

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nemanja Š. Garai

Varijante u genu *CHRNA1* i mikroRNK u plazmi kao prediktori nastanka i terapijskog odgovora kod stečene autoimune mijastenije gravis

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nemanja Š. Garai

**Variants in the *CHRNA1* gene and plasma microRNAs
as predictors of onset and therapy response in
acquired autoimmune myasthenia gravis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentori:

Dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Ivana Basta, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Članovi komisije:

Dr Goran Brajušković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Stojan Perić, docent
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr Snežana Kojić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Dr Miloš Brkušanin, docent
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Jovan Pešović, docent
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica i pošta

Predmetna doktorska disertacija rezultat je višegodišnjeg intenzivnog, posvećenog i strastvenog naučnog procesa čije bi nastajanje i otelovljenje bilo teško ostvarivo bez prisutnosti i bezrezervne podrške nekolicine ljudi. Svako od njih, u svom domenu i na svoj način, pomogao je da prevaziđem lične i profesionalne prepreke i ostvarim svoj naučni naum.

Duboku naklonost i iskrenu zahvalnost najpre želim da iskažem profesorki dr Dušanki Savić-Pavićević, Duški, za njeno izuzetno mentorstvo i za srećnu okolnost što je uvek umela da nasluti izazove naučnog napredovanja i prepozna trenutke u kojima mi je bilo potrebno vreme za diskusiju. Njena ekspertiza i razumevanje ostavili su trajan trag, ne samo u ovom radu, već i u mom akademskom formiranju.

Istim intenzitetom zahvaljujem profesoru dr Goranu Brajuškoviću na viziji i podsticaju da napravim iskorak ka nastavnom radu, kao i na uverenju da ću znanje umeti uspešno da prenesem, čime je doprineo razvoju mog sopstvenog izraza.

Na svesrdnom mentorstvu zahvalnost iskazujem i profesorki dr Ivani Basti, čiji su primer kompetentnosti, principijelnosti i kontinuiranog naučnog uzrastanja bili i ostaju pouzdan orijentir i merilo kome stremim.

Docentu dr Stojanu Periću dugujem istinsku zahvalnost na ustupanju uzoraka, dragocenim konsultacijama, a naročito na prilici da kroz upoznavanje sa kliničkom praksom potvrdim i produbim svoju doktorsku tezu. Doktoru Vladimiru Jovanoviću i doktorantkinji Kristini Petrović zahvaljujem na stručnoj pomoći i konstruktivnim sugestijama, koje su u značajnoj meri doprinele prevazilaženju naučnoistraživačkih izazova i uobličavanju disertacije. Naučnoj savetnici dr Snežani Kojić zahvalan sam na praćenju toka rada i svrsishodnim smernicama, dok profesorki dr Tatjani Pekmezović zahvalnost upućujem za izuzetnu priliku da već na samom početku doktorskih studija osiguram čvrste temelje i steknem širi uvid u kontekst biomedicinskih istraživanja.

U oblasti neonatalnog skrininga izrazito cenim i zahvalan sam kolegi, docentu dr Milošu Brkušaninu i profesorki Duški, na ukazanoj šansi i veri da ću, uprkos nedugom stažu, moći da odgovorim zahtevima poverene delikatne i izuzetno odgovorne uloge. Ponosan sam što smo timski stvorili uslove da deci sa spinalnom mišićnom atrofijom u našoj zemlji bude obezbeđena pravovremena terapija i prilika za zdrav i normalan život. Ovaj segment mog rada pokazao se kao jedan od ključnih temelja mog profesionalnog sazrevanja.

Kolegi docentu dr Jovanu Pešoviću izražavam zahvalnost na dostupnosti bez ograda i zadržske, kao i na rano ukazanom neupitnom poverenju.

Sanji Madić, studentkinji doktorskih studija, koju pratim u mentorskom procesu, zahvaljujem na saradnji, entuzijazmu i predanosti tokom našeg zajedničkog rada u ulozi u kojoj sam se obreo po prvi put.

Ostalim kolegama, saradnicima i članovima kolektiva - Vojki Simović, Milanki Joksimović, Marini Brusać, Snežani Jeremić, dr Jeleni Karanović, dr Marku Paniću, dr Bogdanu Jovanoviću, dr Ivani Đorđević, dr Aleksu Palibrku, Suzani Matijašević-Joković,

Nemanji Radovanoviću, dr Lani Radenković, dr Vukanu Ivanoviću, Anastasiji Ninković, Kseniji Obadović, Dušanu Laziću, Vanji Obadović, Aleksandru Pejkoviću, Milici Poljičak i Nini Ninković – zahvaljujem na kolegijalnosti i nesebičnoj volji da zajednički pronalazimo rešenja.

Mnoge borbe ostale bi nesavladive bez prisustva mojih najbližih prijatelja Sofije, Saške, Marije i Aleksandra čija prisnost i ohrabrenja predstavljaju izvor velike lične sreće i privilegije.

Posebnu poštu odajem svojoj porodici, u prvom redu mami, tati, bratu Strahinji, Zdenku, bakama Radi i Koki, zbog niza koji ne poznaje kraj. Hvala im na безусловnoj ljubavi i podršci, koje su bile i ostaju moj najveći štit.

Svaka od ovih ćelija oblikovala je biće moje duhovne i profesionalne egzistencije. Nadam se da će ova disertacija ostaviti trag u naučnom prostoru i postati deo šireg nastojanja (mladih) naučnika ka znanju, nauci i svekolikom prosperitetu čoveka i čovečnosti.

Varijante u genu *CHRNA1* i mikroRNK u plazmi kao prediktori nastanka i terapijskog odgovora kod stečene autoimune mijastenije gravis

Sažetak

Primenom komplementarnih genetičkih i molekularnih pristupa, ispitane su varijante u genima za acetilholinski receptor (AChR) kao potencijalni faktori rizika za razvoj, kao i mikroRNK u plazmi kao mogući biomarkeri odgovora na imunosupresivnu terapiju kod AChR-pozitivne mijastenije gravis. U delu istraživanja genetičkih determinanti mijastenije gravis, sprovedeno je bajesovsko fino mapiranje lokusa *CHRNA1* (α 1-subjedinica AChR), zasnovano na sumarnoj statistici studije na nivou celog genoma, neravnoteži vezanosti i funkcionalnim anotacijama, čime je varijanta rs35274388 u promotorskom regionu identifikovana kao potencijalno uzročna. Njena validacija, zajedno sa prethodno *in silico* selektovanom varijantom rs4151121 u lokusu *CHRNA1* (β 1-subjedinica AChR), sprovedena je u studiji genetičke asocijacije tipa slučajeva i kontrola (519 bolesnika i 519 prema polu i starosti uparenih kontrola). Osobe sa rs4151121 genotipom GG ili AG su imale približno 1,5 puta veći rizik za razvoj mijastenije gravis sa kasnim početkom, dok je za varijantu rs35274388 uočen trend povezanosti sa mijastenijom gravis. U delu ispitivanja molekularnih biomarkera sprovedena je prospektivna longitudinalna studija mikroRNK kod novodijagnostikovanih, nelečenih bolesnika (N = 31), sa uzorkovanjem pre započinjanja terapije i nakon 6 i 12 meseci praćenja. Terapija je bila udružena sa promenama nivoa miR-21-5p, miR-27a-3p i naročito miR-150-5p. Nivo miR-150-5p negativno je korelisao sa kliničkim skorovima MG-ADL, QMG i MGC i pokazao odličnu prediktivnu sposobnost za razlikovanje bolesnika sa dobrim odgovorom na terapiju i refraktarnih bolesnika nakon 12 meseci praćenja. Integracijom genetičkih i molekularnih nalaza pokazano je da varijante rs35274388 i rs4151121, zajedno sa miR-150-5p u plazmi, predstavljaju komplementarne determinante rizika i terapijskog odgovora kod AChR-pozitivne mijastenije gravis, što doprinosi razumevanju etiologije i razvoju personalizovanog pristupa lečenja.

Ključne reči: mijastenija gravis, *CHRNA1*, *CHRNA1*, bajesovsko fino mapiranje, tačkaste varijante, mikroRNK, miR-150-5p, imunosupresivna terapija, biomarkeri, prediktivni biomarkeri.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

Variants in the *CHRNA1* gene and plasma microRNAs as predictors of onset and therapy response in acquired autoimmune myasthenia gravis

Abstract

Complementary genetic and molecular approaches were used to investigate variants in acetylcholine receptor (AChR) genes as potential genetic risk factors and plasma microRNAs as potential biomarkers of immunosuppressive therapy response in AChR-positive MG. Within the genetic segment of the thesis, Bayesian fine-mapping of the *CHRNA1* locus ($\alpha 1$ subunit of the AChR) was performed using genome-wide association study summary statistics, linkage disequilibrium data, and functional annotations, identifying the promoter variant rs35274388 as potentially causal. Validation of this variant, together with the previously *in silico*-selected variant rs4151121 in the *CHRNA1* locus ($\beta 1$ subunit of the AChR), was conducted in a case-control genetic association study (519 patients and 519 sex- and age-matched controls). Individuals carrying the rs4151121 GG or AG genotypes had ~1.5-fold increased risk of developing late-onset myasthenia gravis, while a trend towards association with disease was observed for rs35274388. Within the molecular component of the thesis, a prospective longitudinal study of microRNAs was conducted in newly diagnosed, treatment-naïve patients (N = 31), with three follow-ups: at baseline, 6 months, and 12 months. Treatment was accompanied by changes in the levels of miR-21-5p, miR-27a-3p, and particularly miR-150-5p. Plasma miR-150-5p levels were negatively correlated with MG-ADL, QMG, and MGC clinical scores, and showed excellent predictive performance in distinguishing responders from non-responders at 12-month follow-up. By integrating genetic and molecular findings, rs35274388 and rs4151121 variants, together with miR-150-5p, were shown to represent complementary determinants of disease risk and therapeutic response in AChR-positive myasthenia gravis, thereby contributing to a better understanding of disease etiology and to the development of a personalised treatment approach.

Keywords: myasthenia gravis, *CHRNA1*, *CHRNA1*, Bayesian fine-mapping, single-nucleotide variants, microRNAs, miR-150-5p, immunosuppressive treatment, biomarkers, treatment response.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biochemistry and Molecular Biology

Lista skraćenica

- AChR – nikotinski acetilholinski receptor (engl. *nicotinic acetylcholine receptor*)
- BSA – goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*)
- CAPs – pikovi pristupačnosti hromatina (engl. *chromatin accessibility peaks*)
- CS – verodostojni skup varijanti (engl. *credible set*)
- CTLA4 – protein 4 povezan sa citotoksičnim T-limfocitima (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)
- DNK – dezoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid, DNA*)
- ERBB2 – Erb-B2 receptor tirozin kinaza 2 (engl. *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*)
- FRET – transfer fluorescentne rezonantne energije (engl. *fluorescence resonance energy transfer*)
- GWAS – studija asocijacije na nivou celog genoma (engl. *genome-wide association study*)
- HLA – humani leukocitni antigen (engl. *human leukocyte antigen*)
- LD – neravnoteža vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*)
- LRP4 – protein 4 sličan receptoru za lipoproteine niske gustine (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein 4*)
- LRT – test odnosa verodostojnosti (engl. *likelihood ratio test*)
- MAF – učestalost ređeg alela (engl. *minor allele frequency*)
- MG – mijastenija gravis (engl. *myasthenia gravis*)
- MG-ADL – upitnik o aktivnostima svakodnevnog života (engl. *myasthenia gravis activities of daily living scale*)
- MGC – kombinovana skala za procenu težine bolesti (engl. *myasthenia gravis composite scale*)
- MGFA – Američka fondacija za mijasteniju gravis (engl. *Myasthenia Gravis Foundation of America*)
- MR – mendelovska randomizacija (engl. *Mendelian randomization*)
- MuSK – kinaza specifična za mišiće (engl. *muscle-specific kinase*)
- PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
- PIP – naknadna verovatnoća uključenja (engl. *posterior inclusion probability*)
- QMG – kvantitativna skala za procenu težine bolesti (engl. *quantitative myasthenia gravis scale*)
- QTL – lokus za kvantitativne osobine (engl. *quantitative trait locus*)
- RNK – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid, RNA*)
- SMR – mendelovska randomizacija zasnovana na sumarnim podacima (engl. *summary data-based Mendelian randomization*)
- SNP – tačkasta varijanta (engl. *single-nucleotide polymorphism*)

TF - transkripcijski faktor (engl. *transcription factor*)

TNFRSF11A - član 11A superfamilije receptora za faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A*)

TNIP1 - protein 1 koji interaguje sa proteinom 3 indukovanim faktorom nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha-induced protein 3-interacting protein 1*)

TWAS - studija asocijacije na nivou transkriptoma (engl. *transcriptome-wide association study*)

eQTL - lokus povezan sa ekspresijom gena za kvantitativne osobine (engl. *expression quantitative trait locus*)

miR - mikroRNK (engl. *microRNA*)

rpm - obrtaji u minuti (engl. *revolutions per minute*)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Stečena mijastenija gravis.....	1
1.2. Genetički faktori rizika za razvoj mijastenije gravis	4
1.3. Terapija mijastenije gravis.....	5
1.4. Biomarkeri mijastenije gravis	6
2. CILJEVI	8
3. MATERIJAL I METODE.....	9
3.1. Ispitivanje tačkastih varijanti u lokusima koji sadrže gene za AChR kao prediktora rizika za razvoj stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis.....	9
3.1.1. Selekcija potencijalno uzročnih varijanti za validaciju u studiji genetičke asocijacije	9
3.1.2. Dizajn studije genetičke asocijacije tipa slučajeva i kontrola.....	14
3.1.3. Izolovanje i provera kvaliteta i koncentracije DNK	16
3.1.4. Genotipizacija potencijalno uzročnih varijanti	17
3.1.5. Statistička obrada rezultata studije genetičke asocijacije	18
3.2. Analiza mikroRNK iz plazme kao prediktora terapijskog odgovora bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis.....	20
3.2.1. Selekcija mikroRNK za prospektivnu longitudinalnu studiju	20
3.2.2. Dizajn prospektivne longitudinalne studije.....	21
3.2.3. Terapijski protokoli, kliničke skale i definicija kliničkog ishoda	23
3.2.4. Izolovanje ukupne RNK iz plazme.....	23
3.2.5. Konverzija RNK u komplementarnu DNK.....	24
3.2.6. Kvantifikacija mikroRNK u plazmi primenom kvantitativnog PCR-a.....	25
3.2.7. Statistička analiza	27
4. REZULTATI	29
4.1. Rezultati ispitivanja tačkastih varijanti u lokusima koji sadrže gene za AChR kao prediktora nastanka stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis	29
4.1.1. Rezultati selekcije potencijalno uzročnih tačkastih varijanti u lokusu <i>CHRNA1</i> za validaciju u studiji genetičke asocijacije	29
4.1.2. Rezultati studije genetičke asocijacije.....	31
4.2. Rezultati longitudinalne analize mikroRNK u plazmi kao prediktora terapijskog odgovora bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis.....	38
4.2.1. Rezultati terapijskog pristupa i kliničke evaluacije bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis tokom praćenja.....	38
4.2.2. Rezultati ispitivanja nivoa mikroRNK u plazmi bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis tokom praćenja.....	42

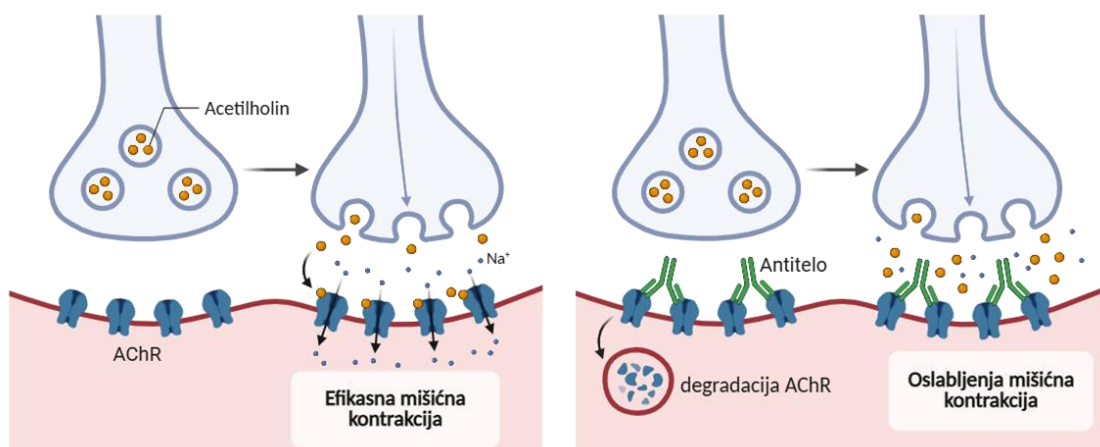
4.2.3. Rezultati ispitivanja korelacije nivoa miR-150-5p, miR-27a-3p i miR-21-5p sa kliničkim skorovima MG-ADL, QMG i MGC	45
4.2.4. Rezultati ispitivanja nivoa miR-150-5p i miR-27a-3p kod zdravih kontrola i bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis	46
4.2.5. Rezultati analize miR-150-5p kao prediktivnog biomarkera kod stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis	47
5. DISKUSIJA	48
5.1. Aktuelni izazovi u lečenju i potreba za novim terapijskim pristupima kod stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis	48
5.2. Varijante rs4151121 i rs35274388 u lokusima gena za AChR kao prediktori nastanka stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis	49
5.3. MikroRNK miR-150-5p iz plazme kao prediktor terapijskog odgovora kod stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis	52
5.4. Budući pravci istraživanja: preporuke i perspektive	56
6. ZAKLJUČCI	57
7. LITERATURA	59
8. PRILOZI	73
Prilog 3.1.	73
Prilog 3.2.	75
Prilog 3.3.	77
Prilog 3.4.	78
Prilog 3.5.	79
Prilog 3.6.	80
Prilog 4.1.	81
Prilog 4.2.	83
Prilog 4.3.	84
Prilog 4.4.	85

1. Uvod

1.1. Stečena mijastenija gravis

Mijastenija gravis (MG) je retko, imunski posredovano neurološko oboljenje koje se klinički manifestuje slabošću i patološkim zamaranjem poprečno-prugastih mišića, uz poboljšanje mišićne snage nakon odmora ili primene antiholinesterazne terapije (Gilhus et al., 2019; Pfaff et al., 2022). Prosečna stopa incidencije MG iznosi 8-10 obolelih na milion stanovnika u različitim regionima sveta (Gilhus, 2016). Epidemiološka studija koja je sprovedena na teritoriji grada Beograda u tridesetogodišnjem periodu (1979-2008), zabeležila je jednu od najviših vrednosti incidencije – 13,3 na milion stanovnika (Lavrnic et al., 2013).

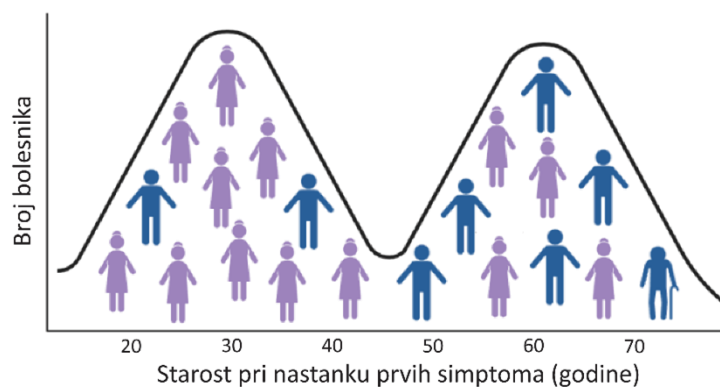
MG predstavlja i najčešće oboljenje nervno-mišićne sinapse (engl. *neuromuscular junction*) koje nastaje usled narušavanja imunološke tolerancije prema antigenima na postsinaptičkoj membrani mišićnog vlakna (Gilhus et al., 2019). Dosadašnja istraživanja ukazuju da proces senzibilizacije započinje u timusu, dok je eferentni krak imunskog odgovora posredovan autoantitelima usmerenim na različite postsinaptičke antigene (Matsui et al., 2025). U približno 85 % slučajeva autoantitela stupaju u interakciju sa epitopima subjedinica nikotinskog acetilholinskog receptora (engl. *nicotinic acetylcholine receptor*; AChR-pozitivna MG) (Slika 1.1), a ređe sa epitopima kinaze specifične za mišiće (engl. *muscle-specific kinase*; MuSK-pozitivna MG) (~6 %) i proteina 4 sličnom receptoru za lipoproteine niske gustine (engl. *Low density lipoprotein receptor-related protein 4*, LRP4) (Pfaff et al., 2022).



Slika 1.1. Šematski prikaz događaja na nervno-mišićnoj sinapsi. **A.** U normalnim fiziološkim uslovima, oslobađanje acetilholina iz presinaptičkog završetka i njegovo vezivanje za nikotinske acetilholinske receptore (AChR) na postsinaptičkoj membrani dovode do depolarizacije mišićnog vlakna i efikasne mišićne kontrakcije. **B.** Kod AChR-pozitivne MG, autoantitela usmerena na AChR uzrokuju njihovu blokadu ili degradaciju, što rezultira smanjenom postsinaptičkom depolarizacijom i oslabljenom mišićnom kontrakcijom. Slika je izrađena korišćenjem BioRender.com.

AChR-pozitivna MG, kao najčešća serološka forma bolesti, odlikuje se izraženom heterogenošću. Ona se ispoljava kako u pogledu starosti pri pojavi prvih simptoma bolesti, tako i u kliničkom ispoljavanju bolesti, koje obuhvata širok spektar simptoma i kliničkih znakova bolesti različite težine (Gilhus, 2016). Ovi aspekti imaju važne implikacije za razmatranje genetičke osnove bolesti, kao i za identifikaciju molekularnih biomarkera relevantnih za različite kliničke entitete i aspekte AChR-pozitivne MG.

AChR-pozitivna MG može se javiti u bilo kom uzrastu i kod pripadnika oba pola; međutim, epidemiološke studije dosledno ukazuju na izraženu bimodalnu raspodelu starosti pri nastanku prvih simptoma (**Slika 1.2**) (Bubuioc et al., 2021; Dresser et al., 2021; Rutledge et al., 2016). MG sa ranim početkom najčešće se javlja kod osoba ženskog pola, sa vrhom incidencije u trećoj deceniji života, dok je MG sa kasnim početkom detektovana kod približno istog broja pacijenata ženskog i muškog pola, sa vrhom incidencije oko šezdesete godine života (**Slika 1.2**) (Djordjevic et al., 2024; Gilhus, 2016; Lavrnic et al., 2013; Pfaff et al., 2022). Ovakva bimodalna raspodela starosti na početku bolesti ukazuje na postojanje različitih genetičkih determinanti rane i kasne forme AChR-pozitivne MG, što predstavlja osnov za njihovo razmatranje kao zasebnih entiteta u genetičkim analizama.



Slika 1.2. Šematski prikaz bimodalne raspodele oboljevanja u odnosu na starost na početku prvih simptoma AChR-pozitivne MG. Rani početak bolesti češće se registruje kod osoba ženskog pola, dok kasni početak karakteriše približno podjednaka zastupljenost ženskog i muškog pola. Slika je izrađena korišćenjem BioRender.com.

Kod približno 50 % bolesnika bolest se inicijalno manifestuje slabošću i patološkom zamorljivošću ekstraokularnih mišića, sa spuštanjem kapaka (ptoza) i/ili pojavom duplih slika (diplopija). Očni simptomi ostaju jedini znaci bolesti, od početka prvih tegoba, kod 5-25 % slučajeva kod kojih se postavlja dijagnoza okularne forme MG (Pfaff et al., 2022). Međutim, kod većine bolesnika tokom prve dve do tri godine dolazi do generalizacije bolesti, sa zahvatanjem ostalih mišićnih grupa, najčešće facijalnih, bulbarnih i mišića ekstremiteta, što definiše generalizovanu formu MG (Hehir & Silvestri, 2018; Pfaff et al., 2022). Zbog izražene kliničke heterogenosti, Američka fondacija za MG (engl. *Myasthenia Gravis Foundation of America*, MGFA) predložila je standardizovanu kliničku klasifikaciju bolesnika (Jaretzki et al., 2000), koja je danas široko prihvaćena i koristi se u svakodnevnoj kliničkoj praksi u zbrinjavanju bolesnika sa AChR-pozitivnom MG (Pfaff et al., 2022; Szczudlik et al., 2020). Prema MGFA klasifikaciji, bolesnici su podeljeni u pet kategorija (Forma I-V) na osnovu težine kliničke slike i zahvaćenosti određenih mišićnih grupa, pri čemu forma I obuhvata okularnu MG, dok forme II-V odgovaraju generalizovanoj MG

(**Tabela 1.1**). Retrospektivna studija tokom koje su poređene okularna i generalizovana forma bolesti pokazala je da bolesnici sa okularnom MG imaju niže titre autoantitela na AChR, zahtevaju manje intenzivnu terapiju i brže postižu stabilnu kontrolu bolesti u poređenju sa bolesnicima sa generalizovanom MG (Axelsen et al., 2024). Shodno tome, razlike između okularne i generalizovane MG ne odražavaju isključivo kliničku prezentaciju bolesti, već i distinktno aspekte imunopatogeneze i obrasce terapijskog odgovora (Axelsen et al., 2024), što predstavlja važno metodološko razmatranje pri izboru učesnika u kliničkim studijama koje obuhvataju bolesnike sa MG.

Tabela 1.1. Klinička klasifikacija bolesnika prema preporukama Američke fondacije za MG (MGFA), poznata kao MGFA skala (Jaretzki et al., 2000).

Klinička slika	Simptomi		Kategorija
Slabost očnih mišića	Ptoza (spuštanje kapaka) i/ili diplopija (dupli vid).		Forma I
Generalizovana slabost	Blaga slabost	Dominantna zahvaćenost aksijalnih i/ili mišića ekstremiteta. U manjoj meri mogu biti zahvaćeni i orofaringealni i respiratorni mišići	Forma IIa
		Dominantna zahvaćenost orofaringealnih i/ili respiratornih mišića. U manjoj meri mogu biti zahvaćeni i aksijalni i/ili mišići ekstremiteta.	Forma IIb
	Umerena slabost	Dominantna zahvaćenost aksijalnih i/ili mišića ekstremiteta. U manjoj meri mogu biti zahvaćeni i orofaringealni i respiratorni mišići.	Forma IIIa
		Dominantna zahvaćenost orofaringealnih i/ili respiratornih mišića. U manjoj meri mogu biti zahvaćeni i aksijalni i/ili mišići ekstremiteta.	Forma IIIb
	Teška slabost	Dominantna zahvaćenost aksijalnih i/ili mišića ekstremiteta. U manjoj meri mogu biti zahvaćeni i orofaringealni i respiratorni mišići.	Forma IVa
		Dominantna zahvaćenost orofaringealnih i/ili respiratornih mišića. U manjoj meri mogu biti zahvaćeni i aksijalni i/ili mišići ekstremiteta.	Forma IVb
	Mijastenična kriza sa potrebom za intubacijom i mehaničkom ventilacijom.		Forma V

1.2. Genetički faktori rizika za razvoj mijastenije gravis

MG je multifaktorijalno oboljenje koje se razvija kod osoba sa genetičkom predispozicijom u specifičnim uslovima sredine (Lavrnic et al., 2013). Doprinos genetičkih faktora razvoju MG je opisan u studijama konkordantnosti koje su analizirale sličnosti kod blizanačkih parova. Značajno viši stepen konkordantnosti među monozigotnim (približno 30-40 %) u odnosu na dizigotne blizance (oko 4-5 %), podržava postojanje nasledne genetičke predispozicije za razvoj ove bolesti (Ramanujam et al., 2011).

Razumevanje genetičke predispozicije za razvoj AChR-pozitivne MG značajno je unapređeno genomskim istraživanjima, koja su ukazala na doprinos različitih genetičkih faktora riziku za razvoj MG sa kasnim i ranim početkom (Braun et al., 2024). Studije asocijacije na nivou celog genoma (engl. *genome-wide association studies*, GWAS) identifikovale su brojne lokuse, pre svega gene uključene u regulaciju imunološkog odgovora, kao što su *HLA* (Chia et al., 2022; Gregersen et al., 2012; Renton et al., 2015; Seldin et al., 2016), *TNIP1* (Gregersen et al., 2012), *TNFRSF11A* (Chia et al., 2022; Renton et al., 2015; Seldin et al., 2016), *CTLA4* (Renton et al., 2015), *PTPN22* (Chia et al., 2022) i drugi. Pored imunoloških lokusa, GWAS i studije asocijacije na nivou celog transkriptoma (engl. *transcriptome-wide association studies*, TWAS) identifikovale su lokuse gena ključnih za strukturnu organizaciju nervno-mišićne sinapse. Među njima su geni koji kodiraju subjedinice AChR, *CHRNA1* ($\alpha 1$ -subjedinica) i *CHRNB1* ($\beta 1$ -subjedinica), kao i gen *ERBB2*, koji reguliše ekspresiju AChR na postsinaptičkoj membrani (Braun et al., 2024; Chia et al., 2022; Zhu et al., 2022).

GWAS i TWAS omogućavaju ispitivanje genetičke predispozicije multifaktorijalnih oboljenja i statističku identifikaciju lokusa i molekularnih puteva uključenih u patogenezu bolesti, sa potencijalnim implikacijama za razvoj novih terapijskih strategija (Visscher et al., 2012). Međutim, statistički identifikovane varijante ne moraju nužno predstavljati uzročne genetičke faktore, budući da dizajn ovih studija ne omogućava razmatranje strukture neravnoteže vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, LD). Drugim rečima, određena varijanta može biti identifikovana usled vezanog nasleđivanja sa uzročnom varijantom, te predstavljati njenu „zamenu“ (engl. *proxy*) (Tam et al., 2019; Wang & Huang, 2022). Stoga je neophodna primena naprednih analitičkih strategija radi identifikacije varijanti koje imaju funkcionalni i uzročni značaj. U tom cilju primenjuju se napredni *in silico* metodološki pristupi, poput mendelovske randomizacije (engl. *Mendelian randomization*, MR) (Sanderson et al., 2022) i finog mapiranja (engl. *fine-mapping*) (Schaid et al., 2018), koji integrišu GWAS signale sa obrascima LD-a i funkcionalnim genomskim anotacijama (Gerber et al., 2024; Wang & Huang, 2022). Ipak, iako ovi pristupi omogućavaju selekciju potencijalno uzročnih varijanti na lokusima identifikovanim u genomskim studijama, potvrda njihove uzročne uloge zahteva validaciju na humanom uzorku. U tom kontekstu, studije genetičke asocijacije tipa slučajeva i kontrola (engl. *case-control study*), omogućavaju procenu uticaja pojedinačnih genetičkih varijanti na rizik za razvoj složenih oboljenja kroz poređenje njihove učestalosti između obolelih i zdravih ispitanika (Al-Chalabi, 2009; Lewis & Knight, 2012).

Uprkos napretku u razumevanju genetičke osnove AChR-pozitivne MG ostvarenog kroz GWAS i TWAS, uzročna uloga genetičkih varijanti u lokusima koji kodiraju subjedinice AChR ostaje nedovoljno ispitana. Zhu i saradnici (2022) su primenom MR pristupa zasnovanog na sažetim podacima (engl. *summary data-based MR*, SMR), selektovali varijantu rs4151121 u lokusu *CHRNA1* kao verovatno uzročnu za AChR-pozitivnu MG, međutim ova pretpostavka nije ispitana u studijama genetičke asocijacije. Pored toga, iako je lokus *CHRNA1* dosledno identifikovan u GWAS istraživanjima (Braun et al., 2024; Chia et al., 2022), do sada nisu sprovedene napredne analize usmerene na identifikaciju potencijalno uzročnih varijanti unutar ovog genomskog regiona.

1.3. Terapija mijastenije gravis

Savremeno lečenje MG zasniva se na stratifikovanom terapijskom pristupu, utemeljenom na serološkim i kliničkim podtipovima bolesti, uz individualizovano prilagođavanje terapije u skladu sa terapijskim odgovorom i karakteristikama bolesnika. U tom kontekstu, razvijene su međunarodne konsenzusne smernice koje neurolozima pružaju okvir za izbor terapije kod različitih podtipova MG (Narayanaswami et al., 2021; Sanders et al., 2016; Wiendl et al., 2023). Uprkos razvoju novih terapijskih opcija, uključujući ciljane biološke lekove (Uzawa & Utsugisawa, 2023), usled njihove ograničene efikasnosti, u kliničkoj praksi i dalje se najčešće primenjuje standardna terapija. Inhibitori acetilholinesteraze, u kombinaciji sa kortikosteroidima, decenijama predstavljaju standardnu terapiju generalizovane AChR-pozitivne MG, dok se kod bolesnika sa neadekvatnim terapijskim odgovorom dodatno uvode drugi imunosupresivi, poput azatioprina, ciklosporina A i mikofenolat-mofetila (Farmakidis et al., 2018). Kod teških formi bolesti i u situacijama akutnog pogoršanja primenjuju se privremeni terapijski postupci, poput terapijske izmene plazme i aplikacije intravenskih imunoglobulina (Farmakidis et al., 2018; Gajdos et al., 1998; Pavlekovic et al., 2023).

Inhibitori acetilholinesteraze sprečavaju razgradnju acetilholina, čime se povećava njegova efektivna koncentracija u nervno-mišićnoj sinapsi i pojačava nervno-mišićna transmisija. Najčešće se koriste lekovi piridostigmin bromid i neostigmin bromid. Efekat ove vrste lekova je kratkotrajan i uglavnom se koristi samo za ublažavanje simptoma bolesti (Narayanaswami et al., 2021).

Kortikosteroidi su imunosupresivi sa kojima se kod većine bolesnika sa MG lečenje započinje imajući u vidu da relativno brzo, obično 4-6 nedelja od početka primene, ostvaruju terapijsku efikasnost. Najčešće primenjivan lek je prednizon. Međutim, poznato je da kod većine bolesnika 7-14 dana nakon početka terapije, posebno pri davanju visokih doza kortikosteroida, može doći do prolaznog pogoršanja stanja obolelih koje spontano prolazi najčešće tokom perioda od dve nedelje. Pored toga, poznato je da tokom dugoročne primene kortikosteroida dolazi do razvoja brojnih neželjenih efekata poput arterijske hipertenzije, povećanja telesne mase, kušingoidnog izgleda lica, promena na koži i osteoporoze (Buchman, 2001). U širokoj upotrebi je i lek deflazakort, koji ima manje izražene neželjene efekte, koji se pre svega odnose na metabolizam i gustinu kostiju (Brunton et al., 2018; Montecucco et al., 1988). U slučajevima nepotpunog terapijskog odgovora na primenjenu kortikosteroidnu terapiju, ili u slučaju pojave neželjenih efekata ove terapije i pored njene efikasnosti, u lečenju obolelih sa MG koriste se i nesteroidni imunosupresivi. U većini evropskih zemalja najčešće se koristi azatioprin. On se veoma

retko uvodi kao monoterapija, imajući u vidu odloženi terapijski efekat koji nastaje obično 3-6 meseci nakon početka lečenja, dok se maksimalni efekat ispoljava tek nakon dve godine od početka terapije. Međutim, i ova terapija uzrokuje pojavu neželjenih efekata o kojima moramo voditi računa tokom njene primene, a to su gastrointestinalne smetnje, hepatotoksičnost i supresija kostne srži.

Kako bi se smanjio rizik od razvoja potencijalnih neželjenih efekata tokom dugoročne imunosupresivne terapije u lečenju bolesnika sa MG se preporučuje primena kombinovane imunoterapije, primenom steroidnih i nesteroidnih imunosupresiva u najnižim terapijski efikasnim dozama (Gilhus, 2016). Izbor terapije zavisi od forme i težine bolesti, postojanja pridruženih komorbiditeta i pojave neželjenih efekata primenjene terapije. Dosadašnje iskustvo iz kliničke prakse govori da postizanje dugoročne i stabilne remisije i dalje predstavlja izazov u lečenju MG, imajući u vidu da ~20 % bolesnika ne odgovori adekvatno na primenu konvencionalne imunoterapije ili razvija neželjene efekte koji ograničavaju njihovu dugoročnu primenu (Kaminski & Denk, 2022; Sanders & Evoli, 2010). Ovi podaci naglašavaju potrebu ne samo za razvojem novih, efikasnijih terapijskih strategija, već i za identifikacijom pouzdanih biomarkera odgovora na standardnu imunosupresivnu terapiju u cilju omogućavanja racionalnijeg i personalizovanog pristupa lečenju bolesnika sa MG.

1.4. Biomarkeri mijastenije gravis

Identifikacija pouzdanih biomarkera odgovora na terapiju i dalje predstavlja značajan izazov u lečenju i praćenju bolesnika sa MG. Utvrđeno je da titar autoantitela ne pokazuje konzistentnu korelaciju sa težinom bolesti (Kojima et al., 2021; Meriggioli & Sanders, 2012), iako je ona opisana na individualnom nivou (Vincent & Newsom-Davis, 1985). Pored toga, odgovor na repetitivnu nervnu stimulaciju, kao i abnormalnosti detektovane elektromiografijom pojedinačnog mišićnog vlakna, ne odražavaju u dovoljnoj meri objektivni klinički status obolelih sa MG da bi se mogli koristiti kao biomarkeri terapijskog odgovora (Benatar et al., 2006, 2012). Dosadašnjim istraživanjima nisu identifikovani biomarkeri koji bi bili potencijalni prediktori rezistencije na terapiju kod bolesnika sa MG (Imai et al., 2015).

Razvoj novih molekularnih biomarkera odgovora na terapiju zahteva višefazni proces, usmeren na ispitivanje njihove specifičnosti i senzitivnosti, ključnih za široku kliničku primenu. Ovaj proces obuhvata inicijalnu identifikaciju kandidata u studijama preseka (engl. *cross-sectional studies*), praćenu validacijom u nezavisnim kohortama u studijama slučajeva i kontrola i studijama longitudinalnog dizajna (engl. *longitudinal study*) u cilju ispitivanja njihove diskriminativne snage i pouzdanosti (Pepe et al., 2001).

Studije preseka identifikovale su više cirkulišućih mikroRNK kao kandidate za biomarkere MG (Cavalcante et al., 2019; Punga et al., 2014). Cirkulišuće mikroRNK su male nekodirajuće RNK detektibilne u biološkim tečnostima, koje odražavaju fiziološko i patološko stanje organizma. Njihov dijagnostički i prognostički potencijal u različitim bolestima zasniva se na tkivnoj i ćelijskoj specifičnosti ekspresije, visokoj stabilnosti u biološkim tečnostima, neinvazivnom uzorkovanju i mogućnosti automatizovane i isplative kvantifikacije (Andersen & Tost, 2020; D'Abundo et al., 2024; D'Alessandra et al., 2010; Dobrowolny et al., 2021; Kosaka et al., 2010; Lim et al., 2025; Sayed et al., 2014; Wang et al.,

2010). Uloga mikroRNK u regulaciji ekspresije gena uključenih u imunološki odgovor i metabolizam lekova ukazuje na njihov potencijal kao biomarkera odgovora na terapiju kod bolesnika sa MG (Singh et al., 2013; Yu et al., 2016). Punga i saradnici (2014) su identifikovali izmenjenu ekspresiju tri mikroRNK sa ulogom u imunološkom odgovoru - miR-21-5p, miR-27a-3p i miR-150-5p - u serumu bolesnika sa AChR-pozitivnom MG u poređenju sa zdravim kontrolama. Takođe, Cavalcante i saradnici (2019) su pokazali izmenjenu ekspresiju miR-181d-5p, miR-323b-3p, miR-340-3p, miR-409-3p i miR-485-3p u punoj krvi između bolesnika sa pozitivnim odgovorom i refraktarnih bolesnika na imunosupresivnu terapiju. Uprkos obećavajućim nalazima, validacione studije ovih mikroRNK u MG bile su ograničene veličinom uzorka, heterogenošću bolesti kod analiziranih bolesnika ili nedostatkom adekvatnih kontrola (Beretta et al., 2022; Punga et al., 2015; Sabre et al., 2018). Nedavna prospektivna studija dodatno je ukazala na potrebu za dugoročnim praćenjem ispitanika u vremenskim intervalima od nekoliko meseci, kao i za regrutacijom uparenih kontrola (Huang et al., 2024), kako bi se dalje ispitaio potencijal mikroRNK kao molekularnih biomarkera u odgovoru na imunosupresivnu terapiju kod bolesnika sa MG.

2. Ciljevi

1. Ispitivanje potencijalno uzročnih varijanti u lokusima koji sadrže gene za subjedinice AChR (*CHRNA1* i *CHRN1*) kao prediktora rizika za razvoj stečene AChR-pozitivne MG.

Specifični ciljevi:

- Selekcija potencijalno uzročnih funkcionalnih varijanti u lokusu *CHRN1* i u lokusu *CHRNA1* primenom bajesovskog finog mapiranja;
- Validacija selektovanih uzročnih varijanti kroz genetičku studiju asocijacije slučajeva i kontrola.

2. Ispitivanje odabranih mikroRNK u plazmi kao biomarkera odgovora na imunosupresivnu terapiju kod stečene AChR-pozitivne MG.

Specifični ciljevi:

- Ispitivanje razlika u nivoima mikroRNK u plazmi bolesnika pre i nakon primene imunosupresivne terapije;
- Ispitivanje korelacije nivoa mikroRNK u plazmi i kliničkih skorova specifičnih za MG tokom prospektivne longitudinalne studije;
- Ispitivanje razlika u nivoima mikroRNK u plazmi kontrolnih ispitanika iz opšte populacije i bolesnika pre i nakon primene imunosupresivne terapije;
- Ispitivanje potencijala mikroRNK kao prediktora odgovora na imunosupresivnu terapiju.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitivanje tačkastih varijanti u lokusima koji sadrže gene za AChR kao prediktora rizika za razvoj stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis

3.1.1. Selekcija potencijalno uzročnih varijanti za validaciju u studiji genetičke asocijacije

Varijanta rs4151121 u lokusu *CHRNA1* je odabrana za validaciju u genetičkoj studiji asocijacije na osnovu podataka iz literature. Varijanta rs4151121 je *in silico* selektovana kao potencijalno uzročna primenom metode mendelovske randomizacije zasnovane na sumarnim podacima (engl. *summary data-based Mendelian randomization*, SMR) (Zhu et al., 2022) (**Slika 3.1A**). Ovim pristupom integrisani su podaci sumarne statistike iz najsveobuhvatnije studije asocijacije na nivou celog genoma bolesnika sa MG (Chia et al., 2022) i podaci o lokusima povezanim sa varijacijama u ekspresiji gena u skeletnim mišićima (engl. *expression quantitative trait loci*, eQTLs) (Zhu et al., 2022). Analiza Zhu i saradnika (2022) pokazala je da varijanta rs4151121 ima veliki potencijal da bude uzročna varijanta za razvoj MG, uz malu verovatnoću da je njen efekat posledica plejotropije ili povezanosti sa nekom drugom uzročnom varijantom. Dodatno, prema pregledu relevantnih naučnih baza (PubMed, Scopus) do 15. septembra 2024. godine nije bila eksperimentalno ispitana u validacionim studijama genetičke asocijacije.

In silico analiza varijanti u lokusu *CHRNA1* bajesovskim finim mapiranjem

U cilju precizne identifikacije potencijalno uzročne varijante u lokusu *CHRNA1* i sagledavanja njene biološke relevantnosti sprovedena je *in silico* analiza primenom međusobno komplementarnih pristupa statističkog i funkcionalnog bajesovskog finog mapiranja (engl. *Bayesian fine-mapping*) (Gerber et al., 2024; Schaid et al., 2018).

U fazi filtriranja varijanti za fino mapiranje, iz GWAS sumarne statistike (engl. *summary statistics*) (Chia et al., 2022) izdvojeno je ukupno 5120 genetičkih varijanti pozicioniranih do 1 megabaze (Mb) uzvodno i nizvodno u odnosu na vodeću varijantu identifikovanu u studiji asocijacije na nivou celog genoma (rs35274388; chr2:174764492, GRCh38) (**Slika 3.1B**). Potom su iz analize isključene varijante sa učestalošću ređeg alela (engl. *minor allele frequency*, MAF) manjom od 0,01, kao i varijante sa korigovanim p-vrednostima većim od 10^{-5} . Nakon primene navedenih kriterijuma, selektovano je ukupno 46 varijanti za sprovođenje finog mapiranja lokusa *CHRNA1* (**Slika 3.1B**).

Za statističko fino mapiranje primenjeni su modeli koji omogućavaju integraciju jačine signala asocijacije i strukture neravnoteže vezanosti između genetičkih varijanti. Analize su sprovedene korišćenjem imputiranih podataka za selektovanih 46 varijanti, uključujući MAF, beta i SE vrednosti iz GWAS sumarne statistike (**Prilog 3.1**) (Chia et al., 2022), kao i LD matricu međusobne neravnoteže vezanosti konstruisanu na osnovu evropskog referentnog panela projekta 1000 Genomes (CEU populacija, faza 3) (1000 Genomes Project Consortium, 2015) (**Slika 3.2**). Statističko fino mapiranje izvedeno je primenom tri međusobno komplementarna algoritma: stohastičke pretrage modela (engl. *shotgun stochastic search*) korišćenjem softvera FINEMAP (Benner et al., 2016), kao i tačne

inferencije (engl. *exact inference*) i Gibbsovog uzorkovanja (engl. *Gibbs sampling*) implementiranih u softveru PAINTOR (Kichaev et al., 2014). FINEMAP je pokrenut sa podrazumevanim parametrima: `--model sss, --corr-config 0.95, --n-causal-snps 5, --corr-group 0.99, --n-configs-top 50000, --prior-k 0, --prior-k0 0, --prior-std 0.05`, prema preporukama iz radnog toka softvera (Benner et al., 2016). Algoritam stohastičke pretrage modela korišćen je za procenu broja potencijalno uzročnih varijanti u lokusu *CHRNA1*. Izračunate su prethodne (engl. *prior probability*) i naknadne verovatnoće (engl. *posterior probability*) za prisustvo od nula do pet uzročnih varijanti u analiziranom skupu podataka, a kao najverovatniji scenario uzet je onaj sa najvišom posteriornom verovatnoćom, prema preporukama iz radnog toka softvera. Softver PAINTOR je pokrenut sa podrazumevanim parametrima `-input.files [fajl], -in [direktorijum], -out [direktorijum], -Zhead [fajl], -LDname [fajl]`. Algoritam tačne inferencije je pokrenut postavkom dodatnog parametra `-enumerate N`, koji podrazumeva zadavanje unapred definisanog broja potencijalno uzročnih varijanti, gde N predstavlja broj uzročnih varijanti (Gerber et al., 2024). Nakon toga je primenjen algoritam Gibbsovog uzorkovanja postavkom parametra `-mcmc` umesto `-enumerate N`, koji ne zahteva zadavanje pretpostavljenog broja potencijalno uzročnih varijanti.

Za funkcionalno fino mapiranje korišćeni su modeli koji omogućavaju integraciju imputiranih podataka iz GWAS sumarne statistike, LD matrica i funkcionalnih genomskih anotacija. Imputirane funkcionalne genomske anotacije sadržale su podatke o lokusima koji korelišu sa varijacijama u fenotipu kvantitativnih osobina unutar populacije – lokusi za kvantitativne osobine (engl. *quantitative trait loci*, QTL), mestima vezivanja transkripcionih faktora (engl. *transcription factor*, TF), motivima podudarnim sa mestima vezivanja TF i drugim motivima, DNaza I zaštićenim mestima hromatina (engl. *DNase footprints*) i pikovima pristupačnosti hromatina (engl. *chromatin accessibility peaks*, CAPs). Navedeni podaci su preuzeti iz baze RegulomeDB, verzija 2.1 (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023). Dodatne funkcionalne anotacije, uključujući podatke o pozicijama varijanti uzvodno ili nizvodno od transkripta, u okviru promotora, introna ili egzona, kao i u okviru utišivača ili pojačivača, definisane su na osnovu konsenzusnih regulatornih elemenata upotrebom alata Variant Effect Predictor (McLaren et al., 2016) u okviru Ensembl baze, verzija 110 (Martin et al., 2023). Ukupno je u analize imputirano 14 funkcionalnih anotacija, izraženih u formi binarnih matrica (**Prilog 3.2**). Funkcionalno fino mapiranje izvršeno je primenom dva algoritma: tačne inferencije i Gibbsovog uzorkovanja korišćenjem PAINTOR softvera (Kichaev et al., 2014). Softver je pokrenut sa postavkom podrazumevanih parametara za funkcionalno fino mapiranje: `-input.files [fajl], -in [direktorijum], -out [direktorijum], -Zhead [fajl], -LDname [fajl], -annotations [anotacija1, anotacija2, ...] i -enumerate N` (za pokretanje algoritma tačne inferencije) ili `-mcmc` (za pokretanje algoritma Gibbsovog uzorkovanja). Za procenu statističkog značaja svake pojedinačne anotacije (A1) prvo je pokrenut osnovni model bez anotacija (M0), a zatim su pokrenuti modeli koji uključuju samo jednu anotaciju (M1), na primer, „promotor“ (engl. *single-annotation model*). Rezultati svakog modela izraženi su u vidu bajesovog faktora (engl. *Bayes factor*), koji kvantifikuje poboljšanje modela sa ispitivanom anotacijom (M1) u odnosu na osnovni model bez anotacija (M0). Na kraju, u finalni model (engl. *multi-annotation model*) imputirane su sve anotacije koje su statistički značajno doprinele poboljšanju osnovnog modela (M0).

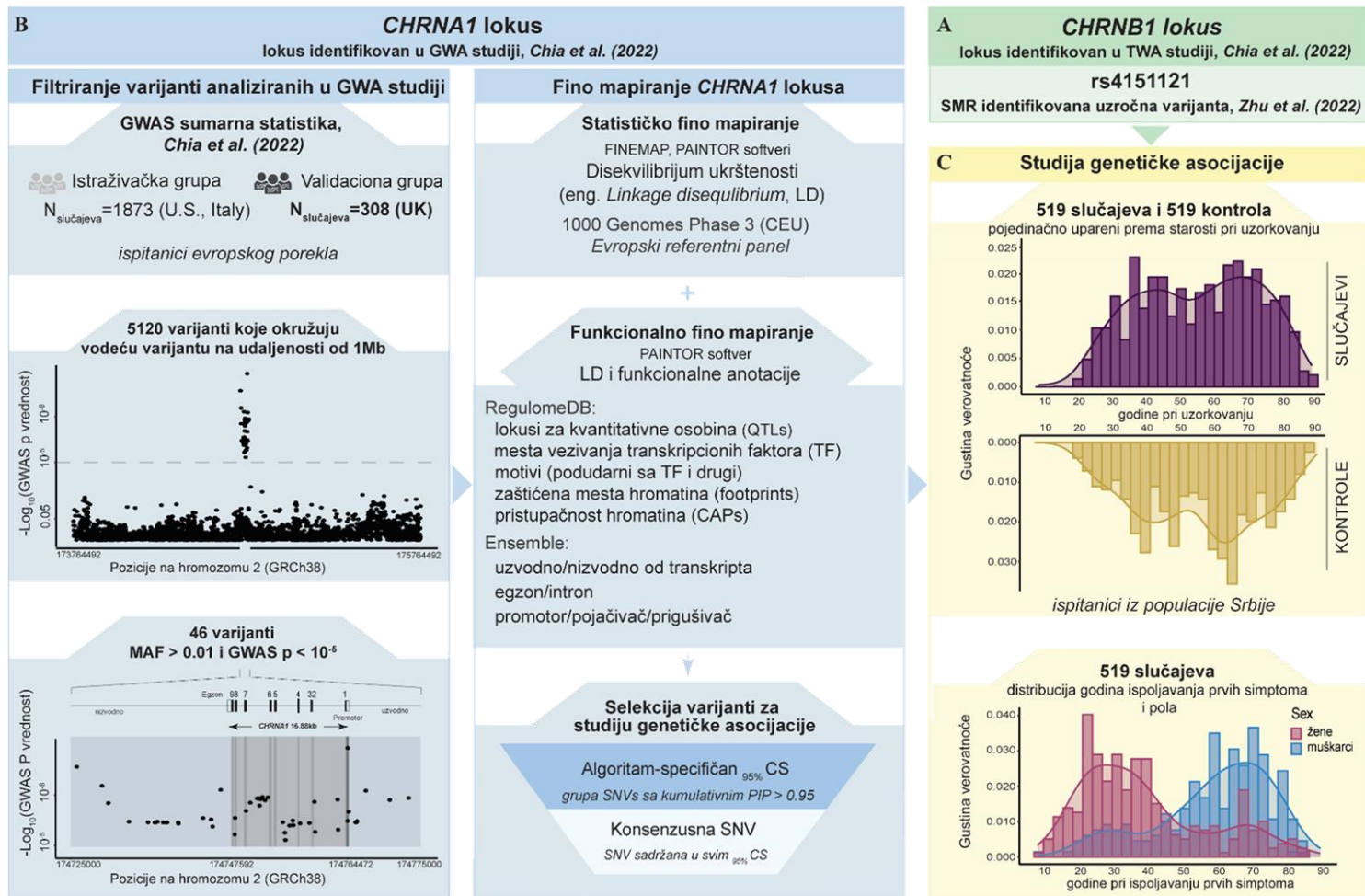
Statistička značajnost modela sa imputiranim anotacijama procenjena je upotrebom testa odnosa verodostojnosti (engl. *likelihood ratio test*, LRT), prema sledećoj formuli:

$$LRT = -2 \times [\log(\text{bajesov faktor}(M0)) - \log(\text{bajesov faktor}(M1))],$$

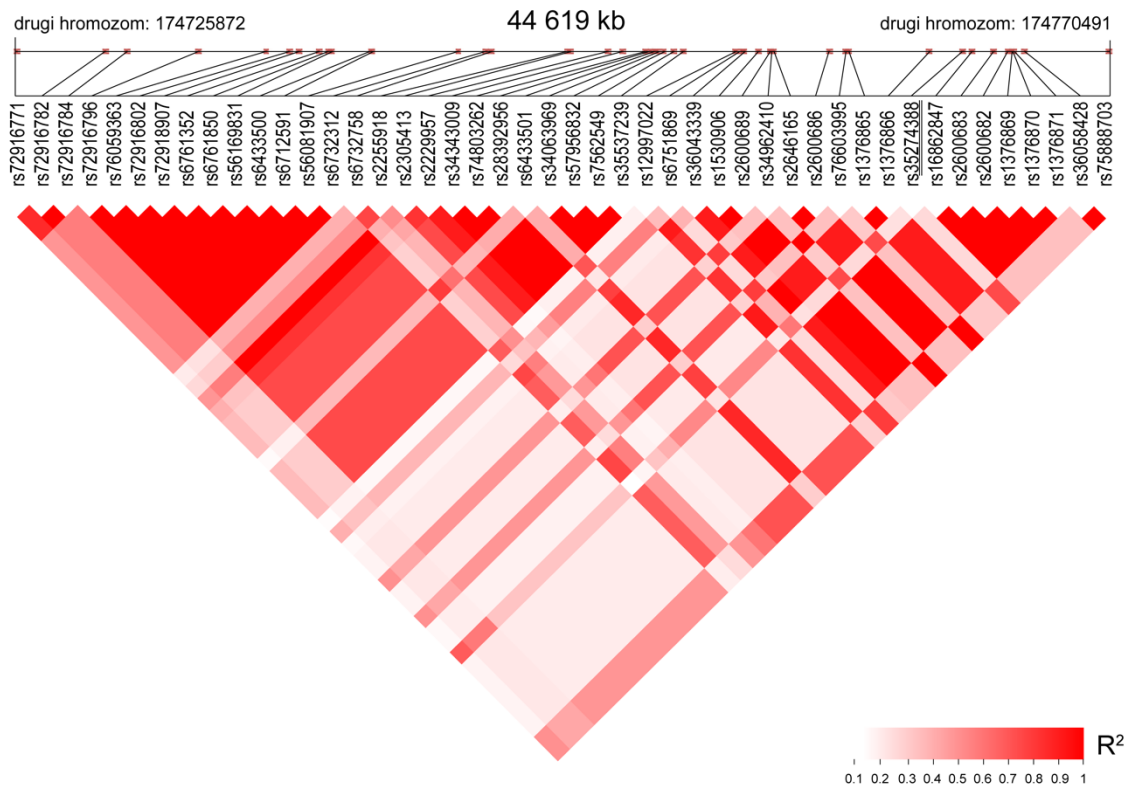
gde M0 predstavlja model bez anotacije, a M1 model koji uključuje ispitivanu anotaciju. Statistička značajnost poboljšanja modela nakon uvođenja anotacije procenjena je poređenjem dobijene LRT statistike sa χ^2 raspodelom sa jednim stepenom slobode (df = 1), pri čemu je kao prag statističke značajnosti korišćena p-vrednost < 0,05.

Kao mera verovatnoće da je određena varijanta uzročna korišćena je naknadna verovatnoća uključenja (engl. *posterior inclusion probability*, PIP), koja se kreće u opsegu od 0 do 1, pri čemu vrednost 0 označava da varijanta nije uzročna, dok je vrednost 1 označavala potpunu (100 %) verovatnoću uzročnosti. Algoritmi stohastičke pretrage modela i tačne inferencije, koji zahtevaju definisanje pretpostavljenog broja uzročnih varijanti dali su jedinstvene PIP vrednosti za svaku varijantu, dok je algoritam Gibbsovog uzorkovanja pokrenut nezavisno 10 puta sa 100 000 iteracija, a PIP vrednosti su izražene kao srednje vrednosti ovih ponavljanja.

Na osnovu rezultata svakog modela generisan je verodostojni skup potencijalno uzročnih varijanti (engl. *credible set*, CS), koji je sadržao varijante čija je kumulativna PIP vrednost bila $\geq 0,95$ (95%CS). Varijanta koja je sadržana u 95%CS svih modela određena je kao konsenzusna varijanta i odabrana je za eksperimentalnu validaciju u genetičkoj studiji asocijacije.



Slika 3.1. Radni tok istraživanja. **A.** Izbor potencijalno uzročne varijante rs4151121 u lokusu *CHRN1* na osnovu prethodnih genomskih studija. **B.** Izbor potencijalno uzročnih varijanti u lokusu *CHRNA1* primenom statističkog i funkcionalnog bajesovskog finog mapiranja. Genomske pozicije varijanti označene su prema Ensembl bazi podataka, verzija 110 (GRCh38) (Martin et al., 2023). **C.** Studija genetičke asocijacije sa individualno uparenim bolesnicima i kontrolama prema godinama pri uzorkovanju (N = 1038), kao i prikaz raspodele starosti pri pojavi prvih simptoma i polne strukture bolesnika sa MG gde je na y osi predstavljena gustina verovatnoće. Slika je generisana korišćenjem programa Adobe Illustrator, verzija 27.0 (Adobe Inc., 2023).



Slika 3.2. Grafikon strukture neravnoteže vezanosti (engl. *linkage disequilibrium plot*, LD plot) za 46 varijanti u lokusu *CHRNA1*, načinjen na osnovu evropskog referentnog panela iz projekta 1000 Genomes Phase 3 (CEU) (1000 Genomes Project Consortium, 2015). Prikazane su relativne pozicije varijanti na fizičkoj mapi hromozoma 2 (chr2:174725872-174770491, GRCh38). Jačina neravnoteže vezanosti je izražena parametrom R^2 za sve parove varijanti i predstavljena je kvadratićima u bojama, od crvene (najjača povezanost) do svetlo roze (slabija povezanost).

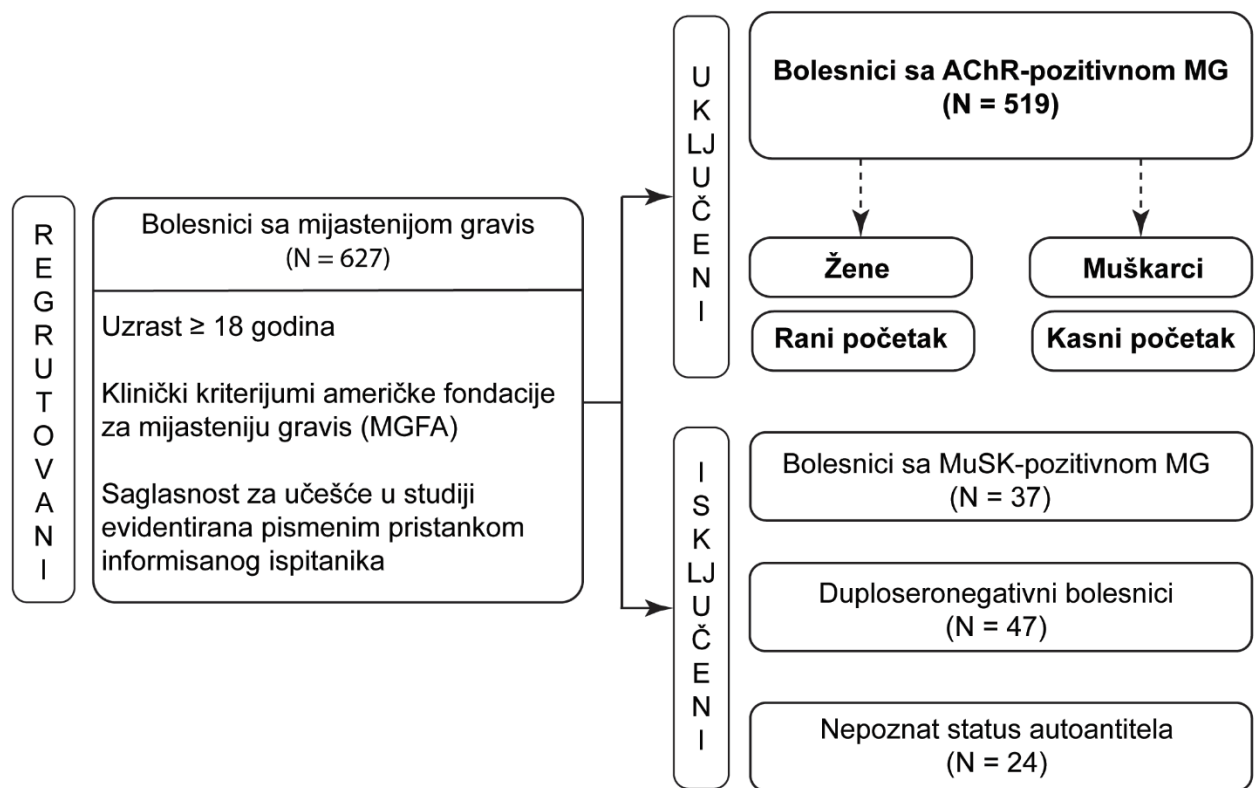
3.1.2. Dizajn studije genetičke asocijacije tipa slučajeva i kontrola

Genetička studija asocijacije tipa slučajeva i kontrola uključila je ispitanike uzrasta od 18 do 90 godina iz populacije Republike Srbije. Prevalentni i incidentni slučajevi (bolesnici sa MG) regrutovani su na Klinici za neurologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu gde se dijagnostikuje i leči veliki broj obolelih sa stečenom MG. Bolesnici su dijagnostikovani prema preporukama Američke fondacije za mijasteniju gravis (MGFA) (Jaretzki et al., 2000), tokom redovnih pregleda ili bolničkog lečenja, od strane neurologa specijalizovanih za neuromišićne bolesti. Svaki bolesnik je uparen sa jednom kontrolnom osobom iz opšte populacije Srbije prema polu i uzrastu (± 3 godine).

Tokom perioda studije ukupno je regrutovano 627 bolesnika sa stečenom MG (**Slika 3.3**). Od tog broja, u studiju je uključeno 519 slučajeva koji su pored kliničkog kriterijuma karakteristične slabosti i patološke zamorljivosti mišića, kao farmakološkog testa i testa neuromišićne transmisije ispunjavali i serološki kriterijum prisustva antitela na AChR. Iz analize su isključeni bolesnici sa MuSK-pozitivnom MG (N = 37), duploseronegativnom MG (N = 47) i bolesnici sa nepoznatim serološkim statusom (N = 24) (**Slika 3.3**).

Za potrebe ovog istraživanja bolesnici sa AChR-pozitivnom MG podeljeni su po polu i starosti na početku prvih simptoma (**Slika 3.3**). Studija je obuhvatila 284 žena i 235 muškaraca, dok je 215 bolesnika imalo rani početak (pre 40. godine života), a 304 bolesnika kasni početak MG (posle 40. godine života). Granica od 40 godina (Meriggioli & Sanders, 2009) korišćena je u skladu sa najobimnijim studijama asocijacije na nivou celog genoma za MG (Chia et al., 2022; Renton et al., 2015), koje su pokazale da bolesnici sa ranim i kasnim početkom bolesti imaju različitu genetičku osnovu. Zbog neujednačenih starosnih granica u različitim studijama, u ovom istraživanju postavljena je i granica od 50 godina (Gilhus, 2016), prema kojoj je 276 obolelih svrstano u grupu bolesnika sa ranim početkom, a 243 u grupu sa kasnim početkom bolesti.

Od svih ispitanika uzorkovano je 5 ml periferne krvi u tubice sa 0,38 % natrijum citratom kao antikoagulansom (VACUETTE® Sodium Citrate Tubes, Greiner Bio-One, Austrija). Uzorci su prvobitno skladišteni na 4 °C do izolovanja genomske DNK, a potom čuvani na -20 °C. Svi ispitanici su detaljno upoznati sa ciljevima i procedurama istraživanja i dali su saglasnost za dobrovoljno učešće. Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu (Odluka broj 187/14).



Slika 3.3. Dijagram toka koji prikazuje kriterijume za selekciju bolesnika sa stečenom MG za studiju genetičke asocijacije.

3.1.3. Izolovanje i provera kvaliteta i koncentracije DNK

Izolovanje genomske DNK iz uzoraka periferne krvi ispitanika sprovedeno je primenom komercijalnog QIAamp DNA Blood Mini kompleta (Qiagen, Nemačka), koji omogućava dobijanje približno 6 µg DNK iz 200 µl krvi. Procedura je sprovedena prema uputstvu proizvođača. U mikrotubu od 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka) dodato je 200 µl periferne krvi, zatim 200 µl AL pufera i 20 µl proteinaze K. Dobijena smeša je kratko vorteksovana (oko 15 sekundi) i zatim inkubirana na 56°C tokom 10 minuta. Nakon inkubacije, smeša je centrifugirana do dostizanja 8000 obrtaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) (Heraeus Megafuge 8R, ThermoFisher Scientific, SAD), pri čemu su uklonjene kondenzovane kapljice sa unutrašnje strane poklopca i oboda mikrotube. U smešu je dodato 200 µl 96 % etanola (ZORKA Pharma, Srbija), nakon čega je smeša vorteksovana tokom 15 sekundi i potom centrifugirana na 8000 rpm tokom 1 minuta. Pripremljena smeša je nalivena na kolonicu sa silika membranom smeštenom u kolektorsku tubu i centrifugirana na 8000 rpm tokom 1 minuta. Kolonica je prebačena u novu kolektorsku tubu. Na kolonice je dodato 500 µl AW1 pufera, a zatim je izvršeno centrifugiranje na 8000 rpm tokom 1 minuta. Kolonice su prebačene u nove kolektorske tubice. Na kolonice je dodato je 500 µl AW2 pufera, a potom izvršeno centrifugiranje na 8000 rpm tokom 3 minuta, nakon čega su kolonice prebačene u sterilne mikrotube od 1,5 ml. Na kolonice je dodato 200 µl sterilne vode bez nukleaze (Nuclease-Free Water, Qiagen, Nemačka) i potom su inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta. Nakon inkubacije, DNK je eluirana centrifugiranjem na 13000 rpm tokom 1 minuta. Izolovana DNK je čuvana na 4°C do provere njenog kvaliteta i koncentracije, a potom je skladištena na -20°C.

Kvalitet i koncentracija izolovane genomske DNK ispitani su elektroforezom u 0,8 % agaroznom gelu. Gel je pripremljen rastvaranjem agaroze (Serva, Nemačka) u 0,5 × TBE puferu (0,045 M Tris-borat, 0,001 M EDTA, pH 8,0). Uzorci DNK su pomešani sa puferom za nalivanje koji je sadržao boju bromfenol plavo (0,25 %, w/v) za praćenje toka elektroforeze – rastvorenu u 30 % (v/v) glicerolu. Za vizualizaciju DNK u gelu upotrebljen je interkalirajući agens – etidijum bromid (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japan), koji je dodat u gel u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Elektroforeza je izvršena u 0,5 × TBE puferu (pH 8,0), pri konstantnom naponu od 100 V, u trajanju od 15 minuta, korišćenjem sistema za horizontalnu elektroforezu (Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad, SAD). Nakon izvršene elektroforeze, DNK je vizualizovana pod UV svetlom talasne dužine 254 nm na transiluminatoru (Mini Transilluminator, Bio-Rad, SAD), a dobijeni rezultati su dokumentovani fotografisanjem gela.

Procena kvaliteta DNK zasnivala se na njenom izgledu u gelu: jasno definisana, kompaktna traka ukazivala je na očuvanu, nedegradovanu DNK, dok je pojava razmaza bila pokazatelj delimične degradacije DNK.

Koncentracija izolovane genomske DNK određivana je uporednom analizom intenziteta emitovane fluorescencije od strane traka na gelu koje potiču od DNK izolata i standarda poznate koncentracije korišćenjem ImageJ programa verzija 1.54k. Kao standard korišćena je humana genomska DNK izolovana iz K562 ćelijske linije, čija je koncentracija iznosila 10 ng/µl (Promega, SAD). Intenzitet emitovane fluorescencije proporcionalan je

količini prisutne DNK, što je omogućilo procenu koncentracije DNK u ispitivanim izolatima (Brunk i Simpson, 1977).

3.1.4. Genotipizacija potencijalno uzročnih varijanti

Genotipizacija potencijalno uzročnih varijanti izvršena je upotrebom komercijalnih eseja za alelsku diskriminaciju – TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assay (ThermoFisher Scientific, USA). Eseji su odabrani korišćenjem onlajn platforme dostupne na adresi <http://snp.appliedbiosystems.com>. Za tačkastu varijantu rs35274388 u lokusu *CHRNA1* korišćen je esej C_27857131_10, dok je za tačkastu varijantu rs4151121 u lokusu *CHRN1* korišćen esej C_26050806_10 (ThermoFisher Scientific, USA).

Oba TaqMan eseja su dizajnirana i validirana od strane proizvođača za specifičnu detekciju varijanti rs35274388 i rs4151121 i sadržala su dva prajmera i dve TaqMan probe. TaqMan proba je lokus-specifičan oligonukleotid, dizajniran da se vezuje za ciljnu sekvencu između mesta vezivanja uzvodnog i nizvodnog prajmera. Jedna proba je potpuno komplementarna regionu jednog alela, dok je druga komplementarna drugom alelu odgovarajuće varijante. Na 5' kraju svake TaqMan probe nalazi se fluorescentni marker, tzv. reporter (zelena VIC boja ili plava FAM boja), dok se na 3' kraju nalazi prigušivač (engl. *Quencher*), koji blokira emitovanje fluorescencije kada je proba u intaktnom stanju. Ovaj proces suprimiranja fluorescencije zasniva se na transferu fluorescentne rezonantne energije (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET), pri čemu se energija emitovana od reportera prenosi na prigušivač, sprečavajući emisiju svetlosti dok su reporter i prigušivač blizu jedan drugom. Tokom lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), prajmeri i proba se vezuju za DNK matricu, a Taq polimeraza započinje elongaciju prajmera uzvodno od vezane probe. Ukoliko je proba pravilno vezana za ciljnu sekvencu, Taq polimeraza vrši hidrolizu probe svojom 5'→3' egzonukleaznom aktivnošću, oslobađajući reporter fluoroboju. Nakon hidrolize, reporter i prigušivač su prostorno udaljeni, čime se narušava FRET i omogućava emitovanje fluorescencije od strane reportera. Samo probe koje se potpuno komplementarno hibridizuju sa DNK matricom podležu ovoj hidrolitičkoj degradaciji, što dovodi do oslobađanja fluorescencije i omogućava preciznu detekciju odgovarajućeg alela.

TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assays korišćeni su u skladu sa uputstvom proizvođača (ThermoFisher Scientific, USA). Za pripremu reakcione smeše za 100 reakcija upotrebjeno je 500 µl 2 x TaqMan Universal PCR Master Mix-a (ThermoFisher Scientific, USA), 25 µl odgovarajućeg 40 x TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assay-a i 375 µl vode bez nukleaza (Qiagen, Nemačka). Po 8,5 µl reakcione smeše naliveno je u svaki bunarić optičke reakcione ploče sa 96 bunarića (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, SAD). U bunariće A1 i A2 dodato je po 1,5 µl vode bez nukleaza koja je korišćena kao negativna kontrola, dok je u preostale bunariće dodato po 1,5 µl uzorka DNK (2–15 ng). U slučajevima kada je došlo do inhibicije PCR reakcije, u uzorke je dodat goveđi albumin iz seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, SAD) u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/µl. Reakciona ploča je zatim prekrivena optičkom adhezivnom folijom (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, SAD) i centrifugirana na 3000 rpm tokom 1

minuta radi uklanjanja mehurića. Nakon toga, ploča je postavljena u sistem za PCR u realnom vremenu (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, SAD). Temperaturni profil je obuhvatao inicijalnu denaturaciju na 95°C tokom 10 minuta, praćenom sa 40 ciklusa denaturacije na 92°C tokom 15 sekundi i hibridizacije prajmera sa elongacijom na 60°C tokom 1 minuta.

Za analizu rezultata TaqMan eseja za alelsku diskriminaciju korišćen je softver SDS verzija 1.2 (Applied Biosystems, Warrington, Ujedinjeno Kraljevstvo), koji koristi algoritam za procenu doprinosa svakog alela u ukupnom fluorescentnom signalu pojedinačnih uzoraka. Analiza je obuhvatala tri faze: prvo, tokom koraka „*Pre-read run*“, meren je osnovni nivo fluorescencije svake probe u bunarićima pre početka PCR-a; zatim, tokom „*Amplification run*“, pratila se fluorescencija generisana hidrolizom TaqMan proba u realnom vremenu tokom PCR-a; i na kraju, tokom „*Post-read run*“, intenzitet fluorescencije u svakom bunariću je automatski korigovan tako što je od vrednosti ukupnog signala oduzeta vrednost osnovne fluorescencije izmerene pre PCR-a. Na osnovu korigovanih vrednosti fluorescencije softver je određivao prisutnost i kombinaciju alela u svakom analiziranom uzorku DNK. Određivanje alela i genotipova ispitanika vršeno je automatskim i ručnim pristupom. Svaki rezultat je analiziran u „slepom postupku“, bez prethodnog znanja o grupnoj pripadnosti ispitanika (slučaj ili kontrola). Kao kontrole PCR-a korišćene su kontrole bez matrice (engl. *no-template controls*) i replikati uzoraka. U kontrolama bez matrice nije zabeležena amplifikacija. Za oba eseja, približno 10 % nasumično odabranih uzoraka genotipizirano je u duplikatu, pri čemu je podudarnost rezultata iznosila 100 %.

3.1.5. Statistička obrada rezultata studije genetičke asocijacije

Deskriptivna statistika prikazana je kao učestalost N (%) za kategorijsku varijablu pol i kao srednja vrednost (SV) ± standardna devijacija (SD) za kontinuirane varijable, među kojima su starost pri ispoljavanju prvih simptoma i starost u trenutku uzorkovanja. Raspodela starosti pri pojavi prvih simptoma i polne strukture bolesnika je prikazana upotrebom histograma gde je na y osi prikazana gustina verovatnoće (broj ispitanika u datom intervalu podeljen sa ukupnim brojem ispitanika i širinom intervala), čime je omogućeno poređenje distribucija nezavisno od veličine uzoraka, korišćenjem funkcije `geom_histogram` iz R softverskog paketa `ggplot2` verzija 3.4.2 (Wickham et al, 2023). Razlike u učestalosti polova između bolesnika i kontrola ispitane su Pirsonovim χ^2 -testom. Razlike u starosti pri ispoljavanju prvih simptoma između bolesnika muškog i ženskog pola, zatim između bolesnika sa ranim i kasnim početkom bolesti, kao i razlike u starosti u trenutku uzorkovanja između bolesnika i kontrola, ispitivane su dvostranim Man-Vitnijevim U testom (engl. *Two-tailed Mann-Whitney U test*), nakon provere normalnosti distribucije podataka upotrebom Šapiro-Vilkovog testa (engl. *Shapiro-Wilk test*). Reprezentativnost kontrolne grupe i pouzdanost genotipizacije procenjene su testiranjem raspodele potencijalno uzročnih varijanti rs35274388 *CHRNA1* i rs4151121 *CHRNA1* na Hardi-Vajnbergovu ravnotežu (engl. *Hardy-Weinberg equilibrium*) upotrebom Pirsonovog χ^2 -testa. Navedena testiranja su urađena u osnovnom statističkom paketu softverskog okruženja R, verzija 4.1.2 (R Core Team, 2023).

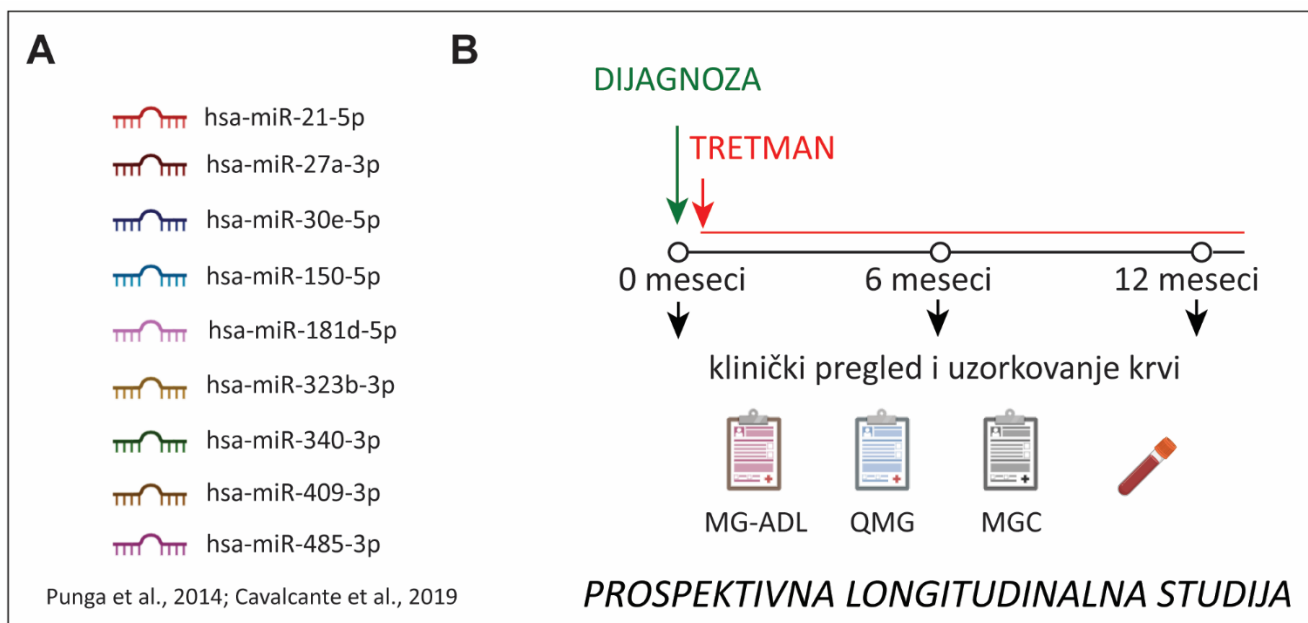
Ispitivanje povezanosti alela i genotipova varijanti rs35274388 i rs4151121 sa rizikom za razvoj MG, kao i njene rane i kasne forme izvršeno je upotrebom testova implementiranih u programu PLINK, verzija 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>; Purcell et al., 2007). Povezanost alela je testirana upotrebom Pirsonovog χ^2 -testa, dok je testiranje genotipova izvršeno primenom univarijantne logističke regresije, prema aditivnom, dominantnom i recesivnom modelu nasleđivanja. Izbor najbolje fitovanog modela (engl. *best-fitting model*) je izvršen na osnovu kriterijuma AIC (enlg. *Akaike Information Criterion*), pri čemu je model sa najnižom vrednošću AIC smatran najprikkladnijim. Pol i starost uključeni su kao kovarijate (engl. *covariates*) u analize podgrupa definisanih prema starosti pri ispoljavanju prvih simptoma. U analizama podgrupa bolesnika muškog i ženskog pola, kontrolna grupa je podeljena prema polu, a svaki bolesnik je uparen po starosti (± 3 godine) sa jednom kontrolnom osobom. Korekcija za višestruka testiranja sprovedena je primenom permutacionog testa sa 10^6 iteracija, korišćenjem maksimalne (T) permutacione procedure softvera PLINK.

Kao mera veličine efekta korišćen je odnos šansi (engl. *odds ratio*, OR) sa intervalom poverenja od 95 % (engl. *confidence interval*, CI), a nivo statističke značajnosti za sve analize je postavljen na p-vrednost $< 0,05$. Snaga studije (engl. *study power*) izračunata je *post-hoc* na osnovu uočene vrednosti OR, MAF za svaku varijantu i odgovarajuće veličine uzorka prema odgovarajućem modelu nasleđivanja korišćenjem funkcije `genpwr.calc` iz R softverskog paketa `genpwr` verzija 1.0.4. (Moore & Jacobson, 2019; R Core Team, 2023).

3.2. Analiza mikroRNK iz plazme kao prediktora terapijskog odgovora bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis

3.2.1. Selekcija mikroRNK za prospektivnu longitudinalnu studiju

Na osnovu pretrage relevantnih naučnih baza podataka (PubMed i Scopus; poslednja pretraga izvršena 15. maja 2025. godine), za ispitivanje u dugoročnoj prospektivnoj longitudinalnoj studiji odabrano je osam mikroRNK identifikovanih u studijama preseka. Tri mikroRNK – miR-21-5p, miR-27a-3p i miR-150-5p – identifikovane su na panelu *Exiqon Focus miRNA PCR Panel I + II* (V1.M, Exiqon, Danska), a zatim validirane kvantitativnom PCR metodom (qPCR) korišćenjem specifičnih prajmera, kao potencijalni biomarkeri AChR-pozitivne MG u serumu bolesnika koji nisu bili na imunosupresivnoj terapiji i zdravih kontrola evropskog porekla (**Slika 3.4A**) (Punga et al., 2014). Dodatnih pet mikroRNK – miR-181d-5p, miR-323b-3p, miR-340-3p, miR-409-3p i miR-485-3p – identifikovano je metodom sekvenciranja nove generacije, a potom validirano primenom specifičnih prajmera i qPCR-a kao potencijalni biomarkeri odgovora na imunosupresivnu terapiju u punoj krvi AChR-pozitivnih MG bolesnika, stratifikovanih prema terapijskom odgovoru (**Slika 3.4A**) (Cavalcante et al., 2019). Odabrane mikroRNK analizirane su u uzorcima plazme, u skladu sa podacima iz literature koji preporučuju plazmu kao biološki uzorak od izbora za analizu cirkulišućih mikroRNK (Dufourd et al., 2019; Plebani et al., 2020).



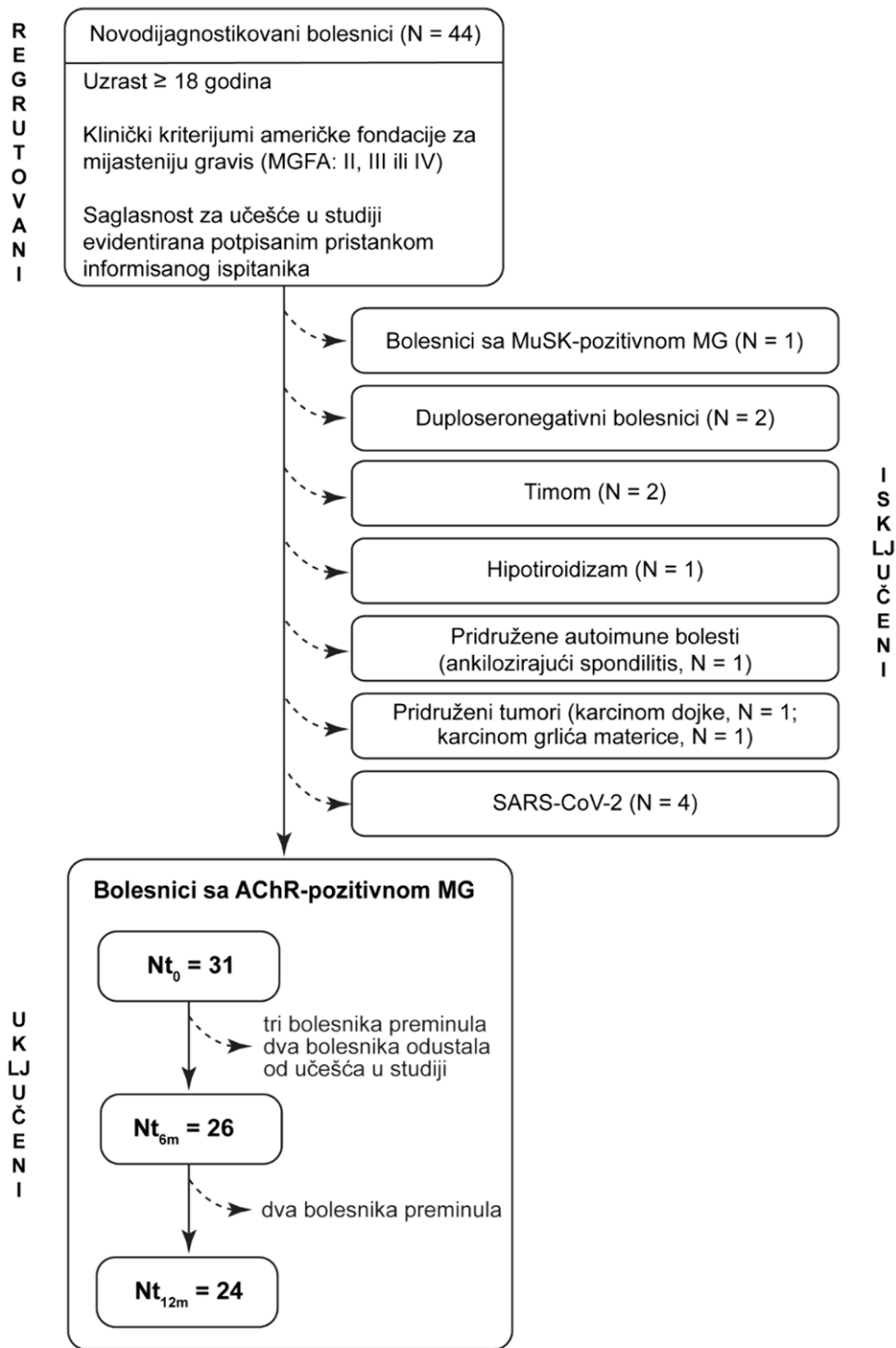
Slika 3.4. Dizajn prospektivne longitudinalne studije za ispitivanje mikroRNK kao biomarkera odgovora na imunosupresivnu terapiju kod AChR-pozitivne MG. **A.** Odabrane mikroRNK. **B.** Tok studije sa vremenskim tačkama kliničkih pregleda i uzorkovanja krvi. Bolesnici su klinički opisani upotrebom validiranog upitnika o aktivnostima svakodnevnog života (MG-ADL), kvantitativne skale za procenu težine bolesti (QMG) i kombinovane skale za procenu težine bolesti (MGC).

3.2.2. Dizajn prospektivne longitudinalne studije

Studija je dizajnirana kao dugoročna prospektivna longitudinalna studija u kojoj su praćeni novodijagnostikovani bolesnici sa AChR-pozitivnom MG, koji pre uključanja u studiju nisu primali imunosupresivnu terapiju. Detaljni klinički pregledi i uzorkovanje krvi sprovedeni su u tri vremenske tačke: na početku studije, pre započinjanja imunosupresivne terapije (t_0) i tokom lečenja, nakon 6 meseci (t_{6m}) i 12 meseci (t_{12m}) praćenja (**Slika 3.4B**).

U studiju su uključeni incidentni bolesnici stariji od 18 godina sa generalizovanom formom MG, klasifikovani kao MGFA forma II-IV prema kriterijumima MGFA (Jaretzki et al., 2000). Bolesnici su dijagnostikovani i praćeni na Klinici za neurologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. Dijagnoza je postavljena na osnovu prisustva fluktuirajuće mišićne slabosti i zamorljivosti, pozitivnog farmakološkog testa nakon primene inhibitora acetilholinesteraze, kao i elektrofiziološkog nalaza sa pozitivnim testom neuromišićne transmisije. Dodatni kriterijumi za uključivanje u studiju bili su prisustvo antitela na AChR i odsustvo imunosupresivne terapije usled drugih stanja minimalno 12 meseci pre uključivanja u studiju ($N = 44$) (**Slika 3.5**). Iz studije su isključeni bolesnici sa MuSK-pozitivnom MG ($N = 1$), duploseronegativnom MG ($N = 2$), kao i bolesnici koji su tokom studije razvili timom ($N = 2$), hipotireozu ($N = 1$), pridružene autoimunske bolesti (ankilozirajući spondilitis, $N = 1$), maligna oboljenja (karcinom dojke, $N = 1$; karcinom grlića materice, $N = 1$), kao i oni koji su bili seropozitivni na SARS-CoV-2 ($N = 4$) (**Slika 3.5**). Svaki bolesnik je pojedinačno uparen sa zdravim kontrolnim ispitanikom iz opšte populacije Republike Srbije prema polu i uzrastu (± 3 godine), koji tokom 12 meseci pre uključivanja u studiju nije primao imunosupresivnu terapiju. Nakon primene navedenih kriterijuma u studiju je uključen 31 bolesnik sa AChR-pozitivnom MG, od kojih su tri bolesnika preminula, a dva odustala od učešća u studiji do šestog meseca praćenja, dok su dva bolesnika preminula između šestog i dvanaestog meseca praćenja (**Slika 3.5**). Uzroci letalnog ishoda nisu bili vezani za osnovnu bolest MG.

Od svih ispitanika uzorkovano je 9 ml periferne krvi u tubice sa raspršenim K2EDTA (CD PUTH, Chengdu, Kina). Uzorci pune krvi su za manje od jednog sata od uzorkovanja centrifugirani na $2000 \times g$ tokom 15 minuta na $4^\circ C$, nakon čega je izdvojena plazma alikvotirana i čuvana na $-80^\circ C$ do prikupljanja uzoraka za sve vremenske tačke. Nakon detaljnog upoznavanja sa ciljevima i procedurama istraživanja, svi ispitanici su dali pisanu informisanu saglasnost za učešće u istraživanju. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Univerziteta u Beogradu – Medicinskog fakulteta (Odluka broj 1322/V-13) i Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (Odluka broj 1787/14).



Slika 3.5. Dijagram toka koji prikazuje kriterijume za selekciju novodijagnostikovanih bolesnika sa stečenom MG za prospektivnu longitudinalnu studiju.

3.2.3. Terapijski protokoli, kliničke skale i definicija kliničkog ishoda

Svi bolesnici su primali standardnu terapiju za MG koja je uključivala primenu inhibitora acetilholinesteraze, piridostigmin, u kombinaciji sa kortikosteroidima (prednizon ili deflazakort). Kod težih kliničkih formi bolesti, sa predominantnom bulbarnom simptomatologijom, kao i kod bolesnika koji su bili u riziku od pojave neželjenih efekata tokom primene, u terapiju je uvedena i druga imunosupresivna terapija, azatioprin. Shodno preporukama, timektomija je urađena kod svih bolesnika mlađih od 50 godina.

Efikasnost terapije objektivno je procenjena upotrebom validiranih kliničkih skala: upitnika o aktivnostima svakodnevnog života (engl. *myasthenia gravis activities of daily living scale*, MG-ADL; procena bolesnika) (**Prilog 3.3**) i kvantitativne skale procene težine bolesti (engl. *quantitative myasthenia gravis scale*, QMG; procena lekara) (**Prilog 3.4**), u skladu sa konsenzusnim preporukama za generalizovanu AChR-pozitivnu MG (Meisel et al., 2024). Zbog postojanja mogućnosti javljanja Hotornovog efekta (engl. *Hawthorne effect*) i pristrasnosti merenja, dodatno je korišćena kombinovana skala za procenu težine bolesti (engl. *myasthenia gravis composite scale*, MGC) (**Prilog 3.5**), koja se bazira na kombinaciji procene stanja od strane samog bolesnika, kao i objektivne procene kliničkog statusa obolelih od strane lekara (Burns et al., 2010).

Procena kliničkog statusa bolesnika uključenih u studiju obavljena je u jutarnjim satima, minimalno 12 sati nakon poslednje doze inhibitora acetilholinesteraze (Keeseey, 2004). Svi bolesnici su regrutovani od strane dva neurologa sa dugogodišnjim iskustvom u kvantitativnoj proceni kliničkog statusa bolesnika sa MG korišćenjem odgovarajućih skala (QMG i MGC).

Bolesnici sa pozitivnim odgovorom na terapiju (responsivni) definisani su kao oni kod kojih je došlo do smanjenja najmanje 2 boda na MG-ADL skali (Bril et al., 2023; Howard et al., 2017, 2021), 3 boda na QMG skali (Katzberg et al., 2014; Thomsen & Andersen, 2020) i 5 bodova na MGC skali (Smith et al., 2024) u t_{6m} i t_{12m} u odnosu na početne vrednosti. Bolesnici koji nisu ispunili navedene kriterijume (neresponsivni) definisani su kao bolesnici refraktarni na terapiju. Dodatni kriterijum koji je korišćen kao pokazatelj odgovora na terapiju bila je minimalna klinička ekspresija (enlg. *Minimal clinical expression*, MCE) koja podrazumeva vrednost skora na MG-ADL skali od 0 ili 1 u t_{6m} i t_{12m} (Bril et al., 2023; Watanabe et al., 2024). Bolesnici su klasifikovani prema MGFA kriterijumima u vremenskim tačkama t_0 , t_{6m} i t_{12m} (Jaretzki et al., 2000).

3.2.4. Izolovanje ukupne RNK iz plazme

Izolovanje ukupne RNK, uključujući i frakciju mikroRNK, urađeno je iz 250 μ l plazme korišćenjem komercijalnog kompleta miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, #217204, Holandija). Sintetičke RNK – “spike-in” kontrole UniSp2, UniSp4 i UniSp5, iz RNA Spike-in kompleta (Qiagen #339390, Holandija) dodate su u pufer za lizu kako bi se pratila efikasnost izolacije RNK (**Tabela 3.1**). Mešavina kontrola pripremljena je tako da je UniSp2 prisutna u koncentraciji sto puta većoj u odnosu na UniSp4, dok je UniSp4 prisutna u sto puta većoj koncentraciji u odnosu na UniSp5. U qPCR reakciji, UniSp2 se detektuje pri najnižim Ct

vrednostima, UniSp4 pri Ct vrednostima od približno sedam ciklusa višim u odnosu na UniSp2, dok se UniSp5 detektuje na najvišim Ct vrednostima. Shodno tome, izolacija RNK smatrana je uspešnom ukoliko je ispitovan ovaj odnos detektovanih Ct vrednosti za sve tri kontrole RNK. Radi poboljšanja efikasnosti ekstrakcije RNK i stabilizacije malih količina RNK u uzorcima plazme, u uzorke je dodat 1 µg RNK bakteriofaga MS2 (Roche, #10165948001, Švajcarska). Prema uputstvu proizvođača, 250 µl plazme centrifugirano je na 1500 × g tokom 5 minuta na 4°C u sterilnoj tubi od 1,5 ml. U novu mikrotubu preneto je 200 µl supernatantne plazme, dodato je 60 µl RPL pufera za lizu, 1,2 µl smeše „spike-in“ kontrola i 1 µl RNK bakteriofaga MS2. Smeša je vorteksovana 10 sekundi i inkubirana 3 minuta na sobnoj temperaturi. U smešu je zatim dodato 20 µl RPP pufera, nakon čega je vorteksovana 30 sekundi, inkubirana 3 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 12 000 × g tokom 3 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je 200 µl bezbojnog supernatanta preneto u novu mikrotubu od 1,5 ml i dodato je 200 µl izopropanola. Smeša je vorteksovana 5 sekundi, preneti na RNeasy UCP MinElute kolonicu sa kolektorskom tubom i centrifugirana na 9000 × g tokom 30 sekundi. Na kolonicu je dodato 700 µl RWT pufera, izvršeno je centrifugiranje na 9000 × g tokom 30 sekundi. Postupak je ponovljen sa 500 µl RPE pufera. Na kolonicu je dalje dodato 500 µl 80 % etanola, a zatim je izvršeno centrifugiranje na 9000 × g tokom 2 minuta. Nakon dodatnog centrifugiranja na 14 000 rpm tokom 5 minuta sa otvorenim poklopcem, kolonica je prebačena u novu tubu od 1,5 ml radi elucije izolovane RNK. Na kolonu je dodato 20 µl dejonizovane vode bez nukleaze (Nuclease-Free Water, Qiagen, Nemačka), a nakon 3 minuta izvršeno je centrifugiranje na 14 000 × g tokom 1 minuta. Eluirani izolati RNK čuvani su na -80 °C do daljih analiza.

3.2.5. Konverzija RNK u komplementarnu DNK

RNK je konvertovana u komplementarnu DNK (engl. *complementary DNA*) reverznom transkripcijom (RT) u reakcionoj smeši zapremine 10 µl, upotrebom komercijalnog miRCURY LNA RT kompleta (Qiagen, #339340, Holandija), u skladu sa uputstvima proizvođača. Reakciona smeša je pripremana na ledu i sadržala je: 2 µl 5 x reakcionog pufera; 4,5 µl sterilne vode bez nukleaza (Qiagen, Nemačka); 1 µl enzimske smeše i 2 µl uzorka RNK (~ 5 ng/µl) i 0,5 µl sintetičke RNK – „spike in“ kontrole UniSP6, iz RNA Spike-in kompleta (Qiagen #339390, Holandija), radi provere prisustva inhibitora kako reverzne transkripcije, tako i qPCR-a (**Tabela 3.1**). Uspešna amplifikacija UniSP6, sa Ct vrednošću oko 21 ciklusa bila je pokazatelj odsustva inhibitora. Reakcija je izvršena u mašini T6M00™ Thermal Cycler (BioRad, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: 40 °C / 1 h, 95 °C / 5 minuta i 4 °C / ∞. Nakon konverzije, uzorci komplementarne DNK su čuvani na -20 °C, najduže 24 sata, pre izvođenja qPCR-a.

Tabela 3.1. Sekvence i oznake RNK i oznake korišćenih miRCURY LNA eseja (Qiagen, Venlo, Holandija).

Sekvenca RNK	Oznaka RNK	Oznaka eseja
nepoznata	spike-in UniSp2	ZP00004671*
nepoznata	spike-in UniSp4	ZP00004673*
nepoznata	spike-in UniSp5	ZP00004687*
nepoznata	spike-in UniSp6	ZP00004674*
5'AUCACAUUGCCAGGGAUUUC	hsa-miR-23a-3p	ZP00000478*
5'AAACCGUUACCAUACUGAGUU	hsa-miR-451a	ZP00001151*
vb5'UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	hsa-miR-16-5p	ZP00000315*
5'UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	hsa-miR-24-3p	ZP00000485*
5'AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	hsa-miR-103a-3p	ZP00000028*
5'CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	hsa-miR-191a	ZP00000368*
5'UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	hsa-miR-21-5p	ZP00000445*
5'UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG	hsa-miR-27a-3p	ZP00000499*
5'UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	hsa-miR-150-5p	ZCP0011567#
5'AACAUAUCAUUGUUGUCGGUGGGU	hsa-miR-181d-5p	ZP00000327*
5'CCCAAUACACGGUCGACCUCUU	hsa-miR-323b-3	ZP00000686*
5'UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC	hsa-miR-340-3p	ZP00000714*
5'GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCU	hsa-miR-409-3p	ZP00000929*
5'GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	hsa-miR-485-3p	ZP00001468*

*Predizajnirani esej; #Novodizajnirani esej

3.2.6. Kvantifikacija mikroRNK u plazmi primenom kvantitativnog PCR-a

Kvantifikacija mikroRNK je izvršena primenom qPCR metode upotrebom komercijalnog miRCURY LNA Probe PCR kompleta (Qiagen, #339373, Venlo, Holandija) i korišćenjem validiranih predizajniranih (engl. *pre-designed*, #339350) i novodizajniranih (engl. *custom-designed*, #339351) eseja miRCURY LNA miRNA Probe (**Tabela 3.1**), prema preporukama proizvođača. Reakcija je urađena u finalnoj zapremini od 5 µl. Reakciona smeša je sadržala 2,5 µl 2 x QuantiNova Probe Master Mix-a; 0,5 µl 10 x miRCURY Probe Universal Primer-a; 0,25 µl ROX Reference Dye, 0,5 µl specifične probe i 1,25 µl komplementarne DNK. Reakcije su rađene u duplikatu u reakcionim pločama sa 96 bunarića (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, SAD), koje su nakon prekrivanja adhezivnom folijom (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific, SAD) centrifugirane na 3000 rpm tokom 1 minuta. Reakcije su izvršene u sistemu StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) uz sledeći temperaturni profil: inicijalna denaturacija 95 °C / 2 minuta, a zatim 40 ciklusa denaturacije na 95 °C / 5 sekundi i hibridizacije sa elongacijom na 56 °C / 30 sekundi. Reakcione ploče su dizajnirane primenom

pristupa maksimalizacije tretmana (engl. *treatment maximization*), prema uputstvima Rieu i saradnika (2009), pri čemu su sve biološke replike jedne osobe u vremenskim tačkama pre i nakon tretmana raspoređene na istu ploču, čime je minimiziran efekat varijabilnosti između ploča. Sirove Ct vrednosti (engl. *threshold cycle*) su automatski očitane korišćenjem softvera StepOnePlus™ verzije 2.2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

Tok obrade i analiza fluorescentnih signala u cilju dobijanja Ct vrednosti sprovedeni su kroz nekoliko uzastopnih koraka. Prvi korak podrazumevao je dizajn i postavku eksperimenta putem opcije *Experimental Design Wizard*, koja omogućava izbor vrste analize (Comparative Ct), vrste hemijske reakcije (TaqMan® Reagents), metode kvantifikacije (Comparative Ct, $\Delta\Delta Ct$), definisanje ciljnih gena i referentnih kontrola, unos imena uzoraka, kao i raspored reakcija na virtuelnoj reakcionoj ploči od 96 mesta. Sledeći korak bio je definisanje PCR protokola kroz opciju *Run Method*. Nakon pokretanja eksperimenta, softver je automatski registrovao fluorescentni signal tokom svakog PCR ciklusa i beležio ga kao sirove Rn vrednosti koje predstavljaju normalizovan fluorescentni signal koji potiče od reporterskog fluorofora (VIC ili FAM) u odnosu na pozadinsku fluorescenciju pasivnog referentnog fluorofora (ROX). Na osnovu početnog, Rn₀ signala, softver je izračunavao ΔRn kao razliku između trenutnog i početnog signala ($\Delta Rn = Rn - Rn_0$), čime se dobija neto porast fluorescentnog signala usled amplifikacije ciljne mikroRNK. Na osnovu toga softver je automatski detektovao značajan porast fluorescentnog signala i postavljao praznu vrednost, a ciklus u kojem je amplifikaciona kriva presekla ovaj prag definisan je kao Ct vrednost.

Analiza amplifikacionih krivih vršena je kroz opciju *Amplification Plot*, pri čemu je logaritamski prikaz omogućavao jasnije sagledavanje eksponencijalne faze. Reakcije sa jasnim eksponencijalnim rastom i plato fazom smatrane su valjanim. Na kraju, opcija *Results* omogućavala je pregled Ct vrednosti za sve reakcije, automatsko izračunavanje srednje vrednosti, standardne devijacije, broja ponavljanja i statusa reakcija.

Kako bi se smanjio efekat varijabilnosti između ploča, sirove Ct vrednosti su kalibrisane na sintetičku UniSp6 koja je imala i ulogu kalibratora između ploča (engl. *inter-plate calibrator*), pri čemu se u svakoj ploči nalazila na istoj poziciji.

Kontrola kvaliteta uzoraka plazme je izvršena proverom prisustva procesa hemolize kroz određivanje nivoa miR-23a-3p i miR-451a i primenom sledeće formule:

$$\Delta Ct_{(\text{hemoliza})} = Ct_{\text{miR-23a-3p (marker plazme)}} - Ct_{\text{miR-451a (marker eritrocita)}}$$

Uzorci sa $\Delta Ct_{(\text{hemoliza})} > 7$ isključeni su iz dalje analize usled povećanog rizika postojanja hemolize i posledične kontaminacije plazmi unutarćelijskom mikroRNK (Shah et al., 2016). Dalje, u analizu su uključeni samo uzorci sa visokim nivoom mikroRNK, odnosno oni čije su sirove Ct vrednosti bile < 36 i sa razlikom Ct vrednosti između replikata $\Delta Ct_{\text{replikati}} < 1,5$ (Beretta et al., 2022).

Četiri mikroRNK – miR-16-5p, miR-24-3p, miR-103a-3p i miR-191a – testirane su kao kandidati za endogene kontrole u svim uzorcima korišćenjem četiri nezavisna algoritma geNorm, NormFinder, BestKeeper i komparativne ΔCt metode, implementiranih u softveru RefFinder (Xie et al., 2012). Nivoi miRNK su finalno izraženi kao relativne vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008), normalizovane u odnosu na endogenu kontrolu miR-191a (Tabela 3.2), koja je imala najstabilniju ekspresiju u našem uzorku, što je bilo u skladu sa prethodnim studijama za MG (Beretta et al., 2022; Punga et al., 2014; Sabre et al., 2018).

Tabela 3.2. Rang stabilnosti četiri mikroRNK kandidata za endogene kontrolne (hsa-miR-191a, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-16-5p i hsa-miR-103a-3p) prema RefFinder analizi (Xie et al., 2012).

Kandidati za endogenu kontrolu	Parametar stabilnosti (M) ^a	Rang
hsa-miR-191a	1,00	1
hsa-miR-24-3p	1,68	2
hsa-miR-103a-3p	3,22	3
hsa-miR-16-5p	3,72	4

^aParametar stabilnosti (engl. *stability value*, M) je izračunat korišćenjem algoritama geNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004), i komparativne ΔCt metode (Silver et al., 2006), pri čemu su niže vrednosti ukazivale na višu stabilnost mikroRNK u uzorku.

3.2.7. Statistička analiza

Deskriptivna statistika prikazana je kao N (%) za kategorijske varijable uključujući pol, primenjenu terapiju, stepen težine bolesti prema MGFA klasifikaciji i odgovor na primenjenu terapiju, zatim kao medijana sa interkvartilnim opsegom (engl. *interquartile range*, IQR) za kliničke skorove i kao srednja vrednost \pm SD za nivoe mikroRNK. Razlike u učestalosti polova između bolesnika i kontrola ispitane su Pirsonovim χ^2 -testom, dok je razlika u prosečnoj starosti testirana neuparenim t-testom, nakon provere normalnosti distribucije podataka upotrebom Šapiro-Vilkovog testa.

Razlike u kliničkim skorovima i nivoima mikroRNK u t_0 , t_{6m} i t_{12m} , ispitivane su analizom varijanse sa ponovljenim merenjima (engl. *Repeated-measures ANOVA*), uz *post-hoc* analizu primenom uparenog t-testa sa Bonferonijevom korekcijom (engl. *Bonferroni correction*), pod uslovom da su pretpostavke normalnosti i sferičnosti bile ispunjene, što je proveravano Šapiro-Vilkovim testom i Maučijevim testom (engl. *Mauchly test*), redom. Ukoliko ove pretpostavke nisu bile ispunjene, korišćen je Fridmanov test (engl. *Friedman test*), praćen *post-hoc* Vilkoksovim testom rangova sa predznakom (engl. *Wilcoxon signed-rank test*) uz Bonferonijevu korekciju.

Korelacije između nivoa mikroRNK i kliničkih skorova ispitivane su Spirmanovim testom rangova (engl. *Spearman's rank test*). Razlike u početnim nivoima mikroRNK između bolesnika i kontrola, kao i između podgrupa bolesnika stratifikovanih prema kliničkom ishodu (MCE i ne-MCE; bolesnika sa pozitivnim odgovorom na terapiju i bolesnika

refraktarnih na terapiju), testirane su nezavisnim t-testom, nakon potvrde normalnosti raspodele podataka Šapiro-Vilkovim testom. Diskriminatorni potencijal pojedinačnih mikroRNK u razlikovanju upoređivanih grupa procenjivan je analizom ROC krive (engl. *receiver operating characteristic curve*). Površina ispod ROC krive (engl. *area under the curve*, AUC) izračunata je kao kvantitativna mera senzitivnosti i specifičnosti testiranog biološkog markera. Diskriminatorna sposobnost tumačena je u skladu sa standardnim pragovima u kliničkoj praksi: AUC < 0,5 - bez diskriminatorne sposobnosti, 0,5-0,7 - slaba, 0,7-0,8 - prihvatljiva, 0,8-0,9 - odlična i > 0,9 - izuzetna diskriminacija (Mandrekar, 2010).

Statistička značajnost tumačena je na osnovu graničnih p-vrednosti od $p < 0,05$, 0,01, 0,001 i 0,0001. Odgovarajuće veličine efekta izračunate su radi interpretacije značajnosti svakog rezultata (**Prilog 3.6**). Sve statističke analize sprovedene su korišćenjem R softverskih paketa, verzija 4.4.3 (R Core Team, 2025).

4. Rezultati

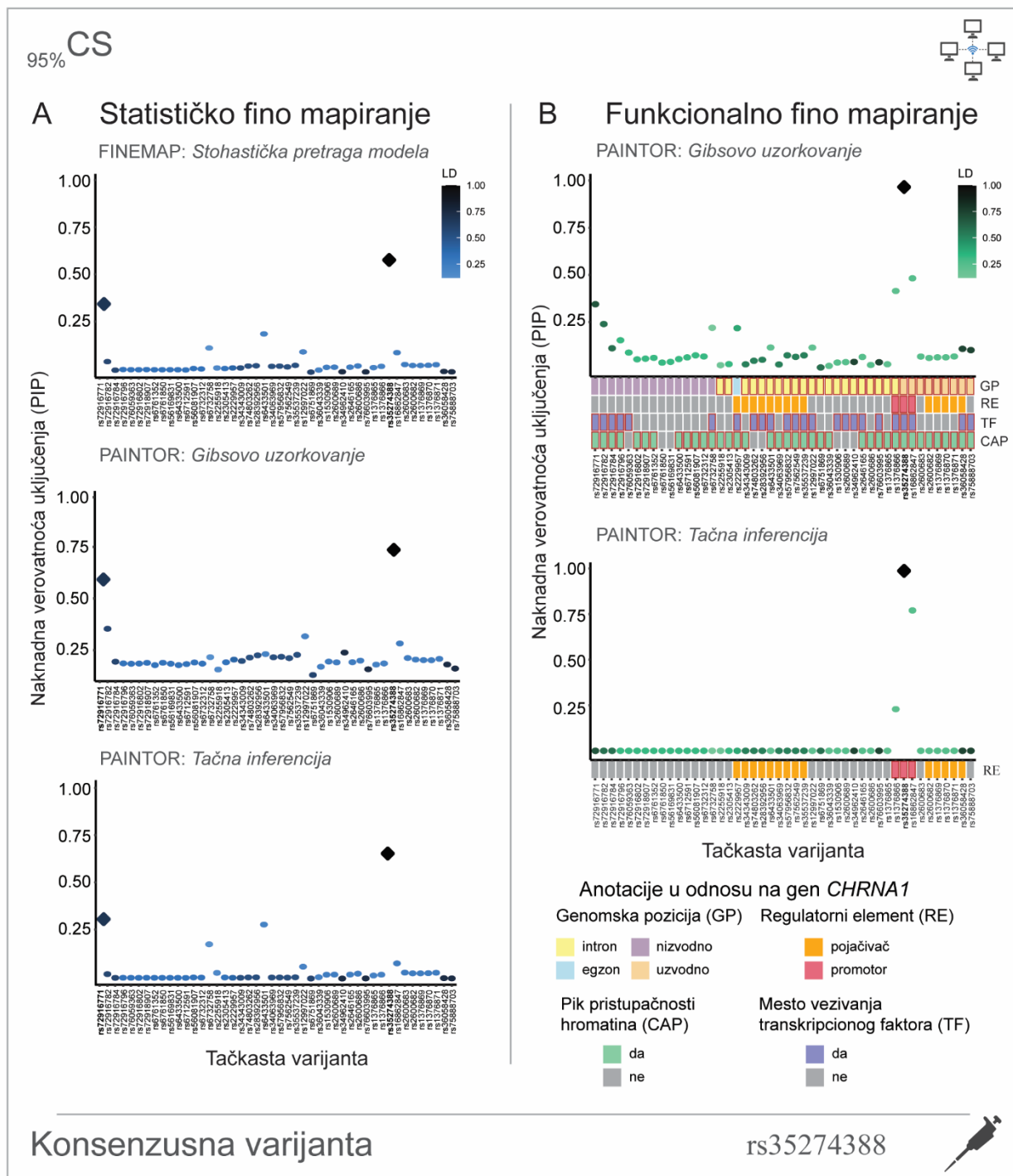
4.1. Rezultati ispitivanja tačkastih varijanti u lokusima koji sadrže gene za AChR kao prediktora nastanka stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis

4.1.1. Rezultati selekcije potencijalno uzročnih tačkastih varijanti u lokusu *CHRNA1* za validaciju u studiji genetičke asocijacije

U analiziranom skupu podataka, prethodna verovatnoća za prisustvo jedne uzročne varijante iznosila je 58,50 %, za dve uzročne varijante 29,30 %, dok su verovatnoće za tri, četiri i pet uzročnih varijanti iznosile 9,50 %, 2,28 % i 0,42 %, redom; mogućnost odsustva uzročnih varijanti nije bila podržana (0,00 %). Analiza naknadne verovatnoće je ukazala da lokus *CHRNA1* najverovatnije sadrži dve uzročne varijante, uz verovatnoću od 74,00 %, dok je verovatnoća za tri varijante iznosila 23,00 %, a za sve ostale mogućnosti bila je manja od 3,00 %. Zaista, tri nezavisna bajesovska algoritma statističkog finog mapiranja identifikovala su 95%CS koji sadrži dve varijante – rs35274388 i rs72916771, a koje su bile u visokom stepenu LD-a ($R^2 = 0,684$, **Slika 4.1A**). Vrednost PIP za rs35274388 bila je viša od 0,590, dok je za rs72916771 bila viša od 0,313 prema svim algoritmima (**Slika 4.1A; Prilog 4.1**).

Za funkcionalno fino mapiranje primenjena su dva bajesovska algoritma. Gibbssov algoritam je u modelima sa imputiranom jednom funkcionalnom anotacijom pokazao da 7 od ukupno 14 anotacija statistički značajno doprinose poboljšanju osnovnog modela bez anotacija (za svaku anotaciju $p < 0,05$, **Prilog 4.2**). Model koji je sadržao 7 anotacija koje su doprinosile poboljšanju osnovnog modela je identifikovao jednu varijantu – rs35274388 u okviru 95%CS-a, sa PIP = 0,965 ($p < 0,001$) (**Slika 4.1B**). Ovaj model je identifikovao rs35274388 u sledećim funkcionalnim anotacijama: promotorskom regionu, mestu vezivanja TF-a, piku otvorenosti hromatina i uzvodnoj sekvenci u odnosu na gen *CHRNA1* (**Slika 4.1B**). Algoritam tačne inferencije je u modelima sa jednom anotacijom pokazao da samo jedna od 14 funkcionalnih anotacija, i to promotorski region, doprinosi poboljšanju osnovnog modela ($p < 0,01$; **Prilog 4.2**). U okviru 95%CS-a identifikovana je varijanta rs35274388, sa PIP = 1,00 (**Slika 4.1B**).

Varijanta rs35274388 je bila sadržana u 95%CS-ovima svih korišćenih algoritama za statističko i funkcionalno fino mapiranje (**Slika 4.1**) i identifikovana je kao konsenzusna, potencijalno uzročna varijanta odabrana za eksperimentalnu validaciju u studiji genetičke asocijacije.



Slika 4.1. Finim mapiranjem lokusa *CHRNA1* identifikovana je varijanta rs35274388 kao potencijalno uzročna za AChR-pozitivnu MG. **A.** Statističko fino mapiranje identifikovalo je tri verodostojna skupa (95%CS), koja su obuhvatala dve varijante – rs35274388 i rs72916771 u visokoj neravnoteži vezanosti (LD). **B.** Funkcionalno fino mapiranje identifikovalo je jednu varijantu – rs35274388 u dva 95%CS-a. Varijante sadržane u 95%CS-ovima predstavljene su kvadratićima, dok su ostale varijante prikazane kružićima. Kvadrati i kružići su obojeni prema stepenu LD-a sa vodećom varijantom u lokusu *CHRNA1* (Chia et al., 2022). Statistički značajne funkcionalne anotacije označene su crveno uokvirenim pravougaonicama na x-osi.

4.1.2. Rezultati studije genetičke asocijacije

Genetičke varijante rs4151121 u lokusu *CHRNA1* i rs35274388 u lokusu *CHRNA1*, koje su *in silico* identifikovane kao potencijalno uzročne, ispitane su kao genetički faktori rizika za razvoj AChR-pozitivne MG u grupi od 519 bolesnika iz Srbije (54,72% žena i 45,28% muškaraca). Obe varijante su bile u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži u grupi koju je činilo 519 kontrolnih ispitanika ($p > 0,05$).

Ređi alel G varijante rs4151121 u lokusu *CHRNA1* bio je statistički značajno učestaliji u grupi bolesnika sa AChR-pozitivnom MG u poređenju sa grupom kontrolnih osoba povećavajući rizik za razvoj bolesti za 19,6 % (43 % naspram 39 %; $p = 0,045$; OR = 1,196; 95% CI = 1,004–1,425), dok je nakon primene permutacionog testa sa 10^6 iteracija zapažen trend ka statističkoj značajnosti ($p_{\text{perm}} = 0,053$) (**Tabela 4.1**). Analiza genotipova ukazala je na povezanost varijante rs4151121 sa rizikom za razvoj AChR-pozitivne MG prema dominantnom modelu nasleđivanja na osnovu AIC ($p = 0,038$; $p_{\text{perm}} = 0,043$; OR = 1,310; 95% CI = 1,015–1,690) (**Tabela 4.1**).

Dalje je ispitana uloga rs4151121 kao genetičkog faktora rizika za razvoj AChR-pozitivne MG sa ranim i kasnim početkom. Utvrđena je statistički značajna povezanost ređeg alela G sa MG kasnog početka pri primeni starosne granice od 40 godina, koja je ukazala da alel G povećava rizik za razvoj bolesti za 32,7 % ($p = 0,006$; $p_{\text{perm}} = 0,007$; OR = 1,327; 95% CI = 1,084–1,625). Prema dominantnom modelu nasleđivanja na osnovu AIC, ispitanici sa genotipovima AG i GG imali su rizik za razvoj kasne MG povećan za 42,0 % u poređenju sa ispitanicima sa genotipom AA ($p = 0,035$; $p_{\text{perm}} = 0,035$; OR = 1,420; 95% CI = 1,025–1,965) (**Tabela 4.1**). Snaga studije od 92,08 %, izračunata u *post-hoc* analizi, potvrdila je pouzdanost dobijenih rezultata. Konzistentni rezultati dobijeni su i prilikom primene starosne granice od 50 godina (**Tabela 4.2**). Ređi alel G je povećavao rizik za razvoj MG kasnog početka za 32,5 % u odnosu na kontrole ($p = 0,011$; $p_{\text{perm}} = 0,013$; OR = 1,325; 95% CI = 1,066–1,647), dok su ispitanici sa genotipovima AG i GG imali rizik povećan za 44,8 % u odnosu na ispitanike sa genotipom AA ($p = 0,050$; $p_{\text{perm}} = 0,049$; OR = 1,448; 95% CI = 0,999–2,098) (**Tabela 4.2**). *Post-hoc* snaga studije u ovom slučaju iznosila je 91,58 %. Nije uočena povezanost rs4151121 sa MG ranog početka pri primeni starosne granice od 40 ili 50 godina ($p > 0,05$; **Tabela 4.1**; **Tabela 4.2**).

Uzimajući u obzir razliku u distribuciji bolesnika muškog i ženskog pola kod AChR-pozitivne MG ranog i kasnog početka, genetičke povezanosti rs4151121 su ispitane u podgrupama bolesnika podeljenih prema polu. Uočena je granična povezanost ređeg alela G sa muškim polom ($p = 0,064$; $p_{\text{perm}} = 0,082$; OR = 1,278; 95% CI = 0,985–1,656), u skladu sa aditivnim modelom nasleđivanja na osnovu AIC ($p = 0,072$; $p_{\text{perm}} = 0,084$; OR = 1,262; 95% CI = 0,979–1,627) (**Tabela 4.3**). Povezanost rs4151121 sa ženskim polom nije utvrđena ($p > 0,05$) (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.1. Učestalost ređeg alela i genotipova varijante rs4151121 u lokusu *CHRNA1* kod 519 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG (215 ranog i 304 kasnog početka prema starosnoj granici od 40 godina) i 519 kontrola, kao i povezanosti alela i genotipova sa bolešću.

	Tačkasta varijanta (aleli, genotipovi, gen) rs4151121 (<u>G</u> /A, GG/AG/AA, <i>CHRNA1</i>) AChR-pozitivna MG			Kontrole
	Svi	Ranog početka	Kasnog početka	
Učestalost ređeg alela	0,432	0,395	0,457	0,388
Povezanost alela				
χ^2	4,033	0,064	7,524	
p^a	0,045	0,8	0,006	
OR	1,196	1,030	1,327	
(95% CI)	(1,004-1,425)	0,818-1,297)	(1,084-1,625)	
p_{perm}^b	0,053		0,007	
Učestalost genotipova	0,187/0,489/0,324	0,159/0,474/0,367	0,207/0,500/0,293	0,162/0,453/0,385
Genetički model				
Aditivan	GG > AG > AA	GG > AG > AA	GG > AG > AA	GG AG AA
t	1,980	1,245	1,859	
p^c	0,047	0,960-1,615	0,063	
OR	1,191	1,245	1,225	
(95% CI)	(1,002-1,417)	(0,960-1,615)	0,989-1,517)	
p_{perm}^b	0,048		0,062	
AIC	1443		1035	
Dominantan	GG + AG vs. AA	GG + AG vs. AA	GG + AG vs. AA	
t	2,074	1,476	2,111	
p^c	0,038	0,14	0,035	
OR	1,310	1,324	1,420	
(95% CI)	(1,015-1,690)	(0,912-1,923)	(1,025-1,965)	
p_{perm}^b	0,043		0,035	
AIC	1442,6		1034	
Recesivan	GG vs. AG + AA	GG vs. AG + AA	GG vs. AG + AA	
t	1,063	1,196	0,819	
p^c	0,288	0,232	0,413	
OR	1,190	1,351	1,174	
(95% CI)	(0,863-1,641)	(0,825-2,213)	(0,800-1,724)	

Ređi alel je podvučen. Skraćenice: χ^2 , parametar χ^2 -statistike; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja; t, parametar t-statistike; AIC, Akaikeov informacijski kriterijum. ^aPirsonov χ^2 -test, ^b 10^6 permutacioni test, ^cLogistička regresija. Statistički značajne asocijacije ($p_{perm} < 0,05$) označene su podebljano.

Tabela 4.2. Učestalost ređeg alela i genotipova varijante rs4151121 u lokusu *CHRNA1* kod 519 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG (276 ranog i 243 kasnog početka prema starosnoj granici od 50 godina) i 519 kontrola, kao i povezanosti alela i genotipova sa bolešću.

	Tačkasta varijanta (aleli, genotipovi, gen) rs4151121 (<u>G</u> /A, GG/AG/AA, <i>CHRNA1</i>) AChR-pozitivna MG		Kontrole
	Ranog početka	Kasnog početka	
Učestalost ređeg alela	0,409	0,457	0,388
Povezanost alela			
χ^2	0,676	6,429	
P ^a	0,411	0,011	
OR	1,092	1,325	
(95% CI)	(0,885-1,348)	(1,066-1,647)	
P _{perm} ^b		0,013	
Učestalost genotipova	0,171/0,478/0,351	0,206/0,502/0,292	0,162/0,453/0,385
Genetički model			
Aditivan	GG > AG > AA	GG > AG > AA	
t	0,808	1,509	
P ^c	0,419	0,131	
OR	1,089	1,203	
(95% CI)	(0,885-1,340)	(0,946-1,531)	
P ^b			
Dominantan	GG + AG vs. AA	GG + AG vs. AA	
t	1,888	1,957	
P ^c	0,059	0,050	
OR	1,381	1,448	
(95% CI)	(0,988-1,931)	(0,999-2,098)	
P ^b		0,049	
Recesivan	GG vs. AG + AA	GG vs. AG + AA	
t	1,456	0,388	
P ^c	0,145	0,698	
OR	1,376	1,089	
(95% CI)	(0,895-2,114)	(0,709-1,673)	

Ređi alel je podvučen. Skraćenice: χ^2 , parametar χ^2 -statistike; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja; t, parametar t-statistike. ^aPirsonov χ^2 -test, ^b10⁶ permutacioni test, ^cLogistička regresija. Statistički značajne asocijacije (p_{perm} < 0,05) označene su podebljano.

Tabela 4.3. Učestalost ređeg alela i genotipova varijante rs4151121 u lokusu *CHRNA1* kod 519 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG podeljenih prema polu (235 muškaraca i 284 žena) i povezanosti alela i genotipova sa bolešću.

	Tačkasta varijanta (aleli, genotipovi, gen) rs4151121 (<u>G</u> /A, GG/AG/AA, <i>CHRNA1</i>)	
	Muškarci	Žene
Učestalost ređeg alela bolesnici i kontrole	0,449 i 0,389	0,417 i 0,387
Povezanost alela		
χ^2	3,426	1,058
P^a	0,064	0,304
OR	1,278	1,133
(95% CI)	(0,985-1,656)	(0,893-1,436)
P_{perm}^b	0,082	
Učestalost genotipova bolesnici i kontrole	0,213/0,472/0,315 i 0,166/0,447/0,387	0,165/0,504/0,331 i 0,158/0,458/0,384
Genetički model		
Aditivnan	GG > AG > AA	GG > AG > AA
t	1,797	1,028
P^c	0,072	0,304
OR	1,262	1,133
(95% CI)	(0,979-1,627)	(0,893-1,436)
P_{perm}^b	0,084	
Dominantan	GG + AG vs. AA	GG + AG vs. AA
t	1,641	1,312
P^c	0,101	0,189
OR	1,375	1,259
(95% CI)	(0,939-2,011)	(0,893-1,776)
Recesivan	GG vs. AG + AA	GG vs. AG + AA
t	1,292	0,228
P^c	0,196	0,820
OR	1,358	1,053
(95% CI)	(0,854-2,161)	(0,674-1,646)

Ređi alel je podvučen. Skraćenice: χ^2 , parametar χ^2 -statistike; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja; t, parametar t-statistike. ^aPirsonov χ^2 -test, ^b 10^6 permutacioni test, ^cLogistička regresija

Ređi alel A varijante rs35274388 u lokusu *CHRNA1* imao je značajno veću učestalost kod bolesnika sa MG u poređenju sa kontrolama, povećavajući rizik za razvoj bolesti za 47,8 % (6,5 % naspram 4,5 %; $p = 0,044$; OR = 1,478; 95% CI = 1,009–2,166), pri čemu je korekcija za višestruko testiranje pokazala trend ka statističkoj značajnosti ($p_{\text{perm}} = 0,060$) (**Tabela 4.4**). Analiza genotipova je pokazala graničnu povezanost alela A sa MG prema aditivnom modelu nasleđivanja na osnovu AIC ($p = 0,051$; $p_{\text{perm}} = 0,061$; OR = 1,452; 95% CI = 0,998–2,111), što ukazuje da ispitanici sa genotipovima AA i AG imaju povećan rizik za razvoj MG (**Tabela 4.4**).

Prilikom analize varijante rs35274388 u odnosu na starost pri ispoljavanju prvih simptoma bolesti sa starosnom granicom od 40 godina, uočen je trend ka statistički značajnoj povezanosti ređeg alela A sa MG kasnog početka ($p = 0,054$; $p_{\text{perm}} = 0,070$; OR = 1,525; 95% CI = 0,990–2,347), dok je analiza genotipova takođe pokazala trend ka statistički značajnoj povezanosti prema aditivnom modelu nasleđivanja na osnovu AIC ($p = 0,055$; $p_{\text{perm}} = 0,055$; OR = 1,569; 95% CI = 0,991–2,487) (**Tabela 4.4**). Nije utvrđena značajna povezanost varijante rs35274388 sa MG ranog početka (**Tabela 4.4**). Međutim, pri podeli bolesnika na MG ranog i kasnog početka primenom starosne granice od 50 godina, dobijeni su suprotni rezultati. Uočena je granična povezanost ređeg alela A sa MG ranog početka ($p = 0,047$; $p_{\text{perm}} = 0,072$; OR = 1,559; 95% CI = 1,003–2,422), prema aditivnom modelu nasleđivanja na osnovu AIC ($p = 0,060$; $p_{\text{perm}} = 0,078$; OR = 1,502; 95% CI = 0,984–2,293) (**Tabela 4.5**). Nije utvrđena značajna povezanost rs35274388 sa MG kasnog početka ($p > 0,05$) (**Tabela 4.5**).

Analiza bolesnika podeljenih prema polu, nije ukazala na povezanost varijante rs35274388 sa muškim ili ženskim polom (**Prilog 4.3**).

Tabela 4.4. Učestalost ređeg alela i genotipova varijante rs35274388 u lokusu *CHRNA1* kod 519 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG (215 ranog i 304 kasnog početka prema starosnoj granici od 40 godina) i 519 kontrola, kao i povezanosti alela i genotipova sa bolešću.

	Svi	Tačkasta varijanta (aleli, genotipovi, gen) rs35274388 (<u>A</u> /G, AA/AG/GG, <i>CHRNA1</i>) AChR-pozitivna MG		Controls
		Ranog početka	Kasnog početka	
Učestalost ređeg alela	0,065	0,063	0,067	0,045
Povezanost alela				
χ ²	4,060	1,948	3,719	
p ^a	0,044	0,163	0,054	
OR	1,478	1,413	1,525	
(95% CI)	(1,009-2,166)	(0,868-2,300)	(0,990-2,347)	
p _{perm} ^b	0,060		0,070	
Učestalost genotipova	0,008/0,115/0,877	0,014/0,098/0,888	0,003/0,128/0,869	0,004/0,083/0,913
Genetički model				
Aditivnan	AA > GA > GG	AA > GA > GG	AA > GA > GG	AA GA GG
t	1,951	0,923	1,920	
p ^c	0,051	0,356	0,055	
OR	1,452	1,282	1,569	
(95% CI)	(0,998-2,111)	(0,757-2,170)	(0,991-2,487)	
p _{perm} ^b	0,061		0,055	
AIC	1443,1		1033,8	
Dominantan	AA + GA vs. GG	AA + GA vs. GG	AA + GA vs. GG	
t	1,915	0,765	1,895	
p ^c	0,055	0,444	0,058	
OR	1,482	1,262	1,598	
(95% CI)	(0,991-2,216)	(0,696-2,287)	(0,984-2,596)	
p _{perm} ^b	0,050		0,057	
AIC	1443,3		1033,9	
Recesivan	AA vs. GA + GG	AA vs. GA + GG	AA vs. GA + GG	
t	0,803	0,877	0,596	
p ^c	0,422	0,380	0,551	
OR	2,008	2,385	2,140	
(95% CI)	(0,366-11,010)	(0,342-16,630)	(0,175-26,100)	

Ređi alel je podvučen. Skraćenice: χ², parametar χ²-statistike; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja; t, parametar t-statistike; AIC, Akaikeov informacijski kriterijum. ^aPirsonov χ²-test, ^b10⁶ permutacioni test, ^cLogistička regresija

Tabela 4.5. Učestalost ređeg alela i genotipova varijante rs35274388 u lokusu *CHRNA1* kod 519 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG (276 ranog i 243 kasnog početka prema starosnoj granici od 50 godina) i 519 kontrola, kao i povezanosti alela i genotipova sa bolešću.

	Tačkasta varijanta (aleli, genotipovi, gen) rs35274388 (<u>A</u> /G, AA/AG/GG, <i>CHRNA1</i>) AChR-pozitivna MG		Kontrole
	Ranog početka	Ranog početka	
Učestalost ređeg alela	0,069	0,062	0,045
Povezanost alela			
χ^2	3,953	1,867	
P_a	0,047	0,172	
OR	1,559	1,387	
(95% CI)	(1,003-2,422)	(0,866-2,222)	
P_{perm}^b	0,072		
Učestalost genotipova	0,014/0,109/0,877	0,000/0,124/0,876	0,004/0,083/0,913
Genetički model			
Aditivan	AA > GA > GG	AA > GA > GG	
t	1,645	1,170	
P_c	0,060	0,242	
OR	1,502	1,381	
(95% CI)	(0,984-2,293)	(0,804-2,372)	
P_{perm}^b	0,078		
Dominantan	AA + GA vs. GG	AA + GA vs. GG	
t	1,478	1,224	
P_c	0,139	0,221	
OR	1,477	1,412	
(95% CI)	(0,880-2,479)	(0,813-2,453)	
P_{perm}^b			
Recesivan	AA vs. GA + GG	AA vs. GA + GG	
t	1,196	/	
P_c	0,232	1	
OR	2,977	/	
(95% CI)	(0,498-17,790)		

Ređi alel je podvučen. Skraćenice: χ^2 , parametar χ^2 -statistike; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja; t, parametar t-statistike. ^aPirsonov χ^2 -test, ^b 10^6 permutacioni test, ^cLogistička regresija

4.2. Rezultati longitudinalne analize mikroRNK u plazmi kao prediktora terapijskog odgovora bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis

4.2.1. Rezultati terapijskog pristupa i kliničke evaluacije bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis tokom praćenja

U studiju je uključen 31 bolesnik sa AChR-pozitivnom MG (16 žena i 15 muškaraca), prosečne starosti $55,7 \pm 20,9$ godina, kao i 31 kontrolni ispitanik (16 žena i 15 muškaraca), prosečne starosti $54,6 \pm 21,3$ godine, bez statistički značajnih razlika u pogledu starosti i pola između grupa ($p > 0,05$). Terapijski pristup i kliničke karakteristike 31 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG uključenih u studiju, u t_0 , t_{6m} i t_{12m} , prikazani su u **Tabeli 4.6**. U t_0 , ni jedan od praćenih bolesnika ($N = 31$) nije primao terapiju za MG. Na kontrolnom pregledu u t_{6m} , bolesnici koji su ostali u studiji ($N = 26$) su primali imunosupresivnu terapiju, uključujući kortikosteroide (prednizon ili deflazakort). Uporedo sa kortikosteroidnom terapijom, 12 bolesnika (46,15 %) je primalo i drugu imunosupresivnu terapiju azatioprin, a 3 bolesnika (11,54 %) su bila podvrgnuta timektomiji. Na kontrolnom pregledu u t_{12m} , bolesnici koji su ostali u studiji ($N = 24$) su nastavili terapiju kortikosteroidima, pri čemu je ukupno 10 bolesnika (41,67 %) dodatno primalo azatioprin, a 6 bolesnika (25,00 %) je bilo podvrgnuto timektomiji.

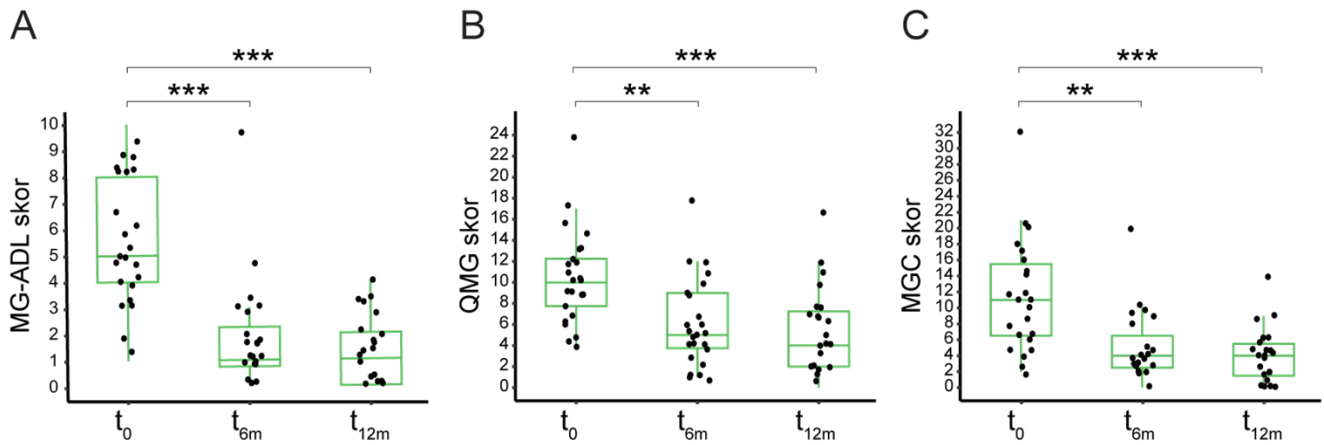
Kod bolesnika sa dostupnim kliničkim podacima u sve tri vremenske tačke ($N = 24$), utvrđeno je da imunosupresivna terapija ima značajan efekat na MG-ADL skor ($\chi^2 = 33,8$, $p = 4,65E-8$; Kendallov $W = 0,703$), uz statistički značajno smanjenje skora za 4 [2,5] poena u t_{6m} i za 4 [3] poena u t_{12m} u odnosu na t_0 (**Slika 4.2A; Tabela 4.7**). Analizirajući promenu skora na QMG skali registrovano je njegovo značajno smanjenje tokom vremena ($\chi^2(2) = 23,5$, $p = 8E-6$; Kendallov $W = 0,489$), pri čemu je uočen veliki terapijski efekat na smanjenje skora za 5 [0,75] poena u t_{6m} i za 6 [0,75] poena u t_{12m} u odnosu na t_0 (**Slika 4.2B; Tabela 4.7**). Takođe, primećen je veliki terapijski efekat na promenu MGC skora ($\chi^2 = 19,6$, $p = 5,52E-5$; Kendallov $W = 0,426$), koji je bio za 7 [5] poena niži u t_{6m} i t_{12m} u odnosu na t_0 (**Slika 4.2C; Tabela 4.7**). Klinički MG-ADL, QMG i MGC skorovi nisu se statistički značajno razlikovali između t_{6m} i t_{12m} ($p > 0,05$; **Slika 4.2A-C; Tabela 4.7**), što ukazuje na to da je terapijski efekat postignut u prvih šest meseci lečenja i održan do dvanaestog meseca praćenja ovih bolesnika. Individualne vrednosti kliničkih MG-ADL, QMG i MGC skorova kod praćenih bolesnika prikazane su u **Prilogu 4.4**.

Tabela 4.6. Terapija i kliničke karakteristike bolesnika sa AChR-pozitivnom MG u vremenskoj tački pre primene imunosupresivne terapije (t₀), 6 meseci (t_{6m}) i 12 meseci (t_{12m}) nakon primene terapije.

	t ₀ (N = 31)	t _{6m} (N = 26)	t _{12m} (N = 24)
Tretman - N (%)			
Bez tretmana	31 (100,00)	0	0
Prednizon/deflazakort	0	26 (100,00)	24 (100,00)
Azatioprin	0	12 (46,15)	10 (41,67)
Timektomija	0	3 (11,54)	6 (25,00)
Klinički skor - medijana [IQR]			
MG-ADL	5 [4]	2 [1]	1 [2]
QMG	9 [5]	5 [5]	4 [5,25]
MGC	10,5 [9,75]	3 [2,75]	4 [4]
Responsivni - N (%)			
MG-ADL	0	21 / 25 [#] (84,00)	20 / 23 [#] (86,96)
QMG	0	19 / 26 [#] (73,07)	19 / 24 [#] (79,16)
MGC	0	15 / 22 [#] (68,18)	16 / 20 [#] (80,00)
MCE	0	13 / 26 (50,00)	15 / 24 (62,50)
MGFA klasa - N (%)			
IIa	8 (25,81)	10 (38,46)	7 (29,16)
IIb	16 (51,61)	5 (19,23)	3 (12,50)
IIIa	1 (3,22)	0	0
IIIb	6 (19,35)	1 (3,84)	0
Remisija - N (%)			
	0	10 (38,46)	14 (58,33)

N, broj bolesnika; MG-ADL, upitnik o aktivnostima svakodnevnog života; QMG, kvantitativna skala za procenu težine bolesti; MGC, kombinovana skala za procenu težine bolesti; MCE, minimalna klinička ekspresija (MG-ADL = 0 ili 1); MGFA, američka fondacija za mijasteniju gravis.

#Ukupan broj bolesnika sa MG koji su ispunjavali uslove da budu smatrani responsivnim na osnovu kliničkog skora pre primene imunosupresivne terapije: MG-ADL > 2, QMG > 3 ili MGC > 5.



Slika 4.2. Klinički skorovi **A.** MG-ADL, **B.** QMG i **C.** MGC kod 24 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG pre primene imunosupresivne terapije (t₀), nakon 6 meseci (t_{6m}) i nakon 12 meseci (t_{12m}) praćenja. Linije predstavljaju vrednosti medijana sa interkvartilnim opsegom. Statistički značajne razlike označene su sa ** (p < 0.01) i *** (p < 0.001).

Tabela 4.7. Klinički skorovi MG-ADL, QMG and MGC kod bolesnika sa AChR-pozitivnom MG u vremenskim tačkama pre terapije (t_0), i nakon 6 meseci (t_{6m}) i 12 meseci (t_{12m}) praćenja.

Poređenje	Statistički parametar	Veličina efekta	p vrednost	$p_{korigovana}$ vrednost
MG-ADL skor - (medijana [IQR]) _{vremenska tačka}				
5 [4] t_0 vs. 1 [1,5] t_{6m} vs. 1 [2] t_{12m}	$\chi^2(df) = 33,8(2)^a$	W = 0,703	4,65E-8	N.A.
5 [4] t_0 vs. 1 [1,5] t_{6m}	W(df) = 256(23) ^b	r = 0,748	3,20E-4	9,60E-4
5 [4] t_0 vs. 1 [2] t_{12m}	W(df) = 253(23) ^b	r = 0,868	4,12E-5	1,24E-4
1 [1,5] t_{6m} vs. 1 [2] t_{12m}	W(df) = 45(23) ^b	r = 0,390	0,078	0,235
QMG skor - (medijana [IQR]) _{vremenska tačka}				
10 [4,5] t_0 vs. 5 [5,25] t_{6m} vs. 4 [5,25] t_{12m}	$\chi^2(df) = 23,5(2)^a$	W = 0,489	8,00E-6	N.A.
10 [4,5] t_0 vs. 5 [5,25] t_{6m}	W(df) = 191(23) ^b	r = 0,691	0,001	0,004
10 [4,5] t_0 vs. 4 [5,25] t_{12m}	W(df) = 290(23) ^b	r = 0,821	6,12E-5	1,84E-4
5 [5,25] t_{6m} vs 4 [5,25] t_{12m}	W(df) = 121(23) ^b	r = 0,227	0,301	0,903
MGC skor - (medijana [IQR]) _{vremenska tačka}				
11 [9] t_0 vs. 4 [4] t_{6m} vs. 4 [4] t_{12m}	$\chi^2(df) = 19,6(2)^a$	W = 0,426	5,52E-5	N.A.
11 [9] t_0 vs. 4 [4] t_{6m}	W(df) = 228(22) ^b	r = 0,688	0,001	0,003
11 [9] t_0 vs. 4 [4] t_{12m}	W(df) = 242(22) ^b	r = 0,788	1,96E-4	5,88E-4
1 [1,5] t_{6m} vs. 4 [4] t_{12m}	W(df) = 38,5(22) ^b	r = 0,191	0,435	1

Skraćenice: MG-ADL, upitnik o aktivnostima svakodnevnog života; QMG, kvantitativna skala za procenu težine bolesti; MGC, kombinovana skala za procenu težine bolesti; IQR, interkvartilni opseg; df, stepen slobode; W, Kendall's W; r, parametar efektivne veličine Vilkoksovog testa; N.A., nije primenjivo. ^aFridmanov test, ^bVilkoksov test rangova sa Bonferonijevom korekcijom (*post-hoc* test). P-vrednosti < 0,05 označene su podebljano.

4.2.2. Rezultati ispitivanja nivoa mikroRNK u plazmi bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis tokom praćenja

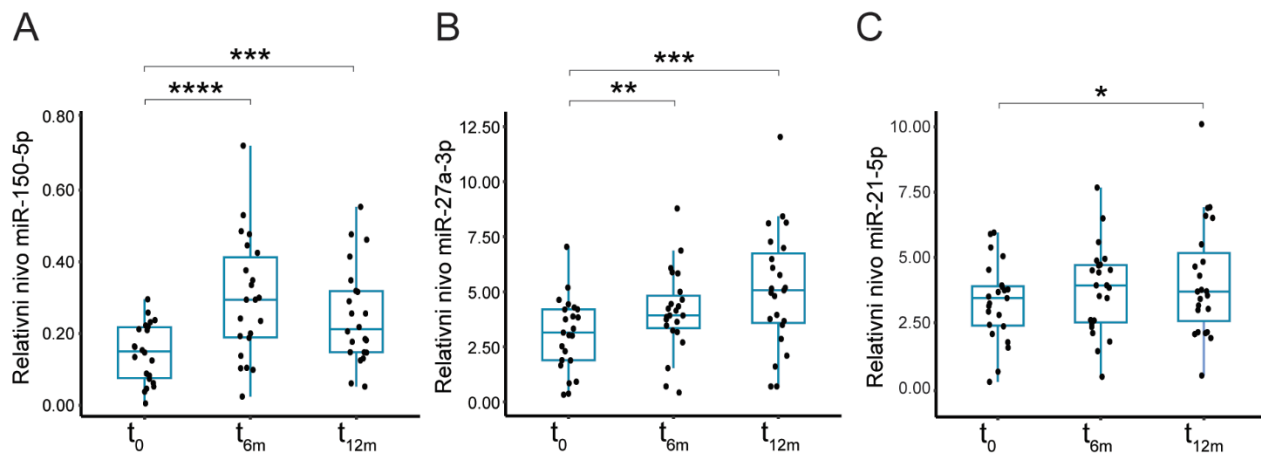
Nakon kontrole kvaliteta 112 prikupljenih uzoraka plazme, dva uzorka su isključena iz analize (jedan uzorak bolesnika u t_0 i jedan uzorak kontrolne osobe) usled detektovanog povećanog rizika postojanja hemolize ($\Delta Ct_{(\text{hemoliza})} > 7$) (Tabela 4.8). Četiri od osam ispitivanih mikroRNK (miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-150-5p i miR-409-3p) su odabrane za validaciju kao potencijalni biomarkeri kod MG, na osnovu njihove visoke zastupljenosti i reproducibilne detekcije u uzorcima plazme (vrednosti $Ct < 36$ i $\Delta Ct_{\text{replikati}} < 1,5$ su detektovane u više od 80 % uzoraka) (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Rizik postojanja hemolize i nivoi analiziranih mikroRNK u uzorcima plazme bolesnika sa AChR-pozitivnom MG pre terapije (t_0), i nakon 6 meseci (t_{6m}) i 12 meseci (t_{12m}) praćenja, kao i kod kontrola.

Vremenska tačka	AChR-pozitivna MG			Kontrole	Svi
	t_0	t_{6m}	t_{12m}	N.A.	
N (%)	31 (100)	26 (100)	24 (100)	31 (100)	112 (100)
$\Delta Ct_{(\text{hemoliza})} > 7$ (Shah et al., 2016), N (%)	1 (3,23)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,23)	2 (1,79)
$Ct < 36$ i $\Delta Ct_{\text{replikati}} < 1.5$ (Beretta et al., 2022), N (%)					
hsa-miR-21-5p	31 (100,00)	26 (100,00)	24 (100,00)	31 (100,00)	112 (100,00)
hsa-miR-27a-3p	31 (100,00)	26 (100,00)	24 (100,00)	31 (100,00)	112 (100,00)
hsa-miR-150-5p	28 (90,32)	24 (92,31)	23 (95,83)	30 (96,77)	105 (93,75)
hsa-miR-409-3p	25 (80,64)	23 (88,46)	21 (87,75)	28 (90,32)	97 (86,61)
hsa-miR-181d-5p	24 (77,42)	22 (84,61)	20 (83,33)	23 (74,19)	89 (79,46)
hsa-miR-340-3p	16 (51,61)	18 (69,23)	11(45,83)	17 (54,84)	62 (55,36)
hsa-miR-323b-3p	13 (41,93)	15 (57,69)	11 (45,83)	17 (54,84)	56 (50,00)
hsa-miR-485-3p	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

Skraćenice: N, broj uzoraka plazme; N.A., nije primenjivo.

Analize su pokazale da je imunosupresivna terapija imala statistički značajan efekat na promenu nivoa miR-21-5p, miR-27a-3p i miR-150-5p tokom vremena (**Slika 4.3; Tabela 4.9**). Terapija je imala veliki efekat na nivo miR-150-5p ($F = 16,274$; $p = 5,85E-6$; $\eta^2 = 0,188$), sa značajnim porastom u t_{6m} ($0,298 \pm 0,170$), i u t_{12m} ($0,249 \pm 0,136$), u odnosu na t_0 ($0,146 \pm 0,082$) (**Slika 4.3A; Tabela 4.9**). Nije uočena razlika u nivou miR-150-5p u t_{6m} i t_{12m} (**Slika 4.3A; Tabela 4.9**). Nivo miR-27a-3p se promenio tokom vremena ($\chi^2 = 16,400$; $p = 2,70E-4$; $W = 0,357$), uz statistički značajan porast u t_{6m} ($1,260 \pm 0,686$), i u t_{12m} ($1,440 \pm 0,727$), u odnosu na t_0 ($0,900 \pm 0,802$), dok razlika u nivou u t_{6m} i t_{12m} nije uočena (**Slika 4.3B; Tabela 4.9**). Takođe, uočen je umeren efekat terapije na nivo miR-21-5p ($F = 3,390$; $p = 0,043$; $\eta^2 = 0,034$), sa značajnim porastom u t_{12m} ($4,100 \pm 2,190$) u odnosu na t_0 ($3,300 \pm 1,500$) (**Slika 4.3C; Tabela 4.9**). Međutim, nisu utvrđene razlike u nivou miR-21-5p u t_{6m} ($3,770 \pm 1,680$) u poređenju sa nivoima u t_0 i u t_{12m} (**Slika 4.3C; Tabela 4.9**). Nivo miR-409-3p se nije menjao tokom vremena ($\chi^2 = 1,900$; $p = 0,387$; $W = 0,048$) (**Tabela 4.9**).



Slika 4.3. Nivoi **A.** miR-150-5p, **B.** miR-27a-3p i **C.** miR-21-5p kod 24 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG pre primene imunosupresivne terapije (t_0), nakon 6 meseci (t_{6m}) i nakon 12 meseci (t_{12m}) praćenja. Nivoi mikro RNK predstavljeni su kao relativne vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ normalizovane na miR-191a. Linije predstavljaju vrednosti medijana sa interkvartilnim opsegom. Statistički značajne razlike označene su sa * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) i **** ($p < 0.0001$).

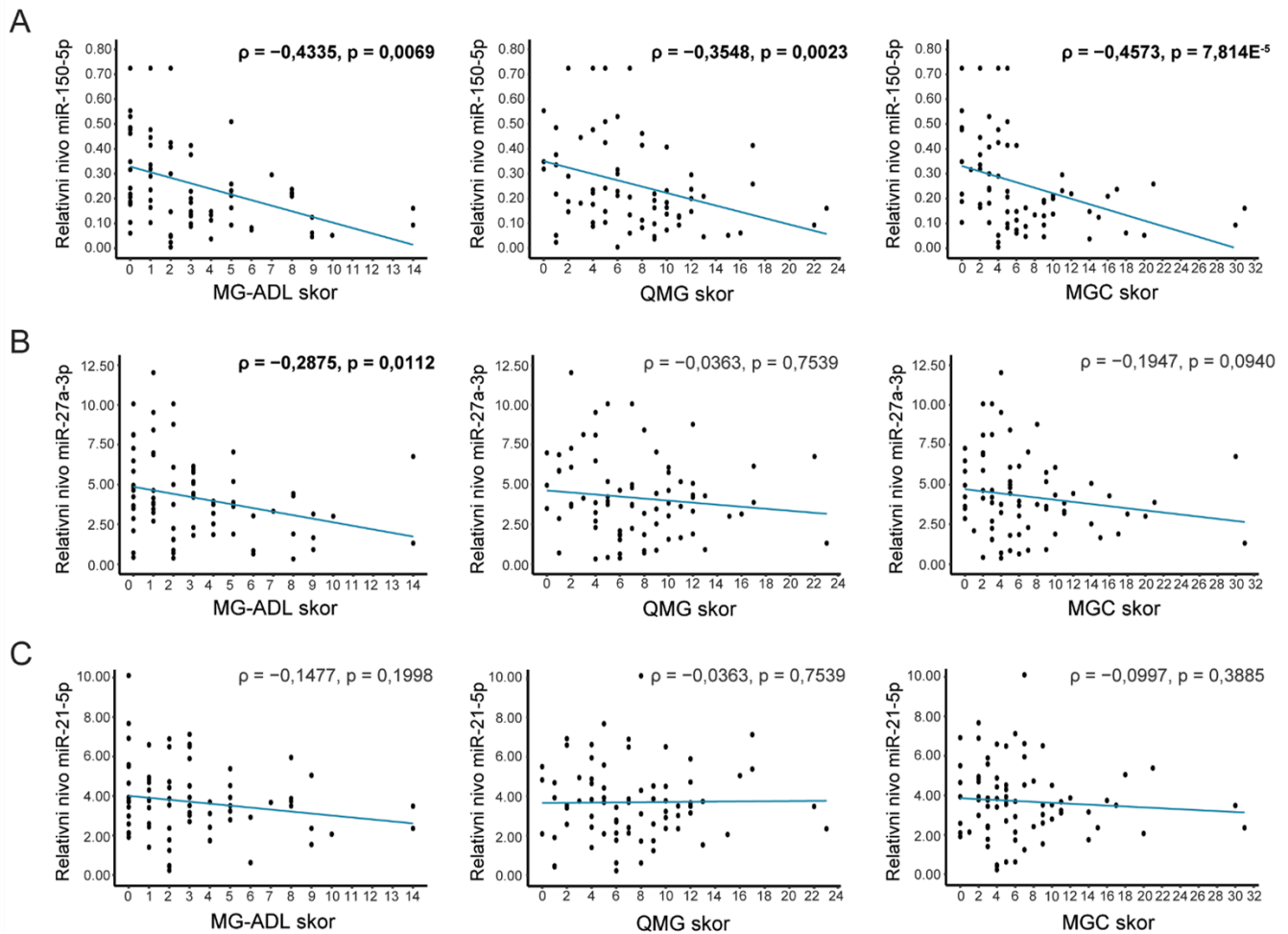
Tabela 4.9. Nivoi hsa-miR-21-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-150-5p i hsa-miR-409-3p kod bolesnika sa AChR-pozitivnom MG u vremenskim tačkama pre terapije (t_0), i nakon 6 meseci (t_{6m}) i 12 meseci (t_{12m}) praćenja.

Poređenje	Statistički parametar	Veličina efekta	p vrednost	Pkorigovana vrednost
hsa-miR-21-5p – (srednja vrednost ± SD)_{vremenska tačka}				
(3,300 ± 1,500) t_0 vs. (3,770 ± 1,680) t_{6m} vs. (4,100 ± 2,190) t_{12m} t_{12m}	F(df) = 3,390 (2) ^a	$\eta^2 = 0,034$	0,043	N.A.
(3,300 ± 1,500) t_0 vs. (3,770 ± 1,680) t_{6m}	t(df) = -1,620 (22) ^b	d = 0,338	0,119	0,357
(3,300 ± 1,500) t_0 vs. (4,100 ± 2,190) t_{12m}	t(df) = -2,630 (22) ^b	d = 0,548	0,015	0,046
(3,770 ± 1,680) t_{6m} vs. (4,100 ± 2,190) t_{12m}	t(df) = -0,995 (22) ^b	d = 0,208	0,330	0,990
hsa-miR-27a-3p – (srednja vrednost ± SD)_{vremenska tačka}				
(0,900 ± 0,802) t_0 vs. (1,260 ± 0,686) t_{6m} vs. (1,440 ± 0,727) t_{12m}	χ^2 (df) = 16,400 (2) ^c	W = 0,357	2,70E-4	N.A.
(0,900 ± 0,802) t_0 vs. (1,260 ± 0,686) t_{6m}	W(df) = 36 (22) ^d	r = 0,647	0,001	0,003
(0,900 ± 0,802) t_0 vs. (1,440 ± 0,727) t_{12m}	W(df) = 26 (22) ^d	r = 0,710	2,50E-4	7,50E-4
(1,260 ± 0,686) t_{6m} vs. (1,440 ± 0,727) t_{12m}	W(df) = 79 (22) ^d	r = 0,374	0,075	0,225
hsa-miR-150-5p – (srednja vrednost ± SD)_{vremenska tačka}				
(0,146 ± 0,082) t_0 vs. (0,298 ± 0,170) t_{6m} vs. (0,249 ± 0,136) t_{12m}	F(df) = 16,274 (2) ^a	$\eta^2 = 0,188$	5,85E-6	N.A.
(0,146 ± 0,082) t_0 vs. (0,298 ± 0,170) t_{6m}	t(df) = -5,280 (21) ^b	d = 1,130	3,12E-5	9,36E-5
(0,146 ± 0,082) t_0 vs. (0,249 ± 0,136) t_{12m}	t(df) = -4,830 (21) ^b	d = 1,030	8,89E-5	2,67E-4
(0,298 ± 0,170) t_{6m} vs. (0,249 ± 0,136) t_{12m}	t(df) = 1,620 (21) ^b	d = 0,346	0,119	0,357
hsa-miR-409-3p – (srednja vrednost ± SD)_{vremenska tačka}				
(0,059 ± 0,035) t_0 vs. (0,051 ± 0,024) t_{6m} vs. (0,057 ± 0,034) t_{12m}	χ^2 (df) = 1,900 (2) ^c	W = 0,048	0,387	N.A.

Skraćenice: df, stepen slobode; η^2 , generalized eta squared; d, Cohen's d; W, Kendall's W; N.A., nije primenjivo. ^aAnaliza varijanse sa ponovljenim merenjima. ^bUpareni t-test sa Bonferonijevom korekcijom (*post-hoc* test), ^cFridmanov test, ^dVilkoksov test rangova sa Bonferonijevom korekcijom (*post-hoc* test). P-vrednosti < 0,05 označene su podebljano.

4.2.3. Rezultati ispitivanja korelacije nivoa miR-150-5p, miR-27a-3p i miR-21-5p sa kliničkim skorovima MG-ADL, QMG i MGC

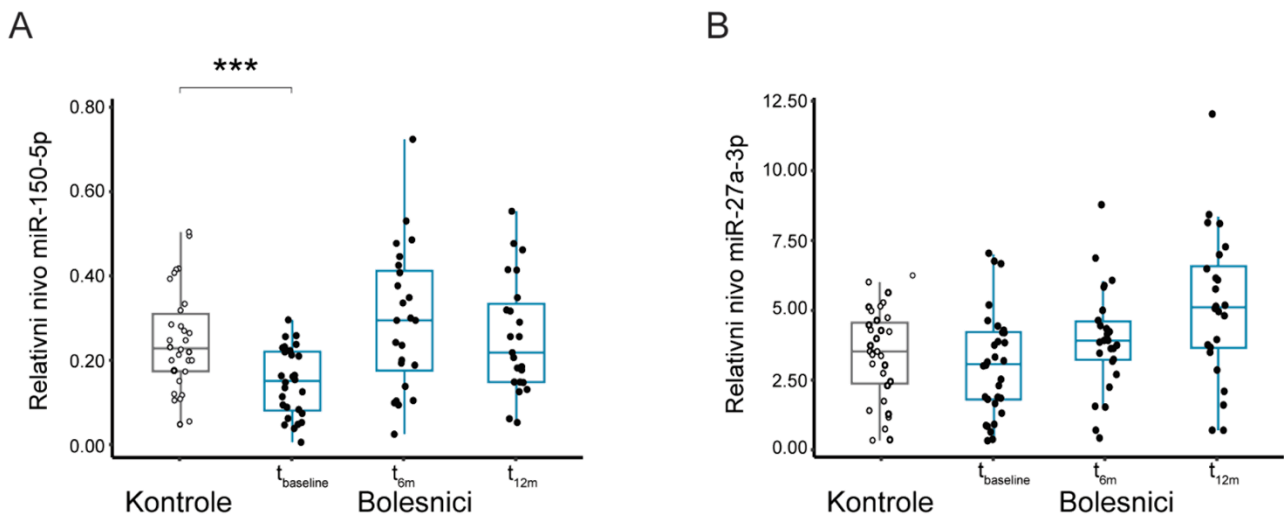
Analizirajući nivoe miR-150-5p, miR-27a-3p i miR-21-5p svih bolesnika u svim vremenskim tačkama, identifikovana je jaka negativna korelacija nivoa miR-150-5p sa MG-ADL skorom ($p = 0,007$; Spirmanov $\rho = -0,433$) i MGC skorom ($p = 7,81E-5$; Spirmanov $\rho = -0,457$), kao i umerena negativna korelacija sa QMG skorom ($p = 0,002$; Spirmanov $\rho = -0,355$) (Slika 4.4A). Nivo miR-27a-3p pokazao je statistički značajnu, ali slabu negativnu korelaciju sa MG-ADL skorom ($p = 0,011$; Spirmanov $\rho = -0,287$), dok korelacija sa QMG i MGC skorom nije uočena ($p = 0,754$; Spirmanov $\rho = -0,036$ i $p = 0,094$; Spirmanov $\rho = -0,195$, redom) (Slika 4.4B). Korelacija nivoa miR-21-5p sa MG-ADL, QMG i MGC skorovima nije uočena (sve $p > 0,05$) (Slika 4.4C).



Slika 4.4. Korelacija nivoa A. miR-150-5p, B. miR-27a-3p i C. miR-21-5p sa MG-ADL (levo), QMG (sredina) i MGC (desno) kliničkim skorovima kod bolesnika sa AChR-pozitivnom MG. Statistički značajne korelacije uočene Spirmanovim testom rangova označene su podebljano.

4.2.4. Rezultati ispitivanja nivoa miR-150-5p i miR-27a-3p kod zdravih kontrola i bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom mijastenijom gravis

Imajući u vidu značaj identifikacije pouzdanih i specifičnih biomarkera, dodatno su upoređeni nivoi miR-150-5p i miR-27a-3p između zdravih kontrola i AChR-pozitivnih MG bolesnika u t_0 , t_{6m} i t_{12m} (Slika 4.5). Utvrđeno je da su bolesnici sa MG imali statistički značajno niži nivo miR-150-5p u t_0 u poređenju sa zdravim kontrolama ($0,147 \pm 0,080$ naspram $0,247 \pm 0,121$; $t = -3,722$; $p = 4,9E-6$) (Slika 4.5A). Međutim, nisu uočene značajne razlike između bolesnika u t_{6m} i t_{12m} ($0,294 \pm 0,169$ i $0,256 \pm 0,137$, redom) i kontrolne grupe ispitanika (obe $p > 0,05$) (Slika 4.5A), što ukazuje na to da se nivo miR-150-5p kod bolesnika normalizovao tokom primene imunosupresivne terapije dostigavši nivo kao kod zdravih kontrola. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u nivou miR-27a-3p između kontrola ($3,368 \pm 1,587$) i bolesnika u t_0 ($3,026 \pm 1,860$), kao ni u t_{6m} ($3,923 \pm 1,858$) i t_{12m} ($5,143 \pm 2,661$) (sve $p > 0,05$) (Slika 4.5B).



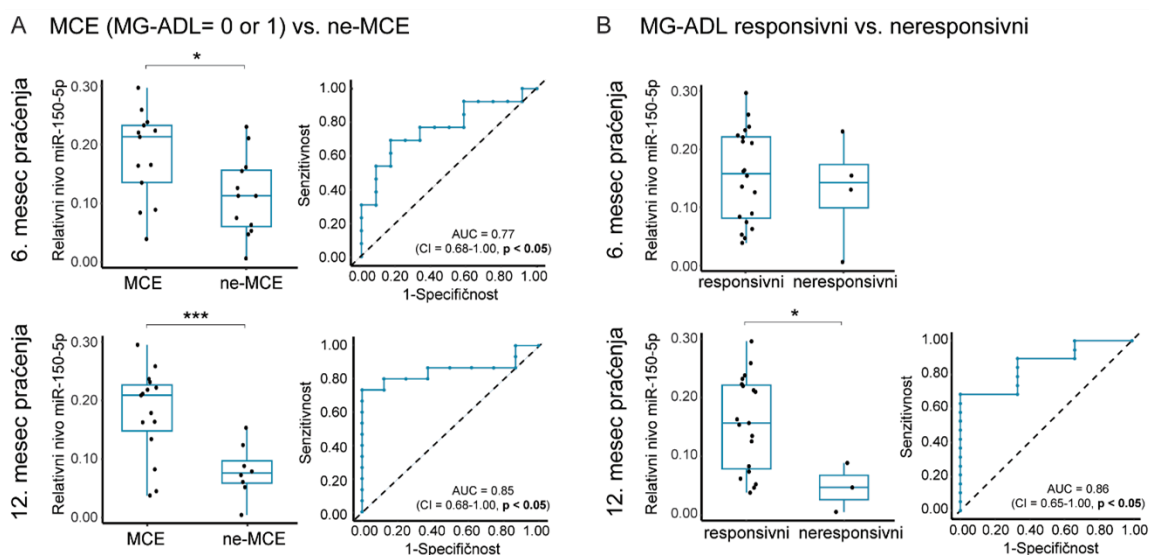
Slika 4.5. Nivoi A. miR-150-5p i B. miR-27a-3p kod zdravih kontrola i bolesnika sa AChR-pozitivnom MG pre primene imunosupresivne terapije (t_0), nakon 6 meseci (t_{6m}) i nakon 12 meseci (t_{12m}) praćenja. Nivoi mikroRNK predstavljeni su kao relativne vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ normalizovane na miR-191a. Linije predstavljaju vrednosti medijana sa interkvartilnim opsegom. Statistički značajna razlika dobijena nezavisnim t-testom označena je sa *** ($p < 0.001$).

4.2.5. Rezultati analize miR-150-5p kao prediktivnog biomarkera kod stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis

Analizirali smo nivo miR-150-5p u t_0 kao prediktivni biomarker odgovora na imunosupresivnu terapiju, stratifikovanjem bolesnika prema njihovim kliničkim ishodima u t_{6m} i t_{12m} (MCE naspram ne-MCE, kao i bolesnici sa pozitivnim odgovorom na terapiju naspram bolesnici refraktarni na terapiju).

Nivo miR-150-5p u t_0 bio je statistički značajno viši kod bolesnika koji su dostigli MCE (MG-ADL skor = 0 ili 1) u poređenju sa bolesnicima koji nisu ispunili ovaj kriterijum, kako u t_{6m} , tako i u t_{12m} (**Slika 4.6A**). ROC analiza je pokazala da miR-150-5p ima odličnu prediktivnu sposobnost za postizanje MCE u t_{12m} ($p = 7,6E-4$, $AUC = 0,850$, $95\% \text{ CI} = 0,684-1,000$, granična vrednost dobijena na osnovu Youdenovog indeksa = 0,16), uz senzitivnost od 73,33 % i specifičnost od 100,00 %. U t_{6m} , prediktivna sposobnost bila je prihvatljiva ($p = 0,026$, $AUC = 0,769$, $95\% \text{ CI} = 0,576-0,963$, granična vrednost na osnovu Youdenovog indeksa = 0,16), sa senzitivnošću od 69,23 % i specifičnošću od 83,33 % (**Slika 4.6A**).

Takođe, nivo miR-150-5p u t_0 je pokazao odličnu diskriminatornu sposobnost u razlikovanju bolesnika sa pozitivnim odgovorom i refraktarnih bolesnika na imunosupresivnu terapiju na osnovu MG-ADL skale u t_{12m} ($p = 0,016$, $AUC = 0,860$, $95\% \text{ CI} = 0,650-1,000$, granična vrednost = 0,12) (**Slika 4.6B**). U t_{6m} nisu uočene statistički značajne razlike ($p > 0,05$; **Slika 4.6B**). U t_{12m} , nivo miR-150-5p je pokazao prihvatljivu diskriminatornu sposobnost za razlikovanje bolesnika sa pozitivnim odgovorom i refraktarnih bolesnika na terapiju prema QMG skali, sa senzitivnošću od 66,70 % i specifičnošću od 100,00 % ($p = 0,001$, $AUC = 0,740$, $95\% \text{ CI} = 0,535-0,943$, granična vrednost = 0,12). Slični rezultati dobijeni su i za MGC skalu, sa senzitivnošću od 73,33 % i specifičnošću od 100,00 % ($p = 0,0002$, $AUC = 0,733$, $95\% \text{ CI} = 0,502-0,965$, granična vrednost na osnovu Youdenovog indeksa = 0,125). U t_{6m} nisu utvrđene razlike između pomenute dve grupe bolesnika prema QMG i MGC skalama (obe $p > 0,05$).



Slika 4.6. Analiza ROC krive nivoa miR-150-5p u plazmi pre primene imunosupresivne terapije kod bolesnika sa AChR-pozitivnom MG stratifikovanih na **A.** MCE i ne-MCE i **B.** Bolesnici sa pozitivnim odgovorom na terapiju i refraktarni bolesnici prema MG-ADL kriterijumu na 6. i 12. mesecu praćenja.

5. Diskusija

5.1. Aktuelni izazovi u lečenju i potreba za novim terapijskim pristupima kod stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis

MG je retka autoimunska bolest nervno-mišićne spojnice, koju karakteriše fluktuirajuća slabost i zamorljivost poprečno-prugastih mišića (Lazaridis & Tzartos, 2020). U najvećem broju slučajeva, patogeneza bolesti zasniva se na stvaranju autoantitela usmerenih na proteine postsinaptičke membrane, najčešće subjedinice nikotinskog AChR, što dovodi do poremećaja neuromišićne transmisije i razvoja kliničkih manifestacija bolesti (Gilhus, 2016). Klinička prezentacija može biti izrazito varijabilna, od blagih izolovano okularnih formi do teških generalizovanih oblika MG, koji u značajnoj meri utiču na funkcionalnost bolesnika utičući na njihov kvalitet života (Dresser et al., 2021). Heterogenost MG ogleda se ne samo u kliničkoj prezentaciji, već i u brzini progresije bolesti, imunološkim, serološkim i genetičkim karakteristikama različitih podgrupa bolesnika. Ova složenost odražava multifaktorijalnu prirodu bolesti, u kojoj interakcija činilaca genetičke predispozicije i spoljašnjih faktora oblikuje individualni tok i odgovor na terapiju.

U savremenom zbrinjavanju bolesnika sa MG, heterogenost bolesti predstavlja značajan izazov u kliničkoj praksi, budući da nove biološke terapije ostvaruju zadovoljavajući efekat samo u jasno definisanim podgrupama bolesnika (Ma et al., 2024). Stoga, standardna imunosupresivna terapija i dalje, nakon nekoliko decenija, predstavlja terapiju izbora u lečenju AChR-pozitivne MG (Zust & Morren, 2023). Ipak, približno petina bolesnika ne postiže adekvatan klinički odgovor, dok se kod dela obolelih javljaju neželjeni efekti koji ograničavaju njenu dugoročnu primenu (Kaminski & Denk, 2022; Sanders & Evoli, 2010). Dostupne terapije MG pretežno su usmerene na globalno smanjenje imunološke aktivnosti i kontrolu kliničkih simptoma (Sweeney et al., 2026). Njihovo delovanje je pretežno nespecifično i zasniva se na širokoj modulaciji imunološkog odgovora, dok ključni patogenetički mehanizmi specifični za MG ne predstavljaju primarne terapijske mete. Kod organ-specifičnih autoimunskih bolesti, poput MG, identifikacija i karakterizacija premanifestnih imunopatoloških procesa od suštinskog su značaja za razvoj novih, efikasnijih i za bolesnika specifičnih terapijskih strategija (Sweeney et al., 2026). Identifikacija genetičkih faktora rizika za razvoj MG mogla bi otvoriti put ka boljem razumevanju prekliničkih imunopatoloških događaja u osnovi bolesti i u perspektivi pružiti nove terapijske mete (Li et al., 2024; Yixian et al., 2025). Sa druge strane, integracija pouzdanih biomarkera odgovora na imunosupresivnu terapiju u aktuelnu kliničku praksu omogućila bi racionalan i personalizovan pristup lečenju bolesnika. Lokusi gena uključenih u strukturnu organizaciju nervno-mišićne spojnice su prepoznati kao nosioci specifičnih genetičkih faktora rizika za razvoj autoimune MG (Chia et al., 2022; Topaloudi et al., 2022), dok cirkulišuće mikroRNK u plazmi mogu odražavati aktuelno imunološko stanje bolesnika, kao i terapijom izazvane promene tokom bolesti (Singh et al., 2013). U okviru ove doktorske teze, primenom komplementarnih genetičkih i molekularnih pristupa, ispitane su varijante u lokusima gena za AChR kao potencijalni genetički faktori rizika za razvoj AChR-pozitivne MG, kao i cirkulišuće mikroRNK u plazmi kao mogući biomarkeri odgovora na imunosupresivnu terapiju.

5.2. Varijante rs4151121 i rs35274388 u lokusima gena za AChR kao prediktori nastanka stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis

U okviru genetičkog segmenta ove doktorske teze ispitivali smo tačkaste varijante u lokusima gena koji kodiraju α i β subjedinice AChR, kao genetičke faktore rizika za razvoj AChR-pozitivne MG. Naši rezultati ukazuju na to da je potencijalno uzročna varijanta rs4151121 u lokusu *CHRNA1*, identifikovana *in silico*, povezana sa razvojem MG sa kasnim početkom. Pored toga, bajesovskim finim mapiranjem lokusa *CHRNA1* identifikovali smo varijantu rs35274388 kao potencijalno uzročnu, koja je pokazala trend ka statistički značajnoj povezanosti sa MG.

Pokazali smo da ređi alel G varijante rs4151121 predstavlja faktor rizika za razvoj MG sa kasnim početkom, pri čemu nosioci genotipova GG i AG imaju približno 1,5 puta veći rizik za razvoj bolesti. Izbor starosne granice za podjelu bolesnika na one sa ranim i kasnim početkom može uticati na dobijene rezultate, s obzirom na to da u literaturi ne postoji jedinstven konsenzus (Chia et al., 2022; Gilhus, 2016; Meriggioli & Sanders, 2009; Renton et al., 2015). Ipak, u okviru istog analitičkog pristupa, ova potencijalna metodološka razlika nije uticala na konzistentnost naših nalaza, budući da su analize sprovedene primenom starosnih granica od 40 i 50 godina pokazale uporedive rezultate.

Iako je uticaj pola kontrolisan uključivanjem ove varijable kao kovarijate u statističku analizu, pol je dodatno razmatran kao biološka varijabla, imajući u vidu neravnomernu zastupljenost muškog i ženskog pola kod MG sa ranim i kasnim početkom (Gilhus, 2016; Meriggioli & Sanders, 2009). U okviru iste ispitivane kohorte, identifikovali smo trend ka statistički značajnoj povezanosti varijante rs4151121 sa ispoljavanjem MG kod osoba muškog pola, što dodatno ukazuje na to da ova varijanta može predstavljati faktor rizika za razvoj MG kasnog početka. Ipak, zbog ograničene veličine uzorka, bolesnici sa kasnim početkom bolesti nisu podeljeni prema polu, te nije bilo moguće pouzdano proceniti da li varijanta rs4151121 nosi najveći rizik za razvoj MG kasnog početka upravo kod osoba muškog pola.

Uočena učestalost ređeg alela G varijante rs4151121 u opštoj populaciji Srbije (38,8 %) bila je uporediva sa učestalošću zabeleženom u evropskoj (35,2 %) i afričkoj populaciji (32,6 %), i znatno viša u odnosu na azijsku populaciju (7,2 % kod Južnih Azijata i 0,1 % kod Istočnih Azijata), prema podacima iz projekta 1000 Genomes Phase 3 (Harrison et al., 2024). Ovi nalazi ukazuju na populaciono-specifičan genetički rizik, što naglašava značaj razmatranja populacionih razlika pri interpretaciji povezanosti ove varijante sa MG.

Varijanta rs4151121 se nalazi na hromozomu 17 (pozicija 7438975, GRCh38.p14), približno 6 kb uzvodno od prvog egzona gena *CHRNA1* (Harrison et al., 2024). Podaci o ekspresiji iz baze GTEx pokazuju da su rizični genotipovi GG i AG povezani sa smanjenom ekspresijom gena *CHRNA1* u skeletnim mišićima (dbGaP Accession phs000424.v8.p2, pristupljeno 23.03.2024). Dodatno, u okviru iste funkcionalne interpretacije, podaci iz baze Regulome (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023), pokazuju da se rs4151121 nalazi u *cis*-regulatornim elementima (aktivnim i slabim pojačivačima) u adultnom slabinskom mišiću, koji predstavlja jedan od skeletnih mišića pogođenih u MG.

U istom istraživačkom okviru analizirana je i varijanta rs35274388 u lokusu *CHRNA1*. U okviru iste kohorte, uočen je trend ka statistički značajnoj povezanosti ređeg alela A, kao i genotipova AA i GA, sa rizikom za razvoj MG, pri čemu nisu uočene razlike u povezanosti ove varijante između muškog i ženskog pola. Učestalost rizičnog alela A u opštoj populaciji Srbije iznosila je 4,5 %, što je u skladu sa evropskom učestalošću od 4,3 %, dok su niže vrednosti zabeležene u američkim (2,6 %), južnoazijskim (2,5 %), afričkim (0,2%) i istočnoazijskim populacijama (0,1 %) prema podacima iz projekta 1000 Genomes Phase 3 (Harrison et al., 2024).

Analiza genetičkih varijanti sa niskom učestalošću ređih alela (MAF < 0,05), poput rs35274388, zahteva eksperimentalne grupe sa velikim brojem uzoraka kako bi se pouzdano detektovala povezanost sa specifičnim fenotipom, što u okviru ove studije verovatno objašnjava varijabilne rezultate dobijene primenom različitih starosnih granica za podelu bolesnika prema uzrastu na početku bolesti. Važno je istaći da je uočena učestalost rizičnog alela kod bolesnika sa MG kasnog početka (6,7 %) uporediva sa prethodnim GWAS nalazima kod bolesnika evropskog porekla (6,5 %), u kojima je rs35274388 identifikovana kao faktor rizika za razvoj MG kasnog početka, naročito kod osoba muškog pola (Chia et al., 2022).

Varijanta rs35274388 se nalazi na hromozomu 2 (pozicija 174764492, GRCh38.p14) u regionu promotora gena *CHRNA1* (Harrison et al., 2024). Dodatno, ova varijanta je pozicionirana u regionima pristupačnog hromatina i slabog pojačivača u adultnom slabinskom mišiću, što dodatno ukazuje na njenu potencijalnu ulogu u regulaciji ekspresije gena *CHRNA1* (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023).

Varijante u regulatornim regionima gena koji kodiraju subjedinice AChR mogu doprineti razvoju MG putem patogenih mehanizama koji deluju kako na nivou skeletnih mišića, tako i u timusu. Autoantitela usmerena na AChR mogu aktivirati sistem komplementa i dovesti do formiranja kompleksa koji uvodi oštećenja na postsinaptičkoj membrani mišića (Lennon et al., 1978), indukovati unakrsno povezivanje AChR i njihovu ubranu endocitozu i degradaciju (Drachman et al., 1978), ili direktno blokirati mesta vezivanja acetilholina i time onemogućiti efikasnu aktivaciju receptora (Drachman et al., 1982). Smanjenje bazalne ekspresije AChR, uslovljeno regulatornim genetičkim varijantama, bi moglo uticati na dostizanje kritičnog praga funkcionalnih receptora za ispoljavanje simptoma MG. Izmenjena ekspresija AChR u skeletnim mišićima može takođe doprineti kliničkoj heterogenosti MG, uključujući odsustvo jasne korelacije između titra autoantitela i kliničkog statusa kod pojedinih bolesnika (Meisel et al., 2023). U tom kontekstu, težina kliničke slike ne mora direktno odražavati intenzitet humoralnog autoimunskog odgovora, već može zavistiti od individualnog funkcionalnog stanja nervno-mišićne spojnice, koje je delimično određeno genetičkim faktorima.

Pored periferne uloge u skeletnim mišićima, regulatorne varijante u genima za AChR mogu imati značajne implikacije i u timusu. Smanjena ekspresija AChR u timusu može narušiti proces centralne tolerancije, omogućavajući preživljavanje autoreaktivnih T-limfocita i posredno podstičući aktivaciju B-ćelija koje proizvode patogena autoantitela. Ovakav mehanizam dodatno povezuje regulatorne varijante u genima *CHRNA1* i *CHRNA1* sa razvojem autoimunosti u MG, naročito u kontekstu starosno-zavisnih promena u timusnoj funkciji.

Ispitivanje gena koji učestvuju u regulaciji imunskog odgovora i gena koji kodiraju strukturne komponente nervno-mišićne spojnice omogućava sveobuhvatni uvid u genetičku predispoziciju MG. Dok prvi predstavljaju deo šire, nespecifične predispozicije ka autoimunosti koju MG deli sa drugim autoimunskim bolestima (Chia et al., 2022; Djordjevic et al., 2024; Topaloudi et al., 2022), geni poput *CHRNA1* i *CHRN1* predstavljaju specifične genetičke faktore rizika za MG, jer direktno utiču na strukturu i funkciju ciljnog tkiva bolesti. Ovu pretpostavku dodatno podržava postojanje genetičkog kontinuuma između kongenitalnih mijasteničnih sindroma i stečene MG. Kongenitalni mijastenični sindromi nastaju usled prisutva varijanti u kodirajućim regionima gena nervno-mišićne spojnice koje imaju veliki fenotipski efekat, dovodeći do izraženih poremećaja strukture i funkcije sinapse (Finsterer, 2019; Freed et al., 2021). Među tim genima nalaze se *CHRNA1*, *CHRN1* i *AGRN*, koji su takođe identifikovani kao nosioci genetičkih faktora rizika u studijama asocijacije na nivou celog genoma kod MG (Chia et al., 2022; Topaloudi et al., 2022). Ovi nalazi su u skladu sa hipotezom o zajedničkoj genetičkoj osnovi monogenih i kompleksnih bolesti sa sličnim fenotipskim ishodima, gde različit stepen funkcionalnog poremećaja, uslovljen veličinom efekta i lokalizacijom varijanti, oblikuje kliničku manifestaciju bolesti (Freund et al., 2018).

Nalaze ove genetičke studije asocijacije treba tumačiti u svetlu određenih ograničenja. Pre svega, trend ka statistički značajnoj povezanosti varijante rs35274388 sa MG kasnog početka može odražavati nisku učestalost ređeg alela A u ispitivanoj populaciji (MAF ~ 5%). Ipak, uočene vrednosti MAF su u skladu sa GWAS nalazima kod bolesnika evropskog porekla, u kojima je takođe uočena povezanost sa MG kasnog početka (Chia et al., 2022). Dodatno ograničenje ove studije predstavlja nemogućnost izučavanja ispitivanih varijanti kao faktora rizika za ispoljavanje različitih kliničkih manifestacija MG, kao i različitih patoloških karakteristika timusa, usled ograničene veličine ispitivanih podgrupa, što može uticati na pouzdanost i reproduktivnost dobijenih nalaza. S obzirom na to da se timom javlja kod 10-15 % bolesnika sa MG (Gilhus, 2016; Meriggioli & Sanders, 2009), sa pikom incidencije oko 50. godine života sa podjednakom učestalošću kod muškog i ženskog pola (Marx et al., 2013), adekvatno dizajnirana studija kod MG bolesnika sa timomom mogla bi dati novi uvid u ulogu varijanti u genima *CHRNA1* i *CHRN1* kao faktora rizika za razvoj MG sa kasnim početkom, predominantno kod muškaraca, kao i njihov doprinos patogenim mehanizmima u timusu i skeletnim mišićima koji dovode do razvoja bolesti.

Snaga ove studije genetičke asocijacije ogleda se u velikoj kohorti bolesnika, homogenoj u pogledu serološkog statusa i klinički potvrđene dijagnoze, kao i u činjenici da je ovo prva studija lokusa *CHRNA1* i *CHRN1* koja uključuje bolesnike i kontrole iz iste populacije, pojedinačno uparene prema polu i starosti.

Zaključno, u ovoj studiji su identifikovane varijante u genima koji kodiraju subjedinice AChR kao faktori rizika za razvoj MG, predominantno sa kasnim početkom u jednoj od evropskih populacija. Imajući u vidu populaciono-specifične razlike u učestalosti rizičnih alela varijanti rs4151121 i rs35274388, njihova potencijalna uzročna uloga u neevropskim populacijama zahteva dodatnu validaciju. Imajući u vidu da je MG retko oboljenje, udruživanje podataka iz različitih kohorti otvorilo bi mogućnost analiza retkih varijanti i razumevanja genetičke osnove različitih manifestacija MG sa adekvatnom

pouzdanosti. Pored toga, sprovođenje funkcionalnih studija moglo bi doprineti razumevanju uloge gena koji kodiraju subjedinice AChR u etiologiji ove bolesti

Iako genetički faktori rizika predstavljaju jednu od komponenti predispozicije za razvoj MG, molekularni biomarkeri mogu pratiti dinamične, terapijom modulirane promene tokom toka bolesti, zbog čega je drugi fokus istraživanja bio usmeren na analizu cirkulišućih mikroRNK u plazmi kao potencijalnih prediktora terapijskog odgovora.

5.3. MikroRNK miR-150-5p iz plazme kao prediktor terapijskog odgovora kod stečene AChR-pozitivne mijastenije gravis

Prisustvo autoantitela na AChR predstavlja pouzdan i široko prihvaćen kriterijum za potvrdu dijagnoze AChR-pozitivne MG (Diogenes et al., 2024; Lazaridis & Tzartos, 2020; Li et al., 2023; Vincent & Newsom-Davis, 1985). Međutim, nivoi detektovanih antitela nisu informativni za predviđanje odgovora na imunosupresivnu terapiju, što predstavlja značajan izazov u svakodnevnom kliničkom radu sa bolesnicima sa MG (Lazaridis & Tzartos, 2020; Meisel et al., 2023). U tom kontekstu, cirkulišuće mikroRNK se sve više razmatraju kao obećavajući biomarkeri, sa njihovom potencijalnom ulogom u predikciji terapijskog odgovora (Beretta et al., 2022; Cavalcante et al., 2019; Huang et al., 2024; Molin et al., 2018; Punga et al., 2015; Punga & Punga, 2018; Punga et al., 2014; Sabre et al., 2019). Ipak, prethodne studije koje su ukazale na potencijal mikroRNK kao biomarkera kod MG opterećene su značajnim metodološkim ograničenjima, uključujući heterogenost ispitivanih kohorti, izostanak adekvatnih kontrolnih grupa i ograničeno trajanje longitudinalnog praćenja, što naglašava potrebu za dodatnim, pažljivo dizajniranim istraživanjima radi njihove pouzdane validacije (Beretta et al., 2022; Huang et al., 2024; Punga et al., 2015; Sabre et al., 2018). U okviru molekularnog segmenta ove doktorske teze, nastojali smo da prevaziđemo navedena ograničenja ispitivanjem prethodno identifikovanih mikroRNK u dobro definisanoj, homogenoj kohorti novodijagnostikovanih, nelečenih bolesnika sa AChR-pozitivnom MG, praćenih tokom 12 meseci od započinjanja imunosupresivne terapije. Primenom strogo definisanih kriterijuma za uključivanje ispitanika u studiju, individualnim uparivanjem bolesnika i zdravih kontrola prema polu i starosti, kao i rigoroznim analitičkim pristupom u kojem su razmatrane isključivo mikroRNK sa visokom zastupljenošću u uzorcima, identifikovali smo miR-150-5p u plazmi kao prediktivni biomarker odgovora na imunosupresivnu terapiju kod AChR-pozitivne MG.

U analiziranoj kohorti MG bolesnika, nivoi miR-150-5p u plazmi pre primene imunosupresivne terapije bili su značajno sniženi u poređenju sa zdravim kontrolama. Ovaj nalaz verovatno odražava smanjenu intraćelijsku ekspresiju miR-150-5p u imunološki relevantnim ćelijama, pre svega CD4⁺ T-limfocitima, koji imaju centralnu ulogu u imunopatogenezi MG i predstavljaju dominantan izvor ove mikroRNK prema podacima iz baze *Human miRNA Tissue Atlas* verzije 3 (2025) (Rishik et al., 2025). Ovakvo tumačenje u skladu je sa prethodnim izveštajima o sniženim nivoima miR-150-5p u CD4⁺ T-limfocitima nelečenih AChR-pozitivnih MG bolesnika (Cron et al., 2019). Imajući u vidu da krvne ćelije predstavljaju glavni izvor cirkulišućih mikroRNK, koje u plazmu dospevaju putem regulisane sekrecije ili pasivnog oslobađanja (Leonard et al., 2024; Pritchard et al., 2012), sniženi nivoi miR-150-5p u plazmi najverovatnije reflektuju

smanjenu intraćelijsku ekspresiju u leukocitima, naročito u CD4⁺ T-limfocitima (Vasilescu et al., 2009).

Nakon započinjanja imunosupresivne terapije, uočen je porast nivoa miR-150-5p u šestom mesecu praćenja, koji je dostigao vrednosti zabeležene kod zdravih kontrola i bio održan i u dvanaestom mesecu praćenja bolesnika naše kohorte. Ove promene su bile praćene značajnim poboljšanjem kliničke slike bolesnika koje je procenjeno objektivnim kliničkim skalama. Iako nije moguće sa sigurnošću razlučiti da li uočene promene nivoa predstavljaju direktan farmakodinamski efekat terapije ili sekundarni odgovor na smanjenje inflamacije, vremenska dinamika porasta i stabilizacije nivoa miR-150-5p prati dinamiku efekta terapije.

U okviru ove studije nije uočen uticaj timektomije na nivoa miR-150-5p u plazmi uprkos povećanju broja timektomisanih bolesnika tokom praćenja (sa 11,5 % na 25,0 % između šestog i dvanaestog meseca). Ovo je u skladu sa nalazima randomizovane studije sa ciljem ispitivanja značaja timektomije kod AChR-pozitivne MG (MGTX), u kojoj nije uočen značajan uticaj intervencije na nivoa miR-150-5p tokom perioda praćenja do 24 meseca (Molin et al., 2018). Poznato je da je kliničko poboljšanje nakon timektomije kod MG najčešće vremenski odloženo, sa prvim klinički relevantnim efektima ispoljenim oko šest meseci nakon hirurške intervencije, uz postepeni dalji napredak tokom narednih godina (Wolfe et al., 2016). Ovakva vremenska dinamika terapijskog odgovora može predstavljati jedno od mogućih objašnjenja za odložene promene nivoa miR-150-5p uočene u studiji uticaja timektomije na nivo miR-150-5p koja je uključila bolesnike u širokom vremenskom intervalu od 2 do 15 godina nakon hirurške intervencije (Punga et al., 2014). Ipak, kod dela bolesnika, naročito onih sa netimomskom, generalizovanom AChR-pozitivnom MG, kliničko poboljšanje može započeti već tokom prvih šest meseci nakon intervencije (Jaretzki et al., 2000). Prema tome, uočene promene nivoa miR-150-5p u našoj studiji najverovatnije reflektuju efekte imunosupresivne terapije, iako se ne može u potpunosti isključiti doprinos terapijom indukovanoog kliničkog poboljšanja.

Pokazali smo da nivoi miR-150-5p negativno korelišu sa kliničkim statusom bolesnika sa AChR-pozitivnom MG, pri čemu je uočena jača korelacija sa funkcionalnim statusom (kliničkim MG-ADL i MGC skorovima), u poređenju sa objektivnim znacima mišićne slabosti (klinički QMG skor). Ovaj nalaz nije iznenađujući, uzimajući u obzir opisanu ulogu miR-150-5p u imunopatološkim procesima, uključujući njenu povezanost sa antiinflamatornim IL-10 i proinflamatornim IL-17 citokinima, koja odražava sistemsku imunološku aktivnost bolesti i doprinosi kliničkim manifestacijama koje prevazilaze sam stepen mišićnih slabosti (Ao et al., 2020). Pored toga, miR-150-5p ima ključnu ulogu u regulaciji razvoja i funkcije B i T limfocita sa potencijalom da suprimira imunološki odgovor koji utiče na patogenezu MG (Zhou et al., 2007). Konkretno, miR-150-5p suprimira ekspresiju transkripcionih faktora, uključujući protein MYB, ograničavajući proliferaciju i diferencijaciju B-ćelija, a posledično i sintezu antitela na AChR (Xiao et al., 2007; Zhou et al., 2007). Njeni regulatorni efekti na citokinske signalne mreže dodatno doprinose uspostavljanju antiinflamatornog imunološkog okruženja, što se povezuje sa smanjenim funkcionalnim oštećenjem nervno-mišićne spojnice i redukcijom mišićne slabosti (Sang et al., 2016). Ove imunomodulatorne funkcije pružaju potencijalno mehanističko objašnjenje za uočenu negativnu korelaciju između nivoa miR-150-5p i težine kliničke slike bolesti (Hu et al., 2023).

Posebno značajan nalaz predstavlja činjenica da su bolesnici koji su nakon dvanaest meseci praćenja ostvarili povoljan terapijski odgovor imali više bazalne nivoe miR-150-5p u plazmi pre započinjanja terapije u poređenju sa bolesnicima kod kojih značajno kliničko poboljšanje nije zabeleženo. Ovakav obrazac ukazuje na potencijal miR-150-5p kao prediktivnog biomarkera terapijskog odgovora i može odražavati povećanu osetljivost autoimuno-aktiviranih B-limfocita na imunosupresivnu terapiju u prisustvu viših nivoa ove mikroRNK, što je prethodno opisano u malignim B-ćelijama (Palagani et al., 2014). Imajući u vidu delimično preklapanje regulatornih signalnih puteva između malignih i autoimuno-aktiviranih B-ćelija, ovaj mehanizam može biti relevantan i u kontekstu MG (Ávila & Giralt, 2018). Zaista, pokazano je da miR-150-5p pokreće nizvodne signalne puteve glukokortikoidnih receptora, regulišući ekspresiju više transkriptata čime ostvaruje efekat sličan mehanizmu delovanja glukokortikoida (npr. MYB, IL23A, SKP2, BUB1, SREBP1, FKBP5) (Palagani et al., 2014). Ovo ukazuje na potencijalni mehanizam putem kojeg miR-150-5p može pojačati terapijsku efikasnost glukokortikoida. U svetlu rastućeg interesovanja za mikroRNK kao potencijalnih terapijskih agenasa (Corey, 2025; Diener et al., 2022), mogućnost istovremene primene sintetske miR-150-5p u kombinaciji sa postojećom imunosupresivnom terapijom nameće se kao koncept vredan daljeg istraživanja.

Bitno je istaći da se raniji nalazi o nivoima miR-150-5p u serumu heterogenih kohorti bolesnika sa MG razlikuju od rezultata ovog istraživanja dobijenih u plazmi. Studije preseka u kojima je analizirana miR-150-5p u serumu, pokazale su povišene nivoe ove mikroRNK kod bolesnika sa MG u poređenju sa zdravim kontrolama (Beretta et al., 2022; Cron et al., 2019; Punga et al., 2015; Punga et al., 2014), što je suprotno nalazima u plazmi. Takođe, longitudinalna analiza miR-150-5p u serumu bolesnika, pokazala je snižene nivoe ove mikroRNK u dvanaestom mesecu praćenja i pozitivnu korelaciju sa MGC skorom (Sabre et al., 2018), što je u suprotnosti sa nalazima porasta nivoa miR-150-5p i negativne korelacije sa MGC skorom u plazmi. Ove razlike bi mogle odražavati heterogenost ispitivanih kohorti, kao i razlike u sastavu i koncentraciji mikroRNK u serumu i plazmi usled specifičnih preanalitičkih pristupa (McDonald et al., 2011; Wakabayashi et al., 2024; Wang et al., 2012) kao i samo patološko stanje bolesti (Cron et al., 2019).

U studijama preseka baziranim na ispitivanju seruma analizirani su bolesnici sa AChR-pozitivnom MG sa ranim početkom bolesti, koji nisu primali imunosupresivnu terapiju (Punga et al., 2014), zatim bolesnici sa AChR-pozitivnom MG sa ranim početkom, koji nisu primali kortikosteroidnu terapiju (Cron et al., 2019), kao i bolesnici sa ranim i kasnim početkom heterogenog serološkog statusa od kojih je većina bila sa AChR-pozitivnom MG (Beretta et al., 2022). Longitudinalna studija bazirana na ispitivanju seruma uključila je novodijagnostikovane pretežno AChR-pozitivne MG bolesnike sa kasnim početkom i okularnom i generalizovanom formom bolesti, koji nisu bili na terapiji MG (Sabre et al., 2018). Sa druge strane, naša kohorta obuhvatala je isključivo novodijagnostikovane bolesnike sa generalizovanom AChR-pozitivnom formom bolesti sa ranim i kasnim početkom koji nisu primali terapiju za MG. Iako klinička heterogenost ispitivanih bolesnika može uticati na razlike u dobijenim rezultatima, konzistentni rezultati dobijeni u studijama koje su ispitivale miR-150-5p u serumu sa različitim kriterijumima uključenja, ukazuju da klinička heterogenost nije glavni razlog neslaganjima nalaza dobijenih iz plazme i seruma. Ipak, ne može se u potpunosti isključiti potencijalni

uticaj etničke pripadnosti i populaciono-specifičnih genetičkih osobnosti, naročito imajući u vidu dobro dokumentovane efekte genetičke varijabilnosti na regulatorne mreže mikroRNK (Huang et al., 2011; Ryan et al., 2010). S obzirom na to da se miR-150-5p pretežno eksprimira u leukocitima (Krammer et al., 2022; Rishik et al., 2025), rezidualno prisustvo T i B limfocita u plazmi potencijalno bi moglo doprineti uočenim razlikama u dobijenim rezultatima. Ipak, ova preanalitička varijabla verovatno nije ključni uzrok zabeleženih neslaganja, imajući u vidu da je primenjen standardni protokol izdvajanja plazme bez ćelija (World Health Organization, 2002).

Mogući uzrok suprotnih nivoa miR-150-5p u plazmi i serumu može odražavati patološko stanje specifično za MG. Cron i saradnici (2019) su pokazali snižene nivoe miR-150-5p u perifernim CD4⁺ T-limfocitima kod bolesnika sa MG koji nisu bili na kortikosteroidnoj terapiji, kao i protektivni efekat viših nivoa miR-150-5p na CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocite, posredovan regulacijom ekspresije proapoptotskih gena. Ovo specifično stanje u CD4⁺ T-limfocitima u MG verovatno se odražava u našoj longitudinalnoj studiji sa plazmom kao biološkim uzorkom, imajući u vidu da nivoi miR-150-5p u plazmi prate trend intraćelijske ekspresije mikroRNK u leukocitima (Vasilescu et al., 2009). Cron i saradnici (2019) su postavili hipotezu da su povišeni nivoi miR-150-5p u serumu posledica njenog intenzivnog oslobađanja iz aktiviranih CD4⁺ T-ćelija. Alternativno, noviji podaci o povećanom broju i aktivaciji trombocita kod MG (Huang et al., 2023; Wen et al., 2025) ukazuju na to da povišeni nivoi miR-150-5p u serumu mogu odražavati njenu ekspresiju u trombocitima (Krammer et al., 2022). Poznata je proinflamatorna uloga trombocita u modulaciji imunskog odgovora posredovanog CD4⁺ T-limfocitima (Li, 2013), kao i regulatorna uloga miR-150-5p u njihovoj produkciji i funkcionalnoj aktivaciji (Pordzik et al., 2018), što dodatno podržava ovu interpretaciju. Pored toga, miR-150-5p je identifikovana u mikročesticama koje trombociti oslobađaju tokom svoje aktivacije, a njeni nivoi u plazmi su bili sniženi kako kod zdravih kontrola, tako i kod bolesnika sa dijabetesom tipa II koji su bili na antitrombocitnoj terapiji (Willeit et al., 2013). Prema tome, nivoi miR-150-5p mogu biti povišeni u serumu MG bolesnika usled samog patološkog stanja bolesti i preanalitičkih faktora povezanih sa aktivacijom trombocita tokom koagulacije, što dovodi do oslobađanja intraćelijskog sadržaja trombocita u serum (Dufourd et al., 2019; World Health Organization, 2002). Ovu pretpostavku dodatno podržava činjenica da je broj trombocita naročito povišen kod nelečenih MG bolesnika, koji se nakon dugotrajne imunosupresivne terapije smanjuje na vrednosti uporedive sa kontrolama. Pored toga, pokazano je da bolesnici sa minimalnim kliničkim manifestacijama imaju sličan broj trombocita kao zdrave kontrole (Wen et al., 2025). Činjenica da je miR-150-5p identifikovana kao potencijalni biomarker za MG, sa povišenim nivoima u serumu (Beretta et al., 2022; Cron et al., 2019; Punga et al., 2015; Punga et al., 2014; Sabre et al., 2018) i sniženim nivoima u plazmi, naglašava značaj sistematske evaluacije biomarkera u različitim biološkim uzorcima kako kod MG, tako i kod drugih oboljenja u kojima su krvne ćelije pogođene patološkim stanjem bolesti.

Iako je veličina uzorka ograničena, ova studija predstavlja značajan iskorak u odnosu na prethodna istraživanja ove retke neurološke bolesti. Ispitivana kohorta odlikuje se homogenim serološkim statusom i generalizovanom kliničkom formom, a isključivanjem bolesnika kod kojih su se tokom praćenja pojavili dodatni faktori koji bi mogli uticati na nivoe mikroRNK zadržan je klinički relevantan uzorak. Dugoročno praćenje novodijagnostikovanih, nelečenih bolesnika, uz reprezentativnu kontrolnu

grupu, pružilo je novi uvid u ulogu mikroRNK iz plazme kod MG. Ipak, glavno ograničenje studije predstavlja nemogućnost detaljnije analize heterogenosti AChR-pozitivne MG. Analiza mikroRNK u odnosu na demografske karakteristike (pol i starost), uzrast u trenutku nastanka bolesti (rani i kasnog početak) i kliničku prezentaciju (npr. MGFA klase II-III) unutar ispitivane kohorte mogla bi dovesti do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata usled ograničene veličine podgrupa. Pored toga, faktori poput klase anti-AChR autoantitela, koji nisu bili obuhvaćeni ovom studijom, mogu pružiti novi uvid i predstavljaju izazov za buduća istraživanja. Iako je u kliničkoj praksi neophodno definisanje granične vrednosti nivoa mikroRNK za razlikovanje MCE od ne-MCE, kao i bolesnika sa dobrim odgovorom na terapiju od refraktarnih bolesnika, ograničen broj ne-MCE i refraktarnih slučajeva u našoj kohorti ukazuje na potrebu za validacijom ove granične vrednosti u većim i nezavisnim kohortama.

Ovo istraživanje je ukazalo na potencijal miR-150-5p iz plazme kao biomarkera odgovora na imunosupresivnu terapiju kod novodijagnostikovanih, nelečenih bolesnika sa generalizovanom AChR-pozitivnom MG.

5.4. Budući pravci istraživanja: preporuke i perspektive

Nalazi ove doktorske teze ukazuju da integracija genetičkih determinanti rizika i dinamičkih molekularnih biomarkera predstavlja obećavajući pristup ka dubljem razumevanju etiologije i heterogenosti AChR-pozitivne MG i unapređenju terapijskog pristupa ovim bolesnicima. Buduća istraživanja trebalo bi da budu usmerena na validaciju identifikovanih varijanti u genima *CHRNA1* i *CHRNA1* u većim, nezavisnim i etnički raznovrsnim kohortama, kako bi se dobio dodatni uvid u njihov doprinos individualnom riziku za razvoj bolesti, naročito u kontekstu MG kasnog početka. Paralelno, sprovođenje funkcionalnih studija u relevantnim ćelijskim i tkivnim modelima, posebno u skeletnim mišićima i timusu, moglo bi razjasniti mehanizme putem kojih regulatorne varijante utiču na ekspresiju AChR, funkcionalni prag nervno-mišićne spojnice i procese centralne imunološke tolerancije.

U oblasti biomarkera, neophodna su dalja longitudinalna istraživanja cirkulišućih mikroRNK zasnovana na uparenim uzorcima plazme i seruma iz iste kohorte bolesnika, uz standardizovane preanalitičke i analitičke procedure. Iako oprečni rezultati za nivo miR-150-5p u plazmi i serumu ne umanjuju njen potencijal kao biomarkera, predložene buduće analize bi pomogle u razrešavanju biološke i metodološke osnove uočenih razlika, kako bi se omogućila njihova pouzdana klinička primena. Poseban značaj ima dalja validacija miR-150-5p kao prediktivnog biomarkera terapijskog odgovora u većim multicentričnim studijama, kao i ispitivanje njenog potencijala u stratifikaciji bolesnika i izboru optimalne terapijske strategije. U celini, nalazi ove teze podržavaju koncept da kombinovanje statičnih genetičkih faktora predispozicije i dinamičnih molekularnih pokazatelja terapijom modulisanih promena može predstavljati osnovu za razvoj racionalnijih i personalizovanih terapijskih pristupa kod AChR-pozitivne MG.

6. Zaključci

Rezultati genetičkog dela ove doktorske teze ukazuju na to da varijante u lokusima koji sadrže gene za $\alpha 1$ i $\beta 1$ subjedinicu AChR predstavljaju značajne genetičke determinante rizika za razvoj stečene AChR-pozitivne MG, sa diferencijalnim doprinosom u odnosu na starost na početku prvih simptoma. Preciznije, iz ovog dela teze izvedeni su sledeći zaključci:

- Primenom statističkog i funkcionalnog bajesovskog finog mapiranja lokusa *CHRNA1* identifikovana je varijanta rs35274388 u okviru verodostojnih skupova svih primenjenih modela i selektovana je kao verovatno uzročna za AChR-pozitivnu MG. Varijanta rs35274388 i varijanta rs4151121 u lokusu *CHRN1*, prethodno identifikovana kao verovatno uzročna primenom mendelovske randomizacije, odabrane su za eksperimentalnu validaciju u studiji genetičke asocijacije.
- U studiji genetičke asocijacije tipa slučajeva i kontrola sa statističkom snagom od 92 % uočena je povezanost varijante rs4151121 u lokusu *CHRN1* sa nastankom stečene AChR-pozitivne MG, pri čemu alel G povećava rizik za razvoj MG sa kasnim početkom. Osobe sa genotipom GG ili AG imaju približno 1,5 puta veći rizik za razvoj MG sa kasnim početkom.
- Studija genetičke asocijacije tipa slučajeva i kontrola ukazala je na postojanje tendencije povezanosti alela A varijante rs35274388 u lokusu *CHRNA1* sa nastankom stečene AChR-pozitivne MG, pri čemu je povezanost zavisna od stratifikacije prema starosti bolesnika na početku prvih simptoma.
- Povezanost gena *CHRNA1* i *CHRN1* sa stečenom MG ukazuje na postojanje kontinuuma genetičke osnove između stečene MG i naslednih, kongenitalnih mijasteničnih sindroma.

Rezultati ispitivanja molekularnih biomarkera u studiji longitudinalnog dizajna ukazuju na to da odabrane cirkulišuće mikroRNK u plazmi, pre svega miR-150-5p, predstavljaju potencijalne biomarkere kliničke težine bolesti i odgovora na imunosupresivnu terapiju kod bolesnika sa stečenom AChR-pozitivnom MG. Iz ovog dela teze izvedeni su sledeći zaključci:

- Utvrđena je statistički značajna razlika nivoa miR-150-5p, miR-27a-3p i miR-21-5p pre i nakon primene imunosupresivne terapije, dok razlika u nivou miR-409-3p nije bila statistički značajna. Razlika u nivou miR-181d-5p, miR-340-3p, miR-323b-3p i miR-485-3p tokom praćenja nije bila analizirana usled uočene niske zastupljenosti ovih mikroRNK u ispitivanom uzorku.
- Utvrđena je statistički značajna korelacija nivoa miR-150-5p i miR-27a-3p u plazmi sa skorovima MG-specifičnih kliničkih skala, pri čemu je miR-150-5p pokazala konzistentnu korelaciju sa kliničkom težinom bolesti, uključujući jaku korelaciju sa skorovima MG-ADL i MGC kliničkih skala i umerenu korelaciju sa skorom QMG kliničke skale.

- Utvrđena je statistički značajna razlika u nivou miR-150-5p između kontrolnih ispitanika i bolesnika pre primene terapije i uočeno je da nivo miR-150-5p tokom primene imunosupresivne terapije u trajanju od 6 i 12 meseci dostiže nivo koji se statistički značajno ne razlikuje u odnosu na kontrolne ispitanike.
- Nivo miR-150-5p pre uvođenja imunosupresivne terapije pokazao je značajnu prediktivnu vrednost za odgovor na terapiju, uključujući postizanje minimalne kliničke ekspresije i pozitivnog odgovora na terapiju prema MG-ADL kliničkoj skali, uz odličnu diskriminatornu sposobnost (AUC > 0,8).

Integracijom rezultata genetičkih i molekularnih analiza pokazano je da varijante u lokusima *CHRNA1* i *CHRNA1* i cirkulišuće mikroRNK u plazmi, naročito miR-150-5p, predstavljaju komplementarne determinante nastanka bolesti i terapijskog odgovora kod stečene AChR-pozitivne MG. U tom smislu, opisani rezultati doprinose boljem razumevanju patogeneze bolesti i postavljaju temelje za dalji razvoj preciznijih biomarkera u kliničkoj praksi.

7. Literatura

- Adobe Inc. (2023). *Adobe Illustrator* (Version 27.0) [Computer software]. <https://www.adobe.com/products/illustrator.html>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Andersen, G. B., & Tost, J. (2020). Circulating miRNAs as Biomarker in Cancer. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 215, 277–298. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26439-0_15
- Ao, W., Tian, C., He, X., Hu, Y., Wang, W., & Liu, Y. (2020). Upregulation of miR150-5p in generalized myasthenia gravis patients is associated with decreased serum levels of IL-17 and increased serum levels of IL-10. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 164(1), 57–62. <https://doi.org/10.5507/bp.2019.009>
- Ávila, A. M., & Giralt, S. (2018). Autoimmune Disorders and Multiple Myeloma- Two Illustrative Case Reports and a Literature Review. *Revista Colombiana de Cancerología*, 22(2), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2017.07.001>
- Axelsen, K. H., Kjær Andersen, R., Andersen, L. K., Vissing, J., & Witting, N. (2024). Ocular versus generalized myasthenia gravis: A continuum associated with acetylcholine receptor antibody titers. *Neuromuscular Disorders*, 43, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2024.07.002>
- Bakeman, R. (2005). Recommended effect size statistics for repeated measures designs. *Behavior Research Methods*, 37(3), 379–384. <https://doi.org/10.3758/BF03192707>
- Benatar, M., Hammad, M., & Doss-Riney, H. (2006). Concentric-needle single-fiber electromyography for the diagnosis of myasthenia gravis. *Muscle & Nerve*, 34(2), 163–168. <https://doi.org/10.1002/mus.20568>
- Benatar, M., Sanders, D. B., Burns, T. M., Cutter, G. R., Guptill, J. T., Baggi, F., Kaminski, H. J., Mantegazza, R., Meriggioli, M. N., Quan, J., Wolfe, G. I., & Task Force on MG Study Design of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. (2012). Recommendations for myasthenia gravis clinical trials. *Muscle & Nerve*, 45(6), 909–917. <https://doi.org/10.1002/mus.23330>
- Benner, C., Spencer, C. C. A., Havulinna, A. S., Salomaa, V., Ripatti, S., & Pirinen, M. (2016). FINEMAP: Efficient variable selection using summary data from genome-wide association studies. *Bioinformatics*, 32(10), 1493–1501. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw018>
- Beretta, F., Huang, Y.-F., & Punga, A. R. (2022). Towards Personalized Medicine in Myasthenia Gravis: Role of Circulating microRNAs miR-30e-5p, miR-150-5p and miR-21-5p. *Cells*, 11(4), 740. <https://doi.org/10.3390/cells11040740>

- Borenstein, M. (2009). Effect sizes for continuous data. In *The handbook of research synthesis and meta-analysis* (pp. 221–235).
- Boyle, A. P., Hong, E. L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M. A., Kasowski, M., Karczewski, K. J., Park, J., Hitz, B. C., Weng, S., Cherry, J. M., & Snyder, M. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, 22(9), 1790–1797. <https://doi.org/10.1101/gr.137323.112>
- Braun, A., Shekhar, S., Levey, D. F., Straub, P., Kraft, J., Panagiotaropoulou, G. M., Heilbron, K., Awasthi, S., Meleka Hanna, R., Hoffmann, S., Stein, M., Lehnerer, S., Mergenthaler, P., Elnahas, A. G., Topaloudi, A., Koromina, M., Palviainen, T., Asbjornsdottir, B., Stefansson, H., ... Ripke, S. (2024). Genome-wide meta-analysis of myasthenia gravis uncovers new loci and provides insights into polygenic prediction. *Nature Communications*, 15(1), 9839. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53595-6>
- Bril, V., Drużdż, A., Grosskreutz, J., Habib, A. A., Mantegazza, R., Sacconi, S., Utsugisawa, K., Vissing, J., Vu, T., Boehnlein, M., Bozorg, A., Gayfieva, M., Greve, B., Woltering, F., Kaminski, H. J., & MG0003 study team. (2023). Safety and efficacy of rozanolixizumab in patients with generalised myasthenia gravis (MycarinG): A randomised, double-blind, placebo-controlled, adaptive phase 3 study. *The Lancet. Neurology*, 22(5), 383–394. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00077-7)
- Brunton, L. L., Knollmann, B. C., & Hilal-Dandan, R. (Eds.). (2018). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (Thirteenth edition). McGraw Hill Medical.
- Bubuioc, A. M., Kudebayeva, A., Turuspekova, S., Lisnic, V., Leone, M. A. The epidemiology of myasthenia gravis. *Journal of Medicine and Life*, 14(1), 7–16. <https://doi.org/10.25122/jml-2020-0145>
- Buchman, A. L. (2001). Side Effects of Corticosteroid Therapy: *Journal of Clinical Gastroenterology*, 33(4), 289–294. <https://doi.org/10.1097/00004836-200110000-00006>
- Burns, T. M., Conaway, M., Sanders, D. B., & MG Composite and MG-QOL15 Study Group. (2010). The MG Composite: A valid and reliable outcome measure for myasthenia gravis. *Neurology*, 74(18), 1434–1440. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181dc1b1e>
- Cavalcante, P., Mizrachi, T., Barzago, C., Scandiffio, L., Bortone, F., Bonanno, S., Frangiamore, R., Mantegazza, R., Bernasconi, P., Brenner, T., Vaknin-Dembinsky, A., & Antozzi, C. (2019). MicroRNA signature associated with treatment response in myasthenia gravis: A further step towards precision medicine. *Pharmacological Research*, 148, 104388. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104388>
- Chia, R., Saez-Atienzar, S., Murphy, N., Chiò, A., Blauwendraat, C., International Myasthenia Gravis Genomics Consortium, Roda, R. H., Tienari, P. J., Kaminski, H. J., Ricciardi, R., Guida, M., De Rosa, A., Petrucci, L., Evoli, A., Provenzano, C., Drachman, D. B., & Traynor, B. J. (2022). Identification of genetic risk loci and prioritization of genes and pathways for myasthenia gravis: A genome-wide association study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(5), e2108672119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2108672119>
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed). L. Erlbaum Associates.

- Corey, D. R. (2025). It is Time to Revisit miRNA Therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics*, 35(1), 1–5. <https://doi.org/10.1089/nat.2024.0069>
- Cron, M. A., Maillard, S., Truffault, F., Gualeni, A. V., Gloghini, A., Fadel, E., Guihaire, J., Behin, A., Berrih-Aknin, S., & Le Panse, R. (2019). Causes and Consequences of miR-150-5p Dysregulation in Myasthenia Gravis. *Frontiers in Immunology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00539>
- D'Abundo, L., Bassi, C., Callegari, E., Moshiri, F., Guerriero, P., Michilli, A., Mora, F., Gardini, A. C., Sangiovanni, A., Piscaglia, F., Sabbioni, S., Gramantieri, L., & Negrini, M. (2024). Circulating microRNAs as biomarkers for stratifying different phases of liver cancer progression and response to therapy. *Scientific Reports*, 14(1), 18551. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69548-4>
- D'Alessandra, Y., Devanna, P., Limana, F., Straino, S., Di Carlo, A., Brambilla, P. G., Rubino, M., Carena, M. C., Spazzafumo, L., De Simone, M., Micheli, B., Biglioli, P., Achilli, F., Martelli, F., Maggiolini, S., Marenzi, G., Pompilio, G., & Capogrossi, M. C. (2010). Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal*, 31(22), 2765–2773. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq167>
- Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: From cells to clinic. *Trends in Genetics: TIG*, 38(6), 613–626. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.02.006>
- Diogenes, L., Dellavance, A., Baldo, D. C., Gozzi-Silva, S. C., Gomes, K., Prado, M. S., Andrade, L. E. C., & Keppeke, G. D. (2024). Detection of Autoantibodies Against the Acetylcholine Receptor, Evaluation of Commercially Available Methodologies: Fixed Cell-Based Assay, Radioimmunoprecipitation Assay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay1. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 11(3), 613–623. <https://doi.org/10.3233/JND-230210>
- Djordjevic, I., Garai, N., Peric, S., Karanovic, J., Pesovic, J., Brkusanin, M., Lavrnica, D., Apostolski, S., Savic-Pavicevic, D., & Basta, I. (2024). Association between Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) Locus and Early-Onset Anti-acetylcholine Receptor-Positive Myasthenia Gravis in Serbian Patients. *Molecular Neurobiology*, 61(11), 9539–9547. <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04183-8>
- Dobrowolny, G., Martone, J., Lepore, E., Casola, I., Petrucci, A., Inghilleri, M., Morlando, M., Colantoni, A., Scicchitano, B. M., Calvo, A., Bisogni, G., Chiò, A., Sabatelli, M., Bozzoni, I., & Musarò, A. (2021). A longitudinal study defined circulating microRNAs as reliable biomarkers for disease prognosis and progression in ALS human patients. *Cell Death Discovery*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00397-6>
- Dong, S., Zhao, N., Spragins, E., Kagda, M. S., Li, M., Assis, P., Jolanki, O., Luo, Y., Cherry, J. M., Boyle, A. P., & Hitz, B. C. (2023). Annotating and prioritizing human non-coding variants with RegulomeDB v.2. *Nature Genetics*, 55(5), 724–726. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01365-3>
- Drachman, D. B., Adams, R. N., Josifek, L. F., & Self, S. G. (1982). Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia

- gravis. *The New England Journal of Medicine*, 307(13), 769–775. <https://doi.org/10.1056/NEJM198209233071301>
- Drachman, D. B., Angus, C. W., Adams, R. N., Michelson, J. D., & Hoffman, G. J. (1978). Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *The New England Journal of Medicine*, 298(20), 1116–1122. <https://doi.org/10.1056/NEJM197805182982004>
- Dresser, L., Wlodarski, R., Rezanian, K., & Soliven, B. (2021). Myasthenia Gravis: Epidemiology, Pathophysiology and Clinical Manifestations. *Journal of Clinical Medicine*, 10(11), 2235. <https://doi.org/10.3390/jcm10112235>
- Dufourd, T., Robil, N., Mallet, D., Carcenac, C., Boulet, S., Brishoual, S., Rabois, E., Houeto, J.-L., de la Grange, P., & Carnicella, S. (2019). Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers. *Biology Methods & Protocols*, 4(1), bpz006. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpz006>
- Farmakidis, C., Pasnoor, M., Dimachkie, M. M., & Barohn, R. J. (2018). Treatment of Myasthenia Gravis. *Neurologic Clinics*, 36(2), 311–337. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.01.011>
- Finsterer, J. (2019). Congenital myasthenic syndromes. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1025-5>
- Freed, A. S., Schwarz, A. C., Brei, B. K., Clowes Candadai, S. V., Thies, J., Mah, J. K., Chabra, S., Wang, L., Innes, A. M., & Bennett, J. T. (2021). CHRNB1-associated congenital myasthenia syndrome: Expanding the clinical spectrum. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 185(3), 827–835. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62011>
- Freund, M. K., Burch, K. S., Shi, H., Mancuso, N., Kichaev, G., Garske, K. M., Pan, D. Z., Miao, Z., Mohlke, K. L., Laakso, M., Pajukanta, P., Pasaniuc, B., & Arboleda, V. A. (2018). Phenotype-Specific Enrichment of Mendelian Disorder Genes near GWAS Regions across 62 Complex Traits. *American Journal of Human Genetics*, 103(4), 535–552. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.08.017>
- Gajdos, P., Chevret, S., Clair, B., Tranchant, C., & Chastang, C. (1998). Plasma Exchange and Intravenous Immunoglobulin in Autoimmune Myasthenia Gravis^a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 841(1), 720–726. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11008.x>
- Gerber, Z., Fisun, M., Aschard, H., & Djebali, S. (2024). PainterPipe: A pipeline for genetic variant fine-mapping using functional annotations. *Bioinformatics Advances*, 4(1), vbad188. <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbad188>
- Gilhus, N. E. (2016). Myasthenia Gravis. *The New England Journal of Medicine*, 375(26), 2570–2581. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602678>
- Gilhus, N. E., Tzartos, S., Evoli, A., Palace, J., Burns, T. M., & Verschuuren, J. J. G. M. (2019). Myasthenia gravis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 30. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0079-y>
- Gregersen, P. K., Kosoy, R., Lee, A. T., Lamb, J., Sussman, J., McKee, D., Simpfendorfer, K. R., Pirskanen-Matell, R., Piehl, F., Pan-Hammarstrom, Q., Verschuuren, J. J. G. M.,

- Titulaer, M. J., Niks, E. H., Marx, A., Ströbel, P., Tackenberg, B., Pütz, M., Maniaol, A., Elsaï, A., ... Seldin, M. F. (2012). Risk for myasthenia gravis maps to a (151) Pro→Ala change in TNIP1 and to human leukocyte antigen-B*08. *Annals of Neurology*, 72(6), 927–935. <https://doi.org/10.1002/ana.23691>
- Harrison, P. W., Amode, M. R., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barba, M., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Campbell, L. I., Martinez, M. C., Charkhchi, M., Chougule, K., ... Yates, A. D. (2024). Ensembl 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D891–D899. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1049>
- Hays, W. L. Statistics (3rd ed.). New York: Holt, Rinehart and Winston. Hopkins, K., & Glass, G. *Basic statistics for the behavioral sciences*. 1981.
- Hehir, M. K., & Silvestri, N. J. (2018). Generalized Myasthenia Gravis. *Neurologic Clinics*, 36(2), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.01.002>
- Howard, J. F., Karam, C., Yountz, M., O'Brien, F. L., Mozaffar, T., & REGAIN Study Group. (2021). Long-term efficacy of eculizumab in refractory generalized myasthenia gravis: Responder analyses. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 8(7), 1398–1407. <https://doi.org/10.1002/acn3.51376>
- Howard, J. F., Utsugisawa, K., Benatar, M., Murai, H., Barohn, R. J., Illa, I., Jacob, S., Vissing, J., Burns, T. M., Kissel, J. T., Muppidi, S., Nowak, R. J., O'Brien, F., Wang, J.-J., Mantegazza, R., & REGAIN Study Group. (2017). Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): A phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *The Lancet. Neurology*, 16(12), 976–986. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30369-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30369-1)
- Hu, Y.-Z., Li, Q., Wang, P.-F., Li, X.-P., & Hu, Z.-L. (2023). Multiple functions and regulatory network of miR-150 in B lymphocyte-related diseases. *Frontiers in Oncology*, 13, 1140813. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1140813>
- Huang, R. S., Gamazon, E. R., Ziliak, D., Wen, Y., Im, H. K., Zhang, W., Wing, C., Duan, S., Bleibel, W. K., Cox, N. J., & Dolan, M. E. (2011). Population differences in microRNA expression and biological implications. *RNA Biology*, 8(4), 692–701. <https://doi.org/10.4161/rna.8.4.16029>
- Huang, X., Xu, M., Wang, Y., Zhang, Z., Li, F., Chen, X., & Zhang, Y. (2023). The systemic inflammation markers as possible indices for predicting respiratory failure and outcome in patients with myasthenia gravis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 10(1), 98–110. <https://doi.org/10.1002/acn3.51706>
- Huang, Y.-F., Bhandage, A. K., Adeström, L. D.-P., & Punga, A. R. (2024). Short-term changes in serum miRNA levels and patient-reported clinical outcomes in myasthenia gravis. *Muscle & Nerve*, 70(2), 284–289. <https://doi.org/10.1002/mus.28177>
- Imai, T., Suzuki, S., Tsuda, E., Nagane, Y., Murai, H., Masuda, M., Konno, S., Suzuki, Y., Nakane, S., Fujihara, K., Suzuki, N., & Utsugisawa, K. (2015). Oral corticosteroid therapy and present disease status in myasthenia gravis. *Muscle & Nerve*, 51(5), 692–696. <https://doi.org/10.1002/mus.24438>

- Jaretzki, A., Barohn, R. J., Ernstoff, R. M., Kaminski, H. J., Keesey, J. C., Penn, A. S., & Sanders, D. B. (2000). Myasthenia gravis: Recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *The Annals of Thoracic Surgery*, *70*(1), 327–334. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(00\)01595-2](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(00)01595-2)
- Kaminski, H. J., & Denk, J. (2022). Corticosteroid Treatment-Resistance in Myasthenia Gravis. *Frontiers in Neurology*, *13*, 886625. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.886625>
- Katzberg, H. D., Barnett, C., Merkies, I. S. J., & Bril, V. (2014). Minimal clinically important difference in myasthenia gravis: Outcomes from a randomized trial. *Muscle & Nerve*, *49*(5), 661–665. <https://doi.org/10.1002/mus.23988>
- Keesey, J. C. (2004). Clinical evaluation and management of myasthenia gravis. *Muscle & Nerve*, *29*(4), 484–505. <https://doi.org/10.1002/mus.20030>
- Kichaev, G., Yang, W.-Y., Lindstrom, S., Hormozdiari, F., Eskin, E., Price, A. L., Kraft, P., & Pasaniuc, B. (2014). Integrating functional data to prioritize causal variants in statistical fine-mapping studies. *PLoS Genetics*, *10*(10), e1004722. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004722>
- Kojima, Y., Uzawa, A., Ozawa, Y., Yasuda, M., Onishi, Y., Akamine, H., Kawaguchi, N., Himuro, K., Noto, Y.-I., Mizuno, T., & Kuwabara, S. (2021). Rate of change in acetylcholine receptor antibody levels predicts myasthenia gravis outcome. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *92*(9), 963–968. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-325511>
- Kosaka, N., Iguchi, H., & Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science*, *101*(10), 2087–2092. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x>
- Krammer, T. L., Zeibig, S., Schrottmaier, W. C., Pirabe, A., Goebel, S., Diendorfer, A. B., Holthoff, H.-P., Assinger, A., & Hackl, M. (2022). Comprehensive Characterization of Platelet-Enriched MicroRNAs as Biomarkers of Platelet Activation. *Cells*, *11*(8), 1254. <https://doi.org/10.3390/cells11081254>
- Lavrnic, D., Basta, I., Rakocevic-Stojanovic, V., Stevic, Z., Peric, S., Nikolic, A., Marjanovic, I., & Pekmezovic, T. (2013). Epidemiological Study of Adult-Onset Myasthenia Gravis in the Area of Belgrade (Serbia) in the Period 1979–2008. *Neuroepidemiology*, *40*(3), 190–194. <https://doi.org/10.1159/000342777>
- Lazaridis, K., & Tzartos, S. J. (2020). Autoantibody Specificities in Myasthenia Gravis; Implications for Improved Diagnostics and Therapeutics. *Frontiers in Immunology*, *11*, 212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00212>
- Lennon, V. A., Seybold, M. E., Lindstrom, J. M., Cochrane, C., & Ulevitch, R. (1978). Role of complement in the pathogenesis of experimental autoimmune myasthenia gravis. *The Journal of Experimental Medicine*, *147*(4), 973–983. <https://doi.org/10.1084/jem.147.4.973>
- Leonard, S., Karabegović, I., Ikram, M. A., Ahmad, S., & Ghanbari, M. (2024). Plasma circulating microRNAs associated with blood-based immune markers: A

- population-based study. *Clinical and Experimental Immunology*, 215(3), 251–260. <https://doi.org/10.1093/cei/uxad126>
- Li, J., Wang, F., Li, Z., Feng, J., Men, Y., Han, J., Xia, J., Zhang, C., Han, Y., Chen, T., Zhao, Y., Zhou, S., Da, Y., Chai, G., & Hao, J. (2024). Integrative multi-omics analysis identifies genetically supported druggable targets and immune cell specificity for myasthenia gravis. *Journal of Translational Medicine*, 22(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-04994-2>
- Li, N. (2013). CD4+ T cells in atherosclerosis: Regulation by platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, 109(6), 980–990. <https://doi.org/10.1160/TH12-11-0819>
- Li, Z., Zhang, C., Chang, T., Zhang, X., Yang, H., Gao, F., Feng, J., Liu, H., Chen, S., Wang, L., Yang, C., Li, H., Pan, Y., Palace, J., Shi, F.-D., & SCREAM Study Investigators. (2023). A multicentre, prospective, double-blind study comparing the accuracy of autoantibody diagnostic assays in myasthenia gravis: The SCREAM study. *The Lancet Regional Health. Western Pacific*, 38, 100846. <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2023.100846>
- Lim, S. Y., Boyd, S. C., Diefenbach, R. J., & Rizos, H. (2025). Circulating MicroRNAs: Functional biomarkers for melanoma prognosis and treatment. *Molecular Cancer*, 24(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02298-7>
- Ma, C., Liu, D., Wang, B., Yang, Y., & Zhu, R. (2024). Advancements and prospects of novel biologicals for myasthenia gravis: Toward personalized treatment based on autoantibody specificities. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1370411. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1370411>
- Mandrekar, J. N. (2010). Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 5(9), 1315–1316. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>
- Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Bignell, A., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Charkhchi, M., Cockburn, A., Da Rin Fiorretto, L., ... Flicek, P. (2023). Ensembl 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D933–D941. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac958>
- Marx, A., Pfister, F., Schalke, B., Saruhan-Direskeneli, G., Melms, A., & Ströbel, P. (2013). The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmunity Reviews*, 12(9), 875–884. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.03.007>
- Matsui, N., Ohigashi, I., & Marx, A. (2025). Thymus research in relation to myasthenia gravis: A new perspective on cell subpopulations and future directions. *Frontiers in Immunology*, 16, 1649171. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1649171>
- McDonald, J. S., Milosevic, D., Reddi, H. V., Grebe, S. K., & Algeciras-Schimnich, A. (2011). Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges. *Clinical Chemistry*, 57(6), 833–840. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.157198>

- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., Flicek, P., & Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, *17*(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
- Meisel, A., Baggi, F., Behin, A., Evoli, A., Kostera-Pruszczyk, A., Mantegazza, R., Morales, R. J., Punga, A. R., Sacconi, S., Schroeter, M., Verschuuren, J., Crathorne, L., Holmes, K., & Leite, M.-I. (2023). Role of autoantibody levels as biomarkers in the management of patients with myasthenia gravis: A systematic review and expert appraisal. *European Journal of Neurology*, *30*(1), 266–282. <https://doi.org/10.1111/ene.15565>
- Meisel, A., Saccà, F., Spillane, J., Vissing, J., & MG Collegium Sub-committee. (2024). Expert consensus recommendations for improving and standardising the assessment of patients with generalised myasthenia gravis. *European Journal of Neurology*, *31*(7), e16280. <https://doi.org/10.1111/ene.16280>
- Meriggioli, M. N., & Sanders, D. B. (2009). Autoimmune myasthenia gravis: Emerging clinical and biological heterogeneity. *The Lancet. Neurology*, *8*(5), 475–490. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70063-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70063-8)
- Meriggioli, M. N., & Sanders, D. B. (2012). Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: Beyond diagnosis? *Expert Review of Clinical Immunology*, *8*(5), 427–438. <https://doi.org/10.1586/eci.12.34>
- Molin, C. J., Sabre, L., Weis, C.-A., Punga, T., & Punga, A. R. (2018). Thymectomy lowers the myasthenia gravis biomarker miR-150-5p. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *5*(3), e450. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000450>
- Montecucco, C., Baldi, F., Fortina, A., Tomassini, G., Caporali, R., Cherie-Ligniere, E. L., & Fratino, P. (1988). Serum osteocalcin (bone Gla-protein) following corticosteroid therapy in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. Comparison of the effect of prednisone and deflazacort. *Clinical Rheumatology*, *7*(3), 366–371. <https://doi.org/10.1007/BF02239194>
- Moore, C., & Jacobson, S. (2019). *genpwr: Power Calculations Under Genetic Model Misspecification* (p. 1.0.4) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.genpwr>
- Narayanaswami, P., Sanders, D. B., Wolfe, G., Benatar, M., Cea, G., Evoli, A., Gilhus, N. E., Illa, I., Kuntz, N. L., Massey, J., Melms, A., Murai, H., Nicolle, M., Palace, J., Richman, D., & Verschuuren, J. (2021). International Consensus Guidance for Management of Myasthenia Gravis: 2020 Update. *Neurology*, *96*(3), 114–122. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001124>
- Palagani, A., Op de Beeck, K., Naulaerts, S., Diddens, J., Sekhar Chirumamilla, C., Van Camp, G., Laukens, K., Heyninck, K., Gerlo, S., Mestdagh, P., Vandesompele, J., & Berghe, W. V. (2014). Ectopic microRNA-150-5p transcription sensitizes glucocorticoid therapy response in MM1S multiple myeloma cells but fails to overcome hormone therapy resistance in MM1R cells. *PLoS One*, *9*(12), e113842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113842>
- Pavlekovics, M., Engh, M. A., Lugosi, K., Szabo, L., Hegyi, P., Terebessy, T., Csukly, G., Molnar, Z., Illes, Z., & Lovas, G. (2023). Plasma Exchange versus Intravenous Immunoglobulin in Worsening Myasthenia Gravis: A Systematic Review and Meta-

- Analysis with Special Attention to Faster Relapse Control. *Biomedicines*, 11(12), 3180. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123180>
- Pepe, M. S., Etzioni, R., Feng, Z., Potter, J. D., Thompson, M. L., Thornquist, M., Winget, M., & Yasui, Y. (2001). Phases of Biomarker Development for Early Detection of Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 93(14), 1054–1061. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.14.1054>
- Pfaff, D. W., Volkow, N. D., & Rubenstein, J. L. (Eds.). (2022). *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-88832-9>
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Plebani, M., Banfi, G., Bernardini, S., Bondanini, F., Conti, L., Dorizzi, R., Ferrara, F. E., Mancini, R., & Trenti, T. (2020). Serum or plasma? An old question looking for new answers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(2), 178–187. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0719>
- Pordzik, J., Piszcz, K., De Rosa, S., Jones, A. D., Eyileten, C., Indolfi, C., Malek, L., & Postula, M. (2018). The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 74. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00074>
- Pritchard, C. C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J. D., Dougherty, K. J., Miyaji, M. M., Tait, J. F., & Tewari, M. (2012). Blood cell origin of circulating microRNAs: A cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prevention Research*, 5(3), 492–497. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370>
- Punga, A. R., Andersson, M., Alimohammadi, M., & Punga, T. (2015). Disease specific signature of circulating miR-150-5p and miR-21-5p in myasthenia gravis patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 356(1–2), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.06.019>
- Punga, A. R., & Punga, T. (2018). Circulating microRNAs as potential biomarkers in myasthenia gravis patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1412(1), 33–40. <https://doi.org/10.1111/nyas.13510>
- Punga, T., Le Panse, R., Andersson, M., Truffault, F., Berrih-Aknin, S., & Punga, A. R. (2014). Circulating miRNAs in myasthenia gravis: miR-150-5p as a new potential biomarker. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(1), 49–58. <https://doi.org/10.1002/acn3.24>
- Pustejovsky, J. E. (2014). Converting from d to r to z when the design uses extreme groups, dichotomization, or experimental control. *Psychological Methods*, 19(1), 92–112. <https://doi.org/10.1037/a0033788>
- R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing* [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>

- R Core Team. (2025). *R: A language and environment for statistical computing* [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Ramanujam, R., Pirskanen, R., Ramanujam, S., & Hammarström, L. (2011). Utilizing Twins Concordance Rates to Infer the Predisposition to Myasthenia Gravis. *Twin Research and Human Genetics, 14*(2), 129–136. <https://doi.org/10.1375/twin.14.2.129>
- Renton, A. E., Pliner, H. A., Provenzano, C., Evoli, A., Ricciardi, R., Nalls, M. A., Marangi, G., Abramzon, Y., Arepalli, S., Chong, S., Hernandez, D. G., Johnson, J. O., Bartoccioni, E., Scuderi, F., Maestri, M., Gibbs, J. R., Errichiello, E., Chiò, A., Restagno, G., ... Traynor, B. J. (2015). A genome-wide association study of myasthenia gravis. *JAMA Neurology, 72*(4), 396–404. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.4103>
- Rieu, I., & Powers, S. J. (2009). Real-time quantitative RT-PCR: Design, calculations, and statistics. *The Plant Cell, 21*(4), 1031–1033. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066001>
- Rishik, S., Hirsch, P., Grandke, F., Fehlmann, T., & Keller, A. (2025). miRNATissueAtlas 2025: An update to the uniformly processed and annotated human and mouse non-coding RNA tissue atlas. *Nucleic Acids Research, 53*(D1), D129–D137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1036>
- Rutledge, S., Kenny, O., O’Riordan, S., McGuigan, C., & Tubridy, N. (2016). Myasthenia gravis: A population-based epidemiological study. *Irish Medical Journal, 109*(2), 355.
- Ryan, B. M., Robles, A. I., & Harris, C. C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research. *Nature Reviews. Cancer, 10*(6), 389–402. <https://doi.org/10.1038/nrc2867>
- Sabre, L., Maddison, P., Sadalage, G., Ambrose, P. A., & Punga, A. R. (2018). Circulating microRNA miR-21-5p, miR-150-5p and miR-30e-5p correlate with clinical status in late onset myasthenia gravis. *Journal of Neuroimmunology, 321*, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.05.003>
- Sabre, L., Maddison, P., Wong, S. H., Sadalage, G., Ambrose, P. A., Plant, G. T., & Punga, A. R. (2019). miR-30e-5p as predictor of generalization in ocular myasthenia gravis. *Annals of Clinical and Translational Neurology, 6*(2), 243–251. <https://doi.org/10.1002/acn3.692>
- Sanders, D. B., & Evoli, A. (2010). Immunosuppressive therapies in myasthenia gravis. *Autoimmunity, 43*(5–6), 428–435. <https://doi.org/10.3109/08916930903518107>
- Sanders, D. B., Wolfe, G. I., Benatar, M., Evoli, A., Gilhus, N. E., Illa, I., Kuntz, N., Massey, J. M., Melms, A., Murai, H., Nicolle, M., Palace, J., Richman, D. P., Verschuuren, J., & Narayanaswami, P. (2016). International consensus guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary. *Neurology, 87*(4), 419–425. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002790>
- Sanderson, E., Glymour, M. M., Holmes, M. V., Kang, H., Morrison, J., Munafò, M. R., Palmer, T., Schooling, C. M., Wallace, C., Zhao, Q., & Smith, G. D. (2022). Mendelian randomization. *Nature Reviews. Methods Primers, 2*, 6. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00092-5>
- Sang, W., Wang, Y., Zhang, C., Zhang, D., Sun, C., Niu, M., Zhang, Z., Wei, X., Pan, B., Chen, W., Yan, D., Zeng, L., Loughran, T. P., & Xu, K. (2016). MiR-150 impairs

- inflammatory cytokine production by targeting ARRB-2 after blocking CD28/B7 costimulatory pathway. *Immunology Letters*, 172, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.11.001>
- Sayed, A. S. M., Xia, K., Salma, U., Yang, T., & Peng, J. (2014). Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases. *Heart, Lung & Circulation*, 23(6), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.01.001>
- Schaid, D. J., Chen, W., & Larson, N. B. (2018). From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nature Reviews. Genetics*, 19(8), 491–504. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0016-z>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Seldin, M. F., Alkhairy, O. K., Lee, A. T., Lamb, J. A., Sussman, J., Pirskanen-Matell, R., Piehl, F., Verschuuren, J. J. G. M., Kostera-Pruszczyk, A., Szczudlik, P., McKee, D., Maniaol, A. H., Harbo, H. F., Lie, B. A., Melms, A., Garchon, H.-J., Willcox, N., Gregersen, P. K., & Hammarstrom, L. (2016). Genome-Wide Association Study of Late-Onset Myasthenia Gravis: Confirmation of TNFRSF11A and Identification of ZBTB10 and Three Distinct HLA Associations. *Molecular Medicine*, 21(1), 769–781. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00232>
- Shah, J. S., Soon, P. S., & Marsh, D. J. (2016). Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PLoS One*, 11(4), e0153200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153200>
- Sheskin, D. J. (2003). *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures: Third Edition* (0 ed.). Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/9781420036268>
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>
- Singh, R. P., Massachi, I., Manickavel, S., Singh, S., Rao, N. P., Hasan, S., Mc Curdy, D. K., Sharma, S., Wong, D., Hahn, B. H., & Rehimi, H. (2013). The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 12(12), 1160–1165. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.07.003>
- Smith, A. G., Wolfe, G. I., Habib, A. A., Qi, C. Z., Yang, H., Du, M., Chen, X., Gelinas, D., Brauer, E., Phillips, G., & Saccà, F. (2024). Risk-Benefit Analysis of Novel Treatments for Patients with Generalized Myasthenia Gravis. *Advances in Therapy*, 41(12), 4628–4647. <https://doi.org/10.1007/s12325-024-03014-5>
- Sweeney, N., Atisha-Fregoso, Y., Pozovskiy, R., Higdon, L., Anderson, M., Diamond, B., & Ridgway, W. M. (2026). Can we cure autoimmunity? *Current Opinion in Immunology*, 98, 102684. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2025.102684>
- Szczudlik, P., Sobieszczuk, E., Szyluk, B., Lipowska, M., Kubiszewska, J., & Kostera-Pruszczyk, A. (2020). Determinants of Quality of Life in Myasthenia Gravis Patients. *Frontiers in Neurology*, 11, 553626. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.553626>

- Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G., & Meyre, D. (2019). Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews. Genetics*, 20(8), 467–484. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0127-1>
- Thomsen, J. L. S., & Andersen, H. (2020). Outcome Measures in Clinical Trials of Patients With Myasthenia Gravis. *Frontiers in Neurology*, 11, 596382. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.596382>
- Tomczak, M., & Tomczak-Łukaszewska, E. (2014). *The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size.* 21, 19–25.
- Topaloudi, A., Zagoriti, Z., Flint, A. C., Martinez, M. B., Yang, Z., Tsetsos, F., Christou, Y.-P., Lagoumintzis, G., Yannaki, E., Zamba-Papanicolaou, E., Tzartos, J., Tsekmekidou, X., Kotsa, K., Maltezos, E., Papanas, N., Papazoglou, D., Passadakis, P., Roumeliotis, A., Roumeliotis, S., ... Paschou, P. (2022). Myasthenia gravis genome-wide association study implicates AGRN as a risk locus. *Journal of Medical Genetics*, 59(8), 801–809. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2021-107953>
- Uzawa, A., & Utsugisawa, K. (2023). Biological therapies for myasthenia gravis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 23(3), 253–260. <https://doi.org/10.1080/14712598.2023.2184257>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Vasilescu, C., Rossi, S., Shimizu, M., Tudor, S., Veronese, A., Ferracin, M., Nicoloso, M. S., Barbarotto, E., Popa, M., Stanciulea, O., Fernandez, M. H., Tulbure, D., Bueso-Ramos, C. E., Negrini, M., & Calin, G. A. (2009). MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PloS One*, 4(10), e7405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007405>
- Vincent, A., & Newsom-Davis, J. (1985). Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: Results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 48(12), 1246–1252. <https://doi.org/10.1136/jnnp.48.12.1246>
- Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I., & Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *American Journal of Human Genetics*, 90(1), 7–24. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.029>
- Wakabayashi, I., Marumo, M., Ekawa, K., & Daimon, T. (2024). Differences in serum and plasma levels of microRNAs and their time-course changes after blood collection. *Practical Laboratory Medicine*, 39, e00376. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2024.e00376>
- Wang, G.-K., Zhu, J.-Q., Zhang, J.-T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.-W., & Jing, Q. (2010). Circulating microRNA: A novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European Heart Journal*, 31(6), 659–666. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq013>

- Wang, K., Yuan, Y., Cho, J.-H., McClarty, S., Baxter, D., & Galas, D. J. (2012). Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PloS One*, 7(7), e41561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041561>
- Wang, Q. S., & Huang, H. (2022). Methods for statistical fine-mapping and their applications to auto-immune diseases. *Seminars in Immunopathology*, 44(1), 101–113. <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00902-8>
- Watanabe, G., Takai, Y., Nagane, Y., Kubota, T., Yasuda, M., Akamine, H., Onishi, Y., Uzawa, A., Kawaguchi, N., Masuda, M., Konno, S., Amino, I., Minami, N., Kimura, T., Samukawa, M., Sugimoto, T., Suzuki, Y., Takahashi, M. P., Suzuki, S., ... Utsugisawa, K. (2024). Cutoffs on severity metrics for minimal manifestations or better status in patients with generalized myasthenia gravis. *Frontiers in Immunology*, 15, 1502721. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1502721>
- Wen, Q., Zhang, S., Wang, Y., Liu, H., Wang, J., Su, S., Xie, N., Lu, Y., Di, L., Xu, M., Wang, M., Chen, H., Wang, S., Zhu, W., Wen, X., Han, J., Wan, D., Zhao, S., Lu, W., ... Da, Y. (2025). Platelet activation plays a pro-inflammatory role in myasthenia gravis. *Nature Communications*, 16(1), 8779. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-63750-2>
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., & Dunnington, D. (2023). *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics* (p. 3.4.4) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggplot2>
- Wiendl, H., Abicht, A., Chan, A., Della Marina, A., Hagenacker, T., Hekmat, K., Hoffmann, S., Hoffmann, H.-S., Jander, S., Keller, C., Marx, A., Melms, A., Melzer, N., Müller-Felber, W., Pawlitzki, M., Rückert, J.-C., Schneider-Gold, C., Schoser, B., Schreiner, B., ... Meisel, A. (2023). Guideline for the management of myasthenic syndromes. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 16, 17562864231213240. <https://doi.org/10.1177/17562864231213240>
- Willeit, P., Zampetaki, A., Dudek, K., Kaudewitz, D., King, A., Kirkby, N. S., Crosby-Nwaobi, R., Prokopi, M., Drozdov, I., Langley, S. R., Sivaprasad, S., Markus, H. S., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Kiechl, S., & Mayr, M. (2013). Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circulation Research*, 112(4), 595–600. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300539>
- Wolfe, G. I., Kaminski, H. J., Aban, I. B., Minisman, G., Kuo, H.-C., Marx, A., Ströbel, P., Mazia, C., Oger, J., Cea, J. G., Heckmann, J. M., Evoli, A., Nix, W., Cialfoni, E., Antonini, G., Witoonpanich, R., King, J. O., Beydoun, S. R., Chalk, C. H., ... MGTX Study Group. (2016). Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. *The New England Journal of Medicine*, 375(6), 511–522. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602489>
- World Health Organization. (2002). *Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations* (WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2). World Health Organization.
- Xiao, C., Calado, D. P., Galler, G., Thai, T.-H., Patterson, H. C., Wang, J., Rajewsky, N., Bender, T. P., & Rajewsky, K. (2007). MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*, 131(1), 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.021>

- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>
- Yixian, Z., Hai, W., Xiuying, L., & Jichun, Y. (2025). Advances in the genetics of myasthenia gravis: Insights from cutting-edge neuroscience research. *Frontiers in Medicine*, 11, 1508422. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1508422>
- Yu, A.-M., Tian, Y., Tu, M.-J., Ho, P. Y., & Jilek, J. L. (2016). MicroRNA Pharmacoeigenetics: Posttranscriptional Regulation Mechanisms behind Variable Drug Disposition and Strategy to Develop More Effective Therapy. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 44(3), 308–319. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.067470>
- Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D. P., & Lodish, H. F. (2007). miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17), 7080–7085. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702409104>
- Zhu, Z., Chen, X., Wang, C., & Cheng, L. (2022). Novel genes/loci validate the small effect size of ERBB2 in patients with myasthenia gravis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(36), e2207273119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207273119>
- Zust, C., & Morren, J. A. (2023). What are the treatment options for myasthenia gravis if first-line agents fail? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 90(2), 81–84. <https://doi.org/10.3949/ccjm.90a.22022>

8. Prilozi

Prilog 3.1.

Podaci iz GWAS sumarne statistike (Chia et al., 2022) za 46 selektovanih genetičkih varijanti na lokusu *CHRNA1*.

Genetička varijanta	Pozicije na hromozomu 2 (GRCh38)	Alel ₁ /Alel ₂	MAF	Beta	SE
rs72916771	174725872	A/G	0,045	0,547	0,086
rs72916782	174729465	A/G	0,047	0,513	0,086
rs72916784	174730370	A/G	0,045	0,489	0,088
rs72916796	174733317	A/G	0,080	0,356	0,070
rs76059363	174736034	A/G	0,081	0,354	0,070
rs72916802	174737013	G/T	0,081	0,353	0,070
rs72918907	174737375	T/C	0,081	0,355	0,070
rs6761352	174738201	G/C	0,081	0,353	0,070
rs6761850	174738627	G/C	0,081	0,353	0,070
rs56169831	174738758	A/G	0,081	0,353	0,070
rs6433500	174740335	G/A	0,081	0,353	0,070
rs6712591	174740368	A/G	0,081	0,351	0,070
rs56081907	174743875	A/G	0,080	0,363	0,070
rs6732312	174745028	T/C	0,081	0,359	0,070
rs6732758	174745231	G/A	0,160	0,271	0,055
rs2255918	174748387	G/A	0,137	0,274	0,058
rs2305413	174748437	C/G	0,080	0,361	0,070
rs2229957	174749988	A/G	0,068	0,395	0,074
rs34343009	174750612	G/A	0,069	0,407	0,073
rs74803262	174751573	G/A	0,069	0,413	0,073
rs28392956	174751765	A/G	0,068	0,415	0,073
rs6433501	174751939	G/A	0,139	0,313	0,057
rs34063969	174752041	G/A	0,068	0,413	0,073
rs57956832	174752286	T/G	0,068	0,414	0,073
rs7562549	174752712	C/A	0,069	0,408	0,073
rs35537239	174753121	C/G	0,068	0,415	0,073
rs12997022	174755246	T/C	0,146	0,284	0,056
rs6751869	174755541	A/C	0,065	0,359	0,075
rs36043339	174755609	G/T	0,135	0,267	0,058
rs1530906	174756207	C/T	0,129	0,294	0,059
rs2600689	174756626	C/T	0,129	0,295	0,059
rs34962410	174756660	T/G	0,059	0,398	0,078
rs2646165	174756754	C/T	0,129	0,295	0,059
rs2600686	174759035	C/T	0,129	0,298	0,059
rs76603995	174759751	T/C	0,056	0,445	0,080
rs1376865	174759869	G/A	0,135	0,279	0,058

rs1376866	174763128	C/T	0,135	0,282	0,058
rs35274388	174764492	A/G	0,037	0,622	0,092
rs16862847	174764872	C/T	0,124	0,320	0,060
rs2600683	174765747	G/C	0,128	0,302	0,059
rs2600682	174766388	T/C	0,128	0,300	0,059
rs1376869	174766522	A/G	0,128	0,300	0,059
rs1376870	174766523	T/C	0,128	0,301	0,059
rs1376871	174766588	T/A	0,128	0,301	0,059
rs36058428	174767075	T/G	0,055	0,467	0,080
rs75888703	174770491	C/A	0,055	0,451	0,080

Skraćenice: MAF, učestalost ređeg alela; SE, standardna greška

Prilog 3.2.

Binarne anotacione matrice za 46 varijanti na lokusu *CHRNA1*, generisane korišćenjem podataka iz baze RegulomeDB, verzija 2.1 (<https://www.regulomedb.org/regulome-search/>) (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023) i baze Ensembl, verzija 110 (Martin et al., 2023).

Genetička varijanta	¹ QTLs	² mesto vezivanja TF	³ motiv podudaran TF	³ motiv	⁴ footprint podudaran TF	⁴ footprint	⁵ CAPs	⁶ tušivač	⁶ pojačivač	⁶ promotor	⁶ nizvodno	⁶ intron	⁶ egzon	⁶ uzvodno
rs72916771	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
rs72916782	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
rs72916784	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
rs72916796	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
rs76059363	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
rs72916802	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
rs72918907	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
rs6761352	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
rs6761850	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rs56169831	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rs6433500	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
rs6712591	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
rs56081907	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
rs6732312	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
rs6732758	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
rs2255918	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
rs2305413	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
rs2229957	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
rs34343009	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
rs74803262	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
rs28392956	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
rs6433501	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
rs34063969	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
rs57956832	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
rs7562549	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
rs35537239	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
rs12997022	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
rs6751869	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
rs36043339	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
rs1530906	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
rs2600689	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
rs34962410	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
rs2646165	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
rs2600686	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
rs76603995	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
rs1376865	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

rs1376866	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
rs35274388	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
rs16862847	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
rs2600683	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
rs2600682	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
rs1376869	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
rs1376870	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
rs1376871	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
rs36058428	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1
rs75888703	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

Skraćenice: QTLs, lokusi za kvantitativne osobine; TF, transkripcioni faktor; footprint, DNaza I zaštićena mesta hromatina; CAPs, pikovi pristupačnog hromatina

¹eQTL podaci iz projekta GTEx, kao i caQTL-ovi iz 9 publikacija, preuzeti su iz baze podataka Regulome, verzija 2.1. (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023).

²podaci o mestima vezivanja TF dobijeni iz ChIP-seq analize u okviru projekta ENCODE, preuzeti su iz baze podataka Regulome, verzija 2.1. (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023).

³podaci o motivima podudarim sa TF i drugim motivima predviđeni na osnovu matrica težina pozicija (engl. *Position weight matrix* PWM) za 746 neredundantnih motiva TF iz JASPAR 2020 CORE kolekcije, preuzeti su iz baze podataka Regulome, verzija 2.1. (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023).

⁴podaci o zaštićenim mestima hromatina podudarnim sa TF i drugim zaštićenim mestima hromatina, predviđeni na osnovu signala iz 642 DNase-seq eksperimenata i 591 motiva TF, korišćenjem standardizovanog radnog toka TRACE, preuzeti su iz baze podataka Regulome, verzija 2.1. (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023).

⁵podaci o dostupnosti hromatina dobijeni iz DNase-seq analize u okviru projekta ENCODE, preuzeti su iz baze podataka Regulome, verzija 2.1. (Boyle et al., 2012; Dong et al., 2023).

⁶anotacije dobijene korišćenjem alata Variant Effect Predictor (McLaren et al., 2016) integrisanog u okviru baze podataka Ensembl, verzija 110 (Martin et al., 2023).

Prilog 3.3.

Validirana klinička skala MG-ADL. Validirani upitnik o uticaju bolesti na svakodnevni život i predstavlja meru funkcionalnosti obolelih sa MG. Skala se sastoji iz osam pitanja koja se odnose na aktivnosti iz svakodnevnog života, žvakanje, gutanje, govor, spuštanje kapaka, postojanje dvoslika, kao i postojanje slabosti i zamorljivosti mišića ekstremiteta tokom aktivnosti. Svaki odgovor se ocenjuje vrednostima od 0 do 3 na osnovu stepena funkcionalne onesposobljenosti bolesnika pri izvođenju uobičajenih svakodnevni aktivnosti. Ukupan broj bodova na skali može imati vrednost od 0 do 24, pri čemu viši skor označava težu formu bolesti. Bolesnici koji imaju MG-ADL skor 0 ili 1 označeni su kao bolesnici koji ispoljavaju minimalne kliničke manifestacije (MCE), kada postoje vrlo blagi simptomi bolesti koji ne utiču na svakodnevno funkcionisanje i nisu dovoljni da bi se bolesnici klasifikovali u neku od formi bolesti prema MGFA klasifikaciji.

Upitnik o aktivnostima svakodnevnog života (engl. <i>myasthenia gravis activities of daily living scale, MG-ADL</i>)					
Ocena	0	1	2	3	Skor
1. Govor	Normalan	Povremeno nerazgovetan ili nazalan govor	Stalno nerazgovetan ili nazalan govor, ali razumljiv	Teško razumljiv govor	
2. Žvakanje	Normalno	Zamor sa čvrstom hranom	Zamor sa mekom hranom	Gastrični tubus	
3. Gutanje	Normalno	Retke epizode gušenja	Česta gušenja koja zahtevaju promenu ishrane	Gastrični tubus	
4. Disanje	Normalno	Gubitak daha pri naprezanju	Gubitak daha pri odmaranju	Zavisnost od ventilatora	
5. Smanjena sposobnost pranja zuba ili češljanja	Nema	Dodatni napor, ači bez potrebe za periodima odmora	Potrebni periodi odmora	Nemogućnost obavljanja jedne od ovih funkcija	
6. Smanjena sposobnost ustajanja sa stolice	Nema	Blago, povremeno koristi ruke	Umereno koristi ruke	Ozbiljno, potrebna pomoć	
7. Dupli vid	Nema	Dešava se, ali ne svakodnevno	Svakodnevno, ali ne stalno	Stalno	
8. Spuštanje kapaka	Nema	Dešava se, ali ne svakodnevno	Svakodnevno, ali ne stalno	Stalno	
UKUPAN SKOR: _____					

Prilog 3.4.

Validirana klinička skala QMG. Skala za kvantifikovanje težine bolesti i procenu funkcionalne onesposobljenosti bolesnika sa MG od strane neurologa. Preporučena za prospektivne kliničke studije sa ciljem evaluacije kliničkog odgovora bolesnika na primenjenu terapiju. Procenjuje se ukupno 13 stavki koje se odnose na postojanje slabosti i zamorljivosti ekstraokularnih mišića, zatim mišića koji učestvuju u žvakanju, govoru i gutanju, kao i mišića vrata i ekstremiteta. Rezultati se ocenjuju vrednostima od 0 do 3, i ukupan broj bodova na skali od 0 do 39 odražava meru sveukupne slabosti obolelih, pri čemu viši skor govori u prilog postojanja teže forme bolesti.

Kvantitativna skala procene težine bolesti (engl. <i>quantitative myasthenia gravis scale, QMG</i>)					
OCENA	0	1	2	3	Skor
Dupli vid pri pogledu u stranu, levo ili desno (s)	61	11-60	1-10	Spontano	
Ptoza, pogled prema gore (s)	61	11-60	1-10	Spontano	
Facijalni mišići	Normalni	Potpuno spuštene, sa otporom	Potpuno spuštene, bez otpora	Nepotpuno spuštene	
Gutanje 120 ml vode	Normalno	Minimalno kašljanje	Kašljanje/ gušenje ili nazalna regurgitacija	Nemogućnost gutanja (bez pokušaja)	
Govor nakon brojanja na glas od 1 do 50 (s)	Normalan na 50	Disartrijski na 30-49	Disartrijski na 10-29	Disartrijski na 9	
Ispružena desna ruka (90°, sedeći) (s)	240	90-239	10-89	0-9	
Ispružena leva ruka (90°, sedeći) (s)	240	90-239	10-89	0-9	
Vitalni kapacitet (%)	≥ 80	65-79	50-64	< 50	
Stisak desne ruke, muškarci; žene (KgW)	≥ 45; ≥ 30	15-44; 10-29	5-14; 5-9	0-4; 0-4	
Stisak leve ruke, muškarci; žene (KgW)	≥ 35; ≥ 25	15-34; 10-24	5-14; 5-9	0-4; 0-4	
Glava, ispružena (45°, ležeći) (s)	120	30-119	1-29	0	
Desna noga ispružena (45°, ležeći) (s)	100	31-99	1-30	0	
Leva noga ispružena (45°, ležeći), (s)	100	31-99	1-30	0	
UKUPAN SKOR: _____					

Prilog 3.5.

Validirana klinička skala MGC. Kombinovana skala koja sadrži podatke dobijene korišćenjem QMG i MG-ADL kliničkih skala. Ona omogućava procenu funkcionalnosti, kao i stepena težine bolesti kvantitativnim ispitivanjem snage mišića obolelih sa MG, pružajući sveobuhvatan uvid u to kako bolest utiče na njihov svakodnevni život. MGC skala se bazira na anamnestičkim podacima dobijenim od bolesnika, kao i na objektivnoj proceni snage specifičnih mišićnih grupa od strane ispitivača. Skala se sastoji od deset stavki od kojih se svaka ocenjuje vrednošću od 0 do 4, s tim da se ukupan zbir kreće u intervalu od 0 do 50, pri čemu viši skorovi označavaju težu formu bolesti.

Kombinovana skale za procenu težine bolesti (engl. <i>myasthenia gravis composite scale, MGC</i>)				
Ptoza, pogled prema gore (pregled od strane lekara)	>45 sekundi = 0	11-45 sekundi = 1	1-10 sekundi = 2	Odmah = 3
Dupli vid pri pogledu u stranu, levo ili desno (pregled od strane lekara)	>45 sekundi = 0	11-45 sekundi = 1	1-10 sekundi = 2	Odmah = 3
Zatvaranje kapaka (pregled od strane lekara)	Normalno = 0	Blaga slabost (mogu se otvoriti uz napor) = 0	Umerena slabost (lako se mogu otvoriti) = 1	Teška slabost (ne mogu se zatvoriti oči) = 2
Govor (podaci od bolesnika)	Normalan = 0	Povremeno nerazgovetan ili nazalan govor = 2	Stalno nerazgovetan ili nazalan govor, ali razumljiv = 4	Teško razumljiv govor = 6
Žvakanje (podaci od bolesnika)	Normalno = 0	Zamor sa čvrstom hranom = 2	Zamor sa mekom hranom = 4	Gastrični tubus = 6
Gutanje (podaci od bolesnika)	Normalno = 0	Retke epizode gušenja = 2	Česta gušenja koja zahtevaju promenu ishrane = 5	Gastrični tubus = 6
Disanje (uzrokovano MG)	Normalno = 0	Gubitak daha pri naprezanju = 2	Gubitak daha pri odmaranju = 4	Zavisnost od ventilatora = 9
Fleksija i ekstenzija vrata (slabije) (pregled od strane lekara)	Normalna = 0	Blaga slabost = 1	Umerena slabost = 3	Teška slabost = 4
Abdukcija ramena (pregled od strane lekara)	Normalna = 0	Blaga slabost = 2	Umerena slabost = 4	Teška slabost = 5
Fleksija kuka (pregled od strane lekara)	Normalna = 0	Blaga slabost = 2	Umerena slabost = 4	Teška slabost = 5
UKUPAN SKOR: _____				

Prilog 3.6.

Mere i interpretacioni pragovi veličine efekta. Tabela prikazuje mere veličine efekta korišćene za određeni statistički test, zajedno sa odgovarajućim pragovima interpretacije zasnovanim na utvrđenim kriterijumima za male, umerene i velike efekte.

Test	Efektivna veličina	Mali efekat	Umereni efekat	Veliki efekat
Analiza varijanse sa ponovljenim merenjima	Generalized Eta Squared (η^2) ^a	≥ 0,01	≥ 0,06	≥ 0,14
Uporeni t-test	Cohen's d (d) ^b	≥ 0,20	≥ 0,50	≥ 0,80
Fridmanov test	Kendall's W (W) ^c	≥ 0,10	≥ 0,30	≥ 0,50
Vilkoksonov test	r ^d	≥ 0,10	≥ 0,30	≥ 0,50

^aPreporučena mera veličine efekta za interpretaciju rezultata ANOVA sa ponovljenim merenjima (Bakeman, 2005), kao i granične vrednosti preuzete sa <https://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/statswiki/FAQ/effectSize>.

^bPreporučena mera veličine efekta za interpretaciju rezultata uparenog t-testa (Borenstein, 2009; Pustejovsky, 2014), kao i granične vrednosti preuzete sa <https://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/statswiki/FAQ/effectSize>.

^cPreporučena mera veličine efekta za interpretaciju rezultata Fridmanovog testa (Cohen, 1988; Hays, n.d.; Sheskin, 2003), kao i granične vrednosti preuzete sa <https://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/statswiki/FAQ/effectSize>.

^dPreporučena mera veličine efekta za interpretaciju rezultata Vilkoksonovog testa (Cohen, 1988; Tomczak & Tomczak-Łukaszewska, 2014), kao i granične vrednosti preuzete sa <https://imaging.mrc-cbu.cam.ac.uk/statswiki/FAQ/effectSize>.

Prilog 4.1.

Izračunate naknadne verovatnoće uključanja (PIPs) za 46 tačkastih varijanti u lokusu *CHRNA1*.

Genetička varijanta	PIP ^a	PIP ^b	PIP ^c	PIP ^d	PIP ^e
rs72916771	0,367	0,586	0,313	0,345	0,000
rs72916782	0,060	0,376	0,023	0,240	0,000
rs72916784	0,014	0,235	0,004	0,112	0,000
rs72916796	0,018	0,228	0,004	0,154	0,000
rs76059363	0,017	0,227	0,004	0,089	0,000
rs72916802	0,017	0,227	0,004	0,053	0,000
rs72918907	0,018	0,230	0,004	0,056	0,000
rs6761352	0,017	0,221	0,004	0,061	0,000
rs6761850	0,017	0,231	0,004	0,036	0,000
rs56169831	0,017	0,227	0,004	0,040	0,000
rs6433500	0,017	0,221	0,004	0,054	0,000
rs6712591	0,016	0,225	0,004	0,063	0,000
rs56081907	0,023	0,232	0,006	0,074	0,000
rs6732312	0,021	0,227	0,005	0,068	0,000
rs6732758	0,132	0,255	0,179	0,220	0,000
rs2255918	0,026	0,202	0,030	0,022	0,000
rs2305413	0,023	0,233	0,006	0,028	0,000
rs2229957	0,027	0,244	0,004	0,218	0,000
rs34343009	0,026	0,238	0,004	0,027	0,000
rs74803262	0,037	0,253	0,006	0,045	0,000
rs28392956	0,038	0,263	0,006	0,051	0,000
rs6433501	0,207	0,268	0,232	0,116	0,000
rs34063969	0,035	0,254	0,006	0,026	0,000
rs57956832	0,036	0,256	0,006	0,074	0,000
rs7562549	0,032	0,251	0,005	0,066	0,000
rs35537239	0,040	0,265	0,007	0,074	0,000
rs12997022	0,112	0,344	0,062	0,115	0,000
rs6751869	0,004	0,178	0,000	0,010	0,000
rs36043339	0,015	0,214	0,007	0,018	0,000
rs1530906	0,030	0,236	0,020	0,036	0,000
rs2600689	0,030	0,233	0,021	0,038	0,000
rs34962410	0,006	0,274	0,000	0,039	0,000
rs2646165	0,030	0,233	0,021	0,065	0,000
rs2600686	0,037	0,240	0,026	0,023	0,000
rs76603995	0,005	0,203	0,001	0,037	0,000

rs1376865	0,028	0,223	0,016	0,027	0,000
rs1376866	0,035	0,228	0,020	0,415	0,228
rs35274388	0,590	0,709	0,647	0,965	1,000
rs16862847	0,108	0,314	0,079	0,482	0,770
rs2600683	0,045	0,251	0,031	0,068	0,000
rs2600682	0,039	0,244	0,027	0,060	0,000
rs1376869	0,039	0,242	0,027	0,064	0,000
rs1376870	0,040	0,242	0,028	0,064	0,000
rs1376871	0,044	0,248	0,030	0,068	0,000
rs36058428	0,008	0,223	0,002	0,109	0,000
rs75888703	0,005	0,206	0,001	0,102	0,000

^aStohastička pretraga modela, statističko fino mapiranje, FINEMAP softver

^bGibbsovo uzorkovanje, statističko fino mapiranje, PAINOTOR softver

^cTačna inferencija, statističko fino mapiranje, PAINOTOR softver

^dGibbsovo uzorkovanje, funkcionalno fino mapiranje, PAINOTOR softver

^eTačna inferencija, funkcionalno fino mapiranje, PAINOTOR softver

Prilog 4.2.

Statistika testa odnosa verodostojnosti (LRT) za dva pristupa funkcionalnog finog mapiranja

	Gibbsovo uzorkovanje			Tačna inferencija		
	Bajesov faktor	LRT	p	Bajesov faktor	LRT	p
Osnovni model	14,957			20,659		
Modeli sa jednom anotacijom						
QTLs	14,896	29,792	P > 0,05	20,663	0,008	P > 0,05
mesto vezivanja TF	26,971	53,942	P < 0,001	21,434	1,55	P > 0,05
motiv podudaran TF	21,327	42,654	P < 0,001	21,557	1,796	P > 0,05
motiv	15,912	31,824	P > 0,05	20,769	0,22	P > 0,05
footprint podudaran TF	21,325	42,64	P < 0,001	21,557	1,796	P > 0,05
footprint	16,181	32,362	P > 0,05	20,898	0,478	P > 0,05
CAPs	17,102	34,204	P < 0,05	20,983	0,648	P > 0,05
utišivač	15,262	30,524	P > 0,05	20,738	0,158	P > 0,05
pojačavač	15,23	30,46	P > 0,05	20,822	0,326	P > 0,05
promotor	29,068	58,136	P < 0,001	24,006	6,694	P < 0,01
nizvodno	15,531	31,062	P > 0,05	20,814	0,31	P > 0,05
intron	17,983	35,966	P < 0,05	21,121	0,924	P > 0,05
egzon	15,884	31,768	P > 0,05	20,7	0,082	P > 0,05
uzvodno	20,37	40,74	P < 0,01	21,974	2,63	P > 0,05
Model sa više anotacija	28,815	27,716	P < 0,001			

Skraćenice: LRT, test odnosa verodostojnosti; P, P vrednost; QTLs, lokusi za kvantitativne osobine; footprint, DNaza I zaštićena mesta hromatina; TF, transkripcioni faktor; CAP, pikovi pristupačnosti hromatina. P-vrednosti < 0,05 označene su podebljano.

Prilog 4.3.

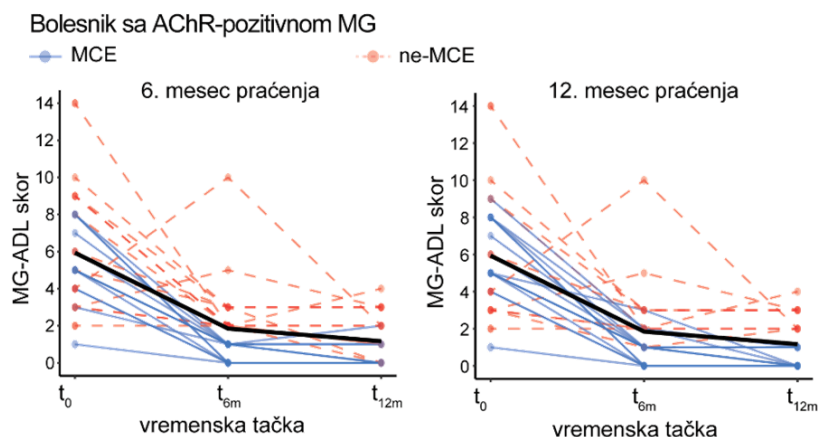
Učestalost ređeg alela i genotipova varijante rs35274388 u lokusu *CHRNA1* kod 519 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG podeljenih prema polu (235 muškaraca i 284 žena) i povezanosti alela i genotipova sa bolešću.

	Tačkasta varijanta (aleli, genotipovi, gen) rs35274388 (<u>A</u> /G, AA/AG/GG, <i>CHRNA1</i>)	
	Muškarci	Žene
Učestalost rizičnog alela		
bolesnici i kontrole	0,066 i 0,042	0,065 i 0,047
Povezanost alela		
χ^2	2,509	1,656
P ^a	0,113	0,198
OR	1,589	1,396
(95% CI)	(0,892-2,830)	(0,838-2,326)
Učestalost genotipova		
bolesnici i kontrole	0,004/0,124/0,872 i 0,000/0,085/0,915	0,011/0,109/0,880 i 0,007/0,081/0,912
Genetički model		
Aditivan	AA > GA > GG	AA > GA > GG
t	1,583	1,217
P ^b	0,113	0,224
OR	1,602	1,354
(95% CI)	(0,894-2,871)	(0,831-2,204)
Dominantan	AA + GA vs. GG	AA + GA vs. GG
t	1,487	1,233
P ^b	0,137	0,217
OR	1,573	1,409
(95% CI)	(0,866-2,859)	(0,817-2,429)
Recesivan	AA vs. GA + GG	AA vs. GA + GG
t	/	0,443
P ^b	1	0,655
OR	/	1,505
(95% CI)		(0,250-9,078)

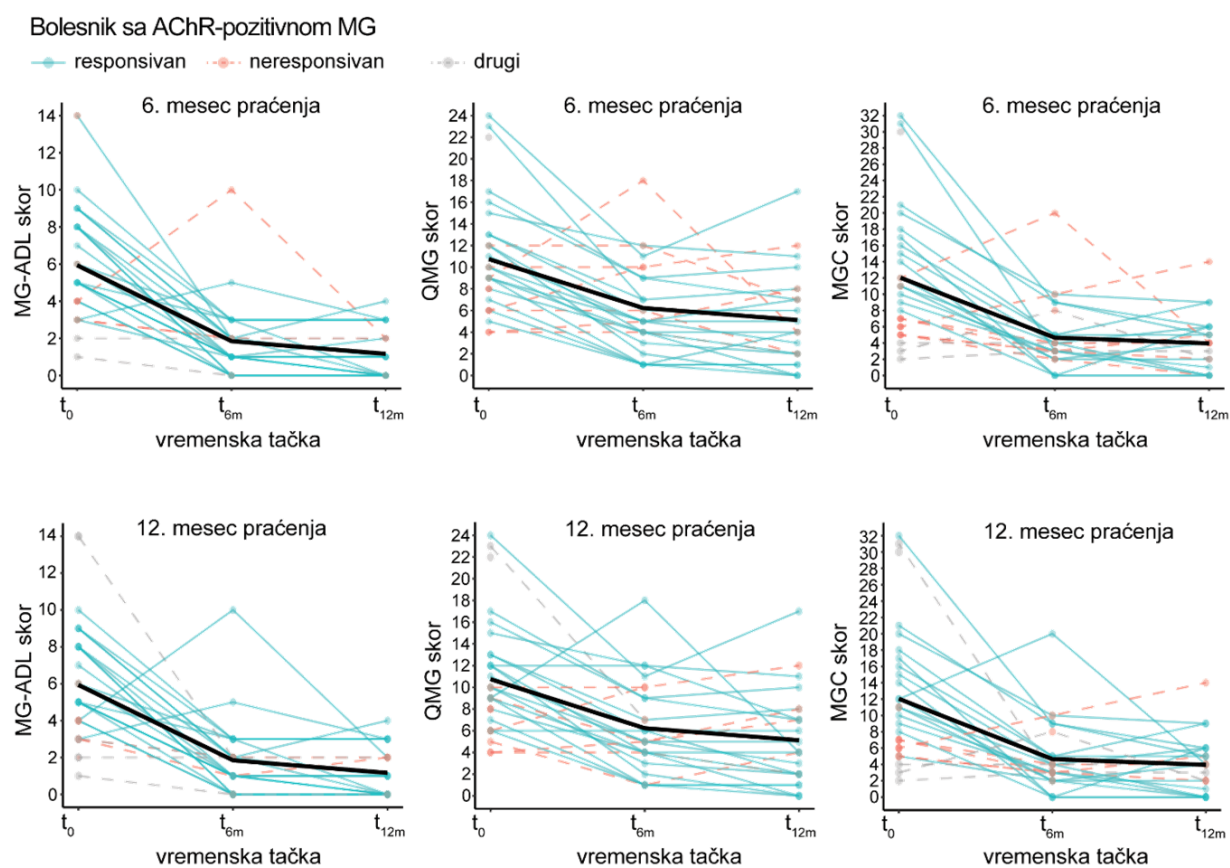
Ređi alel je podvučen. Skraćenice: χ^2 , parametar χ^2 -statistike; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja; t, parametar t-statistike. ^aPirsonov χ^2 -test, ^b10e⁶ permutacioni test, ^cLogistička regresija

Prilog 4.4.

A



B



Vrednosti kliničkih MG-ADL, QMG i MGC skorova kod 31 bolesnika sa AChR-pozitivnom MG i klinički odgovor u 6. i 12. mesecu praćenja. **A.** Bolesnici sa minimalnom kliničkom ekspresijom (MCE) i bez minimalne kliničke ekspresije (ne-MCE) u 6. mesecu (levo) i 12. mesecu praćenja (desno). **B.** Bolesnici sa pozitivnim odgovorom na terapiju i refraktarni bolesnici prema MG-ADL (levo), QMG (sredina) i MGC kriterijumima (desno) u 6. mesecu (gore) i 12. mesecu praćenja. Svaka linija predstavlja promenu kliničkog skora pojedinačnog bolesnika tokom vremena, pri čemu boje označavaju status terapijskog odgovora. Crna linija predstavlja prosečnu promenu kliničkih skorova svih bolesnika tokom vremena.

Biografija autora

Nemanja Garai (rođen 23. januara 1996. godine u Somboru) asistent je i istraživač-saradnik na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Osnovne akademske studije na studijskom programu Molekularna biologija i fiziologija na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2015/2016. godine i završio ih u roku sa prosečnom ocenom 9,80. Potom je na istom fakultetu završio master akademske studije na modulu Humana molekularna biologija sa prosečnom ocenom 10,00. Doktorske akademske studije na studijskom programu Molekularna biologija, podmodul Molekularna genetika i genomika, započeo je 2020. godine.

Autor je i koautor 7 radova objavljenih u vrhunskim i istaknutim međunarodnim časopisima. Angažovan je u izvođenju praktične nastave na osnovnim i master akademskim studijama iz oblasti molekularne biologije, kao i u radu sa talentovanim srednjoškolcima u Istraživačkoj stanici Petnica.

Bio je i jeste uključen u realizaciju više nacionalnih i međunarodnih projekata, među kojima su COST akcije i istraživanja u oblasti retkih bolesti i neonatalnog skrininga. U Centru za humanu molekularnu genetiku Univerziteta u Beogradu učestvuje u sprovođenju DNK analiza radi utvrđivanja biološkog srodstva, kao i u organizaciji procesa i kontroli rezultata nacionalnog programa skrininga novorođenčadi na spinalnu mišićnu atrofiju u Republici Srbiji.

Dobitnik je više stipendija, među kojima je i stipendija Fonda za mlade talente Republike Srbije. Član je domaćih i međunarodnih naučnih udruženja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Немања Гараи _____

Број индекса _____ М3003/2020 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Варијанте у гену *CHRNA1* и микроРНК у плазми као предиктори настанка и терапијског одговора код стечене аутоимуне мијастеније гравис

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Немања Гараи

Број индекса M3003/2020

Студијски програм Молекуларна биологија, модул Молекуларна генетика и геномика

Наслов рада: Варијанте у гену *CHRNA1* и микроРНК у плазми као предиктори настанка и терапијског одговора код стечене аутоимуне мијастеније гравис

Ментор: др Душанка Савић Павићевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет и др Ивана Баста, ванредни професор, Универзитет у Београду – Медицински Факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Варијанте у гену *CHRNA1* и микроРНК у плазми као предиктори настанка и терапијског одговора код стечене аутоимуне мијастеније гравис

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.