

# Povezanost primjene cjepiva Pandemrix i incidencije narkolepsije tipa 1 s obzirom na učestalost alelne varijante HLA-DQB1\*06:02

---

Karuc, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:317986>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ivana Karuc**

**Povezanost primjene cjepiva Pandemrix i  
incidencije narkolepsije tipa 1 s obzirom na  
učestalost alelne varijante HLA-DQB1\*06:02**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura.

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura na stručnom savjetovanju, strpljenju i susretljivosti tijekom izrade ovog rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima za ljubav i bezuvjetnu podršku tijekom cijelog školovanja.*

*Hvala svim prijateljima i kolegama koji su ove studentske dane učinili nezaboravnima.*

*Posebna zahvala ide mojim curama sa Save. Hvala za svaki sladoled na krugovima, palačinke u čajnoj, đir po Jarunu, zagrijavanje za izlazak i gledanje filmova na projektoru u 5. paviljonu. Bez vas bi ovo bio samo smještaj, ali s vama je Dom.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	3
3. MATERIJALI I METODE.....	5
4. RASPRAVA.....	6
4.1. Narkolepsija	
4.1.1. Patofiziologija	
4.1.2. Etiologija	
4.1.3. Genetika i epigenetika	
4.1.4. Okolišni čimbenici	
4.1.5. Klinička slika	
4.1.6. Dijagnostika	
4.1.7. Terapija	
4.2. Cjepiva protiv influence A (H1N1) s AS03 adjuvansom	
4.3. Hipoteza o T-limfocitima posredovanoj etiologiji	
4.3.1. Ispitivanje križne reaktivnosti	
4.3.2. Hipoteza „dva pogotka“	
4.4. Uloga prirodne infekcije.....	
5. ZAKLJUČCI .....	24
6. POPIS KRATICA.....	25
7. LITERATURA .....	28
8. SAŽETAK / SUMMARY .....	35

# 1. UVOD

Narkolepsija je rijedak poremećaj hipotalamusa koji se manifestira disregulacijom ciklusa spavanja i buđenja (prekomjerna dnevna pospanost, katapleksija, halucinacije, paraliza sna) te motoričkim, kognitivnim, psihijatrijskim, metaboličkim i autonomnim poremećajima (Bassetti i sur., 2019). Najnovija, treća verzija Međunarodne klasifikacije poremećaja spavanja (engl. *International Classification of Sleep Disorders, ICSD-3*) razlikuje tip 1 i tip 2 narkolepsije. Narkolepsija tipa 1 (NT1) proizlazi iz međudjelovanja genskih i okolišnih čimbenika koji dovode do imunoposredovanog selektivnog gubitka ili disfunkcije oreksinskih neurona u lateralnom hipotalamusu. Pacijente s NT1 odlikuju katapleksija i snižena koncentracija oreksina (hipokretina) u cerebrospinalnoj tekućini (engl. *cerebrospinal fluid, CSF*). Kod narkolepsije tipa 2 (NT2) odsutan je simptom katapleksije, a koncentracija oreksina u CSF je unutar referentnog intervala ( $> 110 \text{ pg/mL}$ ) (Sateia, 2014.). Nadalje, NT1 je povezana s metaboličkim sindromom, pretilošću i psihosocijalnim smetnjama. Nekoliko lijekova, uključujući modafinil, natrijev oksibat, pitolisant, solriamfetol i metilfenidat, poboljšava narkoleptičke simptome kod većine bolesnika. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razumio klinički spektar narkolepsije, točna imunopatogeneza koja dovodi do gubitka oreksinskih neurona i nove terapijske mogućnosti poput agonista oreksina i imunomodulacije (Bassetti i sur., 2019).

Dvojna nomenklatura oreksin/hipokretin potječe iz paralelnog otkrića ovog hormonskog sustava od strane dvije različite istraživačke skupine (Sakurai i sur., 1998; de Lecea i sur., 1998). Prema trenutnim preporukama, koje se slijede u ovom radu, peptide treba imenovati nomenklaturom oreksina, dok geni slijede nomenklaturu hipokretina (HCRT za peptid i HCRTR1 i HCRTR2 za receptore) (Melén i sur., 2020).

Godine 2009. i 2010., nakon kampanje procjepljivanja protiv H1N1 tipa virusa influence A koji je uzrokovao pandemiju „svinjske gripe“, uočen je značajan porast u incidenciji narkolepsije i to u zemljama u kojima je korišteno cjepivo Pandemrix. To cjepivo je inaktivirani fragmentirani virion A/H1N1/pdm09 s AS03 adjuvansom. Proizvedeno je u Njemačkoj i korišteno tijekom pandemije diljem Europe. Uočena povećana incidencija NT1 uslijed cijepjenja Pandemrixom potaknula je istraživačke ambicije znanstvenika u svrhu produbljenja znanja o imunopatogenezi narkolepsije i generiranja dokaza koji podupiru hipotezu njezine autoimune etiologije (Buonocore i van der Most, 2022).

Ključno obilježje autoimunih bolesti je korelacija s alelnom varijantom sustava humanih leukocitnih antigena (engl. *human leukocyte antigen*, HLA). Molekule HLA klase II uključene su u regulaciju imunskog sustava, a eksprimiraju ih antigen-prezentirajuće stanice (engl. *antigen-presenting cells*, APC) koje prezentiraju antigene CD4+ T-limfocitima. Pojava NT1 usko je povezana s pozitivnošću za određene alele HLA-II, a neke alelne varijante djeluju kao protektivne, odnosno smanjuju rizik NT1. Dok su npr. HLA-DPA1 i DQB1\*06:03 protektivni aleli, DQB1\*06:02 smatra se genskim biljegom koji snažno predisponira za NT1 (Buonocore i van der Most, 2022). Međutim, relativno velika učestalost DQB1\*06:02 alelne varijante u populaciji (15 – 30 % generalne populacije) ukazuje na snažnu ulogu okolišnih čimbenika u ukupnoj etiologiji NT1, kao što su trauma, stres i prirodna infekcija *Streptococcus*-om ili virusom influence te cijepljenje protiv influence (Liblau, 2018).

Multidisciplinarni pristup problematici tijekom prethodnog desetljeća doveo je do proširenja i usavršavanja prvobitno postavljene hipoteze o potencijalnom temeljnom mehanizmu nastanka i progresije NT1. Iako dokazi nisu dostatni za donošenje definitivnih zaključaka, nastali mehanistički model nudi koherentno tumačenje povezanosti cijepljenja Pandemrixom i NT1 (Buonocore i van der Most, 2022).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nakon kampanje procjepljivanja protiv H1N1 tipa virusa influence A koji je uzrokovao pandemiju „svinjske gripe“, 2009. i 2010. godine uočen je značajan porast u incidenciji NT1 u zemljama u kojima je korišteno cjepivo Pandemrix (Buonocore i van der Most, 2022).

Unatoč prividnoj neaktualnosti teme, bitno je istaknuti da je povećana incidencija narkolepsije, uslijed primjene cjepiva Pandemrix, uvelike uvjetovala javno mnijenje o cjepivu propisanom tijekom pandemije SARS-CoV-2 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) te poljuljala povjerenje ljudi zbog ubrzanog postupka dolaska cjepiva na tržište uslijed pandemijskih uvjeta. Navedeno je uzrokovalo otpor javnosti prema COVID-19 (engl. *coronavirus disease 2019*) cjepivu ([www.medicalxpress.com](http://www.medicalxpress.com)), pogotovo u skandinavskim zemljama gdje je velika zastupljenost alelne varijante HLA-DQB1\*06:02, koja predisponira narkolepsiju, a slijedom toga i velika incidencija Pandemrix-povezane narkolepsije (Bomfim i sur., 2017). Vrijedi nadodati kako je, ne samo korelacija incidencije NT1 s primjenom cjepiva Pandemrix, već i sama patogeneza NT1 dandanas tema intenzivnih istraživanja te još uvijek nije definitivno dokazano da je NT1 autoimuna bolest, mada su dokazi nepobitno uvjerljivi (Buonocore i van der Most, 2022).

Iako se cjepivo Pandemrix više ne koristi i svim serijama Pandemrixa je sada istekao rok trajanja, Globalni savjetodavni odbor za sigurnost cjepiva (engl. *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*, GACVS) smatra da treba nastaviti istraživanja kako bi se bolje opisali mogući patofiziološki mehanizmi korelacije povećane incidencije narkolepsije i primjene cjepiva Pandemrix. Razumijevanje okidača i uzroka ove korelacije od ključne je važnosti jer će biti potrebna nova cjepiva za zaštitu od budućih pandemija ([www.who.int](http://www.who.int)).

Ponovno izbijanje zaraze H1N1 virusom influence nije bilo ni isključivo zbog kvaziciklične odlike pojava epidemija, a sumnje su potvrđene 30. lipnja 2020. kad su znanstvenici u Kini otkrili novi soj H1N1 influence („svinjske gripe“), zvan *genotype 4 (G4) reassortant Eurasian avian-like (EA) H1N1 virus (G4 EA H1N1)*. Predviđa se da će buduće mutacije G4 EA H1N1 virusa poboljšati njihovu adaptaciju na ljudske stanice, pogotovo kod zaposlenika u mesnoj industriji. Stoga se predlaže nadziranje zdravstvenog stanja ovih radnika i ubrzana istraživanja u vidu novog cjepiva, zahvaljujući neolakotnoj okolnosti da trenutno dostupna tri- i četirivalentna sezonska cjepiva protiv influence ne pružaju adekvatnu zaštitu protiv G4 EA H1N1 virusa (Shaikh i sur., 2021).

Slijedom toga, jasno je kako treba olakšati već dovoljno opterećenom zdravstvenom sustavu tražeći rješenja za nadolazeće epidemije, a prvi korak je prikupiti informacije o već dostupnim cjepivima.

Ciljevi ovog diplomskog rada su opisati kliničku sliku narkolepsije te genske i okolišne čimbenike koji utječu na razvoj bolesti, a fokus rada leži u patofiziologiji NT1 s naglaskom na autoimunu komponentu NT1, ulogu alelne varijante HLA-DQB1\*06:02 u patogenezi NT1, križnu reaktivnost hemaglutinina (HA) s oreksinom u hipotalamusu te molekularnu mimikriju uslijed povećane propusnosti krvno-moždane barijere (KMB). Također, cilj je objasniti hipotezu „*dva pogotka*“ koja objašnjava povezanost porasta incidencije narkolepsije s primjenom cjepiva Pandemrix te naglasiti važnost međunarodno koordinirane mreže ispitivanja sigurnosti cjepiva.



### **3. MATERIJALI I METODE**

Ovaj diplomski rad je teorijskog karaktera te su provedena istraživanja uključivala pregled stručne i znanstvene literature na temu narkolepsije i cjepiva Pandemrix s naglaskom na imunopatogenezu bolesti. Pregled literature proveden je elektroničkim putem. Pretraživane su baze podataka PubMed i ScienceDirect, znanstveni radovi i članci. Od ključnih pojmova korištene su pojedinačno i u kombinaciji riječi narkolepsija, Pandemrix, H1N1, influenza, HLA-DQB1\*06:02, oreksin, hipokretin itd. U ovaj pregledni diplomski rad uključeno je 77 literaturnih navoda.

## 4. RASPRAVA

### 4.1. Narkolepsija

U posljednjih 20 godina postignut je značajan napredak u razumijevanju kliničke slike, etiologije, patofiziologije, dijagnostike i liječenja narkolepsije. Utvrđeno je i nekoliko biomarkera, uključujući polisomnografske nalaze REM (engl. *rapid eye movement sleep*) faza na početku sna (engl. *sleep onset REM period*, SOREMP), pozitivnost na alelnu varijantu HLA-DQB1\*06:02 i koncentraciju oreksina u CSF. Ovi biomarkeri poboljšali su dijagnostičku točnost i otvorili prostor za dodatna istraživanja (Bassetti i sur., 2019).

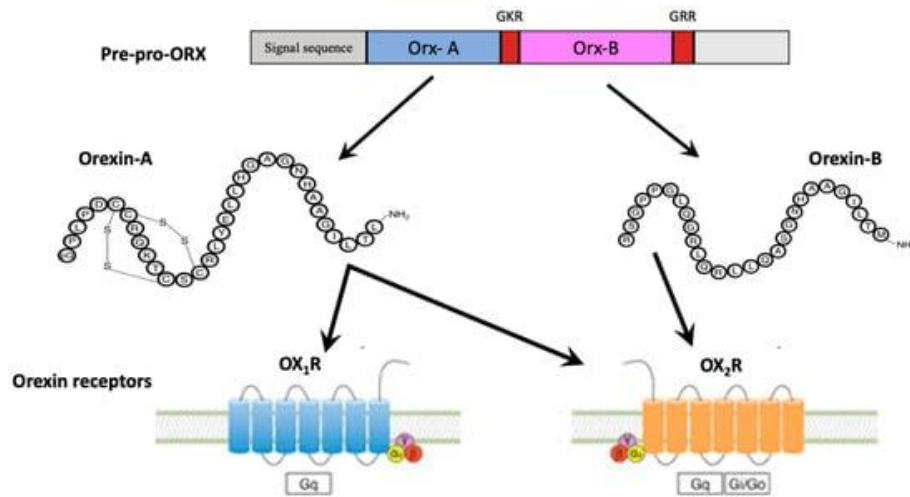
Procjenjuje se da prevalencija narkolepsije u Europi i Sjevernoj Americi iznosi 200 - 500 na milijun stanovnika. U svijetu se po prevalenciji ističe Japan s 1600 oboljelih na milijun stanovnika, a najmanje se pojavljuje kod židovske i arapske populacije (2 – 40 / milijun stanovnika). Varijacija među populacijama posljedica je međudjelovanja genskih i okolišnih čimbenika (Bassetti i sur., 2019).

Dokazi iz ranih 1980-ih, koji su sugerirali na povezanost HLA sustava s narkolepsijom, upućivali su na imunosnu podlogu patogeneze. Uočene niske koncentracije oreksina u CSF, a nedugo zatim i selektivna destrukcija oreksinskih neurona u lateralnom hipotalamusu, potaknuli su hipotezu da su te stanice cilj navedenog imunosnog procesa (Bassetti i sur., 2019).

#### 4.1.1. Patofiziologija

Oreksin A i oreksin B su mali neuropeptidi koji pobuđuju ciljne neurone preko G-protein spregnutih oreksinskih receptora tipa 1 i 2 (HCRT1R i HCRT2R). Oreksin B veže se za HCRT2R, a oreksin A za HCRT1R i HCRT2R. Oreksinski neuroni u lateralnom hipotalamusu sintetiziraju preprooreksin, prekursor dug 131 aminokiselinu (AK). Oreksini nastaju kidanjem preprooreksina pri čemu nastaju 33-AK dugi oreksin A i 28-AK dugi oreksin B. Dok je oreksin B linearni peptid, oreksin A ima dva disulfidna mosta, Cys6-Cys12 i Cys7-Cys14, koji su uzrok dužeg poluvremena života u odnosu na oreksin B. Oreksin A i B zatim prolaze posttranslacijsku modifikaciju amidaciju na C-terminalnom kraju koja je ključna za njihovu biološku aktivnost. Amidacija omogućuje vezanje oreksina za receptore, a rezultirajući postreceptorski signalni putevi dovode do interakcija koje sudjeluju u regulaciji kognitivnih funkcija i stanja budnosti, ali i apetita te sustava nagrade i motivacije (Ball i sur., 2023). Disfunkcija ovog ključnog sustava

remeti interakciju neuralnih mreža frontalnog režnja, limbičkog sustava, diencefalona i moždanog debla te se sukladno tome očituje karakterističnim simptomima narkolepsije kao što su prekomjerna dnevna pospanost, katapleksija, paraliza sna s halucinacijama, sindrom nemirnih nogu, anksiozno - depresivni poremećaj, poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću te autonomni i metabolički simptomi (Bassetti i sur., 2019).



**Slika 1.** Oreksini i njihovi receptori

(preuzeto iz Villano i sur., (2022) uz dopuštenje izdavača)

Oreksinski neuroni obilno inerviraju moždane regije koje potiču budnost, kao što su noradrenergički neuroni locusa coeruleusa, dopaminergički neuroni u ventralnom tagmentalnom polju, histaminergički neuroni tuberomamilarne jezgre i kolinergički neuroni bazalnog prozencefalona (prednjeg mozga). Oreksin ima tu osobitost da, za razliku od klasičnih kratkodjelujućih neurotransmitera, dugotrajno pobuđuje ciljne neurone. Naime, intraventrikularna injekcija oreksina A potiče budnost u roku od nekoliko sati od administracije. Slijedom toga, gubitak oreksinskih neurona rezultira gubitkom konstantnosti lučenja, a to se očituje pretjeranom dnevnom pospanošću (engl. *excessive daytime sleepiness*, EDS) i kratkom latencijom spavanja (Bassetti i sur., 2019).

Tijekom REM faze inhibitorni interneuroni kralježnične moždine, koji stvaraju gama-aminomaslačnu kiselinu (engl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA) i glicin, hiperpolariziraju motorne neurone i tako potiču atoniju mišića, a te inhibitorne interneurone aktiviraju glutamatergični neuroni sublaterodorzalne jezgre. Nasuprot tome, tijekom budnosti i NREM (engl. *non-rapid eye movement*) faze neurone sublaterodorzalne jezgre inhibiraju neuroni ventrolateralne periakveduktalne sive tvari (PAG) i susjednog lateralnog pontinog tegmentuma (LPT) te serotoninergični neuroni dorzalne raphe jezgre (DRN), dok tijekom REM faze ti



### 4.1.2. Etiologija

Danas je na snazi hipoteza „dva pogotka“. Podrazumijeva utjecaj okolišnih čimbenika i okidača uz istovremenu gensku predispoziciju koji zajedno dovode do imunoposredovanog selektivnog uništavanja neurona koji proizvode oreksin. Autopsije pacijenata koji su bolovali od narkolepsije pokazali su selektivni gubitak 75 – 95 % (medijan 90 %) od ograničenog broja oreksinskih neurona koji je u rasponu 50 000 - 70 000 (Valko i sur., 2013). Moguće je i da su, zbog smanjene ekspresije oreksina, neki od ovih neurona nedetektibilni, ali ne i nepovratno uništeni. Na selektivnost nam upućuje činjenica da nisu zahvaćeni ostali neuroni lateralnog hipotalamusa kao što su neuroni koji luče melanin-koncentrirajući hormon (engl. *melanin-concentrating hormone*, MCH). Moždano tkivo pokazalo je pojačanu gliozu, ali bez neurodegenerativnih i proinflamatornih promjena (Honda i sur., 2009).

### 4.1.3. Genetika i epigenetika

Narkolepsija je usko povezana s regijom gena HLA klase II (DP, DQ i DR) koja kodira za MHC (engl. *major histocompatibility complex*) II molekule. APC eksprimiraju MHC II molekule i na taj način prezentiraju prethodno ingestirane antigene CD4+ T-limfocitima. Istraživanja su pokazala da je 95 – 98 % NT1 pacijenata pozitivno na HLA-DQB1\*06:02 alel, što uključuje homozigote i heterozigote, te da DQB1\*06:02 homozigotnost (nasuprot heterozigotnosti) značajno povećava rizik (Buonocore i van der Most, 2022). Uočena je i poveznica incidencije narkolepsije s genima HLA klase I (A, B i C) koji kodiraju za molekule MHC I. Pomoću MHC I stanice prezentiraju vlastite antigene CD8+ T-limfocitima. Povezanost s HLA klasom I navodi nas na zaključak da su u imunopatogenezu narkolepsije uključeni i citotoksični mehanizmi. Na animalnom modelu dokazano je da su citotoksični (CD8+ T-limfociti) uzrokovali selektivni gubitak oreksinskih neurona. Naime, i oreksinski neuroni, kao i sve stanice osim eritrocita, eksprimiraju MHC I molekule (Tafti i sur., 2016).

Nekoliko non-HLA gena također povezujemo s rizikom od narkolepsije. Primjeri su: karnitin palmitoil transferaza 1B (engl. *carnitine palmitoyl transferase 1B*, CPT1B),  $\alpha$ -lanac receptora T-limfocita (engl. *T-cell receptor  $\alpha$  chain*, TRA), kolin kinaza (engl. *choline kinase*, CHKB), katepsin H (engl. *cathepsin H*, CTSH), purinergički receptor 2Y11 (engl. *purinergic receptor subtype 2Y11*, P2RY11), ligand za član 4 superobitelji receptora čimbenika tumorske nekroze (engl. *tumour necrosis factor ligand superfamily member 4*, TNFSF4) itd. (Sarkanen i sur., 2018).

CPT1B je enzim koji određuje brzinu biokemijske reakcije  $\beta$ -oksidacije dugolančanih masnih kiselina. Pomoću CPT1B iz dugolančanog acil-koenzima A nastaje dugolančani acilkarnitin koji može ući u mitohondrij gdje se odvija  $\beta$ -oksidacija (Partinen i sur., 2014). Miyagawa i sur. (2011) mjerili su koncentracije acilkarnitina u serumu pacijenata s NT1 i kontrolnih ispitanika. Razine acilkarnitina bile su zamjetno niske u otprilike 20 % slučajeva pacijenata, a u kontrolnoj skupini su bile unutar referentnog intervala. Ovi podaci sugeriraju da  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina može biti promijenjena u NT1, a mišji modeli podržavaju ovu hipotezu. Miševi s juvenilnom visceralnom steatozom (JVS) pokazuju primarni nedostatak karnitina zbog smanjene reapsorpcije u bubrežnim tubulima, a njihovi simptomi se pogoršavaju tijekom posta. Kod ispitivanja miševa s JVS koji poste uočena je fragmentirana budnost i smanjena lokomotorna aktivnost, a oba simptoma bila su uklonjena primjenom modafinila. Kuwajima i sur. (2007) sugerirali su da L-karnitin suprimira utjecaj JVS na smanjenje ekspresije gena za oreksin. Stoga su Romigi i sur. (2015) proveli kliničko istraživanje u kojem su NT1 pacijenti oralno uzimali L-karnitin. Iako je testnu skupinu činilo samo 30 ljudi te iz toga ne možemo povlačiti statistički relevantne zaključke, pokazano je znatno poboljšanje simptoma u odnosu na placebo skupinu. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika kroz duži period kako bi se utvrdila učinkovitost suplementacije L-karnitinom u liječenju narkolepsije.

Osim poznatih predisponirajućih genskih obilježja i okolišnih okidača usko povezanih s narkolepsijom, zabilježena je i korelacija s titrom anti-Tribbles homolog 2 (anti-TRIB2) i antigangliozidnih antitijela te antitijela na neuronske strukture i neurotransmitere (Häggmark-Månberg i sur., 2016). Tribbles homolog 2 regulira aktivaciju mitogenom aktivirane proteinske kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i na taj način sudjeluje u regulaciji staničnog rasta i proliferacije (www.uniprot.org). Novodijagnosticirani NT1 pacijenti pokazali su statistički značajno povećanje koncentracije anti-TRIB2 antitijela u odnosu na kontrolnu skupinu te je, sukladno tome, očekivano da ta antitijela uzrokuju selektivno uništavanje oreksinskih neurona (Lind i sur., 2014). Međutim, pokazano je da uslijed destrukcije oreksinskih neurona raste koncentracija anti-TRIB2 antitijela, odnosno ispostavilo se da porast koncentracije anti-TRIB2 antitijela nije uzrok, već posljedica uništenja oreksinskih neurona u NT1 (Tanaka i sur., 2017).

Antigangliozidna antitijela povezujemo s progresivnim neurološkim bolestima poput Guillain-Barréovog sindroma. Saariaho i sur. (2015) uočili su povećane koncentracije anti-GM3 antitijela (engl. *anti-monosialodihexosylganglioside antibodies*) kod djece i adolescenata s Pandemrix-povezanim narkolepsijom. Nije u potpunosti razjašnjena uloga anti-gangliozidnih

antitijela u patogenezi narkolepsije, ali nameće se stajalište da, kao i anti-TRIB2 antitijela, nastaju kao posljedica neuronalnog oštećenja.

Epigenetika je područje s progresivno rastućim interesom znanstvene javnosti, a bavi se istraživanjem nasljednih promjena u genskoj ekspresiji bez promjena u slijedu nukleotida. Zbog složene interakcije s okolišnim čimbenicima i genskim varijacijama, epigenetske promjene pridonose etiologiji kompleksnih bolesti kao što je narkolepsija. DNA metilacija je glavni i najčešće istraživani epigenetski mehanizam. Zahvaljujući razvoju DNA-chip tehnologije, moguće je uočiti obrasce metilacije karakteristične za određenu bolest. Shimada i sur. (2018) proveli su epigenomsku asocijacijsku studiju (engl. *epigenome-wide association study*, EWAS) DNA metilacije u narkolepsiji s ciljem definiranja lokusa čija je metilacija ključna u patogenezi. Budući da EWAS rezultati nisu bili dostatni za donošenje zaključaka, integrativni pristup u kombinaciji s rezultatima prethodno provedene cjelogenomske asocijacijske studije (engl. *genome-wide association study*, GWAS) pomogao im je u identifikaciji diferencijalno metiliranih pozicija (engl. *differentially methylated positions*, DMP), a DMP su potom rangirani prema statističkoj i kliničkoj značajnosti za narkolepsiju. Zaključci istraživanja su da najviše rangirani DMP sudjeluju u regulaciji lučenja hormona te u biokemijskim putevima metabolizma monokarboksilnih kiselina, da su puno brojniji u ne-CpG regijama i da je više od 95 % takvih mjesta hipometilirano kod pacijenata koji boluju od narkolepsije. Integrativni pristup GWAS i EWAS prikazao je gensku regiju CCR3 kao kandidata s visokom značajnošću za narkolepsiju. CCR3 genska regija kodira receptor 3 za CC tip kemokina koji sudjeluje u regrutaciji leukocita i ostalih upalnih stanica u središnji živčani sustav. To dodatno podupire autoimunu hipotezu etiologije narkolepsije.

#### **4.1.4. Okolišni čimbenici**

Podudarnost kod jednojajčanih blizanaca iznosi tek 25 %, što nas navodi na pretpostavku da okolišni čimbenici igraju veliku ulogu u etiologiji narkolepsije. Čimbenici iz okoliša koje najčešće povezujemo s narkolepsijom su infekcija *Streptococcus pyogenes*-om i H1N1 influencom, cijepivo protiv H1N1 influence te traumatske ozljede glave s posljedicom oštećenja KMB (Bassetti i sur., 2019).

Populacijske epidemiološke studije pokazale su da je rizik narkolepsije povećan 5,4 puta za osobe s poviješću orofaringealne streptokokne infekcije (Koepsell i sur., 2010), a na isti nas zaključak dovodi podatak da su anti-streptolizinska antitijela prisutna u 65 % pacijenata koji boluju od narkolepsije (Aran i sur., 2009). Pretpostavljeni mehanizam utjecaja streptokokne

infekcije na razvoj narkolepsije jest da superantigeni, koji su jedan od temeljnih čimbenika virulencije *Streptococcus*-a, unakrsno povezuju (engl. *cross-linking*) beta lanac receptora T-stanica (engl. *T-cell receptor*, TCR) i alfa lanac MHC i na taj način potiču autoimuni odgovor. Streptokokna infekcija može i nespecifično povećati rizik za narkolepsiju tako što uzrokuje generaliziranu aktivaciju imunskog sustava (engl. *bystander activation*) i povećanu propusnost KMB prema autoreaktivnim T-limfocitima, prouzrokovanu proupalnim stanjem i vrućicom (Dye i sur., 2018).

Nakon pandemije influence H1N1 2009. - 2010. godine, *Swedish Medical Products Agency* zabilježila je porast rizika od narkolepsije za 6 - 9 puta kod djece stanovnika skandinavskih zemalja gdje je korišteno cjepivo Pandemrix (Sarkanen i sur., 2018). Nadalje, unatoč tome što Kina nije organizirala kampanju masovnog procjepljivanja, Han i sur. (2011) utvrdili su da se u Kini incidencija trostruko povećala, sugerirajući da sama infekcija H1N1, neovisno o cjepivu, može biti okidač patofizioloških promjena koje dovode do narkolepsije. Znanstveni rad iz područja imunologije (Luo i sur., 2018) predložio je mogućnost da je uzrok autoimunog procesa, koji pogađa oreksinske neurone, mehanizam molekularne mimikrije zbog križne reaktivnosti oreksina (ali isključivo amidiranog i time biološki aktivnog) i glikoproteina HA H1N1 virusa. Nadalje, kao i kod streptokokne infekcije, nespecifična generalizirana aktivacija imunskog sustava uslijed upale dodatno pridonosi citotoksičnosti i neuralnom oštećenju koji rezultiraju narkolepsijom (Sarkanen i sur., 2018).

#### **4.1.5. Klinička slika**

Zahvaljujući svojoj hipotalamičkoj etiologiji, narkolepsija se prezentira kroz široki spektar kliničkih manifestacija u okviru ciklusa spavanje - budnost, ali i motoričkih, psihijatrijskih, emocionalnih, kognitivnih, metaboličkih i autonomnih simptoma (Bassetti i sur., 2019).

Pretjerana dnevna pospanost (EDS) vodeći je simptom, a prezentira se kroz česte nekontrolirane napade spavanja i fragmentaciju sna te poteškoće u održavanju pažnje. Epizode napadaja sna većinom nastupaju prilikom monotonih aktivnosti (npr. gledanje televizije, učenje, čitanje), ali se također mogu pojaviti i kad su pacijenti aktivni i obavljaju složene radnje. Više od 60 % pacijenata javlja se s kroničnim umorom, koji moramo razlučiti od EDS-a. Za razliku od EDS-a, umor je vrlo rezistentan na terapiju. Osim toga, kronični umor može pogoršati simptome EDS-a jer smanjuje dnevnu aktivnost koja je glavna mjera u borbi protiv EDS-a (Bassetti i sur., 2019).



Katapleksija je jedini specifični simptom NT1, a odnosi se na iznenadne kratke epizode bilateralnog gubitka mišićnog tonusa. Manifestira se kroz mlohavost lica i vilice, sklapanje kapaka, dizartriju i bilateralni gubitak motoričke kontrole ekstremiteta. Većinom se javlja uslijed okidača, iznenadnih emocionalnih reakcija. Zanimljivo je da su okidači katapleksije češće povezani s pozitivnim nego negativnim emocijama. Primjerice, strah, ljutnja i bol vrlo će rijetko uzrokovati ovaj simptom, dok je najtipičniji okidač smijanje. Napadaji su kratki (2 - 10 sekundi) ili do prestanka trajanja okidača. Svijest, pokretljivost oka i disanje obično su očuvani tijekom napadaja katapleksije (Bassetti i sur., 2019).

Paraliza sna nastupa, obično u kombinaciji s halucinacijama, u 50 – 60 % pacijenata, i to na početku sna (hipnagogične halucinacije), pri buđenju (hipnopompične) te tijekom dnevnih drijemeža. Paraliza sna opisuje nemogućnost govora i voljnog pomicanja mišića te se obično javlja tijekom tranzicija spavanje - budnost. Napadaji paralize sna obično su popraćeni respiratornim distresom i većinom vizualnim halucinacijama, iako su u do čak 85 % slučajeva halucinacije popraćene drugim osjetima poput sluha, mirisa i okusa (Bassetti i sur., 2019). Nadalje, noćne more i lucidno sanjanje češće su kod pacijenata koji boluju od narkolepsije u odnosu na generalnu populaciju (Dodet i sur., 2015).

Narkolepsija je povezana s nizom psihijatrijskih i kognitivnih simptoma. Čak 20 – 30 % pacijenata boluje od anksiozno - depresivnog poremećaja (Ruoff i sur., 2017). Pacijenti imaju smanjenu kvalitetu života te je kod njih zabilježena veća stopa prometnih nesreća i ozljeda u odnosu na zdravu populaciju (Pizza i sur., 2015). Na animalnim modelima pokazano je da je u narkolepsiji prisutna primarna disfunkcija centra za nagradu u mozgu, budući da oreksin utječe na njegovu funkciju. Velik broj psihijatrijskih simptoma povećava psihosocijalni teret pacijenata. Od kognitivnih simptoma, pacijenti se susreću s poremećajem pozornosti s hiperaktivnošću (engl. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD), poteškoćama u donošenju odluka i održavanju pažnje te općenito smanjenim kognitivnim sposobnostima. Ti simptomi zajedno rezultiraju nezadovoljavajućom performansom na poslu i u školi što dodatno pridonosi psihosocijalnom teretu (Bassetti i sur., 2019).

Kod pacijenata su uočeni poremećaji u prehrani i usporen metabolizam. Incidencija pretilosti (osobe s indeksom tjelesne mase (engl. *body mass indeks*, BMI) > 30 kg/m<sup>2</sup>) je dvostruko veća, a BMI je 10 – 20 % veći u odnosu na zdravu populaciju (Rocca i sur., 2015). Paradoksalno, pacijenti pokazuju smanjen apetit i unos hrane zahvaljujući deficitu oreksina. Naime, oreksinski neuroni su pod utjecajem hormona adipokina koji reguliraju apetit. Grelin i niska koncentracija glukoze u krvi aktiviraju, a leptin inhibira lučenje oreksina. Slijedom toga zaključeno je da oreksinski neuroni opažaju metabolički i nutritivni status te potiču adekvatnu

želju za hranom kako bi zadovoljili potrebe organizma za energijom. Kod NT1 ovaj homeostatski proces može biti narušen zbog deficita oreksina uslijed uništavanja neurona koji ga izlučuju te je slijedom toga kod pacijenata smanjena želja za hranom. Evolucijski gledano, uslijed niske energije i potrebe za hranom, budnost i motivacija za kretanjem uzrokovana djelovanjem oreksina izuzetno je korisna u lovu na hranu (Straat i sur., 2020). Na modelu štakora, oreksin potiče lokomotornu aktivnost koja je ključni dio potrage za hranom (Samson i sur., 2010). To nas navodi na zaključak da je manjak oreksina, prisutan u NT1 pacijenata, uzrok smanjenja fizičke aktivnosti. Međutim, smanjenje lokomotorne aktivnosti ne objašnjava u potpunosti kilažu stečenu uslijed nastupa bolesti, već se smatra da se uzrok energijskog deficita krije u metabolizmu (Straat i sur., 2020). Donjacour i sur. (2014) pokazali su da NT1 pacijenti imaju nižu serumsku koncentraciju glicerola u odnosu na zdrave kontrole, što upućuje na smanjenu stopu lipolize u adipocitima. S druge strane, inzulinska osjetljivost pokazala se nepromijenjenom u usporedbi sa zdravom populacijom.

Od autonomnih simptoma, kod pacijenata su zabilježene nesvjestice, probavne smetnje, noćno preznojavaње, hipotenzija, erektilna disfunkcija, suhoća usta, palpitacije, valunzi te abnormalni pokreti zjenica (Plazzi i sur., 2011). Smatra se da je podloga ovih promjena hipotalamohipofizna disfunkcija što bi također moglo objasniti povećanu stopu preuranjenog puberteta (Rocca i sur., 2015).

#### **4.1.6. Dijagnostika**

Zbog nespecifičnih simptoma narkolepsije, pacijenti su često nedijagnosticirani te je prosječni interval od početka simptoma do dijagnoze čak 14 godina (Luca i sur., 2013). Dijagnostika predstavlja poseban izazov u pedijatrijskoj populaciji zbog neobične prezentacije katapleksije i pretjerane dnevne pospanosti te zbog oskudnog iskustva mjerenja oreksina u dječjoj CSF (Bassetti i sur., 2019).

Prema smjernicama ICSD-3 za dijagnostiku narkolepsije preporučuju se upitnici o spavanju, polisomnografija, višestruki test latencije spavanja (engl. *multiple sleep latency test*, MSLT) te mjerenje oreksina u CSF (Sateia, 2014), a mogu biti korisne i slikovne metode poput magnetske rezonance jer pomažu utvrditi neuronske mreže u podlozi katapleksije pokazujući promijenjene obrasce aktivnosti u hipotalamusu te u kortikolimbičkim i trunkalnim centrima za nagradu (Meletti i sur., 2015).

Eliminacijski kriterij je prosječan broj sati spavanja tijekom 2 tjedna. Ako je on manji od 6, razmatraju se druge dijagnoze. Nakon što se utvrdi da je taj broj veći od 6, prvi korak je

polisomnografija da se eliminiraju druge bolesti spavanja poput apneje. Mjeri se moždana aktivnost, saturacija kisikom, rad srca, tonus mišića i disanje te pokreti očiju i nogu. Slijedi MSLT koji se izvodi tako da se tijekom 2 sata pacijentu pruža prilika za 4 - 5 drijemeža u trajanju od 20 minuta ([www.ninds.nih.gov](http://www.ninds.nih.gov)). Pozitivan test pokazat će SOREMP minimalno 2 puta tijekom testa, a SOREMP se definira kao nastup REM faze unutar 15 minuta od početka spavanja. Druga mogućnost za pozitivnost ovog dijagnostičkog kriterija jest jedan SOREMP na polisomnogramu i jedan u MSLT-u. Na pozitivan test ukazuje i smanjena prosječna latencija spavanja (vrijeme potrebno za zaspati) ispod 8 minuta. Ako je MSLT negativan, ali postoji opravdana klinička sumnja na narkolepsiju, potrebno je ponoviti test (Sateia, 2014). Kao potvrdni dijagnostički test koristi se radioimunokemijska metoda (engl. *radioimmunoassay*, RIA) za mjerenje oreksina u CSF. Možemo postaviti dijagnozu narkolepsije ako je koncentracija oreksina u CSF  $\leq 110$  pg/mL ili  $< 1/3$  prosječne vrijednosti oreksina u referentnoj (zdravoj) populaciji mjerene istom metodom (RIA) (Bassetti i sur., 2019). I<sup>125</sup> RIA trenutno je zlatni standard za mjerenje oreksina u CSF. Međutim, zbog interferencije matriksa i nezadovoljavajuće preciznosti i točnosti pretrage, ali i u cilju zamjene nuklearnomedicinskih pretraga alternativama, Hirtz i sur. (2016) predložili su masenu spektrometriju koja se temelji na istovremenom praćenju više specifičnih prijelaza (engl. *multiple reaction monitoring*, MRM) te su zaključili kako ova pretraga predstavlja budućnost kvantifikacije oreksina u CSF.

Uz svakodnevne nekontrolirane epizode pospanosti i utonuća u san tijekom minimalno 3 mjeseca, za dijagnozu NT1 potrebna je smanjena koncentracija oreksina ( $\leq 110$  pg/mL ili  $< 1/3$  prosječne vrijednosti oreksina u referentnoj (zdravoj) populaciji mjerene istom radioimunokemijskom metodom) i/ili katapleksija (definirana kao više od 1 epizode većinom kratkog ( $< 2$  min) bilateralno simetričnog gubitka mišićnog tonusa u stanju svijesti), smanjena latencija spavanja ( $\leq 8$  min) te najmanje dva SOREMP-a u MSLT-u (ili jedan u MSLT-u, a jedan na polisomnogramu). Dijagnoza NT2 podrazumijeva iste dijagnostičke kriterije s jednakim *cut-off* vrijednostima uz iznimku katapleksije, koja mora biti odsutna, te koncentracije oreksina u CSF koja kod NT2 mora biti iznad referentne vrijednosti. Ako se kasnije razvije katapleksija ili koncentracija oreksina smanji ispod referentne vrijednosti, bolest se treba reklasificirati iz NT2 u NT1 (Sateia, 2014).

#### **4.1.7. Terapija**

Optimalna terapija narkolepsije podrazumijeva kombinaciju farmakoloških i nefarmakoloških mjera. U nefarmakološke mjere ubrajamo fizičku aktivnost, adekvatan unos

kofeina, balansiranu dijetu bez povećanog unosa ugljikohidrata te psihoterapiju (Filardi i sur., 2018). Farmakološke mjere podrazumijevaju simptomatsku terapiju, prvenstveno u svrhu poboljšanja vodećih simptoma poput pretjerane dnevne pospanosti i katapleksije, ali i drugih simptoma, npr. halucinacija. Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) je kao prvu liniju liječenja pretjerane dnevne pospanosti odobrila modafinil te racemičnu smjesu armodafinila (R-enantiomer) i L-enantiomera. Armodafinil ima duže poluvrijeme eliminacije, ali oba enantiomera potiču dopaminergičnu transmisiju (Kallweit i Bassetti, 2017). Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) je za navedenu indikaciju odobrila modafinil i armodafinil te solriamfenitol, selektivni inhibitor ponovne pohrane dopamina i noradrenalina (engl. *norepinephrine-dopamine reuptake inhibitor*, NDRI) (Thorpy i sur., 2019) i pitolisant, H3-inverzni agonist (Szakacs i sur., 2017).

Osim u liječenju pretjerane dnevne pospanosti, pitolisant pokazuje dobre učinke i u liječenju simptoma katapleksije te je odobren od strane EMA-e za tu indikaciju (Szakacs i sur., 2017). Klomipramin i imipramin u niskoj dozi kao i selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI) poput venlafaksina i fluoksetina mogu olakšati katapleksiju u roku od nekoliko dana, ali nisu odobreni u toj indikaciji (Jin i sur., 2019). Kao prvu liniju liječenja EMA i FDA odobrili su natrijev oksibat, kojem je potrebno 3 - 6 mjeseci za maksimalni učinak (Bogan i sur., 2015), a jedini je lijek s dokazanim dugoročnim pozitivnim učinkom na noćni san (Roth i sur., 2017) i također je jedini lijek odobren u ovoj indikaciji kod djece (Plazzi i sur., 2018). Nadalje, uz venlafaksin i klomipramin dokazano smanjuje pojavu halucinacija (Kallweit i Bassetti, 2017).

Budući da je za sada dostupna samo simptomatska terapija, ključno je potaknuti istraživanja u smjeru terapija koje mijenjaju tijek bolesti (engl. *disease modifying therapy*). Imunomodulatori poput *i.v.* imunoglobulina i humaniziranih monoklonskih antitijela (Dauvilliers i sur., 2009) te plazmafereza (Chen i sur., 2005) i visoke doze kortikosteroida (Adams i sur., 2023) pokazali su zadovoljavajuće rezultate u malim studijama, a natalizumab i alemtuzumab su se pokazali uspješnima na pojedinačnim pacijentima (Donjacour i Lammers, 2012). Potrebne su randomizirane kontrolirane kliničke studije kako bi se postavili čvrsti dokazi i eliminirao *bias* uzrokovan placebom i spontanom poboljšanjem simptoma narkolepsije.

#### **4.2. Cjepiva protiv influence A (H1N1) s AS03 adjuvansom**

Cjepivo protiv influence A (H1N1)/pdm09 s AS03 adjuvansom (Pandemrix) proizvedeno je u GlaxoSmithKline Biologicals u Dresdenu u Njemačkoj i bilo je najviše

korišteno u Europi tijekom pandemije influence A H1N1 2009. godine, kolokvijalno nazvane pandemija „svinjske gripe“, te je prema procjenama 31 milijun Europljana primilo Pandemrix (www.gsk.com). Najveća procijepljenost zabilježena je u Finskoj, Irskoj, Norveškoj i Švedskoj gdje je uvelike bilo prisutno cijepjenje u okviru školske medicine (Johansen i sur., 2018). Isti proizvođač u Quebecu u Kanadi proizvodio je slično influenza A (H1N1)/pdm09 cjepivo s AS03 adjuvansom (Arepanrix) koje je korišteno na američkim kontinentima te u Turskoj i Maleziji, a broj osoba koje su primile Arepanrix procjenjuje se na 59 milijuna (Buonocore i van der Most, 2022).

Influenca A (H1N1) 2009 monovalentno cjepivo je fragmentirano cjepivo koje sadrži pročišćene površinske antigene HA i neuraminidazu (NA). Pripravljeno iz virusa koji se umnožava u alantoisnoj šupljini embrioniranih kokošnjih jaja inokuliranih specifičnom vrstom suspenzije virusa influence koja sadrži neomicin i polimiksin. Određeni soj virusa se uzgaja te zatim pročišćava centrifugom i filtracijom nakon čega slijedi inaktivacija beta-propiolaktonom. Inaktivirani virus se potom ukoncentrira i pročišćava zonskom centrifugom. Površinski proteini (HA i NA) odvajaju se od unutarnjih (MA1 (matriksni protein 1), NP (nukleoprotein), NS1 i 2 (engl. *non-structural protein*), PB1 i 2 (engl. *polymerase basic*)...) centrifugom uz prisutnost nonilfenol etoksilata koji se potom uklanja iz smjese. Cjepivo je formulirano tako da sadrži 15 µg HA u 0,5 mL doze A/California/7/2009 (H1N1)v-like soja virusa influence. Tiomersal (derivat žive), prezervativ koji se koristi tijekom proizvodnje, uklanja se postupnim koracima pročišćavanja do količine u tragovima ( $\leq 1 \mu\text{g} / 0,5 \text{ mL}$  doze cjepiva) (www.drugs.com).

Pandemrix i Arepanrix sadržavaju soj H1N1 influence A preporučen od strane Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organisation, WHO), A/California/7/2009 (H1N1) v-like strain (X-179A). Oba cjepiva sadržavaju 5 glavnih viralnih proteina: hemaglutinin HA1 i HA2 podjedinice, NA, NP i MA1 te neviralne proteine kokoši (*Gallus gallus*) iz matriksa korištenog u proizvodnji cjepiva. Pandemrix sadržava više NP i NA, a Arepanrix veću raznolikost viralnih i kokošnjih proteina uz iznimku PDCD6IP, TSPAN8, H-FABP, HSP i TUB proteina koji su zastupljeniji u Pandemrixu (Jacob i sur., 2015).

AS03 je adjuvans na bazi emulzije ulje/voda (engl. *oil in water*, O/W), sadrži DL-alfa-tokoferol (smjesa svih izomera alfa-tokoferola) i skvalan ulje dispergirano u vodi (O'Hagan i sur., 2021). Proučavajući sigurnosni profil AS03 adjuvansa tijekom kliničkih studija, uočena je povećana imunogeničnost u odnosu na cjepiva bez adjuvansa uz blage i prolazne simptome, većinom lokalizirane na mjestu injekcije (Cohet i sur., 2019). Mehanizam djelovanja uključuje povećanu ekspresiju citokina urođene imunosti i aktivaciju interferonskih signalnih puteva (Wimmers i sur., 2021). U odgovoru na razne antigene usmjerava imunosti odgovor od

urođenog prema specifičnom, tj. prema aktivaciji CD4+ (ali ne i CD8+) T-limfocita (Roman i sur., 2011). Faza 3 randomizirane studije (McElhaney i sur., 2013), koja je uspoređivala efikasnost sezonskog cjepiva protiv influence, pokazala je veću uspješnost influenza A/H3N2 cjepiva s adjuvansom u odnosu na cjepivo bez adjuvansa u prevenciji infekcije tim virusom i pneumonije kao komorbiditeta te posljedično i smanjenu smrtnost. Bogato iskustvo primjene AS03 adjuvansa ulilo je nadu u efikasnost i sigurnost njegove primjene te će on neminovno nastaviti biti ključ u borbi protiv pandemija.

*Dozvola za promet na veliko lijekovima* od strane EMA-e cjepivu protiv influence A (H1N1)/pdm09 s AS03 adjuvansom Pandemrix istekla je 13. kolovoza 2015. godine (a Arepanrixu u prosincu 2010. godine) kada GlaxoSmithKline Biologicals nije tražio obnovu dozvole zbog nedovoljne potražnje cjepiva. Time ovaj medicinski proizvod prestaje biti autoriziran i njegova je uporaba prekinuta ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

### **4.3. Hipoteza o T-limfocitima posredovanoj etiologiji**

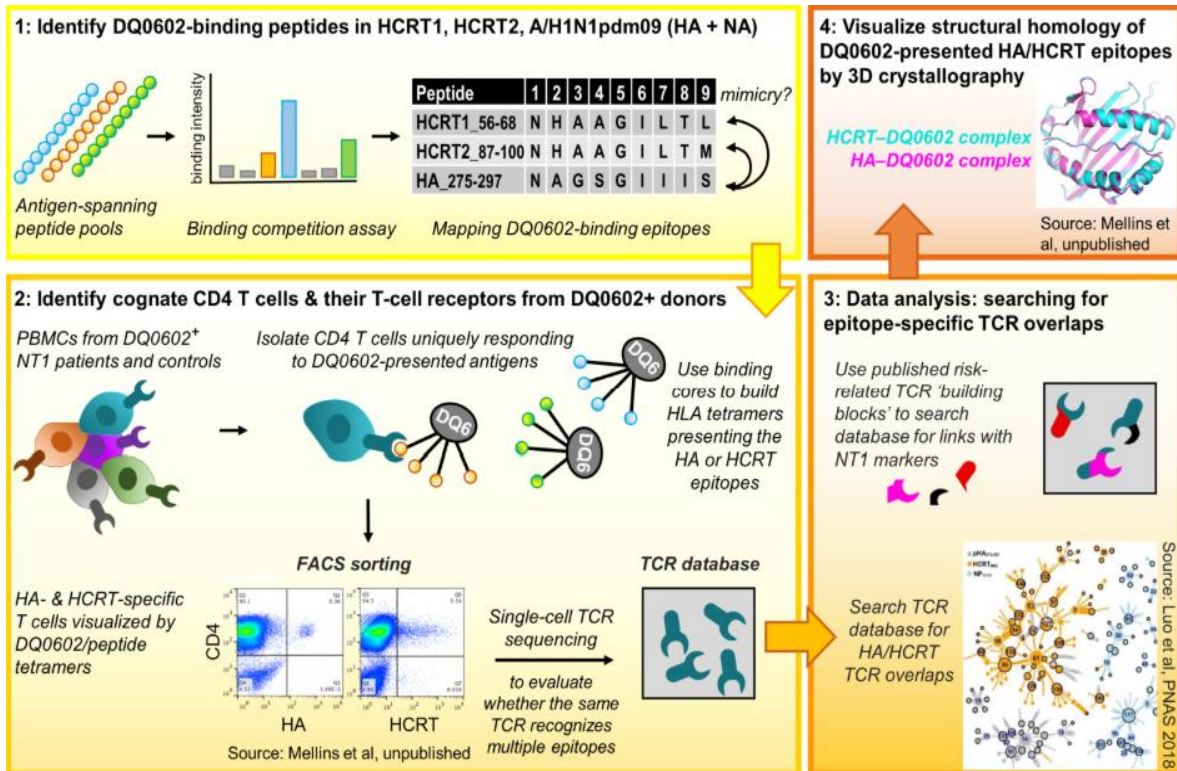
Uočena poveznica NT1 i HLA-DQB1\*06:02 alela te funkcija spomenutog alela u CD4+ T-staničnoj prezentaciji dala je naslutiti patofiziološki mehanizam koji uključuje receptor CD4+ T-limfocita (TCR) koji specifično prepoznaje peptid iz oreksinskih neurona, a temeljna uloga oreksinskog deficita u NT1 navela je na zaključak da bi upravo ovaj karakteristični peptid mogao biti autoantigen, a oreksinski neuroni žrtva direktnog i citokinima-posredovanog napada CD4+ i CD8+ T-limfocita. Ova je hipoteza potkrijepljena dokazima genske predispozicije za NT1 određenih pacijenata sa SNP-ovima (engl. *single nucleotide polymorphism*) na genima TRAJ24, CTSH, P2RY11 itd. koji utječu na T-staničnu aktivaciju, a uz HLA čine osnovne genske čimbenike (Ollila i sur., 2015).

Ova uvjerljiva hipoteza bila je podvrgnuta intenzivnim istraživanjima prošlog desetljeća koja su pokazala da oreksin može biti meta i CD4+ i CD8+ T-stanica (Jiang i sur., 2019). Pretpostavka o T-stanično posredovanoj etiologiji dodatno je produbljena ispitivanjem križne reaktivnosti oreksina i proteina influence H1N1.

#### **4.3.1. Ispitivanje križne reaktivnosti**

Problematici su pristupili Luo i sur. (2018), a njihovo se ispitivanje temeljilo na mapiranju četiri osnovna proteina, oreksina A i B te H1N1 proteina HA i NA, na način da su se koristili preklapajući petnaestomerni (15 AK) peptidi iz njihovih AK sekvenci. U prvom

koraku, u smjesama tih 15-mernih peptida mjerilo se vezanje na HLA-DQB1\*06:02, a na peptidima koji su se (dovoljno jako) vezali ispitivala se jačina akitvacije T-stanica u drugom koraku.



**Slika 3.** Shematski prikaz ispitivanja križne reaktivnosti

(preuzeto iz Buonocore i van der Most, (2022) uz dopuštenje izdavača)

Drugi korak koristi HLA-DQB1\*06:02-pozitivne APC i HLA-II tetramere za ispitivanje peptida iz prvog koraka na obim aktivacije T-stanica. Takav dvostruki pristup koristi se radi osiguravanja DQ0602-specifičnosti. Naime, pomoću spomenutih APC, koji eksprimiraju isključivo DQ0602-kodirane MHC molekule, stimulira se pročišćene donorske CD4+ T-stanice, a drugi pristup koristi DQ0602-peptid tetramere za direktnu vizualizaciju srodnih CD4+ T-limfocita (koji prepoznaju te peptide). Iako je ovaj složeni proces pomogao u detekciji CD4+ T-limfocita s određenom razinom dokaza za križnu reaktivnost, dodatno usavršavanje postignuto je analizom TCR-ova koji prepoznaju određeni peptid. Naime, pomoću FACS (engl. *fluorescence-activated cell sorting*) protočne citometrije izolirani su srodni T-limfociti koji su potom izloženi analizi sekvence TCR-a (engl. *single-cell TCR sequence analysis*), novijoj tehnologiji koja datira iz 2014. godine. Ta metoda je omogućila usporedbu sekvenci TCR-ova

koji prepoznaju epitope oreksina i HA te je pomogla definirati križnu reaktivnost kao identičnost sekvenci TCR-ova (Luo i sur., 2018).

Baza podataka dobivena ovom pretragom ključna je u trećem koraku gdje se *in silico* ispituju homologije TCR sekvenci epitopa oreksina i HA. To je pomoglo u identifikaciji CD4+ T-stanica, izoliranih s HA i oreksinskim tetramerima, koje imaju identične TCR-ove, a te stanice nađene su u većini ispitivanih pacijenata (Luo i sur., 2018).

Četvrti korak koristi kristalografiju X-zraka za uočavanje mimikrije na trodimenzionalnoj razini. Iz analize strukture kristala, dobivenih iz kompleksa HA odnosno oreksina s HLA-DQB1\*06:02 (odnosno s MHC-II molekulom koju kodira) na veznom mjestu, uočene su konformacijske sličnosti koje nisu bile vidljive na razini primarne strukture (AK slijeda). Drugim riječima, dobiven je uvid u trodimenzionalnu homologiju (Luo i sur., 2018).

Sumarno, ovaj je rad identificirao oreksin kao glavnu metu i autoantigen, ali isključivo u svom biološki aktivnom amidiranom obliku (Luo i sur., 2018). Stoga kratko poluvrijeme amidirane forme može objasniti neuspješnu indukciju tolerancije nezrelih T-stanica na oreksin u timusu i dati nam drugi kut gledanja na uzrok razvoja autoimunog procesa (Buonocore i van der Most, 2022).

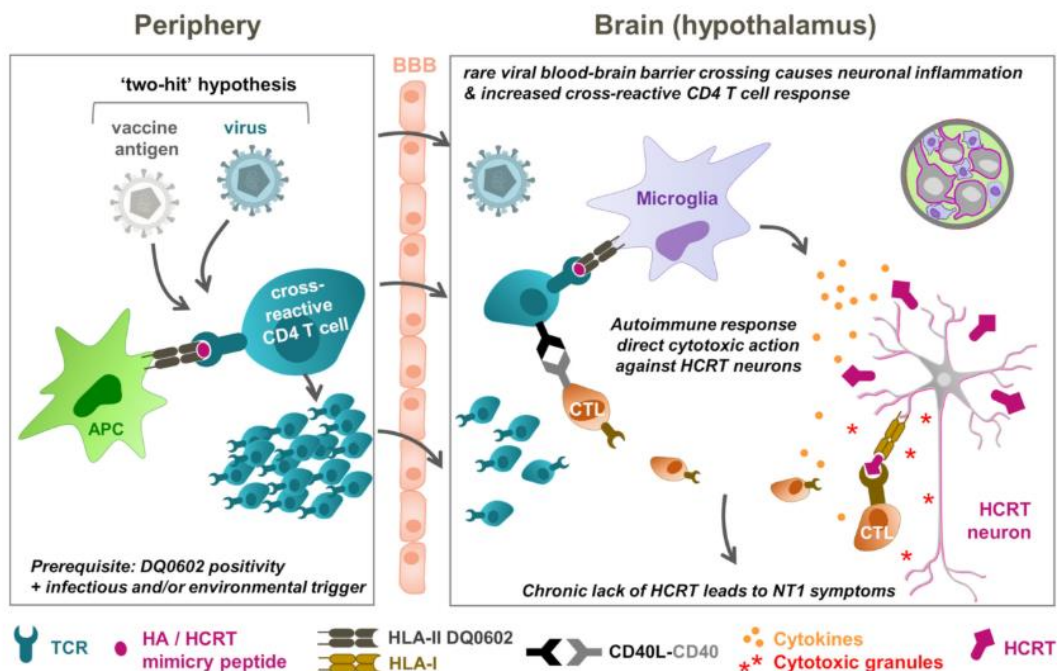
Bila su potrebna dodatna istraživanja za postavljanje dokaza križne reaktivnosti. Cogswell i sur. (2019) usporedili su oreksin-specifični T-stanični odgovor kod pedijatrijskih pacijenata s NT1 i zdrave djece pomoću unutarstaničnog obilježavanja citokina. Otkrili su da NT1 pacijenti pokazuju jači CD4+/CD8+ odgovor koji je bio dodatno pojačan prethodnim izlaganjem proteinima virusa influence. Snažniji oreksin-specifični CD8+ odgovor primijetili su i Pedersen i sur. (2019) kod NT1 pacijenata u odnosu na zdravu populaciju, koristeći peptid-MHC-I multimerne označene s DNA barkodom, kako bi se pratile specifičnosti proučavanih T-stanica prema antigenima.

Smatra se da HLA-DQB1\*06:02-orijentirane CD4+ T-stanice koje podliježu križnoj reaktivnosti djeluju kao pokretač autoimunog procesa, ali ne i glavni protagonist patofiziologije bolesti. Veliku ulogu igra i gubitak perifernih mehanizama tolerancije što dovodi do pojave neprovjerenih aktiviranih autoreaktivnih CD4+ T-stanica u mozgu. Slijedom toga, zahvaljujući širenju epitopa (engl. *epitope spreading*), lokalna imunosna aktivacija uzrokuje okretanje CD4+ T-stanica prema novim metama, uključujući čak i antigene koji su prezentirani na HLA-DR. Dodatno, novonastali proupalni okoliš olakšava prijelaz KMB (Liblau, 2018). Ova hipoteza je podržana podatkom da je HLA-DQB1\*06:02-orijentirani odgovor maksimalan na početku bolesti (Luo i sur., 2018).



### 4.3.2. Hipoteza „dva pogotka“

Hipoteza „dva pogotka“ (engl. „*two-hit*“ hypothesis) podrazumijeva prirodnu infekciju, uz nastanak križno reaktivnih CD4+ T-stanica, nakon koje ubrzo slijedi cijepljenje koje dodatno aktivira imunostani sustav. Temelji se na pretpostavljenim sličnostima u AK slijedu i trodimenzionalnoj strukturi između viralnih antigena i autoantigena, na način da CD4+ T-stanice, koje reagiraju na HA influence, mogu prepoznati peptidne sekvence oreksina. Izlučeni oreksin potom prepoznaju APC, specifičnije mikroglia stanice, koje okružuju oreksinske neurone te kod HLA-DQB1\*06:02-pozitivnih osoba prezentiraju DQ0602-vezujuće peptide CD4+ T-stanicama. Istovremeno se u perifernim limfnim čvorovima CD4+ T-stanicama prezentiraju peptidi virusa influence, primjerice HA. Te mimikrijske peptide mogu prepoznati HA/oreksin križno reaktivne CD4+ T-stanice. Bilo kakav upalni proces, uzrokovan primjerice infekcijom ili traumom, može potaknuti te križno reaktivne stanice na prelazak KMB s ciljem rješavanja lokalne upale. Te križno reaktivne CD4+ T-stanice mogu, po prelasku KMB, prepoznati mimikrijske oreksinske peptide prezentirane od strane mikroglije te potaknuti autoimuni proces (Liblau, 2018).



Slika 4. Hipoteza „dva pogotka“

(preuzeto iz Buonocore i van der Most, (2022) uz dopuštenje izdavača)

U cilju objašnjenja specifičnosti vezanja peptida na DQ0602, pretpostavljeno je da mimikrijski peptid, kad ga prezentira DQ0602-eksprimirajuća mikroglija, pokazuje jedinstvenu konformaciju. Ovaj mehanistički model nalaže da bi isti peptid, kad bi bio vezan na protektivni alel poput DQ0603, spriječio aktivaciju križno reaktivnih T-stanica jer ta promijenjena konformacija mijenja pogled TCR-a na peptid (Ollila i sur., 2015).

Luo i sur. (2018) pokazali su da su i NT1 pacijenti i zdravi ispitanici imali CD4+ T-stanice koje prepoznaju DQ0602-HA/oreksin komplekse. Iz toga slijedi da su te križno reaktivne T-stanice potrebne, ali ne i dovoljne za samostalno uzrokovanje simptoma narkolepsije. Prema Edwards i sur. (2019), uslijed povećane propusnosti KMB zbog traume ili prelaska patogena (virus influence, *Streptococcus*) tijekom infekcije, novonastala lokalna upala može rezultirati proliferacijom i migracijom T-stanica iz periferije u mozak. U DQ0602- pozitivnih pacijenata, taj imunski odgovor može uključivati i križno reaktivne CD4+ T-stanice („prvi pogodak“), a može biti pojačan zasebnim događajem, primjerice cijepljenjem, za vrijeme ili ubrzo nakon infekcije („drugi pogodak“). Schwartz i Raposo (2014) smatraju da pogreška u mehanizmu imunski tolerancije može predstavljati „treći pogodak“. Slijedom skupljenih dokaza, Buonocore i van der Most (2022) postavili su hipotezu da je kod dijela predisponiranih pacijenata cijepljenje potaknulo već aktiviranu imunsku kaskadu. Naime, dokazano je da primjena cjepiva s adjuvansom pojačava CD4+ (ali ne i CD8+) T-stanični odgovor (Couch i sur., 2014).

Daljnje pojačanje imunskog odgovora zbog širenja epitopa i autoimunog prepoznavanja epitopa na oreksinu može potaknuti oreksin-specifične T-stanice na imunski napad na oreksinske neurone. Taj je napad posredovan citotoksičnim (CD8+) T-limfocitima koji sadrže citotoksične granule s perforinom i granzimom, a prepoznavanje antigena uvjetovano je prezentacijom peptida na MHC-I molekulama. Naredni progresivni gubitak oreksinskih neurona zbog selektivnog citotoksičnog uništenja dovodi do karakterističnih NT1 simptoma (Buonocore i van der Most, 2022).

#### **4.4. Uloga prirodne infekcije**

Utjecaj prirodne infekcije na incidenciju narkolepsije prvobitno su pretpostavili Han i sur. (2011) prema podacima iz Pekinga u Kini gdje se broj oboljelih povećao trostruko, a pritom je 96 % novih NT1 pacijenta iz 2010. godine izjavilo da nisu primili H1N1 cjepivo. Nadalje, podatci iz Quebeca pokazali su povećanje broja slučajeva tijekom prvog (proljetnog) pandemijskog vala, također u nedostatku cijepljenja (Montplaisir i sur., 2014). Nedavno

istraživanje od strane Stowe i sur. (2020) pokazalo je da je povećan rizik od Pandemrix-povezane narkolepsije ograničen na pacijente s nastupom simptoma unutar 12 mjeseci od cijepljenja. To je postavilo vremenski okvir od godinu dana unutar kojeg se NT1 može povezati s cjepivom, a sve izvan toga postavlja ostale čimbenike, primjerice prirodnu infekciju influencom, u prednost u ulozi okidača bolesti. Vodeći se tom pretpostavkom, Zhang i sur. (2021) zaključili su da je nagli porast incidencije NT1 kod djece 2013. godine, stoga izvan vremenskog okvira pogodnog za prepisivanje uzroka cijepljenju, posljedica drugih rizičnih čimbenika, poput recirkulacije H1N1 influence A. Moguć kandidat je i influenza B jer djeca češće obolijevaju (van de Sandt i sur., 2015) i maksimalna cirkulacija ovog virusa bila je na prijelazu iz veljače na ožujak 2013., a vrhunac broja *de novo* dijagnosticiranih NT1 pacijenata u lipnju iste godine (Zhang i sur., 2021).

## 5. ZAKLJUČCI

Narkolepsija tipa 1 (NT1) je poremećaj hipotalamusa karakteriziran gubitkom oreksinske signalizacije u mozgu. Osim poremećaja spavanja, bolest se manifestira kroz niz motoričkih, psihijatrijskih, emocionalnih, kognitivnih, metaboličkih i autonomnih simptoma.

Multifaktorijalna etiologija uključuje genske, epigenske i okolišne čimbenike, a najveći rizik predstavljaju pozitivnost na HLA-DQB1\*06:02 alelnu varijantu, prethodna infekcija virusom influence H1N1 ili *Streptococcus*-om te primjena cjepiva protiv influence A H1N1/pdm09 s AS03 adjuvansom (Pandemrix).

Iako su potrebna dodatna istraživanja kako bi se donijeli definitivni zaključci o patofiziologiji NT1, genetički, epidemiološki i eksperimentalni podaci podržavaju hipotezu da je NT1 autoimuna bolest posredovana T-stanicama usmjerena na neurone koji proizvode oreksin. Zbog sličnosti u AK slijedu i trodimenzionalnoj strukturi između HA i oreksina, CD4+ T-stanice koje reagiraju na HA influence mogu prepoznati peptidne sekvence oreksina. Upalni proces uslijed infekcije ili traume može potaknuti te križno reaktivne stanice na prelazak KMB. Te križno reaktivne CD4+ T-stanice mogu, po prelasku KMB, prepoznati mimikrijske oreksinske peptide prezentirane od strane mikroglije te potaknuti autoimuni proces. Opisana pojava poznata je pod nazivom molekularna mimikrija.

Trenutno je na snazi hipoteza „dva pogotka“. Ona podrazumijeva prirodnu infekciju, uz nastanak križno reaktivnih CD4+ T-stanica, nakon koje ubrzo slijedi cijepljenje. Cjepivo, posebice s adjuvansom, pojačava već aktivirani imunski sustav te uz „treći pogodak“ (poremećaj mehanizama periferne tolerancije) uzrokuje selektivno uništavanje oreksinskih neurona i slijedom toga poremećaj oreksinske signalizacije. Ovaj mehanistički model treba dodatno istražiti na animalnim modelima i u kliničkim studijama jer su nalazi tih istraživanja ključni za optimalni javnozdravstveni odgovor tijekom sljedeće pandemije. Naime, ako je hipoteza točna, tijekom cirkulacije virusa bi cjepiva s adjuvansom mogla biti uskraćena u populacijama koje su posebno osjetljive na narkolepsiju, kao što su djeca i adolescenti, osobito kada virus uzrokuje relativno blage simptome u toj populaciji.

Sumarno, pandemija H1N1 influence 2009. godine ostavila je za sobom lekciju da je potrebna međunarodno koordinirana i harmonizirana mreža ispitivanja sigurnosti cjepiva kako bi se sigurnost pandemijskih cjepiva mogla brže i točnije evaluirati, primarno zbog njihove brze proizvodnje i primjene. Znamo da dolazi nova pandemija, ali ne znamo kada. Stoga, vrijeme za proširenjem znanja o cjepivima i njihovoj sigurnosti je sad.

## 6. POPIS KRATICA

ADHD - poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću, engl. *attention deficit hyperactivity disorder*

AK - aminokiselina

anti-TRIB2 - anti-Tribbles homolog 2

anti-GM3 - engl. *anti-monosialodihexosylganglioside antibodies*

APC - antigen-prezentirajuće stanice, engl. *antigen-presenting cells*

BMI - indeks tjelesne mase, engl. *body mass index*

CCR3 – receptor 3 za CC tip kemokina

CD – engl. *cluster of differentiation*

CHKB - kolin kinaza, engl. *choline kinase*

COVID-19 - bolest uzrokovana koronavirusom, engl. *coronavirus disease 2019*

CPT1B - karnitin palmitoil transferaza 1B, engl. *carnitine palmitoyl transferase 1B*

CSF - cerebrospinalna tekućina, engl. *cerebrospinal fluid*

CTSH - katepsin H, engl. *cathepsin H*

DMP - diferencijalno metilirane pozicije, engl. *differentially methylated positions*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

DRN - dorzalna raphe jezgra, engl. *dorsal raphe nucleus*

EDS - pretjerana dnevna pospanost, engl. *excessive daytime sleepiness*

EMA - Europska agencija za lijekove, engl. *European Medicines Agency*

EWAS - epigenomska asocijacijska studija, engl. *epigenome-wide association study*

FACS - engl. *fluorescence-activated cell sorting*

FDA - Agencija za hranu i lijekove, engl. *Food and Drug Administration*

G4 EA H1N1 – engl. *genotype 4 reassortant Eurasian avian-like H1N1 virus*

GABA - gama-aminomaslačna kiselina, engl. *gamma-aminobutyric acid*

GACVS - Globalni savjetodavni odbor za sigurnost cjepiva, engl. *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*

GWAS - cjelogenomska asocijacijska studija, engl. *genome-wide association study*

HA - hemaglutinin

HCRT – hipokretin (oreksin)

HLA - humani leukocitni antigeni, engl. *human leukocyte antigen*

ICSD-3 - Međunarodna klasifikacija poremećaja spavanja, engl. *International Classification of Sleep Disorders*

JVS - juvenilna visceralna steatoza

KMB – krvno-moždana barijera

LPT – lateralni pontini tegmentum

MA1 – matriksni protein 1

MAPK - mitogenom aktivirana proteinska kinaza, engl. *mitogen-activated protein kinase*

MCH - melanin-koncentrirajući hormon, engl. *melanin-concentrating hormone*

MHC - engl. *major histocompatibility complex*

MPC – medijalni prefrontalni korteks, engl. *medial prefrontal cortex*

MRM – engl. *multiple reaction monitoring*

MSLT - višestruki test latencije spavanja, engl. *multiple sleep latency test*

NA - neuraminidaza

NDRI - selektivni inhibitor ponovne pohrane dopamina i noradrenalina, engl. *norepinephrine-dopamine reuptake inhibitor*

NP – nukleoprotein

NREM - engl. *non-rapid eye movement*

NS – engl. *non-structural protein*

NT1 / 2 – narkolepsija tipa 1 / 2

P2RY11 - purinerški receptor 2Y11, engl. *purinergic receptor subtype 2Y11*

PAG - periakveduktalna siva tvar

PB - engl. *polymerase basic*

REM - engl. *rapid eye movement sleep*

RIA – radioimunokemijska metoda, engl. *radioimmunoassay*

SARS-COV-2 - engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SNP - engl. *single nucleotide polymorphism*

SOREMP - REM faza na početku sna, engl. *sleep onset REM period*

SSRI - selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina, engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*

TCR – receptor T-stanica, engl. *T-cell receptor*

TNFSF4 - ligand za član 4 superobitelji receptora čimbenika tumorske nekroze, engl. *tumour necrosis factor ligand superfamily member 4*

TRA -  $\alpha$ -lanac receptora T-limfocita, engl. *T-cell receptor  $\alpha$  chain*

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija, engl. *World Health Organisation*

## 7. LITERATURA

Adams J, Nathan S, Feldman J, Honda R, Diamandis C, Seideman D. Successful treatment of narcolepsy with prednisolone. *Swabian Research*, 2023.

Aran A, Lin L, Nevsimalova S, Plazzi G, Hong SC, Weiner K, Zeitzer J, Mignot E. Elevated anti-streptococcal antibodies in patients with recent narcolepsy onset. *Sleep*, 2009, 32, 979-983.

Ball HL, Said H, Chapman K, Fu R, Xiong Y, Burk JA, Rosenbaum D, Veneziano R, Cotten ML. Orexin A, an amphipathic  $\alpha$ -helical neuropeptide involved in pleiotropic functions in the nervous and immune systems: Synthetic approach and biophysical studies of the membrane-bound state. *Biophys Chem*, 2023, 297, 107007.

Bassetti CLA, Adamantidis A, Burdakov D, Han F, Gay S, Kallweit U, Khatami R, Koning F, Kornum BR, Lammers GJ, Liblau RS, Luppi PH, Mayer G, Pollmächer T, Sakurai T, Sallusto F, Scammell TE, Tafti M, Dauvilliers Y. Narcolepsy - clinical spectrum, aetiopathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Neurol*. 2019, 15, 519-539.

Bogan RK, Roth T, Schwartz J, Miloslavsky M. Time to response with sodium oxybate for the treatment of excessive daytime sleepiness and cataplexy in patients with narcolepsy. *J Clin Sleep Med*, 2015, 11, 427-432.

Bomfim IL, Lamb F, Fink K, Szakács A, Silveira A, Franzén L, Azhary V, Maeurer M, Feltelius N, Darin N, Hallböök T, Arnheim-Dahlström L, Kockum I, Olsson T. The immunogenetics of narcolepsy associated with A(H1N1)pdm09 vaccination (Pandemrix) supports a potent gene-environment interaction. *Genes Immun*, 2017, 18, 75-81.

Buonocore SM, van der Most RG. Narcolepsy and H1N1 influenza immunology a decade later: What have we learned? *Front Immunol*, 2022, 13, 902840.

Chen W, Black J, Call P, Mignot E. Late-onset narcolepsy presenting as rapidly progressing muscle weakness: response to plasmapheresis. *Ann Neurol*, 2005, 58, 489-490.

Cogswell AC, Maski K, Scammell TE, Tucker D, Orban ZS, Koralnik IJ. Children with narcolepsy type 1 have increased T-cell responses to orexins. *Ann Clin Transl Neurol*, 2019, 6, 2566-2572.

Cohet C, van der Most R, Bauchau V, Bekkat-Berkani R, Doherty TM, Schuind A, Tavares Da Silva F, Rappuoli R, Garçon N, Innis BL. Safety of AS03-adjuvanted influenza vaccines: A review of the evidence. *Vaccine*, 2019, 37, 3006-3021.

Couch RB, Bayas JM, Caso C, Mbawuike IN, López CN, Claeys C, El Idrissi M, Hervé C, Laupèze B, Oostvogels L, Moris P. Superior antigen-specific CD4+ T-cell response with AS03-adjuvantation of a trivalent influenza vaccine in a randomised trial of adults aged 65 and older. *BMC Infect Dis*, 2014, 14, 425.

Dauvilliers Y, Abril B, Mas E, Michel F, Tafti M. Normalization of hypocretin-1 in narcolepsy after intravenous immunoglobulin treatment. *Neurology*. 2009, 73, 1333-1334.



de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95, 322-327.

Dodet P, Chavez M, Leu-Semenescu S, Golmard JL, Arnulf I. Lucid dreaming in narcolepsy. *Sleep*, 2015, 38, 487-497.

Donjacour CE, Aziz NA, Overeem S, Kalsbeek A, Pijl H, Lammers GJ. Glucose and fat metabolism in narcolepsy and the effect of sodium oxybate: a hyperinsulinemic-euglycemic clamp study. *Sleep*, 2014, 37, 795-801.

Donjacour CE, Lammers GJ. A remarkable effect of alemtuzumab in a patient suffering from narcolepsy with cataplexy. *J Sleep Res*, 2012, 21, 479-480.

Dye TJ, Gurbani N, Simakajornboon N. Epidemiology and Pathophysiology of Childhood Narcolepsy. *Paediatr Respir Rev*, 2018, 25, 14-18.

Edwards K, Lambert PH, Black S. Narcolepsy and pandemic influenza vaccination: What we need to know to be ready for the next pandemic. *Pediatr Infect Dis J*, 2019, 38, 873–876.

Filardi M, Pizza F, Antelmi E, Pillastrini P, Natale V, Plazzi G. Physical Activity and Sleep/Wake Behavior, Anthropometric, and Metabolic Profile in Pediatric Narcolepsy Type 1. *Front Neurol*, 2018, 9, 707.

GlaxoSmithKline European regulatory update on Pandemrix™, 2011., [www.gsk.com](http://www.gsk.com), pristupljeno 25. lipnja 2024.

Hägmark-Månberg A, Zandian A, Forsström B, Khademi M, Lima Bomfim I, Hellström C, Arnheim-Dahlström L, Hallböök T, Darin N, Lundberg IE, Uhlén M, Partinen M, Schwenk JM, Olsson T, Nilsson P. Autoantibody targets in vaccine-associated narcolepsy. *Autoimmunity*. 2016, 49, 421-433.

Han F, Lin L, Warby SC, Faraco J, Li J, Dong SX, An P, Zhao L, Wang LH, Li QY, Yan H, Gao ZC, Yuan Y, Strohl KP, Mignot E. Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in China. *Ann Neurol*, 2011, 70, 410-417.

Hirtz C, Vialaret J, Gabelle A, Nowak N, Dauvilliers Y, Lehmann S. From radioimmunoassay to mass spectrometry: a new method to quantify orexin-A (hypocretin-1) in cerebrospinal fluid. *Sci Rep*, 2016, 6, 25162.

Honda M, Arai T, Fukazawa M, Honda Y, Tsuchiya K, Salehi A, Akiyama H, Mignot E. Absence of ubiquitinated inclusions in hypocretin neurons of patients with narcolepsy. *Neurology*, 2009, 73, 511-517.

Influenza H1N1 Vaccine Prescribing Information, 2024., [www.drugs.com](http://www.drugs.com), pristupljeno 24. lipnja 2024.

- Jacob L, Leib R, Ollila HM, Bonvalet M, Adams CM, Mignot E. Comparison of Pandemrix and Arepanrix, two pH1N1 AS03-adjuvanted vaccines differentially associated with narcolepsy development. *Brain Behav Immun*, 2015, 47, 44-57.
- Jiang W, Birtley JR, Hung SC, Wang W, Chiou SH, Macaubas C, Kornum B, Tian L, Huang H, Adler L, Weaver G, Lu L, Ilstad-Minnihan A, Somasundaram S, Ayyangar S, Davis MM, Stern LJ, Mellins ED. In vivo clonal expansion and phenotypes of hypocretin-specific CD4+ T cells in narcolepsy patients and controls. *Nat Commun*, 2019, 10, 5247.
- Jin L, Shi L, Zhang Y, Chen BB, Wang XL, Liu YH. Antidepressants for the treatment of narcolepsy: A prospective study of 148 patients in northern China. *J Clin Neurosci*, 2019, 63, 27-31.
- Johansen K, Pfeifer D, Salisbury D. Immunization in Europe. U: Plotkin's Vaccines. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, urednici, Amsterdam, Boston, Heidelberg, Elsevier, 2018, str. 1441-1465.
- Kallweit U, Bassetti CL. Pharmacological management of narcolepsy with and without cataplexy. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18, 809-817.
- Koepsell TD, Longstreth WT, Ton TG. Medical exposures in youth and the frequency of narcolepsy with cataplexy: a population-based case-control study in genetically predisposed people. *J Sleep Res*, 2010, 19, 80-86.
- Kuwajima M, Fujihara H, Sei H, Umehara A, Sei M, Tsuda TT, Sukeno A, Okamoto T, Inubushi A, Ueta Y, Doi T, Kido H. Reduced carnitine level causes death from hypoglycemia: possible involvement of suppression of hypothalamic orexin expression during weaning period. *Endocr J*, 2007, 54, 911-925.
- Liblau RS. Put to sleep by immune cells. *Nature*, 2018, 562, 46-48.
- Lind A, Ramelius A, Olsson T, Arnheim-Dahlström L, Lamb F, Khademi M, Ambati A, Maeurer M, Nilsson AL, Bomfim IL, Fink K, Lernmark Å. A/H1N1 antibodies and TRIB2 autoantibodies in narcolepsy patients diagnosed in conjunction with the Pandemrix vaccination campaign in Sweden 2009-2010. *J Autoimmun*, 2014, 50, 99-106.
- Luca G, Haba-Rubio J, Dauvilliers Y, Lammers GJ, Overeem S, Donjacour CE, Mayer G, Javidi S, Iranzo A, Santamaria J, Peraita-Adrados R, Hor H, Kutalik Z, Plazzi G, Poli F, Pizzi F, Arnulf I, Lecendreux M, Bassetti C, Mathis J, Heinzer R, Jennum P, Knudsen S, Geisler P, Wierzbicka A, Feketeova E, Pfister C, Khatami R, Baumann C, Tafti M; European Narcolepsy Network. Clinical, polysomnographic and genome-wide association analyses of narcolepsy with cataplexy: a European Narcolepsy Network study. *J Sleep Res*, 2013, 22, 482-495.
- Luo G, Ambati A, Lin L, Bonvalet M, Partinen M, Ji X, Maecker HT, Mignot EJ. Autoimmunity to hypocretin and molecular mimicry to flu in type 1 narcolepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115, E12323-E12332.
- McElhaney JE, Beran J, Devaster JM, Esen M, Launay O, Leroux-Roels G, Ruiz-Palacios GM, van Essen GA, Caplanusi A, Claeys C, Durand C, Duval X, El Idrissi M, Falsey AR,

Feldman G, Frey SE, Galtier F, Hwang SJ, Innis BL, Kovac M, Kremsner P, McNeil S, Nowakowski A, Richardus JH, Trofa A, Oostvogels L; Influence65 study group. AS03-  
adjuvanted versus non-adjuvanted inactivated trivalent influenza vaccine against seasonal  
influenza in elderly people: a phase 3 randomised trial. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13, 485-496.

Melén K, Jalkanen P, Kukkonen JP, Partinen M, Nohynek H, Vuorela A, Vaarala O, Freitag  
TL, Meri S, Julkunen I. No evidence of autoimmunity to human OX1 or OX2 orexin  
receptors in Pandemrix-vaccinated narcoleptic children. *J Transl Autoimmun*, 2020, 3,  
100055.

Meletti S, Vaudano AE, Pizza F, Ruggieri A, Vandi S, Teggi A, Franceschini C, Benuzzi F,  
Nichelli PF, Plazzi G. The Brain Correlates of Laugh and Cataplexy in Childhood  
Narcolepsy. *J Neurosci*, 2015, 35, 11583-11594.

Miyagawa T, Miyadera H, Tanaka S, Kawashima M, Shimada M, Honda Y, Tokunaga K,  
Honda M. Abnormally low serum acylcarnitine levels in narcolepsy patients. *Sleep*, 2011, 34,  
349-353A.

Montplaisir J, Petit D, Quinn MJ, Ouakki M, Deceuninck G, Desautels A, Mignot E, De Wals  
P. Risk of narcolepsy associated with inactivated adjuvanted (AS03) A/H1N1 (2009)  
pandemic influenza vaccine in Quebec. *PLoS One*, 2014, 9, e108489.

Narcolepsy fiasco spurs Covid vaccine fears in Sweden, 2020., [www.medicalxpress.com](http://www.medicalxpress.com),  
pristupljeno 19. lipnja 2024.

Narcolepsy, 2023., [www.ninds.nih.gov](http://www.ninds.nih.gov), pristupljeno 25. lipnja 2024.

New data on narcolepsy following the 2009 pandemic influenza vaccine, 2017.,  
[www.who.int](http://www.who.int), pristupljeno 24. lipnja 2024.

O'Hagan DT, van der Most R, Lodaya RN, Coccia M, Lofano G. "World in motion" -  
emulsion adjuvants rising to meet the pandemic challenges. *NPJ Vaccines*, 2021, 6, 158.

Ollila HM, Ravel JM, Han F, Faraco J, Lin L, Zheng X, Plazzi G, Dauvilliers Y, Pizza F,  
Hong SC, Jennum P, Knudsen S, Kornum BR, Dong XS, Yan H, Hong H, Coquillard C,  
Mahljos J, Jolanki O, Einen M, Arnulf I, Högl B, Frauscher B, Crowe C, Partinen M, Huang  
YS, Bourgin P, Vaarala O, Désautels A, Montplaisir J, Mack SJ, Mindrinos M, Fernandez-  
Vina M, Mignot E. HLA-DPB1 and HLA class I confer risk of and protection from  
narcolepsy. *Am J Hum Genet*, 2015, 96, 136-146.

Pandemrix : EPAR - Product Information, 2016., [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), pristupljeno 25. lipnja  
2024.

Partinen M, Kornum BR, Plazzi G, Jennum P, Julkunen I, Vaarala O. Narcolepsy as an  
autoimmune disease: the role of H1N1 infection and vaccination. *Lancet Neurol*, 2014, 13,  
600-613.

Pedersen NW, Holm A, Kristensen NP, Bjerregaard AM, Bentzen AK, Marquard AM,  
Tamhane T, Burgdorf KS, Ullum H, Jennum P, Knudsen S, Hadrup SR, Kornum BR. CD8+ T

cells from patients with narcolepsy and healthy controls recognize hypocretin neuron-specific antigens. *Nat Commun*, 2019, 10, 837.

Pizza F, Jaussent I, Lopez R, Pesenti C, Plazzi G, Drouot X, Leu-Semenescu S, Beziat S, Arnulf I, Dauvilliers Y. Car Crashes and Central Disorders of Hypersomnolence: A French Study. *PLoS One*, 2015, 10, e0129386.

Plazzi G, Moghadam KK, Maggi LS, Donadio V, Vetrugno R, Liguori R, Zoccoli G, Poli F, Pizza F, Pagotto U, Ferri R. Autonomic disturbances in narcolepsy. *Sleep Med Rev*, 2011, 15, 187-196.

Plazzi G, Ruoff C, Lecendreux M, Dauvilliers Y, Rosen CL, Black J, Parvataneni R, Guinta D, Wang YG, Mignot E. Treatment of paediatric narcolepsy with sodium oxybate: a double-blind, placebo-controlled, randomised-withdrawal multicentre study and open-label investigation. *Lancet Child Adolesc Health*, 2018, 2, 483-494.

Q92519, 2024., [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), pristupljeno 24. lipnja 2024.

Rocca FL, Pizza F, Ricci E, Plazzi G. Narcolepsy during Childhood: An Update. *Neuropediatrics*, 2015, 46, 181-198.

Roman F, Clément F, Dewé W, Walravens K, Maes C, Willekens J, De Boever F, Hanon E, Leroux-Roels G. Effect on cellular and humoral immune responses of the AS03 adjuvant system in an A/H1N1/2009 influenza virus vaccine administered to adults during two randomized controlled trials. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18, 835-843.

Romigi A, Liguori C, Izzi F, Albanese M, Marchi A, Mancini C, Tarquini E, Mercuri NB, Placidi F. Oral L-carnitine as treatment for narcolepsy without cataplexy during pregnancy: a case report. *J Neurol Sci*, 2015, 348, 282-283.

Roth T, Dauvilliers Y, Guinta D, Alvarez-Horine S, Dynin E, Black J. Effect of sodium oxybate on disrupted nighttime sleep in patients with narcolepsy. *J Sleep Res*, 2017, 26, 407-414.

Ruoff CM, Reaven NL, Funk SE, McGaughey KJ, Ohayon MM, Guilleminault C, Black J. High Rates of Psychiatric Comorbidity in Narcolepsy: Findings From the Burden of Narcolepsy Disease (BOND) Study of 9,312 Patients in the United States. *J Clin Psychiatry*, 2017, 78, 171-176.

Saariaho AH, Vuorela A, Freitag TL, Pizza F, Plazzi G, Partinen M, et al. Autoantibodies against ganglioside GM3 are associated with narcolepsy-cataplexy developing after Pandemrix vaccination against 2009 pandemic H1N1 type influenza virus. *J Autoimmun*, 2015, 63, 68-75.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 1998, 92, 573-585.

Samson WK, Bagley SL, Ferguson AV, White MM. Orexin receptor subtype activation and locomotor behaviour in the rat. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010, 198, 313-324.

Sarkanen T, Alakuijala A, Julkunen I, Partinen M. Narcolepsy Associated with Pandemrix Vaccine. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18, 43.

Sateia MJ. International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. *Chest*, 2014, 146, 1387-1394.

Schwartz M, Raposo C. Protective autoimmunity: A unifying model for the immune network involved in CNS repair. *Neuroscientist*, 2014, 20, 343–358.

Shaikh MY, Yasmin F, Ochani RK, Shah SMI. Influenza swine flu virus: A candidate for the next pandemic? *J Glob Health*, 2021, 11, 03011.

Shimada M, Miyagawa T, Toyoda H, Tokunaga K, Honda M. Epigenome-wide association study of DNA methylation in narcolepsy: an integrated genetic and epigenetic approach. *Sleep*. 2018, 41.

Stowe J, Andrews N, Gringras P, Quinnell T, Zaiwalla Z, Shneerson J, Miller E. Reassessment of the risk of narcolepsy in children in England 8 years after receipt of the AS03-adjuvanted H1N1 pandemic vaccine: A case-coverage study. *PLoS Med*, 2020, 17, e1003225.

Straat ME, Schinkelshoek MS, Fronczek R, Lammers GJ, Rensen PCN, Boon MR. Role of Brown Adipose Tissue in Adiposity Associated With Narcolepsy Type 1. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11, 145.

Szakacs Z, Dauvilliers Y, Mikhaylov V, Poverennova I, Krylov S, Jankovic S, Sonka K, Lehert P, Lecomte I, Lecomte JM, Schwartz JC; HARMONY-CTP study group. Safety and efficacy of pitolisant on cataplexy in patients with narcolepsy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 2017, 16, 200-207.

Tafti M, Lammers GJ, Dauvilliers Y, Overeem S, Mayer G, Nowak J, Pfister C, Dubois V, Eliaou JF, Eberhard HP, Liblau R, Wierzbicka A, Geisler P, Bassetti CL, Mathis J, Lecendreux M, Khatami R, Heinzer R, Haba-Rubio J, Feketeova E, Baumann CR, Kutalik Z, Tiercy JM. Narcolepsy-Associated HLA Class I Alleles Implicate Cell-Mediated Cytotoxicity. *Sleep*, 2016, 39, 581-587.

Tanaka S, Honda Y, Honda M, Yamada H, Honda K, Kodama T. Anti-Tribbles Pseudokinase 2 (TRIB2)-Immunization Modulates Hypocretin/Orexin Neuronal Functions. *Sleep*. 2017, 40.

Thorpy MJ, Shapiro C, Mayer G, Corser BC, Emsellem H, Plazzi G, Chen D, Carter LP, Wang H, Lu Y, Black J, Dauvilliers Y. A randomized study of solriamfetol for excessive sleepiness in narcolepsy. *Ann Neurol*, 2019, 85, 359-370.

Valko PO, Gavrillov YV, Yamamoto M, Reddy H, Haybaeck J, Mignot E, Baumann CR, Scammell TE. Increase of histaminergic tuberomammillary neurons in narcolepsy. *Ann Neurol*, 2013, 74, 794-804.

van de Sandt CE, Dou Y, Vogelzang-van Trierum SE, Westgeest KB, Pronk MR, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Rimmelzwaan GF, Hillaire MLB. Influenza B virus-specific CD8+

T-lymphocytes strongly cross-react with viruses of the opposing influenza B lineage. *J Gen Virol*, 2015, 96, 2061-2073.

Vassalli A, Dellepiane JM, Emmenegger Y, Jimenez S, Vandi S, Plazzi G, Franken P, Tafti M. Electroencephalogram paroxysmal  $\theta$  characterizes cataplexy in mice and children. *Brain*, 2013, 136, 1592-1608.

Wimmers F, Donato M, Kuo A, Ashuach T, Gupta S, Li C, Dvorak M, Foecke MH, Chang SE, Hagan T, De Jong SE, Maecker HT, van der Most R, Cheung P, Cortese M, Bosinger SE, Davis M, Roupheal N, Subramaniam S, Yosef N, Utz PJ, Khatri P, Pulendran B. The single-cell epigenomic and transcriptional landscape of immunity to influenza vaccination. *Cell*, 2021, 184, 3915-3935.

Zhang Z, Gool JK, Fronczek R, Dauvilliers Y, Bassetti CLA, Mayer G, Plazzi G, Pizza F, Santamaria J, Partinen M, Overeem S, Peraita-Adrados R, da Silva AM, Sonka K, Del Rio-Villegas R, Heinzer R, Wierzbicka A, Young P, Högl B, Manconi M, Feketeova E, Mathis J, Paiva T, Canellas F, Lecendreux M, Baumann CR, Lammers GJ, Khatami R. New 2013 incidence peak in childhood narcolepsy: more than vaccination? *Sleep*, 2021, 44, zsaa172.

## 8. SAŽETAK / SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Narkolepsija tipa 1 (NT1) je poremećaj spavanja koji nastaje zbog kronične deficijencije oreksina do koje dolazi zbog selektivnog imunoposredovanog uništenja oreksinskih neurona u hipotalamusu. Osim disregulacije ciklusa spavanje - budnost, bolest se prezentira raznim motoričkim, kognitivnim, psihijatrijskim, metaboličkim i autonomnim simptomima, a najspecifičniji simptom je katapleksija. Etiologija je multifaktorijalna, a uključuje genske, epigenske i okolišne čimbenike. Rizični faktori su pozitivnost na HLA-DQB1\*06:02 alelnu varijantu, prethodna infekcija virusom influence H1N1 ili *Streptococcus*-om te primjena cjepiva protiv influence A H1N1/pdm09 s AS03 adjuvansom (Pandemrix). Patofiziologija bolesti još uvijek je tema istraživanja, no do sad utvrđeni genetički, epidemiološki i eksperimentalni podaci podržavaju hipotezu da je NT1 autoimuna bolest posredovana T-limfocitima usmjerena na oreksinske neurone. Razumijevanje imunopatogeneze NT1 važno je iz javnozdravstvene perspektive jer može usmjeriti daljnja istraživanja u smjeru novih terapijskih mogućnosti narkolepsije i drugih autoimunih bolesti te pomoći uspostaviti globalno koordiniranu mrežu ispitivanja sigurnosti cjepiva kao ključnog čimbenika u borbi protiv budućih pandemija.

## 8.2. Summary

Narcolepsy type 1 (NT1) is a sleep disorder caused by chronic orexin deficiency that occurs due to selective immune-mediated destruction of orexin neurons in the hypothalamus. In addition to dysregulation of the sleep-wake cycle, the disease presents itself with various motor, cognitive, psychiatric, metabolic, and autonomic symptoms, the most specific symptom being cataplexy. The etiology is multifactorial and includes genetic, epigenetic, and environmental factors. Risk factors include HLA-DQB1\*06:02-positivity, previous H1N1 influenza virus or *Streptococcus* infection, and administration of the AS03-adjuvanted influenza A H1N1/pdm09 vaccine (Pandemrix). The pathophysiology of the disease is still an object of ongoing research, but the genetic, epidemiological, and experimental data established so far support the hypothesis that NT1 is a T-lymphocyte-mediated autoimmune disease targeting orexin-producing neurons. Understanding the immunopathogenesis of NT1 is important from the perspective of public health because it can guide further research toward modern therapeutic approaches to narcolepsy and other autoimmune diseases and also help establish a globally coordinated vaccine safety infrastructure as a crucial factor in the fight against future pandemics.



# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Povezanost primjene cjepiva Pandemrix i incidencije narkolepsije tipa 1 s obzirom na učestalost alelne varijante HLA-DQB1\*06:02

Ivana Karuc

### SAŽETAK

Narkolepsija tipa 1 (NT1) je poremećaj spavanja koji nastaje zbog kronične deficijencije oreksina do koje dolazi zbog selektivnog imunoposredovanog uništenja oreksinskih neurona u hipotalamusu. Osim disregulacije ciklusa spavanje - budnost, bolest se prezentira raznim motoričkim, kognitivnim, psihijatrijskim, metaboličkim i autonomnim simptomima, a najspecifičniji simptom je katapleksija. Etiologija je multifaktorijalna, a uključuje genske, epigenske i okolišne čimbenike. Rizični faktori su pozitivnost na HLA-DQB1\*06:02 alelnu varijantu, prethodna infekcija virusom influence H1N1 ili Streptococcus-om te primjena cjepiva protiv influence A H1N1/pdm09 s AS03 adjuvansom (Pandemrix). Patofiziologija bolesti još uvijek je tema istraživanja, no do sad utvrđeni genetički, epidemiološki i eksperimentalni podatci podržavaju hipotezu da je NT1 autoimuna bolest posredovana T-limfocitima usmjerena na oreksinske neurone. Razumijevanje imunopatogeneze NT1 važno je iz javnozdravstvene perspektive jer može usmjeriti daljnja istraživanja u smjeru novih terapijskih mogućnosti narkolepsije i drugih autoimunih bolesti te pomoći uspostaviti globalno koordiniranu mrežu ispitivanja sigurnosti cjepiva kao ključnog čimbenika u borbi protiv budućih pandemija.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 36 stranica, 4 grafička prikaza, 0 tablica i 77 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: narkolepsija, Pandemrix, H1N1, influenza, HLA-DQB1\*06:02, oreksin, hipokretin

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj, 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Association between the use of the Pandemrix vaccine and the incidence of narcolepsy type 1 with regard to the HLA-DQB1\*06:02 allele frequency

Ivana Karuc

#### SUMMARY

Narcolepsy type 1 (NT1) is a sleep disorder caused by chronic orexin deficiency that occurs due to selective immune-mediated destruction of orexin neurons in the hypothalamus. In addition to dysregulation of the sleep-wake cycle, the disease presents itself with various motor, cognitive, psychiatric, metabolic, and autonomic symptoms, the most specific symptom being cataplexy. The etiology is multifactorial and includes genetic, epigenetic, and environmental factors. Risk factors include HLA-DQB1\*06:02-positivity, previous H1N1 influenza virus or Streptococcus infection, and administration of the AS03-adjuvanted influenza A H1N1/pdm09 vaccine (Pandemrix). The pathophysiology of the disease is still an object of ongoing research, but the genetic, epidemiological, and experimental data established so far support the hypothesis that NT1 is a T-lymphocyte-mediated autoimmune disease targeting orexin-producing neurons. Understanding the immunopathogenesis of NT1 is important from the perspective of public health because it can guide further research toward modern therapeutic approaches to narcolepsy and other autoimmune diseases and also help establish a globally coordinated vaccine safety infrastructure as a crucial factor in the fight against future pandemics.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 36 pages, 4 figures, 0 tables and 77 references. Original is in Croatian language.

Keywords: narcolepsy, Pandemrix, H1N1, influenza, HLA-DQB1\*06:02, orexin, hypocretin

Mentor: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.**, Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.**, Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2024.