarımnda her daim desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Canan ULUSOY, Hande YÜCEER, Elif ŞANLI, Ece AKBAYIR, Gizem KORAL, Selen SOYLU, Sedat GÜNBEK, Beyza Nur YALÇIN ve Melike TEZEL'e,

Doktora eğitimim boyunca 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programları bursiyeri olarak beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na

Bu zorlu süreçte maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, hayallerimi gerçekleştirmem adına kendileri de benimle birlikte birçok zorluğa göğüs geren sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:TDK-2022-39064

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nöromiyelitis Optika Spektrum Hastalıkları	4
2.1.1. Hastalığa Tarihsel Bakış	4
2.1.2. Epidemiyoloji ve Demografik Özellikler	5
2.1.3. Etiyoloji ve Risk Faktörleri	6
2.1.3.1. Genetik risk faktörleri	6
2.1.3.2. Çevresel risk faktörleri	6
2.1.4. Patogenez	7
2.1.5. Klinik Özellikler ve Tanı	13
2.1.5.1. Klinik Bulgular	13
2.1.5.2. Klinik Seyir ve Prognoz	13
2.1.5.3. Tanı Kriterleri	14
2.1.5.4. Nörogörüntüleme Bulguları	16
2.1.5.5. Serolojik Testler	16
2.1.5.6. Tanıyı Destekleyici Diğer Tetkikler	18
2.1.6. Ayırıcı Tanı	19
2.1.7. Tedavi	20
2.2. Serolojik Durum ile Klinik ve Prognozun İlişkisi	21

2.3. Seronegatif NMOSH İçin Biyobelirteç Saptanmasının Önemi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Olgu Seçimi	24
3.2. Olguların Serolojik Durumunun Hücre Temelli Deneylerle Doğrulanması	25
3.2.1. Bakteriyel Transformasyon Protokolü	26
3.2.2. Plazmid İzolasyonu	26
3.2.3. Plazmid Transfeksiyon Protokolü	26
3.2.4. AQP4 antijeni ile hücre yüzey boyama protokolü	27
3.2.5. MOG antijeni ile hücre yüzey boyama protokolü	27
3.3. Astrosit hücrelerine karşı henüz tanımlanmamış antikorların varlığının araştırılması	27
3.3.1. Primer sıçan astrosit kültürü	28
3.3.2. Sıçan astrosit yüzey boyama	28
3.4. İP ve kütle-spektrometresi ile aday hedef oto-antijenlerin tanımlanması	28
3.4.1. Manyetik boncuklar aracılığıyla İP Protokolü	29
3.4.2. İmmünpresipitatların jel elektroforezde yürütülmesi	29
3.4.3. Kütle spektrometre protokolü	30
3.4.4. Biyoinformatik analiz	30
3.5. Seçilen hedef antijenlere karşı serum antikor varlığının validasyonu	31
3.6. İstatistiksel analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. Olguların klinik ve demografik özellikleri	33
4.2. AQP4 ve MOG antijenlerine spesifik antikor tarama sonuçları	34
4.3. Primer sıçan astrosit boyaması	35
4.4. İP ve kütle spektrometre sonuçları	36
4.5. ELISA ile validasyon sonuçları	40
5. TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	50
ETİK KURUL	68
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	69

ÖZGEÇMİŞ.....	70
----------------------	-----------



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. AQP4 antikoru negatif NMOSH veya AQP4 antikoru durumu bilinmeyen NMOSH için tanı kriterleri	15
Tablo 4-1. NMOSH olgularının demografik ve klinik özellikleri	33
Tablo 4-2. Kütle spektrometre sonuçlarına göre olası hedef antijenlerin fonksiyonlarına göre gruplandırılmış listesi.	37
Tablo 4-3. ELISA yapılan olguların klinik ve demografik özellikleri	41
Tablo 4-4. ELISA ile saptanan serum anti-CLIC1-IgG düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması	41
Tablo 4-5. CLIC1 antikoru pozitif ve negatif OSMS olgularının klinik ve demografik özelliklerinin karşılaştırılması.....	42
Tablo 4-6. CLIC1 antikoru pozitif ve negatif RİON olgularının klinik ve demografik özelliklerinin karşılaştırılması.....	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. AQP antijeninin yapısı ve özellikleri.....	8
Şekil 2-2 AQP4 antikoru pozitif bireylerde hastalık mekanizmaları.....	11
Şekil 4-1. M23-AQP4 antijeni ile transfekte hücrelerle yapılan CBA deneylerinin mikroskop görüntüsü... ..	34
Şekil 4-2. DDK işaretli MOG antijeni ile transfekte hücrelerle yapılan CBA deneylerinin mikroskop görüntüsü... ..	35
Şekil 4-3. Primer sıçan astrositleri ile immun boyama deneylerinin mikroskop görüntüsü... ..	36
Şekil 4-4. Hasta gruplarında antikor pozitifliğini değerlendirilmesi... ..	42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- APRIL:** Proliferasyon indükleyici ligand (A proliferation inducing ligand)
- AQP4:** Aquaporin 4
- BAFF:** B hücresi aktive edici faktör (B cell activating factor)
- BOS:** Beyin omurilik sıvısı
- BSA:** Sığır serum albumini (Bovine serum albumine)
- CBA:** Hücre temelli deney (Cell based assay)
- CHO:** Çin hamstring yumurtalığı (Chinese hamstring ovary)
- CLIC1:** Klorür hücre içi kanal proteini 1 (Chloride intracellular channel protein 1)
- CPSF-73:** Bölünme ve Poliadenilasyon Spesifiklik Faktörü (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor)
- CV2-CRMP5:** Kollapsin yanıt medyatör protein 5 (Collapsin response mediator protein 5)
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DMEM:** Dulbecco'nun Değiştirilmiş Eagle Medyumu (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- E.coli:** Escherichia coli
- EDSS:** Genişletilmiş Özürlülük Durumu Ölçeği (Expanded Disability Status Scale)
- EGFP:** Geliştirilmiş Yeşil Floresan Protein (Enhanced Green Fluorescent Protein)
- ELISA:** Enzim bağlı immünosorbent deneyi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- FBS:** Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
- FITC:** Floresan-5-izotiyosiyanat
- GFAP:** Glial fibriler asidik protein
- GO:** Gen ontolojisi
- HEPES:** 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
- HLA:** İnsan lökosit antijeni (Human leukocyte antigen)
- IgG:** İmmunoglobulin G
- IgM:** İmmunoglobulin M
- IL:** Interlökin
- İP:** İmmunopresipitasyon
- IPND:** Uluslararası NMO Tanı Paneli (The International Panel for NMO Diagnosis)
- IVIG:** İntravenöz immunglobulin
- IVMP:** İntravenöz metilprednizolon
- KBB:** Kan-beyin bariyeri

- Kir:** İçten doğrultucu potasyum (Inwardly rectifying potassium)
- KMS:** Konvansiyonal MS
- LB:** Luria-Bertani
- LC:** Sıvı kromatografisi (Liquid chromatography)
- LPS:** Lipopolisakkarit
- MOG:** Myelin oligodentrosit glikoproteini
- MOGEM:** MOG ilişkili ensefalomiyelit
- MRG:** Manyetik rezonans görüntüleme
- MS:** kütle spektrometre (Mass Spectrometry)
- MS:** Multipl sklerozis
- NF-155:** Nörofasin-155
- NMDAR:** N-metil-D-aspartat reseptör
- NMO:** Nöromiyelitis Optika
- NMOSH:** Nöromiyelitis Optika Spektrum Hastalığı
- OAPs:** Ortogonal olarak düzenlenmiş partiküller (Orthogonal arrays of particles)
- OKB:** Oligokonal bant
- ON:** Optik nörit
- OSMS:** Optikospinal multipl sklerozis
- PBS:** Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)
- PEI:** Polyetilenimin
- PFA:** Paraformaldehit
- PIC:** Proteinaz inhibitor kokteyli
- PLL:** Poli-L-lizin
- RIÖN:** Rekürren inflamatuvar optik nörit
- RNF14:** Ring finger protein 141
- RRMS:** Tekrarlayan düzelen multipl sklerozis (Relapsing-remitting Multiple Sclerosis)
- SDS-PAGE:** Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid
- siRNA:** Küçük interfere RNA (Small interfering RNA)
- SSS:** Santral sinir sistemi
- Th17:** Yardımcı T hücresi 17 (T-helper-17)
- TMB:** Tetrametilbenzidin
- TNF- α :** Tümör nekroz faktör alfa
- ULTM:** Uzun longitudinal transvers miyelit
- VEGF:** Vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)

ÖZET

Karaaslan Z. Seronegatif Nöromiyelitis Optika Hastalarında Tanımlanmamış Antijenik Hedeflerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2023.

Amaç: Nöromiyelitis optika spektrum hastalıkları (NMOSH) santral sinir sisteminin özüllülük yaratan bir hastalıdır. Olguların büyük bir kısmında Aquaporine-4 (AQP4) antijenine karşı patojen antikorlar tespit edilmiştir. Antikor tespit edilemeyen seronegatif NMOSH grubunun ise patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Spinal kord ve optik sinir ağırlıklı tutulum ile seyreden bir multipl sklerozis (MS) altipi olan optikospinal MS (OSMS) olguları özellikle seronegatif grup ile ayırıcı tanıda zorluklara neden olmaktadır. Bu çalışmada amacımız seronegatif NMOSH grubunda astrosit antijenlerine karşı henüz tanımlanmamış antikorların saptanması, OSMS ile ayırıcı tanıya yardımcı biyobelirteçlerin saptanmasıdır.

Yöntem: Çalışma için seronegatif NMOSH(n=30), OSMS (n=10), ve sağlıklı kontrol (n=5) olgularından elde edilen serumlarda astrosit yüzey antijenlerine karşı antikor varlığı primer sıçan astrosit kültürü ile araştırıldı. Spesifik bağlanma izlenen olgu serumlarında antijen-antikor kompleksleri immünpresipitasyon (İP) yöntemi ile çöktürülerek, ürünler jel elektroforezde yürütüldü. Sağlıklı kontrollerden farklılık gösteren bantlar içeren örnekler hedef antijenin tanımlanabilmesi için kütle spektrometre ile analiz edildi. Biyoinformatik analizler sonucu daha geniş bir olgu grubunda (AQP4 pozitif NMOSH=19, seronegatif NMOSH=11, OSMS =29, konvansiyonal MS (KMS)= 36, rekürren inflamatuvar optik nörit (RİON)=15, sağlıklı kontrol=36) home-made Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile antikor varlığı doğrulandı.

Bulgular: Primer astrosit kültüründe 2 seronegatif NMOSH ve 5 OSMS olgusunda immün boyama izlendi. Bu örneklerle yapılan İP incelemesinde yalnızca OSMS grubunda birden fazla olguda ortak protein bantları izlendi. Kütle spektrometre incelemesi ve biyoinformatik analizler sonucu Chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) hedef antijen olarak tespit edildi. ELISA ile doğrulama deneyleri OSMS ve RİON gruplarında CLIC1 antikor pozitifliği olduğunu gösterdi.

Sonuç: CLIC1 antijenine karşı gelişmiş antikorlar OSMS grubu ile seronegatif NMOSH olgularında ayırıcı tanı için yardımcı olabilecek bir biyobelirteç olabilir.

Anahtar Kelimeler: Nöromiyelitis optika; multipl sklerozis; otoantikor; Chloride intracellular channel protein 1

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-39064

ABSTRACT

Karaaslan Z. Investigation of Unidentified Antigenic Targets in Patients with Seronegative Neuromyelitis Optica. İstanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Neuroscience. PhD thesis. İstanbul. 2023.

Objective: Neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) is a disabling disease of the central nervous system. Pathogenic antibodies against Aquaporine-4 (AQP4) antigen were detected in most of the cases. The pathogenesis of the seronegative NMOSD group in which no antibodies could be detected has not yet been fully elucidated. Optico-spinal multiple sclerosis (OSMS) cases with predominantly spinal cord and optic nerve involvement cause difficulties in the differential diagnosis, especially with the seronegative group. Our aim in this study is to establish the unidentified antibodies against astrocyte antigens in the seronegative NMOSD and to identify biomarkers that help differential diagnosis with MS-SCON.

Method: For the study, the presence of antibodies against astrocyte surface antigens in the sera obtained from seronegative NMOSD(n=30), OSMS (n=10), and healthy control(n=5) cases were investigated by primary rat astrocyte culture. Antigen-antibody complexes were precipitated by immunoprecipitation (IP) method in the sera of the cases with specific binding, and the products were carried out in gel electrophoresis. Samples containing bands that differed from healthy controls were analyzed by mass spectrometry to identify the target antigen. After bioinformatic analysis, the presence of antibodies was confirmed by the home-made Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) method with a larger cohort (AQP4 positive NMOSD=19, seronegative NMOSD=11, OSMS =29, conventional MS (CMS)= 36, recurrent inflammatory optic neuritis (RION)= 15, healthy control=36)

Results: Immunostaining was observed in 2 seronegative NMOSD and 5 OSMS cases in primary astrocyte culture. Gel electrophoresis of the IP products of these samples revealed the bands that were observed only in OSMS group. Chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) was identified as the target antigen after mass spectrometry and bioinformatic analysis. Confirmation experiments by ELISA showed antibody positivity in OSMS and RION groups.

Conclusion: Antibodies against CLIC1 antigen may be a helpful biomarker for differential diagnosis in OSMS group and seronegative NMOSD cases.

Key Words: Neuromyelitis optica, multiple sclerosis, autoantibody, chloride intracellular channel protein 1

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: TDK-2022-39064

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöromiyelitis Optika (NMO) santral sinir sisteminin (SSS) nadir bir inflamatuvar hastalığıdır. Hastalık tipik olarak monofazik optik nörit (ON) ve uzun longitudinal transvers miyelit (ULTM) atakları ile tanımlanmış ancak yıllar içinde tekrarlayıcı ataklarla seyredebileceği anlaşılmıştır (1). Başlangıçta özellikle multipl sklerozis (MS) tanı şemsiyesi altında değerlendirilen birçok olgu, 2004 yılında astrositler üzerinde eksprese edilen aquaporin 4 (AQP4) antijenine karşı gelişen antikorların (Anti-AQP4) saptanması ile ayrı bir antite olarak tanınmış ve patogeneziyle ilgili önemli ipuçları edinilmiştir (2). Bu antikorların saptanması aynı zamanda hastalığın beyin sapı, diensefalon ya da serebral tutulum ile seyreden daha nadir klinik sendromlarla da ortaya çıkabileceğinin anlaşılmasına neden olmuştur. Bu bilgiler ışığında tanı kriterleri Nöromiyelitis Optika Spektrum Hastalığı (NMOSH) başlığında AQP4 antikor pozitifliğini de içerecek şekilde revize edilmiştir (3). Ancak tipik olarak NMOSH fenotipi göstermesine rağmen hassas tetkik yöntemleriyle dahi AQP4 antijenine karşı antikor saptanamamış %10-40 civarında hasta bulunmaktadır (4). Tanı kriterlerinin güncellenmesi hastalığın daha erken dönemde tanınması ve daha etkin immunsupresif tedavi ile erken tedavi olanağı sağlamıştır (5). AQP4 antikoru pozitif olgular için tanı kriterlerinde bir konsensus oluşmuş olmakla birlikte seronegatif olgularla ilgili daha detaylı incelemelerin gerektiği belirtilmiştir (3).

Anti-AQP4 antikoru negatif olan ancak NMOSH tanı kriterlerini dolduran olguların bir kısmında myelin oligodendrosit glikoproteinine (MOG) karşı antikorların saptandığı gösterilmiş ve bu olguların demografik ve klinik olarak anti-AQP4 antikoru pozitif olgulardan farklılık gösterdiği bildirilmiştir (6-8). Anti-MOG antikor pozitifliği seronegatif NMOSH olgularının küçük bir kısmını oluşturmakta olup her iki antikoru negatif olduğu NMOSH olguları halen ayırıcı tanıda zorluk yaşanan bir gruba oluşturmaktadır (9).

Seronegatif NMOSH olgularında AQP4 antikoru pozitif olgulara kıyasla kadın dominansı daha az olmakla birlikte hastalık başlangıç yaşı daha düşük saptanmıştır. Klinik olarak ise optikomyelit başlangıç ve ağır ON ataklarının daha nadir olduğu bildirilmiştir. Atak sıklığı, özürllülük oranları ve diğer klinik parametreler açısından anlamlı farklılık izlenmemiştir (10, 11). Patolojik olarak incelendiğinde anti-AQP4

antikoru pozitif olgularda hakim tablonun astrosit hasarı ve buna sekonder oligodentrosit desteğinin azalmasına bağlı demiyelinizasyon olduğu izlenmektedir (12). Seronegatif olgularla ilgili sınırlı patofizyoloji çalışmalarında seropozitif olgularda izlenen kompleman bağımlı sitotoksitenin bu olguların serumlarında gösterilemediği bildirilmiş ancak bunun test duyarlılığıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (13). Seronegatif olguların da immunsupresif tedavilere iyi yanıt veriyor olması bu olgularda henüz tanımlanmamış antikorların varlığını gündeme getirmiştir (14, 15). Astrosit hasar belirteci olarak kullanılan glial fibriler asidik protein (GFAP) ve astrositik bir enzim olan glutamin sentetaz düzeylerinin seronegatif olgularda da yüksek saptanması bu teoriyi destekler niteliktedir (16). Lalive ve ark. protein mikroarray teknolojisi ile yaptıkları incelemede anti-AQP4 antikoru pozitif bir olguda yeni potansiyel hedef antijenler olduğunu tanımlamış ve hastalık patogenezinde birden fazla antikorun rol oynayabileceğini ileri sürmüştür (17). Olgu düzeyinde kolapsin yanıt medyatör proteini 5 ("CV2/collapsin response mediator protein 5"- CV2-CRMP5) ve N-metil-D-aspartat reseptör (NMDAR) antijenlerine karşı gelişen antikorların da NMOSH olgularında pozitif saptandığı bildirilmiştir (18, 19).

Seronegatif olgularda antikor saptanamamasının önemli bir nedeni antijenlerin üç boyutlu yapısının test yöntemlerinde tanınmasıyla ilgili sorunlara bağlı düşük duyarlılık ve özgüllük olabilir. Bu nedenle antijenlerin üç boyutlu yapısının korunduğu antikor tarama yöntemleri, bu grupta hedef oto-antijen taraması için uygun bir yöntem olacaktır. Spesifik bir antikora bağlı antijenin tespiti esasına dayalı bir yöntem olan immunopresipitasyon (İP) tekniği proteinlerin üç boyutlu yapısının korunması nedeniyle önemli bir antijen-antikor kompleksi tarama yöntemidir (20). Bu teknikle saflaştırılan antijen-antikor komplekslerinin tanımlanması ise kütle spektrometre yöntemi ile sağlanmaktadır (21).

Seronegatif NMOSH olguları ayırıcı tanısında önemli bir grup az sayıda olmakla birlikte optikospinal ağırlıklı seyreden MS hastalarıdır. Interferon beta, natalizumab, fingolimod gibi MS tedavisinde kullanılan hastalık modifiye edici tedavilerin NMOSH hastalarında etkisiz olduğu ya da hastalığı kötüleştirdiğinin gösterilmesi, MS ve NMOSH ayırıcı tanısını oldukça önemli hale getirmiştir (22).

Bu çalışmada amacımız seronegatif NMOSH olgularında hastalık patogeneziyle ilişkili yeni hedef oto-antijenlerin tanımlanması, hastalığın tanısı ve prognozu hakkında

bilgi verebilecek yeni biyobelirteçlerin saptanması, özellikle MS ve NMOSH ayırıcı tanısında kullanılabilecek tanısal biyobelirteçlerin saptanmasıdır. Bu amaçla seronegatif NMOSH olguları ve optik sinir ve spinal ağrılıklı ataklarla seyreden MS olgularının serumlarından İP ve kütle spektrometre yardımıyla astrosit yüzey antijenlerine karşı henüz henüz tanımlanmamış otoanikorların varlığının araştırılması planlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöromiyelitis Optika Spektrum Hastalıkları

2.1.1. Hastalığa Tarihsel Bakış

NMOSH, SSS'nin kronik, otoimmün ve inflamatuvar özellikte, ağırlıklı spinal kord ve optik sinir tutulumu ile seyreden, patolojik olarak immün aracılı astrosit kaybı ve sekonder demiyelinizasyon ve nörodejenerasyonun izlendiği bir grup hastalığını ifade eder (23, 24).

NMO, ilk olarak 1984 yılında Eugene Devic tarafından ON ve miyelit atakları ile seyreden bir hastalık olarak tanımlanmış ve Devic hastalığı olarak da isimlendirilmiştir (25). İlk tanımlandığı dönemde eş zamanlı gelişen bilateral optik nörit ve transvers miyelit ile prezente olan monofazik bir hastalık olduğu düşünülse de ilerleyen yıllarda hastalığın relapslarla seyredebileceği, eş zamanlı ON ve miyelit kliniğinin olguların yalnızca %10'unda ortaya çıktığı anlaşılmıştır (1, 26). Her ne kadar ayrı bir antite olarak tanımlanmış olsa da NMO uzun yıllar MS hastalığının optik sinir ve spinal kord tutma eğilimi gösteren ağır bir varyantı olarak görülmeye devam etmiştir. Yaklaşık 100 yıllık bu süreçte hastalık patogenezi ile ilgili yeterli bilginin olmaması, kanıta dayalı tedavi seçeneklerinde de aşama kaydedilememesine neden olmuştur. Wingerchuck ve arkadaşları, 1999 yılında yayınladıkları 71 olgudan oluşan bir vaka serisi ile klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları ile NMO'nun klasik MS'ten ayırt edilebildiğini belirtmiş ve NMO için ilk tanı kriterlerini tanımlanmıştır. Bu kriterler ON ve miyelitin varlığına ek olarak klinik tabloyu açıklayabilecek herhangi bir nörolojik hastalığın dışlanmasını içermektedir (26). NMO'nun ayrı bir hastalık olarak kabul görmesi 2004 yılında Lennon ve arkadaşlarının NMO kliniğine sahip hastaların bir kısmının serumunda NMO immunoglobulin G (IgG) olarak adlandırdığı antikor varlığını göstermesi ile gerçekleşmiştir (2). Yaklaşık bir yıl sonra NMO tanısında %90 üzeri özgüllük değerine sahip olmasının yanı sıra patojenik olduğu da anlaşılan bu antikorların AQP4 antijenini hedef aldığı tespit edilmiştir (27). AQP4 antikorları 2006 yılında revize edilen tanı kriterlerine eklenmiş ve böylece spinal kord ve optik sinir dışındaki bölgelerde tutulum olan ya da MS benzeri görüntüleme bulguları olan NMO olgularının tanı alma şansını artırmak amaçlanmıştır (28). Gerçekten de AQP4 antikorlarının hastalık için yüksek özgüllük göstermesi NMO kliniği ve

nörogörüntüleme bulgularının daha geniş bir çerçevede değerlendirilmesine ve hastalığın daha kısıtlı ya da erken formlarının tanınmasına olanak sağlamıştır. Bu bulgular ışığında serebral, diensefalik ya da beyin sapı lezyonları olan NMO olgularını da kapsayacak şekilde 2007 yılında NMOSH terminolojisi kullanılmaya başlanmıştır (29). AQP4 antikorları tanı için oldukça önemli olsa da olguların %10-40'inde duyarlı yöntemlerle test edilmesine rağmen antikor saptanamamaktadır. AQP4 antikoru negatif NMOSH olarak takip edilen bu hastaların yaklaşık %30'unda daha sonra MOG antijenine karşı antikorlar saptanmıştır (30). 2015 yılında uluslararası NMO tanı paneli (The International Panel for NMO Diagnosis "IPND") tarafından anti-AQP4 antikor serolojik durumunu göz önüne alacak şekilde halen kullanılmakta olan tanı kriterleri geliştirilmiştir. Bu tanı kriterlerine göre klinik heterojenite göz önüne alınarak AQP4 antikoru negatif olan ya da serolojik durumu bilinmeyen olguların tanı alabilmesi için daha rijit şartlar oluşturulmuştur (3). 2006 ve 2015 tanı kriterlerini karşılaştıran çalışmalar, 2015 tanı kriterlerinin erken tanı koyma başarısının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu da immünsüpresif tedaviye erken başlama şansı ve uzun dönemde daha iyi bir prognoz avantajı sağlamıştır (31).

2.1.2. Epidemiyoloji ve Demografik Özellikler

NMO prevalansının dünya genelinde 0,7-10/100.000 arasında değişmekte nadiren 100.000'de 5'i geçmektedir (32). Hastalıkla ilgili en yüksek prevalans değeri ağırlıklı olarak Afrika kökenli bir popülasyona sahip olan Martinik adasından bildirilmiştir (100.000'de 10) (33). Bir meta-analiz çalışmasında 2006 kriterleri baz alındığında NMO'nun genel prevalansı 100.000'de 1,54; 2015 kriterlerine göre değerlendirildiğinde ise 1,51 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada yıllık insidans 2006 kriterlerine göre 100.000'de 0,155 olarak, 2015 kriterlerine göre ise 100.000'de 0,278 olarak raporlanmıştır (34). Popülasyon temelli çalışmalar Asya ve Afrika ırklarında hastalığın görülme sıklığının daha yüksek olduğunu göstermiştir (35). Hastalıkla ilgili farkındalığın artmış olması, ayırıcı tanının daha iyi yapılıyor olması, AQP4 antikor testlerine ulaşılabilirliğin artması, tedavideki gelişmeler ve erken tanı sayesinde mortalitenin azalması gibi sebeplerden ötürü hastalığın prevalansının önümüzdeki yıllarda artış göstermesi beklenmektedir (36).

NMO herhangi bir yaşta görülebilir ancak ortalama hastalık başlangıç yaşı AQP4 antikoru pozitif hastalar için 40, seronegatif hastalar için 38,5 MOG antikoru

pozitif hastalar için ise 31 olarak bildirilmiştir (9,15). AQP4 antikor pozitif olgularda kadınlarda görülme sıklığı erkeklere göre 9 ila 10 kat daha fazladır. Seronegatif olgularda (K:E = 2:1) ve MOG antikor pozitif olgularda (K:E = 1:1) ise bu oran AQP4 antikor pozitiflere göre oldukça düşüktür (9, 37, 38).

2.1.3. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

2.1.3.1. Genetik risk faktörleri

NMOSH olgularının ırklara ve coğrafi bölgelere göre farklılık göstermesi, bunun yanı sıra NMOSH olgularının %3'ünde hastalığın ailevi özellik göstermesi, etiyopatogeneze genetik bir yatkınlığın olabileceğini düşündürmüştür (39). Birçok otoimmün hastalıkla ilişkisi olduğu bilinen “human leukocyte antigen” (HLA) genleriyle ilgili yapılan çalışmalarda HLA- DRB1 * 04:04 ve HLA-DRB1 * 10:01 alellerinin NMOSH insidansı ile pozitif, HLA-DRB1 * 07 ve HLA- DQB1* 02:02 alellerinin ise negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (40). Çin’de NMOSH hastaları ile yapılan bir tüm ekzom dizileme çalışmasında HLA-DQB1 *05:02 alelinin NMOSH gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (41). Bu bulgular farklı HLA alellerinin NMOSH etiyojisinde zıt roller oynayabileceğini göstermektedir.

Hastalık patogeneğinde önemli rolü olan AQP4 genindeki polimorfizmlerin de NMOSH gelişiminde rolü olabileceği düşünülmüştür. Ogasawara ve ark. AQP4 geninin promotor bölgesindeki bir tek nükleotid değişiminin AQP4 antikor pozitif hastalara kontrollerden daha fazla olduğunu göstermiş (42), Matiello ve ark. ise 18. kromozomda saptadıkları bir polimorfizmin NMOSH insidansı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (43).

Bunların dışında da özellikle immün sistemle ilgili vaka düzeyinde birçok genetik varyantın hastalıkla ilişkisi bildirilse de validasyon için daha fazla ve daha geniş popülasyonlarda genetik çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.1.3.2. Çevresel risk faktörleri

Genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de kompleks bir hastalık olan NMOSH için risk faktörü olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla özellikle otoimmüniteyle yakın ilişkisi olduğu, aktif B hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve bu hücrelerde apoptozisi indüklediği bilinen D vitamini (44) ile NMOSH ilişkisi araştırılmıştır. Bir çalışmada 25(OH)D3 düzeyinin NMOSH hastalarında sağlıklı

kontrollere göre düşük olduğu gösterilmiş, ayrıca D vitamini düzeyinin hastalığın akut döneminde remisyona göre daha da düşük hale geldiğini, hatta atak dönemi 25(OH)D3 düzeyinin hastaların özürölülük skorlarıyla negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (45). Ancak NMOSH olgularında D vitamini düzeyi düşüklüğü olsa da bunun hastalık ağırlığı ile ilişkilendirilemediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (46, 47). Bu bulgular NMOSH ve D vitamini düzeyleri arasında neden-sonuç ilişkisi kurmak için yeterli kanıtın bulunmadığını düşündürmektedir.

Aktif ve pasif sigara içiciliğinin NMOSH olgularında seropozitiviteyle ilişkili olduğu gösterilen bir çalışmada sigaranın immün sistem üzerine etkileri nedeniyle oto-antikor üretimini tetikleyebileceği öne sürülmüştür (48). AQP4 antikor pozitif olan NMOSH olgularının incelendiği bir çalışmada sigara içenlerde atak sıklığında içmeyenlere göre bir farklılık gözlenmemekle birlikte relaps sonrası iyileşmenin daha kötü olması nedeniyle özürölülüğü arttığı gösterilmiştir (49).

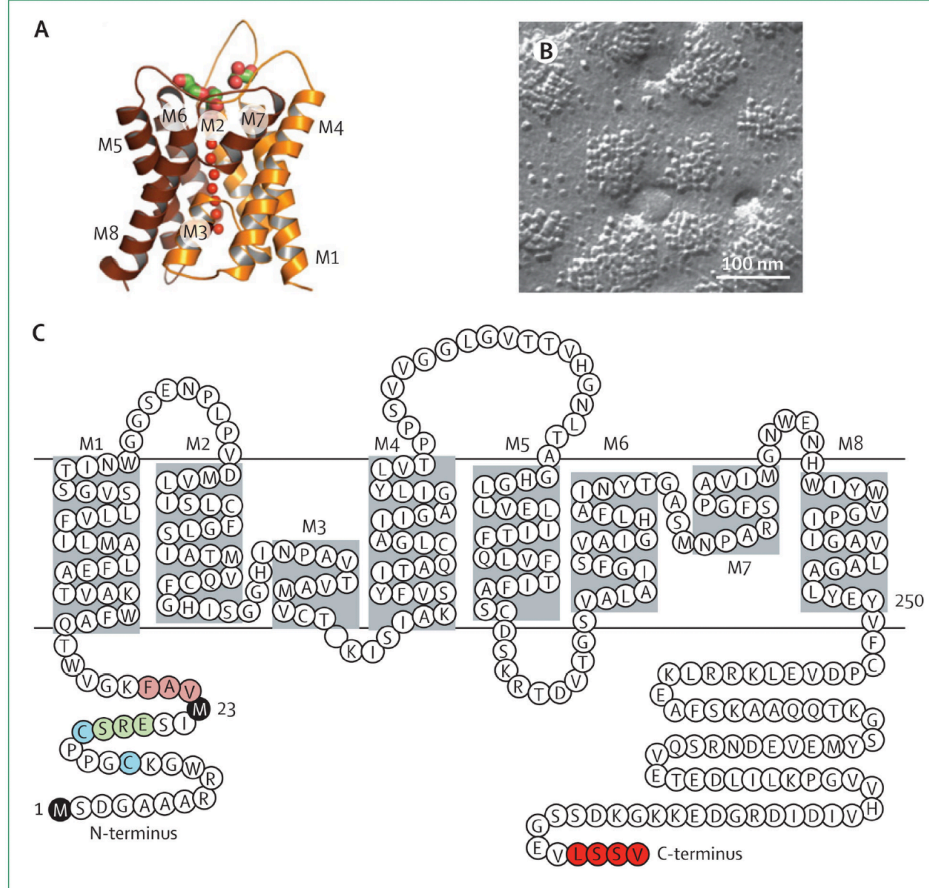
NMOSH ataklarının öncesinde akut enfeksiyonların (özellikle solunum yolu enfeksiyonları) görüldüğü vaka düzeyinde bildirilse de NMOSH gelişimiyle ya da relapslarıyla ilişkilendirilen spesifik bir enfeksiyon bulunmamaktadır (37, 50). Nadiren aşı sonrası başlayan NMOSH olguları bildirilmiştir (51).

2.1.4. Patogenezi

AQP4 antijenine bağlanan antikorların keşfi NMOSH tanısında bir dönüm noktası olmuş, hastalığın demiyelinizan bir hastalık yerine primer olarak otoimmün bir astrositopati olarak sınıflandırılmasını sağlamıştır (24). AQP4 antikorları olguların ortalama %80'inde saptanabilmektedir (52).

AQP4 osmotik gradyana göre çift yönlü çalışan, 6 transmembran domain ve 3 ekstraselüler ilmek yapısı içeren bir su kanalıdır ve en yoğun olarak perivasküler ve peripial astrosit son uçlarında bulunur (53). Ependimal hücre membranlarında da AQP4 eksprese edilir ancak oligodentrositler ve nöronlarda bulunmaz (54). Retinada destek hücresi olarak bilinen Müller hücrelerinde de eksprese edilmektedir (55). AQP4 proteinin tam uzunlukta M1-AQP4 ve farklı bir başlangıç kodonu nedeniyle N terminalinde 23 amino asit daha kısa olan ve M23 AQP4 olarak adlandırılan iki izoformu vardır (56). AQP4 antikorumun bağlanması bu izoformlarda farklı yanıtlar meydana getirir. M1-AQP4 kompleksi internalize olurken, M23-AQP4 kompleksi internalizasyona dirençlidir ve membranda ortogonal olarak düzenlenmiş partiküller

halinde (“orthogonal arrays of particles”- OAPs) agreve olur (57). Bu OAP yapılarının NMO-IgG’nin AQP4 epitoplarının tanınmasında kritik olduğu düşünülmektedir (58, 59). Aynı zamanda kompleman komponenti C1q bağlanması için de OAP yapılarının gerekliliği gösterilmiştir (60) (Şekil 2.1).



Şekil 2-1. AQP antijeninin yapısı ve özellikleri. A) İnsan AQP4 antijeninin yüksek çözünürlüklü kristal yapısı. B) M3-AQP4 ile transfekte edilmiş Chinese hamstring ovary (CHO) hücre hattında ortogonal olarak düzenlenmiş partikül (OAP) yapılarının donma-kırık elektron mikroskobu görüntüsü. C) AQP4 antijeninin protein sekansı. Met-1 ve Met-23 translasyon inhibisyon bölgeleri siyah ile, OAP oluşumu ile ilişkili rezidüler pembe ile, M1-AQP4 izoformunda OAP oluşumuna engel olan rezidüler yeşil ile gösterilmiştir (Papadopoulos ve ark.’dan alınmıştır (12)).

AQP4 antijeninin fizyolojik rolü ile ilgili bilgiler büyük oranda AQP4 knock-out fare modeline dayanmaktadır. AQP4 proteini eksprese etmeyen bu farelerde bazalde görme, işitme ve koklama duyularında ile ilgili bozulma olduğu saptanmıştır (55, 61, 62). İskemik inme ya da su intoksikasyonu gibi stres durumları sonrasında ise sonrası

bu farelerin beyinlerinde sitotoksik ödemde azalma (63), beyin tümörlerinde vazojenik ödemde artış gözlenmiştir (64). Bu fenotip AQP4 eksikliği ile su taşınmasında çift yönlü bozukluk olması sonucu sitotoksik ödemde beyne su girişinin azalması ve vazojenik ödemde fazla interstisyel suyun uzaklaştırılmasında bozulma ile açıklanabilir.

Nöropatolojik ve klinik çalışmalar AQP4 antikorunun hastalık patogeneğinde primer rol oynadığını göstermiştir. AQP4 antikor seviyesinin hastalık ağırlığı ile korelasyon gösterdiği saptanmış, (65, 66) hatta AQP4 antikor varlığının relapsları öngörmede yararlı olabileceği öne sürülmüştür (67). SSS’de NMOSH lezyonları AQP4 ekspresyonu ve kan-beyin bariyerinin (KBB) yoğun olduğu yerlerde olma eğilimindedir (68). Bu bölgelerde özellikle AQP4 ve kompleman aktivasyonu regülatörlerinin (CD46, CD55 ve CD 59) ko-ekspresyonunun daha az olması, bu alanları patofizyolojiye daha duyarlı hale getiriyor olabilir (69). AQP4 ilişkili antikorların hastalık patogeneğinde rolü olduğunu gösteren en önemli kanıtlardan biri de plazma değişimi ya da B hücresi depleksyonu gibi humoral immüniteye yönelik tedavi stratejilerinin başarılarıdır (70, 71). Hayvan çalışmalarında da NMOSH hastalarından elde edilen AQP4 antikoru ve komplemanlarının pasif transferi ile AQP4 kaybı, astrosit ölümü ve NMOSH benzeri patolojik bulgular elde edilebilmiştir (72, 73).

AQP4 antikorları plazmada beyin omurilik sıvısına (BOS) göre 500 kat daha yoğun olarak bulunmaktadır (74) ve bu antikorların ağırlıklı olarak periferde üretildiği, inflamatuvar bir zemin ve bütünlüğü bozulmuş KBB varlığında SSS’ye geçerek lezyonları indüklediği düşünülmektedir (12, 75). Hastalık başlangıcından uzun yıllar önce bile serumda AQP4 antikorlarının saptanabiliyor olması bu hipotezi destekler niteliktedir (76). Ancak AQP4 antikorlarının inflamatuvar bir ortam olmaksızın sirkumventriküler organlar aracılığı ile SSS’ye girerek KBB’de direkt kendisinin hasar oluşturabileceği de öne sürülmektedir (77, 78). NMO hastalarının serum ve BOS’larında yüksek seviyede bulunan interlökin-6 (IL-6) plazmablastlardan AQP4 antikoru sentezini artırmaktadır (79).

AQP4 antikorunun patojenitesi ile ilgili çalışmalar ilk olarak kompleman bağımlı astrosit sitotoksitesinin gerçekleştiğini, ardından granülosit infiltrasyonu, oligodentrosit kaybı ve nihayetinde nöron ölümünün izlendiğini göstermiştir (80). AQP4-IgG, IgG1 tipi bir immunoglobulindir. Plazma membran depozitlerinin oluşmasına ve kompleman membran atak kompleksinin oluşumu sonucu sitotoksitesiteye

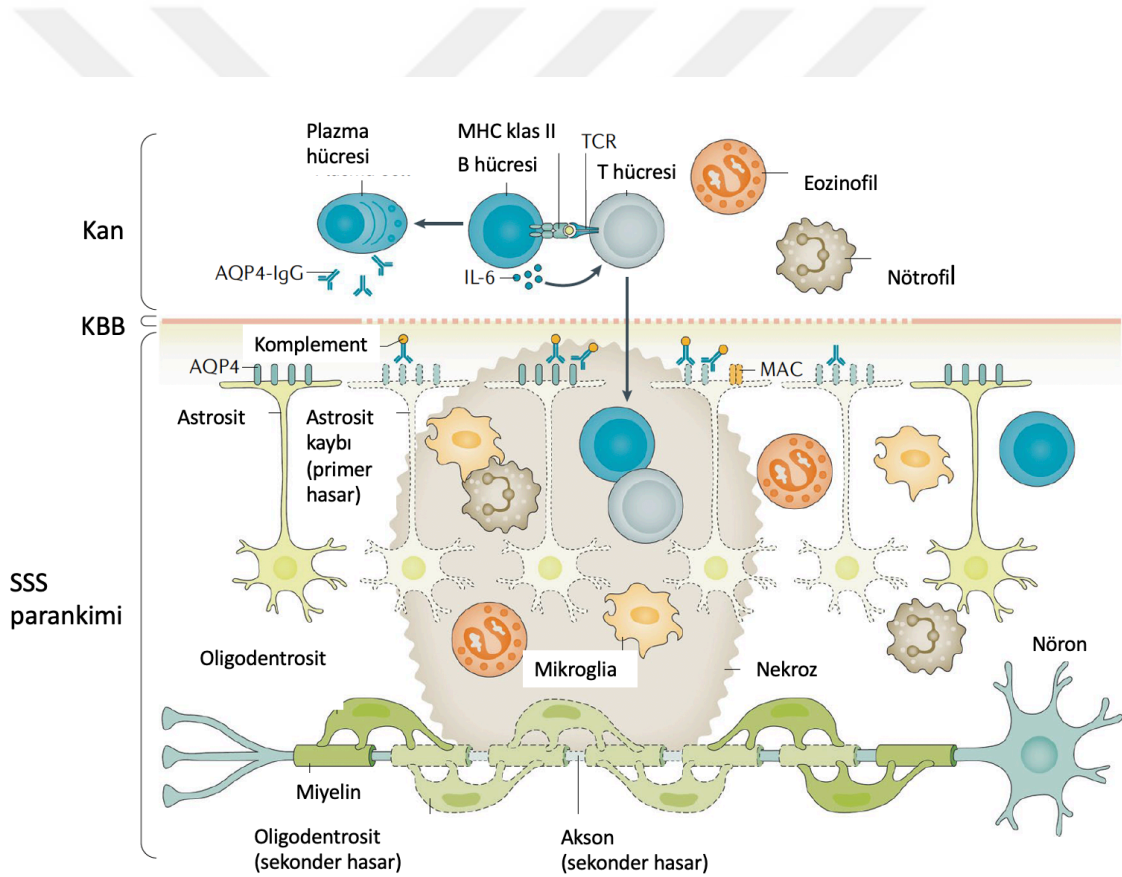
neden olur (81). AQP4 antikorlarının ayrıca doğal öldürücü hücrelerin varlığında antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksositeye neden olduğu da gösterilmiştir (82).

Histopatolojik olarak bakıldığında NMOSH olgularında SSS’de özellikle damar çevresinde IgM, IgG ve kompleman depozitleri ve granülosit, B hücresi, T hücresi ve makrofaj/mikroglia infiltrasyonu içeren lezyonlar izlenmektedir (83). Bu lezyonların önemli bir özelliği astrositlerde AQP4 kaybının izlenmesidir. Ancak AQP4 kaybına rağmen lezyonların bir kısmında hala GFAP ve S-100b gibi astrosit belirteçlerinin tespit edilebiliyor olması, AQP4 kaybının astrosit ölümünden önce gerçekleştiğini düşündürmektedir (83, 84). AQP4 antikoru pozitif olgularda akut atak döneminde astrosit hasarını işaret eden BOS GFAP seviyelerinde artış olduğu da bildirilmiştir (85). Ağır olgularda lezyonlarda nekroz ve kavitasyon izlenebilir (80).

Nötrofil ve eozinofillerin NMO lezyonlarında yoğun miktarda bulunduğu ve hastalık patogenezinde anahtar rol oynadığı birçok insan çalışmasında gösterilmiştir. Nötrofillerin nötrofil elastaz salgılayarak hastalığı agreve ettiği, eozinofillerin ise antikor ya da kompleman aracılı hücrel sitotoksositeyi artırarak hastalık patogenezinde katkıda bulunduğu düşünülmektedir (4, 80, 86, 87). Yine lezyonlarda yoğun miktarda bulunan makrofajların astrosit sitotoksitesi ve granülosit infiltrasyonu sonucu oluşan debrisin temizlenmesinde görevli olduğu düşünülmektedir (88). Makrofajların lezyon bölgesine girmesini sağlayan $\alpha 4$ -integrin molekülüne karşı geliştirilmiş bir moloklonal antikor olan natalizumab tedavisinin NMOSH olgularında hastalık seyrini kötüleştiriyor olması, makrofajların hastalık patogenezinde faydalı rolleri olabileceğine işaret etmektedir (89). NMOSH patogenezinde önemli rol oynayan diğer bir hücre grubu ise B hücreleri ve plazma hücreleridir. NMOSH olgularının BOS incelemelerinde artmış B hücresi aktive edici faktör (“B cell activating factor” (BAFF)), proliferasyon indükleyici ligand (APRIL), bir B lenfosit kemoatraktanı olan CXCL13 düzeylerinin saptanması hastalık patogenezinde B hücrelerinin kritik rol oynadığını göstermektedir (90, 91). T hücrelerinin de periferde immun toleransın bozulmasında rolü olmasının yanı sıra AQP4 antikor üretimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. AQP4 antijenik uyarımın immun yanıtı T-helper-17 (Th17) lehine çevirdiği ve IL-21, IL-6 gibi Th-17 ilişkili sitokinlerin sentezini artırdığı gösterilmiştir (92). IL-17 KBB hasarına neden olarak AQP4 antikorlarının SSS’ye ulaşımını kolaylaştırıyor olabilir. Bunun yanı sıra Th17 hücrelerinin B hücrelerinde antikor üretimini artırma ve granülositler aracılığıyla

SSS’de inflamasyonu tetikleme özellikleri de hastalık patogenezinde katkıda bulunuyor olabilir (93).

Demiyelinizasyon NMO patogenezinde primer bir olay olmayıp astrosit kaybına sekonder olarak gelişmektedir (94). Bu etkinin “gap junction” aracılığıyla astrositlerdeki hasar sinyallerinin oligodentrositlere aktarılmasından kaynaklanabileceği (95) ya da reaktif astrositlerin neden olduğu hasar nedeniyle olabileceği hipotezleri öne sürülmüştür (12). AQP4 antikorumun patojen etkisi sonucu bozulan su dengesinin ekstraselüler glutamat seviyesini de artırarak nöronlar için sitotoksik bir ortam oluşturuyor olabilir (96). AQP4 antikoru pozitif olgularda patogeneze sorumlu olduğu düşünülen mekanizmalar Şekil 2.2’de şematize edilmiştir.



Şekil 2-2 AQP4 antikoru pozitif bireylerde hastalık mekanizmaları. AQP4 ile ilişkili NMOSH olgularında lezyonlar ağırlıklı olarak astrosit son uçlarında IgG ve kompleman birikimi ile karakterizedir. Astrosit kaybına sıklıkla sekonder oligodentrosit ve nöronal kayıp eşlik eder. Kompleman depozitlerinde genellikle membran atak kompleksi oluşumunu işaret eden C9neo birikimi izlenir. Bunun yanı sıra makrofajlar/mikroglia, nötrofiller, eozinofiller, B

hücreleri ve T hücreleri lezyonların içinde bulunur. Şiddetli inflamasyon nekrotik, kaviter lezyonlara neden olabilir. KBB: Kan beyin bariyeri; SSS: Santral sinir sistemi; MHC: majör doku uygunluk kompleksi; TCR, T hücre reseptörü; MAC: Membran atak kompleksi (Jarius ve ark.'dan alınmıştır (36)).

MOG antikoru pozitif olan olgular klinik olarak tipik NMSOH fenotipi gösterse de histopatolojik olarak incelendiğinde astrositopati değil inflamatuvar demiyelinizan bir patern göstermektedir (97). Hastaların BOS incelemesinde artmış “miyelin basic protein” seviyelerine karşı GFAP düzeylerinde yükselme olmaması, astrosit kaybı olmaksızın direkt demiyelinizasyon lehine bir bulgu olarak değerlendirilmiştir (98). In vivo çalışmalarda MOG antikorunun belirgin bir inflamasyon ve nöron ölümüne yol açmadığı gösterilmiştir (99).

Hastalığın patogenezinde AQP4 antikorunun rolünü açıklayan bu çalışmalar hala vakaların yaklaşık %20'sini oluşturan seronegatif NMOSH olgularının immünobiyolojik mekanizması konusunda fikir vermemektedir. Seronegatif hastalarda patofizyoloji ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ayrıca bu çalışmalarda hastaların patofizyolojik olarak homojenitesi ve bulguların tüm seronegatif olgulara uygulanabilirliği şüphelidir. Seronegatif hastaların serumlarından elde edilen IgG'lerin, seropozitiflerden farklı olarak astrosit kaybı ya da oligodentrosit hasarına yol açmadığı, deneysel çalışmalarda NMO benzeri patolojiyi indüklemeyeği gösterilmiştir (94, 100). Buna karşın seronegatif hastaların serumlarının astrosit hücreleri üzerinde kontrol grubu olan MS'ten daha fazla ancak AQP4 antikoru pozitif NMOSH'den daha düşük düzeyde sitotoksositeye neden olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (13). Benzer şekilde hem seronegatif hem AQP4 antikoru pozitif hastalarda AQP4 antijenine reaktif T hücrelerinin saptanması, tespit edilebilir bir hümmoral yanıt olmasa da seronegatif grupta da AQP4 antijenine karşı hüccresel bir yanıtın olduğunu göstermektedir (93). Yüksek doz metilprednizolon ve plazmaferez tedavisine dirençli bir seronegatif NMO olgusunun lenfosit aferez tedavisinden belirgin fayda görmesi de seronegatif olgularda dolaşan sitotoksik T hücrelerinin patogeneizde rolü olabileceğini düşündürmüştür (101).

2.1.5. Klinik Özellikler ve Tanı

2.1.5.1. Klinik Bulgular

Klasik tanımlamada NMO monofazik ve eş zamanlı bilateral ON ve akut miyelin kliniği ile tanımlansa da takip eden süreçte hastalığın relapslarla seyredebileceği hatta hastalığın çoğunlukla unilateral ON, daha nadir olarak izole miyelit olarak başlayabileceği anlaşılmıştır (26, 102). ON, optik sinirin inflamasyonudur ve vizyon kaybına oküler hareketlerle ağrı eşlik eder. Eş zamanlı olarak gelişen bilateral ON, optik kiazma tutulumu, altitudinal görme kaybı gelişmesi, ağır vizyon kaybı (20/200 ya da daha düşük) NMOSH için tipiktir. Kontralateral etkilenmemiş gözde günler ya da haftalar sonra ON gelişebileceğinden, unilateral ON ile başvuran olgularda tekrarlayan oftalmolojik muayene önerilmektedir (103).

NMOSH'de izlenen tipik spinal kord tutulumu ise genellikle 3 ya da daha fazla segmenti tutan, paroksizmal tonik spazmların eşlik ettiği inflamatuvar bir miyelittir (ULTM). Klinik spektrumu hafif duysal yakınmalardan parapleji ya da tetraplejiye, mesane-bağırsak disfonksiyonuna kadar değişebilir (26). Santral kord tutulumu ön plandadır, olguların %70'inden fazlasında santral gri maddeye uzanan lezyon görülür. Kronik dönemde spinal kord atrofisi izlenebilir.

Area postrema sendromu inatçı hıçkırık (>48 sa) ya da bulantı kusma ile karakterizedir. T2 ağırlıklı sekanslarda dördüncü ventrikül kaudal ucunda medulla oblongatada genelde bilateral ve üst servikal segmentlere uzanım gösteren lezyon izlenir. Akut beyin sapı sendromu, semptomatik narkolepsi ve akut diensefalik klinik sendrom, hastalığın daha nadir formlarıdır. Hastalar ensefalopati, psikiyatrik semptomlar, narkolepsi, hemiparezi, ataksi, baş ağrısı gibi semptomlarla başvurabilir (37). Ağrı hem AQP4 pozitif hem negatif olgularda NMOSH kliniğinde sık görülen bir bulgudur (104).

2.1.5.2. Klinik Seyir ve Prognoz

Tedavisiz bırakıldığında AQP4-IgG pozitif olguların çoğunda ortalama 9 aylık bir interval ardından relaps gelişir (37). AQP4 antikoru pozitif grupta ilk ON atağını takiben miyelit atağı için geçen süre ortalama 14 ay, ilk miyelit atağını takip eden ON atağı için ise ortalama süre 3 aydır (105). Hastalığın yıllık atak oranı (miyelit atakları için yılda 0.53, ON için 0.38) interferon beta ya da glatiramer asetat tedavisi altındaki MS olgularına benzerlik gösterse de genişletilmiş özürllülük durum ölçeğinin

("Expanded Disability Status Scale - EDSS) 6-6,5 düzeyine gelmesi için gerekli süre MS'e kıyasla oldukça düşüktür (106, 107). Bu farklılık NMOSH'de spinal kordun tutulumunun daha belirgin olması ve patolojik olarak ağır nekroz gelişebilmesi ile ilişkili olabilir (108).

Akut atak sonrası semptomlarda tamamen gerileme görülebileceği gibi, immunsupresif tedavilere rağmen hastalık ağır ataklarla seyredebilir ve kısa sürede özürüllülüğe neden olabilir. Uygun ve erken tedavi edilmeyen tek bir atak bile sekele neden olabilir (109). ON ataklarında %66, transvers miyelit ataklarında ise %80'den fazla oranda sekele ile iyileşme olabileceği bildirilmiştir (37). Miyelit ataklarının >2/3'si motor semptomlar ile seyreder ve bunların yarısından fazlası bir ya da daha fazla ekstremitelerde modifiye rankin skorlamasında 2 veya daha düşük skorlara neden olabilir. Miyelit öyküsü olan olguların yaklaşık %40'ında takipte EDSS'nin 6 ve üzerine çıktığı gözlenmiştir. (53). Yine de sekele gelişiminin büyük oranda tekrarlayan ataklarla ilişkili olması erken tanı ve etkin tedavi ile uzun dönem özürüllülüğün önüne geçilebileceğini göstermektedir (110). Takip süresi 57,5 ay olan bir kohortta mortalite oranı %6 olarak saptanmış ve ölümlerin büyük kısmının solunumla ilgili beyin sapı merkezlerinin tutulumundan kaynaklı olduğu bildirilmiştir (37).

2.1.5.3. Tanı Kriterleri

Görüldüğü gibi klinik bulguların hiçbirisi NMOSH spesifik değildir ve klinikte bütünüleyici bir yaklaşımla değerlendirme gerektirmektedir. Bu amaçla günümüzde halen 2015 yılında uluslararası NMO tanı paneli IPND tarafından geliştirilen tanı kriterleri kullanılmaktadır. Bu tanı kriterlerinde NMOSH ile ilişkili 6 temel klinik tablo tanımlanmıştır. Bu klinik tablolar şu şekildedir (3):

1. Optik nörit
2. Akut miyelit
3. Area postrema sendromu: Başka türlü açıklanamayan hıçkırık veya mide bulantısı ve kusma epizodu
4. Akut beyin sapı sendromu
5. Semptomatik narkolepsi veya NMOSH için tipik diensefalik manyetik rezonans görüntüleme (MRG) lezyonları olan akut diensefalik klinik sendrom

6. NMOSH için tipik beyin lezyonları olan semptomatik serebral sendrom

Mevcut en iyi test yöntemi kullanılarak AQP4-IgG pozitifliğinin gösterildiği durumda, en az 1 temel klinik tablonun varlığı ve alternatif tanıların dışlanması tanı için yeterlidir. AQP4-IgG tarama yöntemi olarak hücre bazlı testler önerilmektedir. AQP4antikoru negatif olan ya da serolojik durumu bilinmeyen olgularda ise tanı için en az 2 temel klinik tablonun varlığı gerekmektedir (3) (Tablo 2-1).

Tablo 2-1. AQP4 antikoru negatif NMOSH veya AQP4 antikor durumu bilinmeyen NMOSH için tanı kriterleri

1. Bir veya daha fazla klinik atak sonucu ortaya çıkan en az 2 temel klinik özellik ve aşağıdaki gereksinimlerin tümünün karşılanması:
a. Temel klinik özelliklerden en az bir tanesinin optik nörit, akut ULTM veya area postrema sendromu olması
b. Mekansal yayılım (2 veya daha fazla farklı temel klinik özellik)
c. Ek MRG gerekliliklerinin karşılanması*
2. Mevcut en iyi saptama yöntemi kullanılarak AQP4 antikoru için negatif test veya AQP-4 antikor durumunun bilinmemesi
3. Alternatif tanıların dışlanması

* AQP4 antikoru negatif NMOSH ve serolojik durumu bilinmeyen NMOSH için ek MRG gereklilikleri

1. Akut optik nörit: a)Normal bulgular veya sadece non-spesifik ak madde lezyonları olan MRG ya da b) T2-hiperintens lezyon gösteren optik sinir MRG veya T1-ağırlıklı sekanslarda gadolinyum artışı gösteren ve optik sinirin yarısını aşan veya optik kiazmayı içeren lezyonu gösteren MRG.
2. Akut miyelit: Üç ardışık segmenti aşan ilişkili intramedüller MRG lezyonu (ULTM) veya akut miyelit ile uyumlu öyküsü olan hastalarda 3 veya daha fazla ardışık segmentte fokal omurilik atrofi.
3. Area postrema sendromu: ilişkili dorsal medulla/area postrema lezyonları.
4. Akut beyin sapı sendromu: ilişkili periependimal beyin sapı lezyonları.

AQP4; Aquaporine4; MRG: Manyetik rezonans görüntüleme; UTM: Uzun longitudinal transvers miyelit

2.1.5.4. Nörogörüntüleme Bulguları

Görüntüleme bulguları NMOSH ayırıcı tanısında önemli bilgiler vermektedir. NMOSH'de MS'ten farklı olarak spinal kord tutulumu genelde üçten fazla segmentte izlenir ve santral gri maddeyi de içerir. Kordda şişkinlik, T1 sekansında santral hipointensite, sevikal lezyonun beyin sapına uzaması NMOSH'de izlenebilen görüntüleme bulgularıdır (111, 112). Ancak klinik bulguların erken döneminde ya da remisyon döneminde çekilen MRG'lerde kısa segment tutulumu izlenebileceği akılda tutulmalıdır (37). Yakın zamanda tanımlanmış olan aksiyel kesitlerde T2 ağırlıklı sekanslarda hiperintens izlenen parlak noktasal lezyonların AQP4 antikoru pozitif NMOSH tanısını kuvvetle desteklediği gösterilmiştir (113). Optik sinir tutulumunda ise lateral tutulum, sinirin posteriorunda belirgin tutulum (özellikle optik kiazma) ve optik sinirin uzunlamasına tutulumu (yarısından fazlası) NMOSH düşündürülen bulgulardır (114, 115).

2.1.5.5. Serolojik Testler

Tanı kriterlerinden de anlaşılacağı gibi AQP4 antikorunun gösterilmesi NMOSH tanısı için oldukça önemli bir basamaktır. Seronegatif olguların tanı alabilmesi

için gerekli klinik koşullar AQP4 antikoru pozitif olgulara göre daha zorlayıcıdır. Ancak bu olguların bir kısmında test negatifliğinin yöntemdeki teknik sınırlamalardan kaynaklanabileceği, antikor titrelerinin test duyarlılık sınırlarının altında olabileceği unutulmamalıdır.

NMO spesifik antikorlar ilk olarak fare beyini serebellum kesitlerinde indirekt immunofloresan yöntemi ile gösterilmişti. Ancak kemirgenlerde ve insanlarda antijenin ekstraselüler domainlerindeki aminoasit diziliminin hafifçe farklılık gösteriyor olması antikor tespitini zorlaştırmaktaydı (116). NMO-IgG ile ilgili ilk testlerin özgüllük değeri %85-99 arasında değişmekte ancak duyarlılık değerleri istenen düzeyde değildi (%43-73) (117). NMO-IgG antikorunun hedef antijenin AQP4 proteini olduğunun anlaşılmasının ardından, farklı araştırma gruplarınca AQP4 antikorlarını tespit etmeye yönelik radyoimmunopresipitasyon, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), floroimmunopresipitasyon, Western blot gibi teknikler denendi (118-120).

Günümüzde rekombinant insan AQP4 antijeni eksprese eden hücre hatları ile gerçekleştirilen canlı hücre temelli deneyler ("cell based assay"- CBA), en yüksek duyarlılık ve özgüllük değeri ile en güvenilir tanı metodu olarak kabul edilmektedir (121). Bu tekniğin ana prensibi hasta serumunda bulunan AQP4-IgG antikorlarının hücre üzerinde eksprese olan hedef antijenine bağlanması ve bu bağlanmanın immunofloresan ya da akım sitometri yöntemleri ile gösterilmesine dayanmaktadır. Rekombinant protein olarak M23 AQP4 izoformunun kullanılmasının test duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir. Bu proteinlerin floresan işaretleyiciler ile uygulandığında muhtemelen OAP oluşturma yetenekleri azaldığından test duyarlılığının düştüğü, testle ilgili en yüksek duyarlılık değerine M23 AQP4 ile "Enhanced Green Fluorescent Protein" (EGFP) ko-transfeksiyonu ile ulaşıldığı gösterilmiştir. Ayrıca fiksasyon ile muhtemelen hücre membranındaki proteinlerde konformasyonel değişikliklere uğradığından antikor – antijen etkileşiminde azalma olmakta ve test duyarlılığı düşmektedir. Bu nedenle serumla inkübasyonun fiksasyon öncesi yapılması önerilmiştir. Bu şekilde optimize edildiğinde CBA ile AQP4 antikor test duyarlılığı %74,4, özgüllüğü ise %100 değerlerine ulaşmaktadır (10). Çok merkezli bir çalışma ile 21 farklı şekilde dizayn edilen AQP4 antikor testi değerlendirilmiş ve benzer şekilde canlı hücrelerde M23 AQP4 izoformunun transfeksiyonu ile yapılan CBA deneyinin en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu doğrulamıştır. Ancak canlı hücrelerle

çalışmanın teknik zorlukları nedeniyle bu test yalnızca sınırlı merkezlerde yapılabilmektedir. Bu nedenle ticari CBA kitleri dünya çapında daha fazla kullanım alanı bulmaktadır. Akım sitometrisi ile yapılan CBA deneylerinde muhtemelen teknik detaylara bağlı olarak merkezler arasında duyarlılık ve özgüllük değerlerinde varyasyon izlenmiştir (duyarlılık %69,7–100%, özgüllük %90,6–100 arasında değişmektedir) (122).

AQP4-IgG antikoru negatif olan olguların bir kısmında daha sonra pozitifleşme olabilir. Bu teknik nedenlerden kaynaklanabileceği gibi antikor düzeyinin hastalık relapsında artması ve immunsupresif tedavi altında düşmesi ile de ilişkili olabilir (123). Bu nedenle B hücrelerine yönelik tedavi planlanan hastalarda tedavi öncesi ya da seronegatif hastalarda atak sırasında yeniden test yapılması önerilmektedir (11).

2.1.5.6. Tanıyı Destekleyici Diğer Tetkikler

BOS incelemesinde oligoklonal bant (OKB) pozitifliğinin saptanmaması NMOSH tanısı için destekleyici bulgu olarak kabul edilmekle birlikte atak dönemlerinde geçici pozitiflikler izlenebilir. İlk lomber ponksiyonda OKB pozitifliği saptanan olguların yarısından fazlasında takipte OKB negatifleşmesi izlenir. BOS lenfosit sayısının $>50/\mu\text{l}$ olması, nötrofil ya da eozinofil izlenmesi, NMOSH ile MS ayırıcı tanısında yol gösterici bulgular olarak kabul edilmektedir (124).

Retina iç tabakasının yüksek çözünürlüklü görüntülenmesi prensibine dayalı bir yöntem olan optik koherens tomografi incelemesi de tanıya yardımcı olarak bazı merkezlerde kullanılan bir yöntemdir. Aksonal hasarın bir göstergesi olarak peripapiller retinal sinir tabakasında incelme ve atrofi izlenebilir ve bu bulgu NMOSH tanısını destekleyici bir bulgu olarak kabul edilmektedir (125).

NMO ilk atak sonrası tanı süresi miyelit ile başlayan olgularda ortalama 16 ay, ON ile başlayan olgularda ise ortalama 55 aydır. Seronegatif olgularda tanıya kadar geçen süre ortalama 11 ay olup, bunda eş zamanlı ON ve miyelit ataklarının daha sık görülmesinin rolü olduğu düşünülmektedir (37). NMOSH olgularının yaklaşık %42,5'sinin yanlışlıkla MS tanısı aldığı ve bu olguların da yaklaşık %52,6'sının NMOSH tablosunu kötüleştiren interferon beta tedavisi aldığı bilinmektedir (126).

2.1.6. Ayırıcı Tanı

Klinik ve laboratuvar olarak NMOSH tanısını dışlayıcı spesifik bir semptom bulunmamakla birlikte nörolojik kötüleşmenin aylar ya da yıllara yayılan bir süreçte gelişmesi NMOSH'da sıklıkla beklenen bir tablo değildir (%1-2) ve diğer tanıların göz önünde bulundurulması gerekmektedir (127). NMOSH tanısı AQP4-IgG serolojik durumundan bağımsız şekilde tanı kriterleri tam olarak dolduruluyorsa ve alternatif klinik tanımlar dışlanabiliyorsa koyulmalıdır. 2006 tanı kriterlerinde görüntüleme bulgularının normal olması ya da yalnızca non-spesifik ak madde lezyonlarının olması tanı için gerekli iken, NMOSH olgularında %60'a varan oranda kranyal MRG'de ak madde tutulumunun gözlemlendiği, hatta bunların %16'ya varan oranda Barkhoff kriterlerini doldurabildiği saptanmıştır (112, 128, 129). Bu sonuçlar MS ile uyumlu nörogörüntüleme varlığında NMOSH tanısının dışlanamayacağını, ancak tanı için ek kanıtlara ihtiyaç olduğunu göstermektedir (128).

NMOSH ayırıcı tanısında en önemli hastalık gruplarından bir tanesi MOG ilişkili ensefalomyelit (MOGEM) tanısıdır. NMOSH tanı kriterlerini dolduran ancak AQP4 antikoru saptanmayan her hasta MOGEM tanısı için değerlendirilmelidir. MOGEM tanısı için aşağıdaki kriterlerin hepsinin sağlanması gerekmektedir (130):

1. Monofazik ya da rekürren ON, miyelit, beyinsapı ensefaliti ya da ensefalit ya da bu sendromların kombinasyonu
2. MRG bulgularının, ya da yalnızca ON olan olgularda elektrofizyolojik incelemelerin inflamatuvar SSS hastalığı ile uyumlu olması
3. Tam boyutlu MOG antijeni hedef antijen olarak seçilen hücre temelli testler ile MOG-IgG antikorlarının saptanması.

MOGEM'in patofizyolojik, klinik ve prognostik olarak ayrı bir hastalık olarak tanımlanmasının ardından nöromiyelitis optika çalışma grubu MOGEM tanı kriterlerini dolduran AQP4 antikoru negatif NMOSH hastalarının artık NMOSH tanısı altında değerlendirilmemesini önermektedir. Seronegatif NMOSH tanısı için hem AQP4 hem MOG antikorlarının fikse ya da canlı hücreler ile yapılan CBA ile negatif olduğunun gösterilmesi gerekmektedir. AQP4-IgG ve MOG-IgG çift pozitifliği oldukça nadir izlenmekte ve özel merkezlerde doğrulanmalıdır (103).

Hem AQP4 hem MOG antikorlarının saptanamadığı seronegatif (çift-negatif) NMOSH olguları için ise ayırıcı tanıda en çok dikkat edilmesi gereken hastalık MS'tir. MS tedavisinde kullanılan interferon beta, natalizumab ve fingolimod gibi bazı hastalık modifiye edici tedavilerin NMO olgularında kullanılmasının hastalığı kötüleştirebildiğinin anlaşılması, hem bu iki hastalığın farklılığına işaret etmiş, hem de erken ve doğru tanının önemini ortaya koymuştur (22).

Daha nadiren otoimmün, paraneoplastik, enfeksiyöz, metabolik ve vasküler hastalıkların da NMOSH kliniğini taklit edebileceği, ancak aynı zamanda AQP4 antikor pozitif NMOSH olgularına %25-40'a varan oranlarda otoimmün hipotiroidizm, sistemik lupus eritematozus, sjogren sendromu, miyastenia gravis gibi otoimmün hastalıklar eşlik edebileceği de unutulmamalıdır (131, 132). Seronegatif olgularda özellikle ULTM ile seyredabilen nörosarkoidoz ayırıcı tanıda akılda tutulmalıdır (133).

2.1.7. Tedavi

NMOSH akut atak tedavisinde yüksek doz intravenöz metilprednizolon (IVMP) ve dirençli olgularda plazmaferez ya da intravenöz immunglobulin (IVIG) tedavisi uygulanmaktadır. Özellikle AQP4 antikor pozitif olgularda uzun dönem immunsupresif tedavi özüllülüğü azaltmak için oldukça önemlidir. İdame tedavisinde ise prednizon, azatiyoprin, rituksimab, mitoksantron, siklofosamid ve mikofenolat gibi immunsupresif tedaviler kullanılmaktadır (134). Bir meta-analiz çalışmasında 25 bağımsız çalışma incelenmiş ve CD20 eksprese eden B hücrelerini hedef alan bir ilaç olan rituksimab ile yıllık relaps sayısında ortalama 0,79, EDSS skorunda ortalama 0,64 azalma olduğu gösterilmiştir (135). Ancak hastaların %17'sinde rituksimab tedavisine rağmen relapslar devam etmektedir (136). Bunun sebebinin CD20 eksprese etmeyen NMO-IgG üreten plazmablastların elimine edilememesi olduğu düşünülmektedir (137).

Hastalığın immünolojik mekanizmasının daha iyi anlaşılması ile hastalık modifiye edici tedaviler gündeme gelmiştir. Bir kompleman C5a proteinini nötralize eden bir monoklonal antikor olan eculizumab ile yapılan çalışmalar relaps sıklığı ve EDSS skorlarında azalma sağlamıştır (138). IL-6 reseptörüne karşı geliştirilen bir monoklonal antikor olan tosilizumab ile AQP4 antikor pozitif olgularda plazmablastların hayatta kalış süresinde azalma olduğu, antikor üretimini azaltarak hastalık bulgularında iyileşme sağladığı gösterilmiştir (139). IL-6 reseptörlerini bloke eden bir diğer monoklonal antikor olan satralizumab ve B hücresi antijeni olan CD19'a

bağlanan bir monoklonal antikor olan inebilizumab tedavilerinin de atak sıklığı ve EDSS skorlarını düşürdüğü gösterilmiştir (140). Randomize kontrollü çalışmaların sonuçları ümit verici olsa da bu yeni tedavi seçeneklerinin yan etki profili, uygulama rejimleri ve maliyeti açısından sınırlayıcı özellikleri vardır. Otolog hematopoetik kök hücre nakli da sınırlı sayıda olguda denenmiş ve klinik ve radyolojik olarak iyileşme sağladığı gösterilmiştir (141). Bunların yanı sıra vasküler endotelial growth faktöre (VEGF) karşı geliştirilen nötralizan monoklonal antikorlar ile KBB bütünlüğünün yeniden sağlanması, ya da antihistaminik setirizin ile eozinofil degranülasyonunu azaltarak relapsların azaltılması gibi mekanizmaya yönelik tedavi seçenekleri de çalışılmaktadır (142).

Bu tedaviler günümüzde AQP4 antikoru pozitif olgularda etkinliği gösterilmiştir ve seronegatif NMOS olguları için halen tedavi seçenekleri sınırlıdır. Seronegatif hastaların AQP4 antikoru pozitif olgulara göre daha düşük hastalık aktivitesine sahip olması nedeniyle bu grupta immunsupresif tedavi açısından daha az agresif bir yaklaşım benimsenmiştir (9).

2.2. Serolojik Durum ile Klinik ve Prognozun İlişkisi

Seronegatif NMO olguları demografik ve klinik bulgular açısından AQP4-IgG pozitif olgulara göre farklılık göstermektedir. AQP4-IgG pozitif olgularda daha belirgin kadın dominansı, eşlik eden otoimmün hastalıkların daha sık görülmesi, daha ağır atakların izlenmesi, spinal kord lezyon yükünün daha fazla olması söz konusudur. Eş zamanlı ON ve miyelit ataklarının görülme olasılığı ve hastalık başlangıcında bilateral ON görülme olasılığı, monofazik seyir olasılığı seronegatif olgularda daha yüksektir. Miyelit ataklarında seronegatif olgularda duysal semptomlar daha sık görülürken, AQP4-IgG pozitif olgular motor bulgularla daha sık prezente olmaktadır. Yıllık EDSS progresyon indeksinde ve yıllık atak sıklığında iki grup arasında farklılık bulunmamıştır. Beyin sapı ve supratentoryal lezyonlar açısından da serolojik duruma göre bir farklılık izlenmemiştir. Area postrema sendromu seronegatif olgularda AQP4 antikoru pozitif olgulara göre oldukça nadirdir (37). Bu bulgulara ek olarak seronegatif hastaların HLA genotipinin AQP4 antikoru pozitif NMOSH'den daha çok MS ile benzerlik gösteriyor olması da bu iki klinik tablonun farklı etiyopatogeneze sahip olabileceği sorusunu gündeme getirmiştir (143).

MOG-IgG pozitif olgular kadın-erkek oranı, eş zamanlı ON ve transvers miyelit görülme olasılığı, bilateral ON görülme olasılığı, atakların ağırlığı, eşlik eden otoimmün hastalık varlığı gibi özellikler açısından seronegatif gruba daha yakın bir profil çizmektedir (7). Ancak MOG antikoru pozitif olgularda optik kiazma tutulumu daha nadir, lumbosakral miyelit daha sık izlenmektedir. Bu nedenle seksüel disfonksiyon ya da sfinkter disfonksiyonu daha sık izlenebilir (9).

2.3. Seronegatif NMOSH İçin Biyobelirteç Saptanmasının Önemi

Seropozitif hastalardan klinik ve demografik özellikler bakımından da ayrılan seronegatif NMOSH grubu tanı kriterleri konusunda daha dikkatli davranılması gereken, halen hastalık mekanizması ile ilgili soru işaretleri olan bir antitedir. Bu grupta altta yatan farklı bir immünolojik mekanizma olabileceği, hastalığın bir ya da birden fazla hedef antijene yönelik hümmoral yanıtla ilişkili olabileceği araştırılması gereken hipotezlerdir. Bu olgularda henüz tanımlanamamış özellikle astrositik hedeflere karşı antikorlar olabileceği düşünülmektedir (12). Seronegatif olguların bir kısmında anti-MOG antikorlarının saptanması ve bu olguların klinik ve patofizyolojik olarak ayrıştırılabildiğinin gösterilmesi, seronegatif NMOSH grubunun farklı birkaç hastalığı içeren heterojen bir grup olabileceğini de düşündürmüştür. Bu bulgular ışığında antikor üretimini ya da kompleman aktivasyonunu hedef alan tedavi seçenekleri seronegatif NMOSH grubu için uzun dönem tedavide doğru seçenek olamayabilir (10). Nihayetinde bu grupta tanısız biyobelirteçlerin tanımlanması hastaların doğru tanı alması, patogenezinin aydınlatılması ve doğru tedaviye ulaşımı açısından oldukça önem taşımaktadır (3).

Özellikle spinal kord ve optik sinir tutulumuyla seyreden MS alt grubu, klinik ve nörogörüntüleme bulgularında ortaya çıkabilecek örtüşmeler de göz önüne alındığında seronegatif NMOSH ayırıcı tanısında önemli bir başlık haline gelmektedir (144). Özürlülüğün önüne geçilebilmesi için erken dönemde başlanması önerilen immunsupresif tedaviler özellikle MS ve NMOSH ayırıcı tanısı iyi yapılamadığında hastalıkta iyileşme yerine kötüleşmeye neden olabilir. MS tedavisinde sıklıkla kullanılan bir ajan olan interferon-beta muhtemelen Th17 aracılı inflamasyonu ve B hücresi aktive edici faktörü artırarak atak sıklığını ve AQP4-IgG antikor titresini artırmaktadır (145, 146). Natalizumab tedavisinin de muhtemelen lezyon bölgesine makrofaj girişini inhibe ederken nötrofil girişine engel olmaması nedeniyle NMOSH

kliniğini kötüleştirdiği bildirilmiştir (89, 147). Seronegatif olgularda da benzer şekilde natalizumab ile kötüleşme bildirilmiş olması MS ile ayırıcı tanının önemini ortaya koymaktadır (148).

Bu bulgular ışığında çalışmamızda seronegatif NMOSH olgularının serumlarında astrosit yüzey antijenlerine karşı gelişmiş olan antikorların saptanması, hastalığın patogeneze yönelik yeni mekanizmaların aydınlatılması, seronegatif NMOSH grubu ile MS ayırıcı tanısına yardımcı biyobelirteçlerin saptanması amaçlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Çalışmamız antikor taramalarının gerçekleştirildiği bir çalışma kohortu ve sonuçların validasyonunun yapıldığı bir validasyon kohortu içerecek şekilde dizayn edilmiştir. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı kliniğinde izlenen ve aşağıda belirtilen çalışmaya dahil edilme kriterlerini dolduran 30 seronegatif NMOSH olgusu ile kontrol grubu olarak ağırlıkla spinal kord ve optik sinir ataklarıyla seyreden ve optikospinal MS (OSMS) olarak tanımlanan 10 olgu ve 5 primer baş ağrısı dışında bilinen herhangi bir nörolojik ya da sistemik hastalık öyküsü olmayan sağlıklı kontrol olgusu çalışma kohortu olarak dahil edilmiştir.

Çalışmaya alma kriterleri:

- Seronegatif NMOSH hasta grubuna 2015 tanı kriterlerini (3) dolduran, ticari kit ile (EUROIMMUN, AG, Luebeck, Germany) ile bakılan AQP4 ve MOG antikorları negatif saptanan, 18-65 yaş arası olgular

- OSMS grubuna alınan hastalarda:

- En az iki kez ataklı, miyelit ve optik nörit atağı olan 2017 MS tanı kriterlerini dolduran (149), ataklarının tamamı spinal kord ve optik sinir ile ilişkili olan ya da eşlik eden beyin sapı, serebellum ya da supratentoryal hemisferi içeren atakların sayısı tüm ataklarının yarısından az olan

- Ticari kit (EUROIMMUN, AG, Luebeck, Germany) ile bakılan Anti-MOG ve anti-AQP4 antikorları negatif olan

- NMOSH tanı kriterlerini doldurmayan

- Klinik tabloyu MS'ten daha iyi açıklayabilecek başka bir hastalık saptanamayan 18-65 yaş arası olgular

Çalışmadan dışlama kriterleri:

- En son yüksek doz metilprednizolon (>250 mg/gün) tedavisini bir aydan daha kısa süre önce almış hastalar

- Plazmaferez tedavisini üç aydan daha kısa süre önce tamamlamış olan hastalar
- Gebe olan hastalar
- Son altı ayda anti-CD20, anti-IL6 veya siklofosfamid tedavisi almış olmak
- Mitokondrial hastalıklar, iskemik optik nöropati, optik sinir ya da kılıf kaynaklı tümörlere sahip hastalar çalışmaya dahil edilmeyecektir.
- Sağlıklı kontroller için primer baş ağrısı dışında nörolojik hastalık öyküsü bulunması, kendisinde ya da ailesinde otoimmün hastalık öyküsü bulunması ve kronik ilaç kullanımı dışlama kriteri olarak kabul edilmiştir.

Çalışma için etik kurul izni İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih ve sayı: 21.05.2021-204033). Tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verilerek bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmıştır.

Çalışmaya alınan tüm olgulardan 10 ml hacimde 1 kuru tüp kan örneği alınmış ve örnekler 4000 x g hızında 10 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen serumlar deney amaçlı kullanılabilecek kadar -80°C'de saklandı.

3.2. Olguların Serolojik Durumunun Hücre Temelli Deneylerle Doğrulanması

Seronegatif NMOSH tanısı alan olguların serolojik durumunun doğrulanması amacıyla canlı hücrelerle hücre temelli deneyler yapıldı. Bu amaçla öncelikle hedef antijen plazmidleri ile kompetan Escherichia coli (E.coli) hücreleri kullanılarak transformasyon yapıldı ve ardından plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen plazmid DNA'sı ticari hücre hattına transfekte edildi ve hücrelerin hedef antijenleri hücre yüzeyinde eksprese etmesi sağlandı. Hasta serumları ile hedef antijen ile transfekte hücrelerin inkübasyonun ardından hasta serumunda hedef antijene yönelik spesifik IgG varlığı durumunda gerçekleşecek spesifik antijen-antikor bağlanmasını görselleştirmek üzere insan IgG'sine bağlanan floresan işaretli sekonder antikorlar kullanıldı ve mikroskop altında örnekler incelendi. Spesifik bağlanma varlığında immunfloresan mikroskop kullanılarak izlenen floresan renk yoğunluğa göre kuantifiye edildi. Protokol ile ilgili detaylar işlem sırasıyla aşağıda belirtildi.

3.2.1. Bakteriyel Transformasyon Protokolü

Liyofilize halde gelen hedef antijen plazmid; dH₂O eklenerek 10 µM olacak şekilde çözündürüldü. “Alpha gold competent cell” (C4040-10, Invitrogen) -80°C’den çıkartılıp buzun üzerine alındı ve 5-6 dk boyunca belirli aralıklarla yavaşça karıştırıldı. Yeni bir temiz tüpe ilk önce hedef antijen plazmid eklendi ve üzerine Alpha Gold Competent Cell eklenerek pipetaj yapıldı. Otuz dakika buzun üzerinde inkübe edildikten sonra 30-45 saniye 42°C’de ısı bloğunda sarsmadan bekletildi ve tekrar buza alınıp 2 dakika buz üzerinde bekletildi. Tüpler 37°C’de 200 RPM hızda 60 dakika çalkalandı ve tüplerden istenilen miktar kadar antibiyotik içeren Luria-Bertani (LB)-agar petrilere ekim yapılarak 37°C’de inkübe edildi. Petrilere inkübatörden çıkarıldı ve oluşmuş kolonilerden pipet ucu vasıtasıyla 15 ml’lik santrifüj tüpüne toplandı. Tüpler yaklaşık 6-7 saat 37°C’de 200 RPM hızda inkübatörde bekletildi. Tüp içerisinde hücreleri içeren 5 ml LB daha önce ısıtılıp 37°C’ye getirilen ve içerisinde antibiyotik bulunan 50 ml LB içeren bir erlenmayerin içerisine döküldü ve gece boyu 37°C’de 200 RPM hızda inkübe edildi. Erlenmayerin içinde üremenin olduğu saptandıktan sonra plazmid izolasyonuna başlandı.

3.2.2. Plazmid İzolasyonu

Plazmit izolasyonu ticari kit ile (K210010, PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen) protokole uygun olarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.2.3. Plazmid Transfeksiyon Protokolü

Transfeksiyon ajanı olarak polyethylenimine (PEI) kullanılarak HEK293T hücre hattına plazmit transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyondan için hücre yoğunluğunu $\geq$ % 80 olana kadar hücreler %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde çoğaltıldı. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaşıldığında transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyondan hemen önce PEI reaktifi oda sıcaklığına getirildi ve kullanmadan önce nazikçe vortekslendi. 250 µl DMEM içerisine 2,5 µg (2,5 µl 1 µg / µl stok) plazmid DNA’sı eklendi ve yavaşça pipetlendi. Ardından DNA karışımına 7,5 µl PEI reaktifi eklendi. Transfeksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi ve ardından hücreleri içeren kuyulara eşit şekilde dağıtıldı. 48–72 saat inkübasyon gerçekleştirildi.

3.2.4. AQP4 antijeni ile hücre yüzey boyama protokolü

AQP4-M23-EGFP eksprese eden HEK293T hücreleri 13 mm'lik lamellerin üzerinde ekildikten sonra deney günü 24 kuyulu plakalara transfer edildi. Hücreler, içinde 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit (HEPES) ve %1 bovine serum albümin (BSA) içeren DMEM ile 1:20 oranında dilüe edilmiş serumlar 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler üç kere Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkandı ve ardından %4'lük paraformaldehit (PFA) ile 15 dakika fikse edildi. Örnekler üç kere PBS ile yıkandı ve ardından spesifik bağlanmaları görselleştirmek için keçi anti-insan IgG (H+L), Alexa Fluor 568 (A-21090, Thermo Fisher Scientific) ile hücreler 45 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile iki kez yıkamanın ardından hücreler nükleus boyaması için kullanılan 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) içeren kapama medyumu ile mikroskop incelemesinin yapılacağı slayta alındı.

3.2.5. MOG antijeni ile hücre yüzey boyama protokolü

MOG reaktivitesini test etmek için serum örnekleri 1:20 dilüsyonda insan DDK işaretli MOG-alfa1 proteini eksprese eden Chinese hamstring ovary (CHO) hücreleri ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 2 kez DMEM ile yıkanan hücreler spesifik bağlanmaları görselleştirmek amacıyla eşek anti-insan IgG1 antikoru ile (Cy3 işaretli, 709-166-14, Jackson) 45 dk inkübe edildi. Sekonder antikor ile inkübasyonu takiben hücreler %4'lük PFA ile 15 dakika fikse edildi. PBS ile iki kez yıkamanın ardından hücreler transfeskiyonun gözlenebilmesi amacıyla fare-anti-DDK antikoru (TA50011, Origene) ile inkübe edildi. Inkübasyon sonrası PBS ile yıkama yapılarak keçi-anti-fare IgG antikoru (Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) işaretli, AP112F, Merck) ile ikinci kez sekonder antikor uygulaması yapıldı. PBS ile yıkanan hücreler nükleus boyaması için kullanılan 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) içeren kapama medyumu ile mikroskop incelemesinin yapılacağı slayta alındı.

3.3. Astrosit hücrelerine karşı henüz tanımlanmamış antikorların varlığının araştırılması

Tüm serumlar AQP4 ve MOG antijenlerine karşı gelişmiş antikorların varlığı açısından değerlendirildi. Serolojik olarak AQP4 ve MOG antijenlerine karşı antikor içermediği doğrulanan olgularda astrosit antijenlerine karşı henüz tanımlanamamış antikorların varlığını tespit etmek amacıyla primer astrosit kültürü ve ardından hücre yüzey boyama deneyleri gerçekleştirildi.

3.3.1. Primer sıçan astrosit kültürü

Wistar sıçan embriyoları (19 günlük) diseke edildi ve karışık kortikal hücreler T75 flaskta FBS ve antibiyotik-antimikotik içeren DMEM varlığında çoğaltıldı. Kültür medyumunu 2-3 günde bir değiştirildi. In vitro 8. günde mikrogliya ve oligodentrosit prokürsör hücreleri sırasıyla 180 rpm hızda 30 dk ve 240 rpm hızda 6 saat çalkalayıcıda inkübe edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Zenginleştirilmiş astrosit hücreleri kaldırıldı ve poli-L-lizin (PLL) ile kaplı cover slip üzerine ekildi. İnkübasyonun 14. gününde hücrelerin olgun astrosit belirteçleri olan AQP4, GFAP ve S100b ekspresyonları gösterilerek yüzey boyamasına hazır hale geldiği tespit edildi.

3.3.2. Sıçan astrosit yüzey boyama

Olgun sıçan astrositleri %1 BSA içeren DMEM ile 1:100 oranında dilüe edilmiş serum örnekleri ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İki yıkama ardından hücreler %4 PFA ile 10 dk fikse edildi ve arkasından 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich) ile permeabilizasyon gerçekleştirildi. Tavşan-anti-insan GFAP antikoru (Z0334, 1:1000, Dako) ile 45 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. İnsan IgG ve GFAP bağlanmalarını göstermek amacıyla sırasıyla keçi-anti-insan IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (A-11013, Thermo Fisher Scientific) ve keçi-anti-tavşan IgG (H+L), Alexa Fluor 568 (A-11011, Thermo Fisher Scientific) sekonder antikoları ile inkübasyon yapıldı. Spesifik bağlanmanın yoğunluğu, bir floresan mikroskobu kullanılarak görsel olarak değerlendirildi ve yarı kantitatif olarak puanlandı (+ zayıf; ++ orta; +++güçlü).

3.4. İP ve kütle-spektrometresi ile aday hedef oto-antijenlerin tanımlanması

Seronegatif olduğu verifiye edilmiş NMOSH olgularında henüz tanımlanmamış tanısal ve patojen öneme sahip olan hedef oto-antikorların araştırılması projemizin ana hedeflerinden bir tanesidir. Bu amaçla antijen saflaştırılması ve belirlenmesinde sıklıkla kullanılan ve proteinlerin üç boyutlu yapılarının korunarak incelenmesine olanak sağlayan bir teknik olan immünopresipitasyon (İP) tekniği kullanıldı. İP tekniği temel olarak spesifik antikorların varlığında hedef antijenlerin bir kompleks olarak çöktürülmesine dayanır. Bu işlemin gerçekleşebilmesi için antikorların agaroz ya da manyetik boncuklar gibi solid bir substrat ile immobilize edilmesi gerekmektedir. İP hücre ve doku lizatlarından protein pürifikasyonunda sık kullanılan bir yöntemdir. Son yıllarda agaroz boncuklar yerine manyetik boncukların kullanılması püriteyi artırmış, işlemin daha hızlı yapılmasını sağlamıştır (20). Bir sonraki basamakta elde edilen

antijen-antikor kompleksinin değerlendirilmesi için Western blot ya da kütle spektrometre deneyleri yapılmalıdır (150). Çalışmamızda İP sonucunda elde edilen antijen-antikor komplekslerinin tanımlanması amacıyla kütle spektrometresi incelemesi yapıldı. Sıvı kromatografisi (“liquid chromatography”-LC) numuneyi bileşenlerini ayırır ve ardından bunları kütle spektrometresine (“mass spectrometry”-MS) verir. MS, atomlar, moleküller ve kümeler gibi iyonize parçacıkları yüklerinin ilgili kütlelerine (kütle/yük; m/z) oranlarındaki farklılıkları kullanarak ayıran analitik bir tekniktir. LC/MS verileri, spesifik numune bileşenlerinin moleküler ağırlığı, yapısı, kimliği ve miktarı hakkında bilgi sağlamak için kullanılabilir (151).

3.4.1. Manyetik boncuklar aracılığıyla İP Protokolü

Tüm işlemler buz üzerinde ve biyogüvenlik kabini altında yapıldı Ticari astrosit hücreleri (N7805-100, Gibco Human Astrocytes) 10 cm çaplı hücre kültürü petrilerinde büyütüldü. Hücreler bir defa PBS’le yıkandıktan sonra 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5mM EDTA ve %1 Triton-X içine hemen deney öncesi 1:100 oranında eklenmiş proteinaz inhibitor kokteylinden (PIC) oluşan lizis çözeltisi petriye eklendi ve hücreler buz üzerinde kazınarak soğuk tüplere alınarak ve 1 dk vortekslendi. Ardından 30 dakika +4°C’de rotasyonda inkübe edildi. İnkübasyon ardından +4°C’de en yüksek hızda 15 dk santrifüj edildi. Supernatant yeni soğuk tüplere aktarıldı. Hasta serumları 1:20 oranında olacak şekilde elde edilen hücre lizatlarına eklendi ve +4°C’de dikey rotasyonda gece boyu inkübe edildi. Protokolün ikinci gününde süperparamanyetik boncuklar 1 dk vortekslenerek homojen hale getirildi. Her bir 1.5 ml’lik tüpe kesik uç ile 50 ul manyetik boncuk konularak manyetik rack üzerinde 1 dk bekletildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve tüpler manyetik rack’ten uzaklaştırıldı. Hücre lizatları manyetik boncukların üzerine eklendi ve nazıkçe pipetaj yapıldı. Hücre lizatı-manyetik bead kompleksi +4°C’de 4 saat dikey rotasyonda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpler manyetik rack üzerine alındı ve 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkamaların ardından 20 ul elüsyon buffer eklenerek pipet ucuyla karışması sağlandı. 2 dk +4°C’de rotasyonun ardından manyetik rack üzerinde 2 dk daha bekletildi ve üst sıvı temiz tüplere alındı. Üzerine 1:1 oranında 1M Tris- HCl (pH:7.6) çözeltisi eklendi.

3.4.2. İmmünpresipitatların jel elektroforezde yürütülmesi

İP ürünleri Laemmli tamponu ile resuspanse edildi. 10 dk kaynatıldıktan sonra % 4-15 sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid (SDS-PAGE) jel üzerinde yürütüldü.

Boyama sonucu sağlıklı kontrollerden farklı bantlar izlenen örnekler tespit edilerek bu örnekler ile kütle spektrometre deneyi gerçekleştirildi.

3.4.3. Kütle spektrometre protokolü

İmmünopresipitasyon ardından elde edilen kompleksteki proteinlerin tanımlanması için kütle spektrometre incelemesi Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bunun için protein karışımına 10 mM konsantrasyonda ditiyotretiyol eklendi ve 60°C'de 10 dk inkübe edildi. Ardından 20 mM 2-iyodoasitamid ile 30 dk karanlıkta alküllendi. Karışıma 1 µg tripsin (Promega Gold) eklenerek 55°C'de 1,5 saat inkübe edildi ve ardından 1µl formik asit ile asitleştirildi. İnjesiyon için sıvı kromatografisi tüplerine alındı. Triptik peptidler bir Symmetry C18 (5µm,180µm i.d. x 20 mm) kolonunda tutuldu ve asetonitril gradyanı (%4 ila %40 asetonitril, 0.3 µl/dak akış hızı) ile 60 dakikalık bir toplam çalışma süresiyle yüzeyi yüklü hibrid C18 (1,7 µm, 75 µm i.d. x 250 mm) analitik nano sütunda elüte edildi. Veriler, 24 Da'lık bir dört kutuplu iletim genişliğinde, veriden bağımsız edinim modu ile SONAR olarak oluşturulan pozitif iyon duyarlılığı modunda toplandı. Veri işleme için Progenesis-QIP (V.2.4 Waters) kullanıldı.

3.4.4. Biyoinformatik analiz

Elde edilen veriler mikrodizin sistemine ait 'Genome Studio' yazılımı kullanılarak analiz edildi. Ham verilerin analiz edilebilmesi için Illumina bead-çip verileri için önerilen ve yaygın olarak kullanılan normalizasyon yöntemi olan quantile normalizasyonu kullanıldı. Bu çalışmada, çalışma gruplarında kontrollere göre sinyal intensiteleri farklı olarak bulunan proteinlerin tespit edilmesi ve bu proteinlerin yolak analizlerinin yapılması amaçlandı. Bu doğrultuda, hedef proteinler t-test yöntemi ile belirlenerek, yolak ve GO (GeneOntology) analizleri gerçekleştirildi. Yalnızca hasta örneklerinde ekspresyonu izlenen ve istatistiksel olarak anlamlı (unique peptid değeri >3 ve p<0.05) 94 protein tespit edildi. Bu proteinlerin biyolojik fonksiyonları gen seti zenginleştirme araçlarından DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) biyoinformatik programı ile tespit edildi. Saptanan proteinlerin gen ontolojisi analizleri yapılarak biyolojik fonksiyonlarına göre alt gruplara ayrıldı.

3.5. Seçilen hedef antijenlere karşı serum antikor varlığının validasyonu

Kütle spektrometre incelemesinden elde edilen verilerin biyoinformatik analizleri sonucu olası hedef antijen olarak “Chloride intracellular channel protein 1” (CLIC1) antijeni belirlendi. Bir sonraki aşamada bu sonucun validasyonu için çalışma grubundan daha geniş bir validasyon grubunda olguların serumlarında antikor varlığının araştırılması için home-made ELISA yöntemi kullanıldı. Validasyon için çalışma grubunda yer alan seronegatif NMOSH (n=11), OSMS (n=29) ve sağlıklı olgu gruplarının yanı sıra (n=36) dışında kontrol grubu olarak AQP4 pozitif NMOSH (n=19), konvansiyonal MS (KMS, n= 36) ve rekürren inflamatuvar optik nörit (RİON, n= 15) tanısı ile izlenen diğer inflamatuvar nörolojik hastalıklar da dahil edilmiştir. KMS grubuna en az dört atak hikayesi olan, 2017 McDonald tanı kriterlerini (149) dolduran tekrarlayan ve düzelen MS (“Relapsing-remitting MS” -RRMS) tanısıyla izlenen olgular dahil edilmiştir. Bu olguların 15’inde ON ya da spinal atak öyküsü bulunmazken, 10 olguda yalnızca ON, 11 olgu ise yalnızca spinal kord atağı öyküsü bulunmaktadır. KMS grubundaki 36 hastanın hiçbirinde hem ON hem spinal kord atağı öyküsü birlikteliği bulunmamaktadır. Validasyon kohortundaki bir diğer grup olan RİON grubuna üç ya da daha fazla izole optik nörit atağı öyküsü olan, kraniyal ve spinal görüntüleme bulguları normal olan, akciğer grafisi, hemogram ve biyokimya değerleri, vitamin B12 ve folat değerleri normal sınırlarda olan, anti-nükleer antikor, anti-tiroid antikorları, AQP4 ve MOG antikorları negatif olan olgular dahil edilmiştir. KMS ve RİON grupları kontrol grubu olarak kullanılarak CLIC1 antikorlarının MS patogenezindeki rolü olup olmadığının yanı sıra ve anatomik olarak optik sinir ve spinal kordun tutulumuyla ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla ELISA plakları (M9410, 96 well MicroWell™ MaxiSorp™ flat bottom plate, Sigma-Aldrich) CLIC1 rekombinant proteini (1 mg/ml, ab95486, Abcam) ile kuyu başına 100 µl karbonat/bikarbonat solüsyonu içinde 0,2 ug olacak şekilde kaplandı ve gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Ertesi gün bir kez %0,05 Tween-20 içeren PBS ile yıkandı ve ardından %3 BSA ile 2 saat oda sıcaklığında blocking yapıldı. Serum örnekleri 1:100 oranında dilüe edilerek kuyulara her bir örnek iki kez çalışılacak şekilde dağıtıldı ve gece boyu oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Pozitif kontrol olarak ticari anti-CLIC1 antikor (PA5-109552, Thermo Fisher) 1:1000 ile 1:100.000 arasında seri dilüe edilerek kullanıldı. Ertesi gün 5 kez yıkama ardından 1:5000 dilüsyonda hazırlanan peroksidaz işaretli keçi-anti-insan IgG (A6029, Sigma-Aldrich)

antikoru ile 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrası beş yıkama siklusu ardından kormojen Tetrametilbenzidin (TMB) substrat ile reaksiyon başlatıldı. Renk değişimi takip edilerek H_2SO_4 solüsyonu ile reaksiyon durduruldu ve optik dansite spektrofotometrik olarak ölçüldü (Thermo Scientific, Multiskan GO, Waltham, MA USA). Pozitif kontrollerden elde edilen konsantrasyon eğrilerine göre örneklerden okunan optik dansite değerlerine karşılık gelen ortalama konsantrasyon değerleri hesaplandı.

3.6. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen bulgular Graphpad Prism (Version 9.3.1., seri numarası: GPS-2303927-L###-#####, GraphPad Software, San Diego, California, USA) istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma verilerin sunumunda tanımlayıcı istatistiksel metotları (frekans, yüzde, ortalama, standart sapma) kullanılmıştır. Sayısal verilerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin analizinde ikili grup karşılaştırmaları için student-t testi, ikiden fazla grup karşılaştırmaları için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış ve varyans homojenitesine göre post-hoc analiz seçilmiştir. Normal dağılım göstermeyen verilerde ikili grup karşılaştırmaları için Mann Whitney U testi, ikiden fazla grup karşılaştırmaları için Kruskal-Wallis ve post-hoc analiz için Dunn testi kullanılmıştır. Korelasyon analizi non-parametrik verilerde Spearman korelasyon kat sayısı göz önüne alınarak yapılmıştır. Sonuçlar % 95 güven aralığında, $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Olguların klinik ve demografik özellikleri

Çalışma kohortundaki olguların klinik ve demografik özellikleri Tablo 4-1’de belirtilmiştir.

Tablo 4-1. Çalışma kohortundaki olguların demografik ve klinik özellikleri

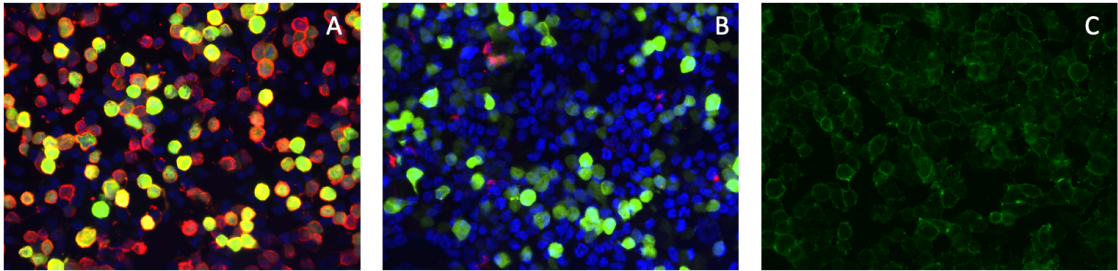
	NMOSH (n=30)	OSMS (n=10)	Sağlıklı kontrol (n=5)
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	24/6	7/3	3/2
Yaş	45,75 ± 13,95	33,87 ± 7,27	33,49 ± 9,43
Hastalık başlangıç yaşı	34,18 ± 13,31	23,17 ± 7,04	
Hastalık takip süresi (yıl)	13,06 ± 9,19	14 ± 5,29	
Başlangıç semptomu (n,%)			
İzole ON	7 (%23,3)	3/10 (%30)	
İzole miyelit	16 (%53,3)	4/10 (%40)	
Eş zamanlı ON ve miyelit	4 (%13,3)		
Eş zamanlı miyelit ve APS	3 (%10)		
Diğer		3 (%30)	
Takipte ortaya çıkan klinik tablolar	22 (%73,3)		
ON	26 (%86,6)		
Miyelit	3 (%10)		
Area postrema sendormu	0		
Akut beyin sapı sendromu	0		
Semptomatik narkolepsi / akut diensefalik klinik sendrom	0		
Semptomatik serebral sendrom			

NMOSH ile uyumlu MRG bulguları	27 (%90)		
Spinal MR bulgusu	14 (%46,6)		
Kranyal MR bulgusu			
BOS OKB paterni	n=27		
1	15 (%50)		
2	3 (%10)		
3	2 (%6,6)		
4	6 (%20)		
5	1 (%3,3)		

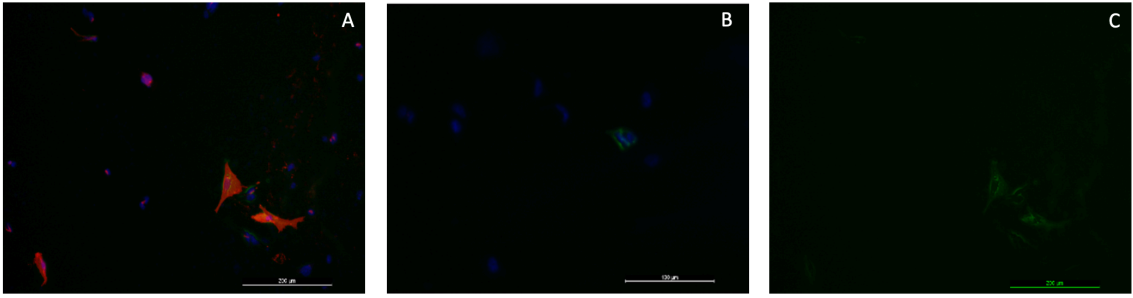
ON: Optik nörit, APS: Area postrema sendromu, NMOSH: Nöromiyelitis optika spektrum hastalıkları, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, BOS: Beyin omurilik sıvısı, OSMS: Optikospinal multipl sklerozis

4.2. AQP4 ve MOG antijenlerine spesifik antikor tarama sonuçları

NMOSH ve optik ve spinal ağırlıklı MS olgularında canlı hücrelerle yapılan CBA deneylerinde örneklerin hiçbirinde M23-AQP4 ya da MOG antijenlerine karşı antikor saptanamamıştır (Şekil 4-1 ve 4-2).



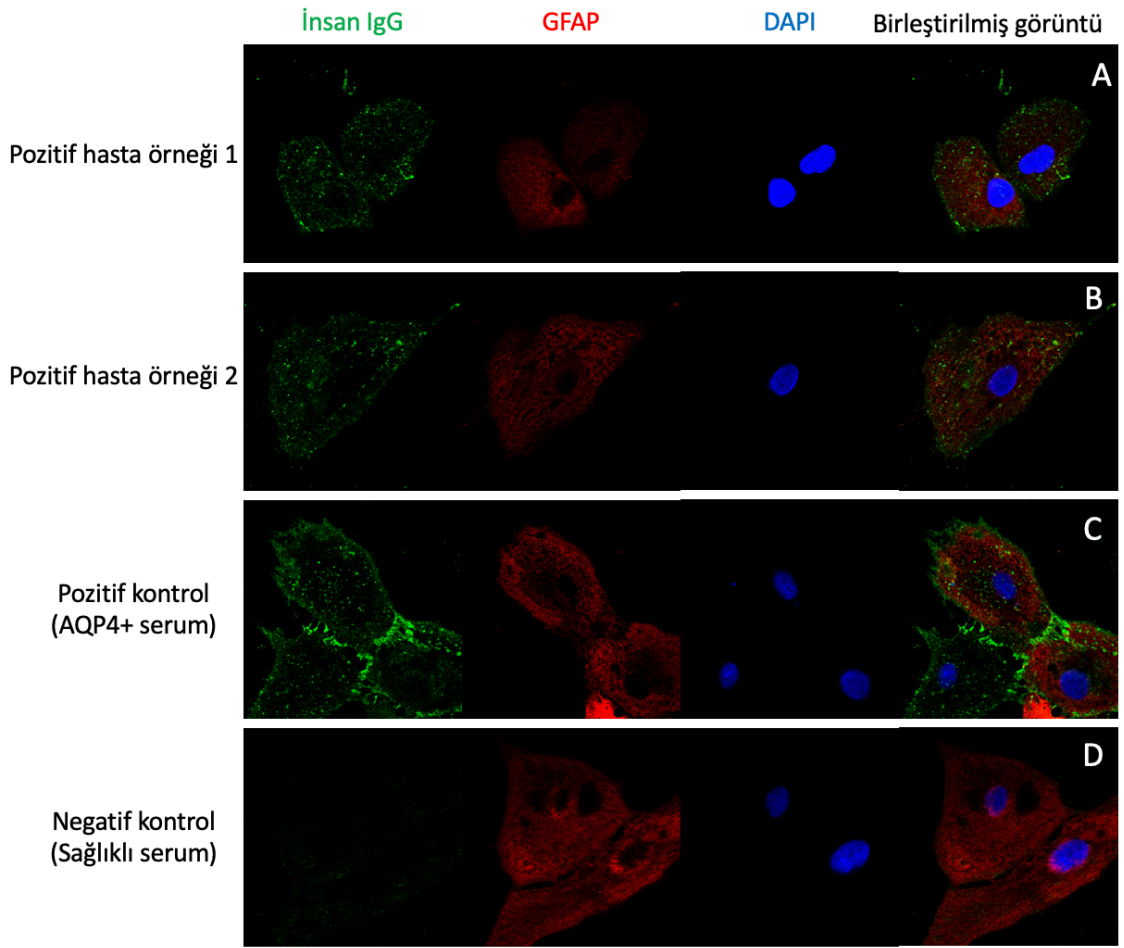
Şekil 4-1. M23-AQP4 antijeni ile transfeke hücrelerle yapılan CBA deneylerinin mikroskop görüntüsü. A) Pozitif kontrol serum B) Negatif kontrol serum C) Hasta örneği ile yapılan incelemeleri 20x büyütmede göstermektedir. Transfeke hücreler floresan mikroskopta yeşil renkte izlenmekte, insan serumunda hedef antijene karşı spesifik bağlanma/antikor varlığında kırmızı renk dalga boyunda sinyal alınmaktadır. DAPI ile boyanan hücre nükleusları mavi renkte izlenmektedir. Negatif kontrol ve antikor saptanmayan hasta serumunda (DAPI boyaması gösterilmemiştir) transfeksiyon izlenmekte ancak spesifik IgG bağlanması gerçekleşmediğinden kırmızı renkte boyanma gözlenmemiştir.



Şekil 4-2. DDK işaretli MOG antijeni ile transfekte hücrelerle yapılan CBA deneylerinin mikroskop görüntüsü. A) Pozitif kontrol serum B) Negatif kontrol serum C) Hasta örneği ile yapılan incelemeleri 20x büyütmede göstermektedir. Transfekte hücreler floresan mikroskopta DDK immün boyaması sonucu yeşil renkte izlenmekte, insan serumunda hedef antijene karşı spesifik bağlanma varlığında kırmızı renkte boyanma gözlenmektedir. DAPI ile boyanan hücre nükleusları mavi renkte izlenmektedir. Negatif kontrol ve antikor saptanmayan hasta serumunda (DAPI boyaması gösterilmemiştir) transfeksiyon izlenmekte ancak spesifik IgG bağlanması gerçekleşmediğinden kırmızı renkte boyanma gözlenmemiştir.

4.3. Primer sıçan astrosit boyaması

Olguların tamamının AQP4 ve MOG antikoru açısından negatif olduğu CBA ile doğrulandıktan sonra bir sonraki basamakta olası yeni antikorların tespiti için primer sıçan astrosit kültüründe tarama yapıldı. Pozitif kontrol olarak AQP4 antikoru pozitif hasta serumu, negatif kontrol olarak da sağlıklı hasta serumu kullanıldı. 30 seronegatif NMOSH hastası ve 10 OSMS olgusu ile gerçekleştirilen immün boyamalarda bir NMOSH olgusunda ++, bir diğerinde + boyanma izlenirken, MS olgularında 2 olguda ++, 3 olguda ise + boyanma izlendi (Şekil 4-3)



Şekil 4-3. Primer sıçan astrositleri ile immun boyama deneylerinin mikroskop görüntüsü. Seronegatif bir NMOSH olgusu (A) ve optik ve spinal ağırlıklı ataklarla seyreden bir MS olgusu (B), AQP4 antikoru pozitif bir NMOSH olgusuna benzer şekilde astrosit membran proteinlerine karşı reaktivite göstermektedir (yeşil boyanma). Astrosit özellikleri GFAP boyaması ile (kırmızı), nukleuslar DAPI karşıt boyaması (mavi) ile tanımlanmıştır. Negatif kontrol ile yapılan deneyde (D) herhangi bir boyanma paterni izlenmemiştir.

4.4. IP ve kütle spektrometre sonuçları

Astrosit yüzey antijenlerine karşı reaktivite gösteren IgG antikorlarının hedef antijenlerini tespit edebilmek için bir sonraki basamakta immunopresipitasyon işlemi yapıldı. Bu amaçla insan ticari insan astrosit hücreleri (N7805-100, Gibco Human Astrocytes) çoğaltılarak sıçan astrosit hücre yüzey boyama sonuçları pozitif olan hasta serumları ile inkübe edildi. Daha sonra manyetik boncuklar yardımıyla antijen-antikor komplekslerine çöktürme işlemi uygulandı. Elde edilen IP ürünleri SDS-PAGE jelde yürütüldüğünde OSMS olgularında benzer moleküler ağırlıkta izlenen ancak NMOSH ve sağlıklı kontrol olgularında izlenmeyen bantlar gözlendi. Bu bantların kütle

spektrometre incelemesi sonucunda MS olgularında diğer gruplardan farklılık gösteren proteinler tespit edildi. Gen ontoloji analizleri ile hedef proteinler moleküler fonksiyonlarına göre gruplandırıldı (Tablo 4-2). Bu tablolarda listelenen proteinlerden hedef antijen tespiti için aşağıdaki kriterler kullanıldı:

1. FDR değeri <0,05 olması
2. Kütle spektrometre incelemesinde “unique peptid” değerinin 3 ve üzerinde olması
3. Antikorların tanıdığı hedef proteinin sadece hasta IgG tarafından saptanmış olması
4. Saptanan proteinin hücre yüzeyinde ifade edilen bir membran proteini olması
5. Aynı hastalık grubuna ait en az 2 olgunun serum antikorları tarafından tanınmış olması.

Bu kriterler doğrultusunda astrosit hücrelerinde CLIC1 (Uniprot veritabanı kodu: O00299) antijeni OSMS olgularında astrosit reaktivitesine neden olabilecek hedef antijen olarak seçildi.

Tablo 4-2. Kütle spektrometre sonuçlarına göre olası hedef antijenlerin fonksiyonlarına göre gruplandırılmış listesi.

Kategori	Terminoloji	Sayı	P değeri	Genler	Bonferroni	FDR
GOTERM_BP_DI RECT	GO:0006898~receptor-mediated endocytosis	24	7,65E-03	P04433, P01780, P07900, Q08380, P01619, P01717, P68871, P01615, P02649, P01614, P01834, P80748, P02760, P04004, P0CF74, P14625, Q9NR12, A0A087WW 87, P00739, A0A0A0MR Z8, P01703, P01701, P01763, P01762, P06310,	1,07E-03	1,01 E-02

				P27797		
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0038096~Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis	20	1,27E-01	P04433, P01780, P07900, O15145, P60709, P0CF74, A0A087WW87, P01619, P61160, P01717, A0A0A0MRZ8, P01615, P01703, P01614, P01834, P01701, P61158, P01763, P80748, P01762, P06310, P08238	1,17E-04	1,30E-03
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0098609~cell-cell adhesion	23	2,52E-04	P26641, P0DMV8, P0DMV9, P13639, Q14847, Q15417, P29692, P33176, Q05682, P11142, Q02878, P15880, P50914, P52907, P00338, P31949, P61313, P83731, Q16643, P63104, P61978, P08238, Q15365, P47756	2,43E-06	1,94E-06
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005913~cell-cell adherens junction	27	6,67E-01	P26641, P0DMV8, Q14847, P0DMV9, Q15417, P29692, P33176, Q02878, P50914, P83731, P63104,	1,83E-04	1,59E-03

				Q15365, P47756, P05556, Q15942, P13639, O00299, Q05682, P18206, P11142, P15880, P52907, P00338, P31949, P61313, Q16643, P61978, P08238		
GOTERM_CC_DI RECT	GO:0016020~mem brane	66	2,48E- 02	P07900, P62917, P62081, P18124, P39019, P02649, P07195, Q92499, P83731, Q16555, P09651, P62753, Q13561, P47756, Q07020, P23284, P06748, P13639, P55795, P60709, P36578, P22626, P11142, P61353, P00338, P62241, P62888, P61313, P61158, P08133, P67936, P05387, P27635, P05388, P27797, P62249, P26641, P25398, O15145, Q08380, P33176, P42766,	6,78E-04	4,91 E-03

				Q02878, P61160, P50914, P23528, P61604, Q15365, P05556, P31943, P26373, P62906, P62829, P14625, O00299, Q08211, Q9NXR1, P18669, P15880, P00558, P62263, P62701, P61978, P62269, P08238, P06576		
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0043209~myelin sheath	12	1,53E-10	P61163, P11142, P18669, P07900, P60709, P07195, Q16555, P26038, P09104, P00441, P12036, P06576	4,20E-12	1,66E-10

4.5. ELISA ile validasyon sonuçları

IP ve kütle spektrometre incelemeleri sonucunda seronegatif NMOSH grubunda astrosit reaktivitesine neden olabilecek hedef antijen tanımlanamamış ancak OSMS olgularında olası bir hedef antijen olarak CLIC1 saptanabilmektedir. Bu antijene karşı gelişen IgG tipi antikorların hasta serumlarında varlığını valide etmek amacıyla daha geniş bir hasta popülasyonunda (AQP4 pozitif NMOSH=19, seronegatif NMOSH=11, OSMS =29, KMS= 36, RİON= 15, sağlıklı kontrol=36) home-made ELISA deneyi yapılmıştır. ELISA yapılan olguların klinik ve demografik özellikleri Tablo 4-3'te belirtilmiştir.

Tablo 4-3. ELISA yapılan olguların klinik ve demografik özellikleri

	OSMS (n=29) (ortalama ± st.sapma)	KMS (n=36) (ortalama ± st.sapma)	RİON (n=15) (ortalama ± st.sapma)	NMOSH (n=30) (ortalama ± st.sapma)	Kontrol (n=36) (ortalama ± st.sapma)
Yaş	36,7±9,3	29,6±8,8	42,8±11,8	45,7±10,4	32,8±8,3
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	14/15	24/12	9/6	24/6	26/10
Hastalık başlangıç yaşı	27,1±9,2	26,4±7,8	34,5±10,5	34,2±13,3	
Hastalık süresi (yıl)	10,0±7,8	8,0±6,5	8,5±6,3	12,3±9,0	
EDSS	2,5±1,6	1,7±1,0	2,1±1,1	3,5±2,0	
Progresyon indeksi	0,5±0,7	0,3±0,3	0,4±0,4	1,0±0,6	
BOS OKB+ (Tip 2, 3 ya da 4)	22/29	27/36	3/15	10/30	

EDSS: Expanded Disability Status Scale, KMS: Konvansiyonel multipl sklerozis, NMOSH: Nöromiyelitis optika spektrum hastalıkları, OKB: Oligoklonal bant, OSMS: Optikospinal multipl sklerozis, Progresyon indeksi: Son EDSS/ toplam hastalık süresi (yıl), RİON: rekürren inflamatuvar optik nörit,

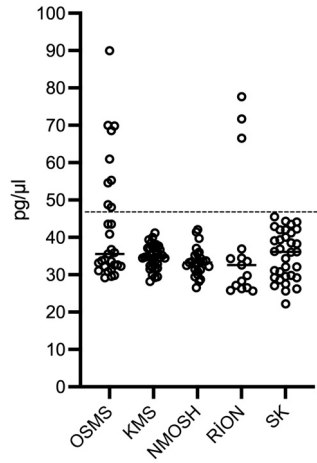
ELISA metodu ile belirlenen serum anti-CLIC1-IgG düzeylerinde gruplar arasında Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanamadı (Tablo 4-4)

Tablo 4-4. ELISA ile saptanan serum anti-CLIC1-IgG düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması

Grup	Serum anti-CLIC1 IgG (pg/µl) (median, min-maks)	p değeri
OSMS	35,55 (29,19 – 89,93)	0,102
KMS	34,70 (28,18 – 41,20)	
RİON	32,57 (25,63 – 77,64)	
NMOSH	33,26 (26,51 – 42,05)	
Sağlıklı kontrol	36,14 (22,20 – 45,51)	

KMS: Konvansiyonel multipl sklerozis, NMOSH: Nöromiyelitis optika spektrum hastalıkları, OKB: Oligoklonal bant, OSMS: Optikospinal multipl sklerozis, RİON: rekürren inflamatuvar optik nörit,

Sağlıklı kontrollerin ortalama + 2 standart sapma değeri anti-CLIC1 IgG düzeyi kesme değeri olarak kabul edildiğinde 9 OSMS olgusu ve 3 RİON olgusunda CLIC1 antikoru pozitifliği olarak değerlendirildi. NMOSH ve KMS olgularının hiçbirinde antikor pozitifliği tespit edilemedi (Şekil 4-4).



Şekil 4-4. Hasta gruplarında antikor pozitifliğini değerlendirilmesi. Kesikli çizgi sağlıklı kontroller için ortalama + 2SD temsil etmektedir. Bu değer kesme değeri olarak kabul edildiğinde 9 OSMS ve 3 RİON olgusu dışında antikor pozitifliği izlenmedi. *OSMS: Optikospinal multipl sklerozis, KMS: Konvansiyonel multipl sklerozis, RİON: rekürren inflamatuvar optik nörit, NMOSH: Nöromiyelitis optika spektrum hastalıkları, OKB: Oligoklonal bant*

CLIC1 antikor pozitifliği gösteren OSMS ve RİON olgularının klinik ve demografik özellikleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı (Tablo 4-5 ve Tablo 4-6). Ancak antikor pozitif olguların EDSS skorlarının daha düşük olma eğilimi gösterdiği tespit edildi.

Tablo 4-5. CLIC1 antikoru pozitif ve negatif OSMS olgularının klinik ve demografik özelliklerinin karşılaştırılması

	CLIC1 antikoru (+) OSMS (n=9) (ortalama±st.sapma)	CLIC1antikoru (-) OSMS (n=20) (ortalama±st.sapma)	p değeri
Yaş	36,0±8,9	37,0±9,7	0,389
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	4/5	10/10	0,782
Hastalık başlangıç yaşı	28,6±8,0	26,5±9,8	0,279
Hastalık süresi (yıl)	8,3±7,5	10,7±8,1	0,249
EDSS	1,8±0,7	2,9±1,8	0,023
Progresyon indeksi	0,5±0,5	0,6±0,7	0,363
BOS OKB+ (Tip 2, 3 ya da 4)	7/9	14/20	0,665

EDSS: Expanded Disability Status Scale, OKB: Oligoklonal bant, OSMS: Optikospinal multipl sklerozis, Progresyon indeksi: Son EDSS/ toplam hastalık süresi (yıl)

Tablo 4-6. CLIC1 antikorlu pozitif ve negatif RION olgularının klinik ve demografik özelliklerinin karşılaştırılması

	CLIC1 antikoru (+) RION (n=3) (ortalama±st.sapma)	CLIC1 antikoru (-) RION (n=12) (ortalama±st.sapma)	p değeri
Yaş	42,6±15,9	42,9±11,4	0,490
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	2/1	7/5	>0,999
Hastalık başlangıç yaşı	39,0±14,7	33,4±9,7	0,293
Hastalık süresi (yıl)	4,0±2,6	9,6±6,5	0,125
EDSS	1,9±1,2	2,7±0,6	0,082
Progresyon indeksi	0,3±0,3	0,9±0,6	0,105
BOS OKB+ (Tip 2, 3 ya da 4)	0/3	2/12	

EDSS: Expanded Disability Status Scale RION: rekürren inflamatuvar optik nörit, OKB: Oligoklonal bant, Progresyon indeksi: Son EDSS/ toplam hastalık süresi (yıl)

Sonuç olarak çalışmamızda NMOSH ve OSMS olgularının bir kısmında astrosit yüzey antijenlerine reaktivite gösteren antikorların varlığı tespit edilmiş, bu antijenleri tanımlamak üzere yapılan İP ve kütle spektrometre incelemelerinde OSMS olgularında antikorların geliştiği hedef antijen CLIC1 olarak tespit edilmiştir. validasyon amacıyla yapılan incelemelerde OSMS ve RION olgularında CLIC1 antikor pozitifliği saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

İnfamatuvar ve otoimmün SSS hastalıkları özellikle genç erişkinlerde özürllülük oluşturabilen önemli bir hastalık grubudur. Bu grubun başında MS gelmekle birlikte daha nadir olmakla birlikte NMOSH da uygun tedavi edilmediğinde önemli derecede morbiditeye neden olabilen bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu iki hastalık gerek klinik bulgular gerek nörogörüntüleme ve diğer tanısal yöntemlerle birbirinden ayrışabilse de klinik ve laboratuvar olarak örtüşme gösteren olguların varlığı ayırıcı tanıda zorluklara neden olabilmektedir. AQP4 antikorunun varlığı NMOSH tanısında oldukça yol gösterici olmakla birlikte, antikor pozitifliği saptanamayan olgular özellikle MS için kullanılan tedavilerin NMOSH grubunda kötüleşmeye neden olabileceği göz önüne alındığında klinisyenler için zorlayıcı bir tablo oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra ilaç çalışmaları için doğru hasta seçimi, seronegatif NMOSH grubunun patogenezinine yönelik soru işaretlerinin aydınlatılması ve hastalık prognozunun öngörülebilmesi için biyobelirteçlerin geliştirilmesi oldukça önemli bir görev haline gelmiştir (152).

Literatürdeki bu boşluğu doldurma amacıyla gerçekleştirdiğimiz bu çalışmamızda 30 seronegatif NMOSH olgusu ve ayırıcı tanıda en çok zorluk yaşanan grup olan OSMS olarak değerlendirilen 10 olgudan alınan serum örnekleri sağlıklı kontrollerin serumları ile birlikte değerlendirilmiştir. Klinik özellikleri açısından değerlendirildiğinde NMOSH olgularında hastalık başlangıç yaşı (ortalama: 34,18 yaş) literatürle uyumlu şekilde AQP4 antikoru pozitif olguların ortalama başlangıç yaşından (ortalama yaş:40 yaş) daha düşüktür. Kadın erkek oranı da benzer şekilde AQP4 antikoru pozitif olgulardan daha düşük olmakla birlikte (Kadın/Erkek oranı: 4/1) literatürde belirtilenden (Kadın/Erkek oranı: 2/1) daha yüksek izlenmiştir. Bu durum olgu sayısının düşüklüğünden kaynaklanıyor olabilir. Yine literatürle uyumlu olarak (%10) eş zamanlı ON ve miyelit ile kliniğe başvuru oranı %13 olarak saptanmıştır (37). Olguların büyük kısmında ana klinik tablo olarak ON ve miyelit atağı olduğu, 3 olguda ilk başvuruda APS'nin klinik tabloya eşlik ettiği görülmektedir.

Günümüze kadar seronegatif NMOSH için tanısal ve prognostik biyobelirteç saptama amacıyla çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiş olsa da literatürde konsensüs sağlanan bir sonuca henüz ulaşamamıştır. Metabolomik verileri plazma miyoinozitol ve format seviyelerinin RRMS ve seronegatif NMOSH ayırıcı tanısında rolü

olabileceğini göstermiştir (153). Bunun yanı sıra multimodal MRG teknikleri ile fonksiyonel görüntüleme araçlarının iki grubun ayrıcı tanısında yardımcı bilgiler verebileceği bildirilmiştir (154). BOS GFAP düzeylerinin AQP4-IgG pozitif olguların yanı sıra seronegatif NMOSH olgularında da yüksek saptandığını gösterilmiş (16), ancak başka bir çalışmada seronegatif olgularda BOS GFAP yüksekliği doğrulanamamıştır (155). Bu bulgular, hasta grubunun heterojeniteini de göz önüne alarak olguların en azından bir kısmında astrosit hücrelerine karşı henüz tanımlanmamış antikorların varlığını düşündürmüştür.

Miyastenia graviste olduğu gibi hastalık patogenezinde birden fazla otoantikorun rol alabiliyor olduğu düşüncesi çalışmacıları NMOSH olgularında yeni otoantikorların varlığını araştırmaya itmiştir. Beyinde eksprese edilen bir diğer su kanalı olan AQP1 antijeninin seronegatif NMOSH olgularında hedef bir antijen olabileceği düşünülmüş ve farklı çalışma gruplarınca bu hipotez test edilmiştir. Tzartos ve ark. seronegatif NMOSH olgularının %24'ünde AQP1 antikoru saptamış, sağlıklı kontroller ve diğer otoimmün non-demyelinizan hastalıklarda ise AQP1 antikorusunun izlenmediğini belirtmiştir. Benzer şekilde Tüzün ve ark. 8 NMOSH olgusunda AQP1 antikorusunun varlığını göstermiş, bunların 1 tanesi seronegatif iken 7 tanesinin AQP4 antikoru da pozitif olan olgular olduğu belirtilmiştir (156, 157) Ancak bu bulguların aksine NMOSH olgularının serumlarında AQP1 antikoru varlığını gösteremeyen çalışmalar da mevcuttur (158, 159). AQP1 antijeninin astrositlerde yoğun şekilde eksprese ediliyor olması ve NMOSH olgularında lezyon bölgesinde selektif olarak kayba uğraması, bu antijenin hastalık patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir (160). NMO hastalarından saflaştırılan IgG ile yapılan bir protein mikroyarray çalışmasında hasta serumlarında kontrollerden farklı olarak bölünme ve poliadenilasyon spesifiklik faktörü ("Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor" - (CPSF-73)), Ring finger protein 141 (RNF141) ve Myosin light chain 2 proteinlerinin hedef antijen olarak tanımlandığını bildirmişlerdir (17). NMO serumları ile muamele edildiğinde kan beyin bariyerinde sıkı bağlantıların ekspresyonunun azaldığı ve KBB bozulduğu gösterilen bir çalışmada ise beyin mikrovasküler endotelial hücrelerine karşı gelişmiş olan AQP4 dışı antikorların varlığı gösterilmiş ve bu antikorların KBB hasarına katkıda bulunuyor olabileceğini ileri sürülmüştür (161). NMOSH olgularında onkonöral antijenlere karşı antikor varlığı araştırılmış ve hem AQP4-IgG pozitif hem seronegatif olgularda bu antijenlere karşı antikor saptanamamıştır (162). Bir adeyzon molekülü olan ve miyelin

kılıfta eksprese edilen nörofasin-155 (NF-155) proteinine karşı antikor varlığı incelendiğinde 129 NMOSH olgusunun %12,4'ünde CBA ile anti-NF-155 antikoru varlığı gösterilmiş, AQP4 antikoru varlığı ile anti-NF-155 antikoru arasında bir ilişki gösterilememiştir. Anti-NF-155 antikoru pozitif saptanan grupta eşlik eden otoimmün hastalık oranı daha fazla bulunmuş ve bu antikorun bozulan periferik immün tolerans sonucu gelişmiş olabileceği düşünülmüştür (163).

Çalışmamızda seronegatif NMOSH patogeneğinde astrosit yüzey antijenlerine karşı gelişen antikorların varlığı hipotezini test etmek için İP ve kütle spektrometre tekniklerinden yararlanılmıştır. İP sonucu elde edilen antijen-antikor kompleksleri SDS-PAGE jelde yürütüldüğüne OSMS grubunda NMOSH ve sağlıklı olgularda izlenmeyen bantlar izlenmiş, ikinci basamakta yapılan kütle spektrometre incelemesinin biyoinformatik analizi sonucunda bu bantlardan sorumlu hedef antijenin CLIC1 antijeni olabileceği düşünülmüştür.

CLIC1 sitoplazma ya da nukleoplazmada çözünebilir formda bulunabileceği gibi, oksidasyon gibi spesifik uyarıların varlığında yapısal değişiklikler göstererek transmembran bir iyon kanalı haline gelebilen ve bu nedenle hücrede oksidasyon sensörü görevi gören bir proteindir (164-166). Transmembran formu membrandan özellikle mikroglia proliferasyonunda önemli bir iyon olan klor iyonunun geçirgenliği ile ilişkilidir (167). CLIC1 transmembran formunun özellikle makrofajlarda reaktif oksijen türevlerinin sentezinin artışıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (168). Bunun yanı sıra aksonal büyüme ile ilişkisinin gösterilmesi, hücre iskeletiyle ilişkili fonksiyonel rolü olduğunu düşündürmüştür (169). Bu özellikler CLIC1 antijeninin hücre çoğalması, göçü ve infiltrasyonu gibi fonksiyonlarla ilişkili olabileceğini göstermektedir (168, 170). Son yıllarda CLIC1 ekspresyonunun glioma, pankreas, meme, karaciğer kanseri gibi bazı tümörlerle ilişkili olduğu gösterilmiş, ekspresyon düzeyi ile sağ kalım arasında ilişki saptanması nedeniyle de prognostik bir belirteç ve potansiyel bir tedavi hedefi olabileceği öne sürülmüştür (171, 172). CLIC1 antijeninin CLIC4 ile birlikte farelerde lipopolisakkarit (LPS) uygulamasının ardından plazma membranında biriktiği ve IL-1 β üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (173). Alzheimer demansı gibi nörodejeneratif süreçlerdeki kronik inflamasyon varlığında sağlıklı kontrollere kıyasla mikroglialarda CLIC1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. CLIC1'in monositlerin makrofajlara dönüşümünde de rol oynadığı düşünülmektedir (174). Neonatal sıçan

mikroglia hücrelerinin amiloid- β ile uyarılmasının CLIC1 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiş, CLIC1 kanalında klor akışını spesifik olarak bloke edilmesinin ardından nöronal apoptozisi önlediği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra CLIC1 spesifik “small interfering RNA” (siRNA) uygulanmasını takiben tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve reaktif oksijen türevlerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında CLIC1’in oksidatif strese kritik rol oynadığı ve inflamatuvar hastalıklarda terapötik bir hedef olabileceği öne sürülmüştür (175, 176).

Son yıllarda MS gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta nörotoksik reaktif astrosit olarak adlandırılan özel bir astrosit tipi tanımlanmıştır (177). CLIC1 ekspresyonu yüksek olan reaktif astrositlerin MS olgularının BOS’larında yüksek olduğu ve hastalık ağırlığı ile de korelasyon gösterdiği izlenmiş ve patojen rollerinin olabileceği düşünülmüştür (178). Glial hücrelerde potasyum iyonlarının transportunda rolü olan bir voltaj bağımlı potasyum kanalı antijen olan “inwardly rectifying potassium” (Kir) channel 4.1” (Kir4.1) antijenine karşı gelişmiş antikörlerin MS olgularında saptanması da astrositik yüzey antijenlerinin nöroimmunolojik hastalıklarda hedef olabileceğinin bir başka kanıtı niteliğindedir (179). CLIC1 antikörleri MS olgularında ilk kez gösterilmiş olup, antikörlerin hedef antijenle etkileşimin sonuçları ve patojen rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir. CLIC1 antikoru pozitif olan OSMS olgularının EDSS skorlarının negatiflere göre daha düşük olma eğilimi göstermesi, bu antikörlerin kompanse edilebilir bir mekanizmayla sentezleniyor olabileceğini düşündürmektedir. CLIC1 aracılı klor akışının blokajının proinflamatuvar sitokin sentezinde azalmaya neden olması ve nöronal apoptozisi azaltmasına (176) benzer bir etki söz konusu olabilir. ELISA sonuçlarında KMS grubunda CLIC1 antikoru pozitifliği saptanmazken spinal kord ve optik sinir ağırlıklı tutulum gösteren bu grupta antikör pozitifliğinin gösterilmesi ise lezyonların anatomik seçiminde farklı mekanizmaların rol alabileceğine işaret etmektedir. RİON grubunda da az sayıda benzer şekilde antikör pozitif olgunun saptanması bu bulguyu desteklemektedir. Ancak çalışmamızda anatomik olarak aynı lokalizasyonları seçme eğiliminde olan seronegatif NMOSH olgularında bu antikörlerin pozitifliğine rastlanamamış olması, altta yatan mekanizmanın anatomik lokalizasyondan daha fazlası olduğunu göstermektedir. CLIC1 antikörünün varlığı özellikle erken dönem olgularda NMOSH ve OSMS ayırıcı tanısında yol gösterici olabilir. Ancak bu antikörün

hastalık ve patogenezele ilişkisini aydınlatarak geniş sayıda olgu sayısı ile çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda seronegatif NMOSH olguları ile yapılan primer astrosit immün boyamalarında 30 olgudan iki tanesinde boyanma izlenmiş, bu da literatürle uyumlu şekilde bu hastaların en azından bir kısmının serumunda astrosit yüzey antijenlerine karşı gelişmiş spesifik antikorların olabileceğini işaret etmiştir. Ancak İP ve kütle spektrometre deneyleri sonucunda bu boyanma paternine sebep olan hedef antijen tespit edilememiştir. Protein-protein etkileşiminde İP kolay uygulanabilir ve ikincil analizlere uygun olması nedeni, ayrıca proteinlerin doğal yapısını bozmaması nedeni ile oldukça avantajlı bir tekniktir. Ancak tüm bu avantajlarına rağmen düşük afiniteli ya da geçici protein etkileşimlerini yakalayamayabilir. Ek olarak, ortak İP tarafından tespit edilen protein-protein etkileşimi çünkü üçüncü bir proteinin varlığı nedeniyle dolaylı olabilir. Sonuç olarak, ortak İP'den elde edilen sonuçların doğrulanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan kütle spektrometre deneylerinin de teknik sınırlılıkları bulunmaktadır. Klinik açıdan önemli bazı moleküller düşük konsantrasyonlarda kütle spektrometre teknolojisinin duyarlılık sınırlarının altında kalabilir (180). Bu limitasyonlar NMOSH serumları ile hücre yüzey boyamada izlenen antijen-antikor etkileşiminin devam eden analizlerde ortaya çıkmamasının nedeni olabilir.

Çalışma gruplarında tanı kriterlerine uygun şekilde referans merkezlerde takip edilen olguların dahil edilmiş olması, hastaların klinik bulgularının dokümantasyonu ile elde edilen sonuçların prognoz ile ilişkisinin değerlendirilebilmesi, kullanılan antikor temelli deneylerin yüksek duyarlılık ve özgüllük değerlerine sahip olması, protein-protein etkileşimlerinin analizi için seçilen tekniklerin proteinleri doğal konformasyonunda tanıyabilmesi ve doğrulama amaçlı ikincil analizlerin yapılmış olması çalışmamızı güçlü kılan özelliklerdir. Olgu sayısının düşük olması çalışmamız için sınırlayıcı bir faktör olmakla birlikte çalışma gruplarının nadir hastalıklar olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca gruplarda saptanan astrosit antijenlerine yönelik antikorların fonksiyonel olarak astrosit üzerinde nasıl etki ettiği sorusu, bu çalışmanın kapsamının dışında kalmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda astrosit CLIC1 antijenine karşı gelişmiş antikorlar MS olgularında ilk kez gösterilmiş ve çalışmamızın ana hedeflerinden biri olan seronegatif NMOSH ve OSMS ayırıcı tanısında kullanılabilecek tanısal bir biyobelirteç

bulma konusunda ümit vaat ettiği düşünülmüştür. Bunun yanı sıra seronegatif NMOSH olgularında astrosit yüzey antijenlerine karşı antikor varlığı gösterilmiş ancak tanımlanamamıştır. Yine de astrositlerin seronegatif olgularda da hastalık patogenezinde rolü olabileceği bir kez daha doğrulanmıştır. Bu ilişkinin aydınlatılması için fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.



KAYNAKLAR

1. Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation*. 2013;10:8.
2. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004;364(9451):2106-12.
3. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015;85(2):177-89.
4. Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(7):383-92.
5. Hyun JW, Jeong IH, Joung A, Kim SH, Kim HJ. Evaluation of the 2015 diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorder. *Neurology*. 2016;86(19):1772-9.
6. Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, et al. Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation*. 2011;8:184.
7. Kitley J, Waters P, Woodhall M, Leite MI, Murchison A, George J, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorders with aquaporin-4 and myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies: a comparative study. *JAMA Neurol*. 2014;71(3):276-83.
8. Ramanathan S, Reddel SW, Henderson A, Parratt JD, Barnett M, Gatt PN, et al. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in bilateral and recurrent optic neuritis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2014;1(4):e40.
9. Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Waters PJ, de Haidar Jorge FM, Takahashi T, et al. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology*. 2014;82(6):474-81.

10. Marignier R, Bernard-Valnet R, Giraudon P, Collongues N, Papeix C, Zephir H, et al. Aquaporin-4 antibody-negative neuromyelitis optica: distinct assay sensitivity-dependent entity. *Neurology*. 2013;80(24):2194-200.
11. Jiao Y, Fryer JP, Lennon VA, Jenkins SM, Quek AM, Smith CY, et al. Updated estimate of AQP4-IgG serostatus and disability outcome in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2013;81(14):1197-204.
12. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*. 2012;11(6):535-44.
13. Sabater L, Giralt A, Boronat A, Hankiewicz K, Blanco Y, Llufríu S, et al. Cytotoxic effect of neuromyelitis optica antibody (NMO-IgG) to astrocytes: an in vitro study. *J Neuroimmunol*. 2009;215(1-2):31-5.
14. Mealy MA, Kim SH, Schmidt F, Lopez R, Jimenez Arango JA, Paul F, et al. Aquaporin-4 serostatus does not predict response to immunotherapy in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler*. 2018;24(13):1737-42.
15. Bonnan M, Valentino R, Olindo S, Mehdaoui H, Smadja D, Cabre P. Plasma exchange in severe spinal attacks associated with neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler*. 2009;15(4):487-92.
16. Kleerekooper I, Herbert MK, Kuiperij HB, Sato DK, Fujihara K, Callegaro D, et al. CSF levels of glutamine synthetase and GFAP to explore astrocytic damage in seronegative NMOSD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(6):605-11.
17. Lalive PH, Menge T, Barman I, Cree BA, Genain CP. Identification of new serum autoantibodies in neuromyelitis optica using protein microarrays. *Neurology*. 2006;67(1):176-7.
18. Ishikawa N, Tajima G, Hyodo S, Takahashi Y, Kobayashi M. Detection of autoantibodies against NMDA-type glutamate receptor in a patient with recurrent optic neuritis and transient cerebral lesions. *Neuropediatrics*. 2007;38(5):257-60.
19. Jarius S, Wandinger KP, Borowski K, Stoecker W, Wildemann B. Antibodies to CV2/CRMP5 in neuromyelitis optica-like disease: case report and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg*. 2012;114(4):331-5.

20. Bonifacino JS, Gershlick DC, Dell'Angelica EC. Immunoprecipitation. *Curr Protoc Cell Biol.* 2016;71.
21. Gingras AC, Gstaiger M, Raught B, Aebersold R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(8):645-54.
22. Kimbrough DJ, Fujihara K, Jacob A, Lana-Peixoto MA, Leite MI, Levy M, et al. Treatment of Neuromyelitis Optica: Review and Recommendations. *Mult Scler Relat Disord.* 2012;1(4):180-7.
23. Bruscolini A, Sacchetti M, La Cava M, Gharbiya M, Ralli M, Lambiase A, et al. Diagnosis and management of neuromyelitis optica spectrum disorders - An update. *Autoimmun Rev.* 2018;17(3):195-200.
24. Kawachi I, Lassmann H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017;88(2):137-45.
25. Devic E. Myélite subaiguë compliquée de névrite optique. *Bull Med.* 1894;8:1033-4.
26. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology.* 1999;53(5):1107-14.
27. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med.* 2005;202(4):473-7.
28. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology.* 2006;66(10):1485-9.
29. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* 2007;6(9):805-15.
30. Cobo-Calvo A, Marignier R. MOG-antibody-associated disease is different from MS and NMO and should be considered as a distinct disease entity - No. *Mult Scler.* 2020;26(3):274-6.

31. Hamid SH, Elson L, Mutch K, Solomon T, Jacob A. The impact of 2015 neuromyelitis optica spectrum disorders criteria on diagnostic rates. *Mult Scler*. 2017;23(2):228-33.
32. Mori M, Kuwabara S, Paul F. Worldwide prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(6):555-6.
33. Flanagan EP, Cabre P, Weinshenker BG, Sauver JS, Jacobson DJ, Majed M, et al. Epidemiology of aquaporin-4 autoimmunity and neuromyelitis optica spectrum. *Ann Neurol*. 2016;79(5):775-83.
34. Bagherieh S, Afshari-Safavi A, Vaheb S, Kiani M, Ghaffary EM, Barzegar M, et al. Worldwide prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) and neuromyelitis optica (NMO): a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*. 2023;44(6):1905-15.
35. Bukhari W, Prain KM, Waters P, Woodhall M, O'Gorman CM, Clarke L, et al. Incidence and prevalence of NMOSD in Australia and New Zealand. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(8):632-8.
36. Jarius S, Paul F, Weinshenker BG, Levy M, Kim HJ, Wildemann B. Neuromyelitis optica. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):85.
37. Jarius S, Ruprecht K, Wildemann B, Kuempfel T, Ringelstein M, Geis C, et al. Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation*. 2012;9:14.
38. Quek AM, McKeon A, Lennon VA, Mandrekar JN, Iorio R, Jiao Y, et al. Effects of age and sex on aquaporin-4 autoimmunity. *Arch Neurol*. 2012;69(8):1039-43.
39. Matiello M, Kim HJ, Kim W, Brum DG, Barreira AA, Kingsbury DJ, et al. Familial neuromyelitis optica. *Neurology*. 2010;75(4):310-5.
40. Brill L, Mandel M, Karussis D, Petrou P, Miller K, Ben-Hur T, et al. Increased occurrence of anti-AQP4 seropositivity and unique HLA Class II associations with neuromyelitis optica (NMO), among Muslim Arabs in Israel. *J Neuroimmunol*. 2016;293:65-70.
41. Zhong X, Chen C, Sun X, Wang J, Li R, Chang Y, et al. Whole-exome sequencing reveals the major genetic factors contributing to neuromyelitis optica

spectrum disorder in Chinese patients with aquaporin 4-IgG seropositivity. *Eur J Neurol*. 2021;28(7):2294-304.

42. Ogasawara M, Meguro A, Sakai T, Mizuki N, Takahashi T, Fujihara K, et al. Genetic analysis of the aquaporin-4 gene for anti-AQP4 antibody-positive neuromyelitis optica in a Japanese population. *Jpn J Ophthalmol*. 2016;60(3):198-205.

43. Matiello M, Schaefer-Klein JL, Hebrink DD, Kingsbury DJ, Atkinson EJ, Weinshenker BG, et al. Genetic analysis of aquaporin-4 in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2011;77(12):1149-55.

44. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007;179(3):1634-47.

45. Shan Y, Tan S, Zhang L, Huang J, Sun X, Wang Y, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D(3) is associated with disease status in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders in south China. *J Neuroimmunol*. 2016;299:118-23.

46. Jitprapaikulsan J, Siritho S, Prayoonwiwat N. Vitamin D level status in Thai neuromyelitis optica patients. *J Neuroimmunol*. 2016;295-296:75-8.

47. Tuzun E, Kucukhuseyin O, Kurtuncu M, Turkoglu R, Yaylim I. Reduced serum vitamin D levels in neuromyelitis optica. *Neurol Sci*. 2015;36(9):1701-2.

48. Eskandarieh S, Moghadasi AN, Sahraian MA, Azimi AR, Molazadeh N. Association of cigarette smoking with neuromyelitis optica-immunoglobulin G seropositivity in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Iran J Neurol*. 2019;18(3):93-8.

49. Messina S, Mariano R, Gerales R, Kim SH, Satukijcha C, Vecchio D, et al. The influence of smoking on the pattern of disability and relapse risk in AQP4-positive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder, MOG-Ab Disease and Multiple Sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;49:102773.

50. Jarius S, Ruprecht K, Kleiter I, Borisow N, Asgari N, Pitarokoili K, et al. MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 2: Epidemiology, clinical presentation, radiological and laboratory features, treatment responses, and long-term outcome. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):280.

51. Harahsheh E, Callister M, Hasan S, Gritsch D, Valencia-Sanchez C. Aquaporin-4 IgG neuromyelitis optica spectrum disorder onset after Covid-19 vaccination: Systematic review. *J Neuroimmunol.* 2022;373:577994.
52. Paul F, Jarius S, Aktas O, Bluthner M, Bauer O, Appelhans H, et al. Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica. *PLoS Med.* 2007;4(4):e133.
53. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 1997;17(1):171-80.
54. Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(26):13052-6.
55. Li J, Patil RV, Verkman AS. Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Muller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(2):573-9.
56. Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, Agre P. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry.* 1999;38(34):11156-63.
57. Hinson SR, Romero MF, Popescu BF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Wolburg H, et al. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(4):1245-50.
58. Crane JM, Lam C, Rossi A, Gupta T, Bennett JL, Verkman AS. Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays. *J Biol Chem.* 2011;286(18):16516-24.
59. Nicchia GP, Mastrototaro M, Rossi A, Pisani F, Tortorella C, Ruggieri M, et al. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia.* 2009;57(13):1363-73.
60. Phuan PW, Ratelade J, Rossi A, Tradtrantip L, Verkman AS. Complement-dependent cytotoxicity in neuromyelitis optica requires aquaporin-4 protein assembly in orthogonal arrays. *J Biol Chem.* 2012;287(17):13829-39.

61. Li J, Verkman AS. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J Biol Chem*. 2001;276(33):31233-7.
62. Lu DC, Zhang H, Zador Z, Verkman AS. Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels. *FASEB J*. 2008;22(9):3216-23.
63. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*. 2000;6(2):159-63.
64. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*. 2004;18(11):1291-3.
65. Jarius S, Franciotta D, Paul F, Bergamaschi R, Rommer PS, Ruprecht K, et al. Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: sensitivity, specificity, and direct comparison with immunohistochemistry. *J Neurol Sci*. 2012;320(1-2):32-7.
66. Kim W, Lee JE, Li XF, Kim SH, Han BG, Lee BI, et al. Quantitative measurement of anti-aquaporin-4 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant human aquaporin-4. *Mult Scler*. 2012;18(5):578-86.
67. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, Linbo L, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol*. 2006;59(3):566-9.
68. Matiello M, Schaefer-Klein J, Sun D, Weinshenker BG. Aquaporin 4 expression and tissue susceptibility to neuromyelitis optica. *JAMA Neurol*. 2013;70(9):1118-25.
69. Saadoun S, Papadopoulos MC. Role of membrane complement regulators in neuromyelitis optica. *Mult Scler*. 2015;21(13):1644-54.
70. Kim SH, Kim W, Huh SY, Lee KY, Jung IJ, Kim HJ. Clinical efficacy of plasmapheresis in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder and effects on circulating anti-aquaporin-4 antibody levels. *J Clin Neurol*. 2013;9(1):36-42.
71. Tahara M, Oeda T, Okada K, Kiriya T, Ochi K, Maruyama H, et al. Safety and efficacy of rituximab in neuromyelitis optica spectrum disorders (RIN-1

study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 2020;19(4):298-306.

72. Ratelade J, Bennett JL, Verkman AS. Intravenous neuromyelitis optica autoantibody in mice targets aquaporin-4 in peripheral organs and area postrema. *PLoS One.* 2011;6(11):e27412.

73. Asavapanumas N, Ratelade J, Verkman AS. Unique neuromyelitis optica pathology produced in naive rats by intracerebral administration of NMO-IgG. *Acta Neuropathol.* 2014;127(4):539-51.

74. Jarius S, Franciotta D, Paul F, Ruprecht K, Bergamaschi R, Rommer PS, et al. Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *J Neuroinflammation.* 2010;7:52.

75. Bennett JL, Lam C, Kalluri SR, Saikali P, Bautista K, Dupree C, et al. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Ann Neurol.* 2009;66(5):617-29.

76. Nishiyama S, Ito T, Misu T, Takahashi T, Kikuchi A, Suzuki N, et al. A case of NMO seropositive for aquaporin-4 antibody more than 10 years before onset. *Neurology.* 2009;72(22):1960-1.

77. Lindner M, Klotz L, Wiendl H. Mechanisms underlying lesion development and lesion distribution in CNS autoimmunity. *J Neurochem.* 2018;146(2):122-32.

78. Broadwell RD, Sofroniew MV. Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for extracellular entry to the central nervous system. *Exp Neurol.* 1993;120(2):245-63.

79. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(9):3701-6.

80. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain.* 2002;125(Pt 7):1450-61.

81. Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain*. 2010;133(Pt 2):349-61.
82. Ratelade J, Zhang H, Saadoun S, Bennett JL, Papadopoulos MC, Verkman AS. Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss. *Acta Neuropathol*. 2012;123(6):861-72.
83. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:185-217.
84. Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Roemer SF, Fryer JP, Kryzer TJ, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2007;69(24):2221-31.
85. Chang KH, Ro LS, Lyu RK, Chen CM. Biomarkers for neuromyelitis optica. *Clin Chim Acta*. 2015;440:64-71.
86. Saadoun S, Waters P, MacDonald C, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, et al. Neutrophil protease inhibition reduces neuromyelitis optica-immunoglobulin G-induced damage in mouse brain. *Ann Neurol*. 2012;71(3):323-33.
87. Zhang H, Verkman AS. Eosinophil pathogenicity mechanisms and therapeutics in neuromyelitis optica. *J Clin Invest*. 2013;123(5):2306-16.
88. Hendriks JJ, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;48(2):185-95.
89. Barnett MH, Prineas JW, Buckland ME, Parratt JD, Pollard JD. Massive astrocyte destruction in neuromyelitis optica despite natalizumab therapy. *Mult Scler*. 2012;18(1):108-12.
90. Vaknin-Dembinsky A, Brill L, Orpaz N, Abramsky O, Karussis D. Preferential increase of B-cell activating factor in the cerebrospinal fluid of neuromyelitis optica in a white population. *Mult Scler*. 2010;16(12):1453-7.
91. Kaneko K, Sato DK, Nakashima I, Ogawa R, Akaishi T, Takai Y, et al. CSF cytokine profile in MOG-IgG⁺ neurological disease is similar to AQP4-IgG⁺

NMOSD but distinct from MS: a cross-sectional study and potential therapeutic implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(9):927-36.

92. Linhares UC, Schiavoni PB, Barros PO, Kasahara TM, Teixeira B, Ferreira TB, et al. The ex vivo production of IL-6 and IL-21 by CD4+ T cells is directly associated with neurological disability in neuromyelitis optica patients. *J Clin Immunol*. 2013;33(1):179-89.

93. Vaknin-Dembinsky A, Brill L, Kassis I, Petrou P, Ovadia H, Ben-Hur T, et al. T-cell reactivity against AQP4 in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2012;79(9):945-6.

94. Marignier R, Nicolle A, Watrin C, Touret M, Cavagna S, Varrin-Doyer M, et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain*. 2010;133(9):2578-91.

95. Wasseff SK, Scherer SS. Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol Dis*. 2011;42(3):506-13.

96. da Silva APB, Souza DG, Souza DO, Machado DC, Sato DK. Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:142.

97. Kaneko K, Sato DK, Nakashima I, Nishiyama S, Tanaka S, Marignier R, et al. Myelin injury without astrocytopathy in neuroinflammatory disorders with MOG antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(11):1257-9.

98. Ikeda K, Kiyota N, Kuroda H, Sato DK, Nishiyama S, Takahashi T, et al. Severe demyelination but no astrocytopathy in clinically definite neuromyelitis optica with anti-myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibody. *Mult Scler*. 2015;21(5):656-9.

99. Saadoun S, Waters P, Owens GP, Bennett JL, Vincent A, Papadopoulos MC. Neuromyelitis optica MOG-IgG causes reversible lesions in mouse brain. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:35.

100. Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, et al. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol*. 2009;66(5):630-43.

101. Moreh E, Gartsman I, Karussis D, Rund D, Hiller N, Meiner Z. Seronegative neuromyelitis optica: improvement following lymphocytapheresis treatment. *Mult Scler*. 2008;14(6):860-1.
102. de Seze J. Neuromyelitis optica. *Arch Neurol*. 2003;60(9):1336-8.
103. Jarius S, Aktas O, Ayzenberg I, Bellmann-Strobl J, Berthele A, Giglhuber K, et al. Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) - revised recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). Part I: Diagnosis and differential diagnosis. *J Neurol*. 2023;270(7):3341-68.
104. Asseuer S, Schmidt F, Chien C, Scheel M, Ruprecht K, Bellmann-Strobl J, et al. Pain in AQP4-IgG-positive and MOG-IgG-positive neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2018;4(3):2055217318796684.
105. Jarius S, Frederikson J, Waters P, Paul F, Akman-Demir G, Marignier R, et al. Frequency and prognostic impact of antibodies to aquaporin-4 in patients with optic neuritis. *J Neurol Sci*. 2010;298(1-2):158-62.
106. Bates D. Treatment effects of immunomodulatory therapies at different stages of multiple sclerosis in short-term trials. *Neurology*. 2011;76(1 Suppl 1):S14-25.
107. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 2006;129(Pt 3):606-16.
108. Lucchinetti CF, Bruck W, Lassmann H. Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2004;56(2):308.
109. Kleiter I, Gahlen A, Borisow N, Fischer K, Wernecke KD, Hellwig K, et al. Apheresis therapies for NMOSD attacks: A retrospective study of 207 therapeutic interventions. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;5(6):e504.
110. Palace J, Lin DY, Zeng D, Majed M, Elson L, Hamid S, et al. Outcome prediction models in AQP4-IgG positive neuromyelitis optica spectrum disorders. *Brain*. 2019;142(5):1310-23.
111. Flanagan EP, Weinshenker BG, Krecke KN, Lennon VA, Lucchinetti CF, McKeon A, et al. Short myelitis lesions in aquaporin-4-IgG-positive neuromyelitis optica spectrum disorders. *JAMA Neurol*. 2015;72(1):81-7.

112. Kim W, Park MS, Lee SH, Kim SH, Jung IJ, Takahashi T, et al. Characteristic brain magnetic resonance imaging abnormalities in central nervous system aquaporin-4 autoimmunity. *Mult Scler.* 2010;16(10):1229-36.
113. Salama S, Levy M. Bright spotty lesions as an imaging marker for neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler.* 2022;28(11):1663-6.
114. Li Y, Xie P, Lv F, Mu J, Li Q, Yang Q, et al. Brain magnetic resonance imaging abnormalities in neuromyelitis optica. *Acta Neurol Scand.* 2008;118(4):218-25.
115. Storoni M, Davagnanam I, Radon M, Siddiqui A, Plant GT. Distinguishing optic neuritis in neuromyelitis optica spectrum disease from multiple sclerosis: a novel magnetic resonance imaging scoring system. *J Neuroophthalmol.* 2013;33(2):123-7.
116. Waters PJ, McKeon A, Leite MI, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology.* 2012;78(9):665-71; discussion 9.
117. McKeon A, Fryer JP, Apiwattanakul M, Lennon VA, Hinson SR, Kryzer TJ, et al. Diagnosis of neuromyelitis spectrum disorders: comparative sensitivities and specificities of immunohistochemical and immunoprecipitation assays. *Arch Neurol.* 2009;66(9):1134-8.
118. Waters P, Jarius S, Littleton E, Leite MI, Jacob S, Gray B, et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis. *Arch Neurol.* 2008;65(7):913-9.
119. Hayakawa S, Mori M, Okuta A, Kamegawa A, Fujiyoshi Y, Yoshiyama Y, et al. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neuroimmunol.* 2008;196(1-2):181-7.
120. Marnetto F, Hellias B, Granieri L, Frau J, Patanella AK, Nytrova P, et al. Western blot analysis for the detection of serum antibodies recognizing linear Aquaporin-4 epitopes in patients with Neuromyelitis Optica. *J Neuroimmunol.* 2009;217(1-2):74-9.
121. Jarius S, Probst C, Borowski K, Franciotta D, Wildemann B, Stoecker W, et al. Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a

highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen. *J Neurol Sci.* 2010;291(1-2):52-6.

122. Waters P, Reindl M, Saiz A, Schanda K, Tuller F, Kral V, et al. Multicentre comparison of a diagnostic assay: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87(9):1005-15.

123. Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, Kuenz B, Hauser A, Berger T, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain.* 2008;131(Pt 11):3072-80.

124. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Ruprecht K, Ringelstein M, Bergamaschi R, et al. Cerebrospinal fluid findings in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica: results from 211 lumbar punctures. *J Neurol Sci.* 2011;306(1-2):82-90.

125. Bennett JL, de Seze J, Lana-Peixoto M, Palace J, Waldman A, Schippling S, et al. Neuromyelitis optica and multiple sclerosis: Seeing differences through optical coherence tomography. *Mult Scler.* 2015;21(6):678-88.

126. Tanaka M, Tanaka K, Komori M. Interferon-beta(1b) treatment in neuromyelitis optica. *Eur Neurol.* 2009;62(3):167-70.

127. Wingerchuk DM, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA, Weinshenker BG. A secondary progressive clinical course is uncommon in neuromyelitis optica. *Neurology.* 2007;68(8):603-5.

128. Matthews L, Marasco R, Jenkinson M, Kuker W, Luppe S, Leite MI, et al. Distinction of seropositive NMO spectrum disorder and MS brain lesion distribution. *Neurology.* 2013;80(14):1330-7.

129. Pittock SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol.* 2006;63(3):390-6.

130. Jarius S, Paul F, Aktas O, Asgari N, Dale RC, de Seze J, et al. MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):134.

131. Kim SM, Kim SJ, Lee HJ, Kuroda H, Palace J, Fujihara K. Differential diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders. *Ther Adv Neurol Disord*. 2017;10(7):265-89.
132. Pittock SJ, Lennon VA, de Seze J, Vermersch P, Homburger HA, Wingerchuk DM, et al. Neuromyelitis optica and non organ-specific autoimmunity. *Arch Neurol*. 2008;65(1):78-83.
133. Flanagan EP, Kaufmann TJ, Krecke KN, Aksamit AJ, Pittock SJ, Keegan BM, et al. Discriminating long myelitis of neuromyelitis optica from sarcoidosis. *Ann Neurol*. 2016;79(3):437-47.
134. Collongues N, de Seze J. Current and future treatment approaches for neuromyelitis optica. *Ther Adv Neurol Disord*. 2011;4(2):111-21.
135. Damato V, Evoli A, Iorio R. Efficacy and Safety of Rituximab Therapy in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2016;73(11):1342-8.
136. Mealy MA, Wingerchuk DM, Palace J, Greenberg BM, Levy M. Comparison of relapse and treatment failure rates among patients with neuromyelitis optica: multicenter study of treatment efficacy. *JAMA Neurol*. 2014;71(3):324-30.
137. Tobin WO, Pittock SJ. Rituximab Therapy in Neuromyelitis Optica: Moving Toward a Personalized Medicine Approach. *JAMA Neurol*. 2015;72(9):974-7.
138. Pittock SJ, Berthele A, Fujihara K, Kim HJ, Levy M, Palace J, et al. Eculizumab in Aquaporin-4-Positive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *N Engl J Med*. 2019;381(7):614-25.
139. Kieseier BC, Stuve O, Dehmel T, Goebels N, Leussink VI, Mausberg AK, et al. Disease amelioration with tocilizumab in a treatment-resistant patient with neuromyelitis optica: implication for cellular immune responses. *JAMA Neurol*. 2013;70(3):390-3.
140. Levy M, Fujihara K, Palace J. New therapies for neuromyelitis optica spectrum disorder. *Lancet Neurol*. 2021;20(1):60-7.
141. Greco R, Bondanza A, Oliveira MC, Badoglio M, Burman J, Piehl F, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in neuromyelitis optica: a

registry study of the EBMT Autoimmune Diseases Working Party. *Mult Scler.* 2015;21(2):189-97.

142. Tugizova M, Vlahovic L, Tomczak A, Wetzel NS, Han MH. New Therapeutic Landscape in Neuromyelitis Optica. *Curr Treat Options Neurol.* 2021;23(4):13.

143. Zephir H, Fajardy I, Outteryck O, Blanc F, Roger N, Fleury M, et al. Is neuromyelitis optica associated with human leukocyte antigen? *Mult Scler.* 2009;15(5):571-9.

144. Kira J. Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol.* 2003;2(2):117-27.

145. Palace J, Leite MI, Nairne A, Vincent A. Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol.* 2010;67(8):1016-7.

146. Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, Hoffmann LA, Kumpfel T, Pellkofer H, et al. Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain.* 2008;131(Pt 6):1455-63.

147. Kirveskari J, Bono P, Granfors K, Leirisalo-Repo M, Jalkanen S, Salmi M. Expression of alpha4-integrins on human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2000;68(2):243-50.

148. Kitley J, Evangelou N, Kuker W, Jacob A, Leite MI, Palace J. Catastrophic brain relapse in seronegative NMO after a single dose of natalizumab. *J Neurol Sci.* 2014;339(1-2):223-5.

149. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-73.

150. Jensen P, Patel B, Smith S, Sabnis R, Kaboord B. Improved Immunoprecipitation to Mass Spectrometry Method for the Enrichment of Low-Abundant Protein Targets. *Methods Mol Biol.* 2021;2261:229-46.

151. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009;30(1):19-34.

152. Berger T, Reindl M. Antibody biomarkers in CNS demyelinating diseases - a long and winding road. *Eur J Neurol*. 2015;22(8):1162-8.
153. Yeo T, Probert F, Jurynczyk M, Sealey M, Cavey A, Claridge TDW, et al. Classifying the antibody-negative NMO syndromes: Clinical, imaging, and metabolomic modeling. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2019;6(6):e626.
154. Zhang N, Sun J, Wang Q, Qin W, Zhang X, Qi Y, et al. Differentiate aquaporin-4 antibody negative neuromyelitis optica spectrum disorders from multiple sclerosis by multimodal advanced MRI techniques. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;41:102035.
155. Hyun JW, Kim Y, Kim KH, Kim SH, Olesen MN, Asgari N, et al. CSF GFAP levels in double seronegative neuromyelitis optica spectrum disorder: no evidence of astrocyte damage. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):86.
156. Tzartos JS, Stergiou C, Kilidireas K, Zisimopoulou P, Thomaidis T, Tzartos SJ. Anti-aquaporin-1 autoantibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *PLoS One*. 2013;8(9):e74773.
157. Tuzun E, Tzartos J, Ekizoglu E, Stergiou C, Zisimopoulou P, Coban A, et al. Aquaporin-1 antibody in neuromyelitis optical patients. *Eur Neurol*. 2014;72(5-6):271-2.
158. Sanchez Gomar I, Diaz Sanchez M, Ucles Sanchez AJ, Casado Chocan JL, Suarez-Luna N, Ramirez-Lorca R, et al. Comparative Analysis for the Presence of IgG Anti-Aquaporin-1 in Patients with NMO-Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8).
159. Schanda K, Waters P, Holzer H, Aboulenein-Djamshidian F, Leite MI, Palace J, et al. Antibodies to aquaporin-1 are not present in neuromyelitis optica. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(6):e160.
160. Long Y, Zheng Y, Shan F, Chen M, Fan Y, Zhang B, et al. Development of a cell-based assay for the detection of anti-aquaporin 1 antibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neuroimmunol*. 2014;273(1-2):103-10.

161. Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, et al. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(3):288-97.
162. Berger B, Hottenrott T, Rauer S, Stich O. Screening for onconeural antibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders. *BMC Neurol*. 2017;17(1):5.
163. Chang SH, Wang J, Zhang X, Zhao N, Jia K, Yi M, et al. The prevalence of anti-neurofascin-155 antibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Clin Exp Immunol*. 2021;206(1):1-11.
164. Harrop SJ, DeMaere MZ, Fairlie WD, Reztsova T, Valenzuela SM, Mazzanti M, et al. Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44993-5000.
165. Littler DR, Harrop SJ, Fairlie WD, Brown LJ, Pankhurst GJ, Pankhurst S, et al. The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition. *J Biol Chem*. 2004;279(10):9298-305.
166. Goodchild SC, Howell MW, Cordina NM, Littler DR, Breit SN, Curmi PM, et al. Oxidation promotes insertion of the CLIC1 chloride intracellular channel into the membrane. *Eur Biophys J*. 2009;39(1):129-38.
167. Valenzuela SM, Mazzanti M, Tonini R, Qiu MR, Warton K, Musgrove EA, et al. The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle. *J Physiol*. 2000;529 Pt 3(Pt 3):541-52.
168. Ulmasov B, Bruno J, Oshima K, Cheng YW, Holly SP, Parise LV, et al. CLIC1 null mice demonstrate a role for CLIC1 in macrophage superoxide production and tissue injury. *Physiol Rep*. 2017;5(5).
169. Uretmen Kagiali ZC, Saner N, Akdag M, Sanal E, Degirmenci BS, Mollaoglu G, et al. CLIC4 and CLIC1 bridge plasma membrane and cortical actin network for a successful cytokinesis. *Life Sci Alliance*. 2020;3(2).
170. Averaimo S, Gritti M, Barini E, Gasparini L, Mazzanti M. CLIC1 functional expression is required for cAMP-induced neurite elongation in post-natal mouse retinal ganglion cells. *J Neurochem*. 2014;131(4):444-56.

171. Setti M, Savalli N, Osti D, Richichi C, Angelini M, Brescia P, et al. Functional role of CLIC1 ion channel in glioblastoma-derived stem/progenitor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(21):1644-55.
172. Gururaja Rao S, Patel NJ, Singh H. Intracellular Chloride Channels: Novel Biomarkers in Diseases. *Front Physiol.* 2020;11:96.
173. Domingo-Fernandez R, Coll RC, Kearney J, Breit S, O'Neill LAJ. The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1 β transcription and activate the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem.* 2017;292(29):12077-87.
174. Carlini V, Verduci I, Cianci F, Cannavale G, Fenoglio C, Galimberti D, et al. CLIC1 Protein Accumulates in Circulating Monocyte Membrane during Neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4).
175. Novarino G, Fabrizi C, Tonini R, Denti MA, Malchiodi-Albedi F, Lauro GM, et al. Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Neurosci.* 2004;24(23):5322-30.
176. Milton RH, Abeti R, Averaimo S, DeBiasi S, Vitellaro L, Jiang L, et al. CLIC1 function is required for beta-amyloid-induced generation of reactive oxygen species by microglia. *J Neurosci.* 2008;28(45):11488-99.
177. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-7.
178. Masvekar R, Wu T, Kosa P, Barbour C, Fossati V, Bielekova B. Cerebrospinal fluid biomarkers link toxic astrogliosis and microglial activation to multiple sclerosis severity. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;28:34-43.
179. Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B, et al. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(2):115-23.
180. Pauwels S, Jans I, Peersman N, Billen J, Vanderschueren D, Desmet K, et al. Possibilities and limitations of signal summing for an immunosuppressant LC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(20):6191-9.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SERONEGATİF NÖROMİYELITİS OPTİKA HASTALARINDA TANIMLANMAMIŞ ANTİJENİK HEDEFLERİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 4	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	Submitted to Koc University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
6	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Yüzüncü Yıl Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	livrepository.liverpool.ac.uk İnternet Kaynağı	<% 1
9	academic.oup.com İnternet Kaynağı	<% 1