UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana S. Đorđević

ANALIZA GENETIČKIH FAKTORA RIZIKA I POKAZATELJI TOKA I ISHODA STEČENE AUTOIMUNE MIJASTENIJE GRAVIS

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Ivana S. Đorđević

ANALYSIS OF GENETIC RISK FACTORS AND INDICATORS OF THE CLINICAL COURSE AND OUTCOMES OF ACQUIRED AUTOIMMUNE MYASTHENIA GRAVIS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentor: Prof. dr Ivana Basta, neurolog, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor: Prof. dr Dušanka Savić-Pavićević, molekularni biolog, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. Doc. dr Stojan Perić, neurolog, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Sonja Rajić, neurolog, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
3. Doc. dr Jovan Pešović, molekularni biolog, docent Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Od pisanja same doktorske disertacije teže mi je bilo da započnem sa pisanjem ovog neizostavnog dela, zahvalnice. Moja je nevolja u dilemi koga navesti prvog, kada sam imala takvu sreću da me na ovom istraživačkom putu usmeri, prati, podstiče i podrži toliko ljudi. Zato sam rešila da pozajmim ideju jedne koleginice koja je svoju sličnu dilemu rešila hronologijom događaja pa ću i ja prve redove ove zahvalnice posvetiti doc. dr Stojanu Periću i prof. dr Dušanki Savić Pavićević od kojih je i potekla ideja o ovom istraživanju. Doc. dr Perić je svojom prepoznatljivom inovativnošću iscrtao trasu po kojom smo se kretali, uvek pronalazeći rešenja za sve poteškoće na koje smo nailazili. Uz sugestije kojima nas je usmeravala prof. Pavićević imala sam poseban osećaj sigurnosti da će rezultati rada biti plodonosni što se kasnije i obistinilo.

Ali istraživanje i ne bi bilo moguće sprovesti bez nesebične pomoći, i to svake vrste, mog prvog mentora i najvećeg profesionalnog uzora prof. dr Dragane Lavrnić čiji pacijenti su uključeni u istraživanje, i mog najvećeg učitelja prof. dr Slobodana Apostolskog koji mi je svojim znanjem i sugestijama, ali i lekcijama pomogao da razumem mijasteniju gravis. Profesorki Lavrnić i profesoru Apostolskom dugujem mnogo više od završene doktorske disertacije, pre svega dugujem na velikoj podršci koju sam dobijala u svakoj prilici i poteškoći i sada koristim priliku da se na svemu na čemu dugujem od srca zahvalim.

Našem istraživačkom putu se kasnije pridružuje i jedan od ključnih saradnika, molekularni biolog dr Nemanja Garai, čija je studioznost i posvećenost dala značajan pečat našem istraživanju.

I na kraju, sve je zaokružila i podigla na viši nivo moj mentor prof. dr Ivana Basta koja je studiozno, temeljno, sa mnogo strpljenja pratila izradu ove disertacije. Profesorski Basti dugujem veliku zahvalnost što je bila posvećen mentor u želji da ove stranice i rezultati budu svima nama na ponos.

Posebnu zahvalnost upućujem svojim koautorima na nesebičnoj saradnji, stručnim savetima, podršci i dragocenom doprinosu u realizaciji naučnih istraživanja koja su predstavljena u ovoj doktorskoj disertaciji, pacijentima sa SAMG koji su svojim učestvovanjem pomogli naše istraživanje i koji veruju svojim lekarima i nauci, kao i svim bivšim i sadašnjim lekarima i medicinskim sestrama trećeg odeljenja Klinike za neurologiju, UKCS.

U zaključku se zahvaljujem onima kojima dugujem sve. Onima koji me nesebično motivišu, bodre, pomažu, raduju se sa mnom, učestvuju, znaju svaku dilemu, svaku brigu i bez kojih ni jedan korak ne bi bio moguć. Hvala mojoj porodici, Stefanu, Dušanu, mami, tati i Deki.

Analiza genetičkih faktora rizika i pokazatelji toka i ishoda stečene autoimune mijastenije gravis

Sažetak:

Uvod: Dosadašnja istraživanja genetičkih prediktora razvoja, kao i kliničkih i dijagnostičkih pokazatelja toka i ishoda stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) su dala neujednačene i ponekad kontradiktorne rezultate, zbog čega prediktori ishoda nisu jasno definisani.

Cilj: Ispitati kliničke, elektrofiziološke i imunoserološke pokazatelje toka i ishoda SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima, kao i povezanost polimorfizama jednog nukleotida gena *CTLA4* i njihovih haplotipova sa rizikom za razvoj, klinički tok i ishod lečenja SAMG u našoj kohorti.

Materijal i metode: Istraživanje je sprovedeno u dva dela i obuhvatilo je bolesnike koji su dijagnostikovani i lečeni u Klinici za neurologiju, UKCS. Prvi deo je retrospektivna studija koja je obuhvatila bolesnike sa SAMG i inicijalno izolovanim okularnim simptomima. Za procenu pokazatelja generalizacije bolesti korišćena je multivarijantna binarna logistička regresija. Drugi deo je studija slučajeva i kontrola u kojoj su TaqMan metodom analizirani polimorfizmi rs231735 i rs231770 u lokusu *CTLA4* kod bolesnika sa antitelima prema nikotinskom acetil-holinskom receptoru (nAChR).

Rezultati: Retrospektivna studija je obuhvatila 209 bolesnika. Ženski pol ($p=0,017$), viša koncentracija nAChR autoantitela ($p<0,001$) i pozitivan test nervno-mišićne transmisije (TNT) ($p<0,001$) pri postavljanju dijagnoze bili su statistički značajno češći kod bolesnika sa generalizovanom formom bolesti i statistički značajno povezani sa generalizacijom bolesti. Genetička analiza je obuhvatila 447 SAMG bolesnika i uparenih kontrola i ukazala je da su varijante rs231735 i rs231770 u lokusu *CTLA4* povezane sa SAMG ranog početka. Pored toga, genotip TT za oba polimorfizma imao je protektivni efekat za razvoj SAMG ranog početka.

Zaključak: Polimorfizmi rs231735 i rs231770 u lokusu *CTLA4* predstavljaju mogući faktor rizika samo za SAMG ranog početka u našoj kohorti. Pol, viša koncentracija nAChR autoantitela i pozitivan TNT izdvajaju se kao pokazatelji generalizacije ove bolesti.

Ključne reči: Stečena autoimuna mijastenija gravis, generalizacija, pokazatelji, nAChR autoantitela, test nervno-mišićne transmisije, *CTLA4*, polimorfizmi.

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: neurologija

UDK:

Analysis of Genetic Risk Factors and Indicators of the Clinical Course and Outcomes of Acquired Autoimmune Myasthenia Gravis

Abstract:

Introduction: Previous research on genetic predictors of development, as well as clinical and diagnostic indicators of the clinical course and treatment outcome of acquired autoimmune myasthenia gravis (MG), has yielded inconsistent and sometimes contradictory results. Therefore, a definitive list of reliable indicators has not been established.

Objective: To examine the clinical, electrophysiological, and immunoserological indicators of disease course and treatment outcome of MG subjects with initially ocular symptoms, as well as the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CTLA4* gene and their haplotypes with the risk of development, clinical course, and treatment outcome of MG in our cohort.

Materials and Methods: The study was conducted in two parts and included patients diagnosed and treated at the Clinic of Neurology, UCCS. The first part was a retrospective study including patients with MG and initially isolated ocular symptoms. Multivariable binary logistic regression was used to assess predictors of generalization. The second part was a case-control study in which the polymorphisms rs231735 and rs231770 at the *CTLA4* locus were analyzed using the TaqMan method in patients with nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) autoantibodies.

Results: The retrospective study included 209 patients. Female sex ($p=0.017$), higher concentration of nAChR autoantibodies ($p<0.001$), and a positive repetitive nerve stimulation test (RNS) ($p<0.001$) at diagnosis were statistically significantly associated with disease generalization and demonstrated predictive value. The genetic analysis included 447 MG patients and matched controls and indicated that the rs231735 and rs231770 variants at the *CTLA4* locus are associated with early-onset MG. The TT genotype for both polymorphisms had a protective effect against the development of early-onset MG.

Conclusion: The rs231735 and rs231770 polymorphisms at the *CTLA4* locus may represent risk factors only for early-onset MG in our cohort. Gender, higher concentration of nAChR autoantibodies and positive RNS stand out as clear predictors of disease generalization

Key words: Acquired autoimmune myasthenia gravis, generalization, predictors, nAChR autoantibodies, repetitive nerve stimuation test, *CTLA4*, polymorphisms

Scientific field: medicine

Scientific subfield: neurology

UDK:

Sadržaj

1 Uvod 1
1.1 Istorijat SAMG 1
1.2 Epidemiologija SAMG 1
1.3 Anatomija i fiziologija nervno-mišićne spojnice 2
1.4 Patofiziologija SAMG 4
1.4.1 SAMG posredovana nAChR autoantitelima 4
1.4.2 SAMG posredovana MuSK autoantitelima 4
1.4.3 SAMG posredovana LRP4 autoantitelima 5
1.4.4 Specifičnost NMS ekstraokularnih mišića 5
1.4.5 Uloga timusa u patogenezi SAMG 6
1.4.6 Uloga genetičkih faktora u patogenezi SAMG 7
1.4.7 Uloga faktora spoljašnje sredine 8
1.4.8 Epigenetički faktori 8
1.5 Klinička slika i klasifikacija SAMG 9
1.5.1 Okularni simptomi 9
1.5.2 Bulbarni simptomi 10
1.5.3 Simptomi trupa, ekstremiteta i respiratorne muskulature 10
1.5.4 Atipične kliničke manifestacije SAMG 10
1.6 MGFA klasifikacija SAMG 11
1.7 Dijagnoza 12
1.7.1 Klinička dijagnoza 12
1.7.2 Klinički testovi 13
1.7.3 Farmakološki testovi 13
1.7.4 Serološko testiranje 14
1.7.5 Elektrofiziološke studije 15
1.7.6 Radiološka dijagnostika timusa 16
1.8 Terapija 16
1.8.1 Terapija okularne forme SAMG 16
1.8.2 Terapija generalizovane forme SAMG 18
1.8.3 Terapija refraktarne forme SAMG 20
1.8.4 Mijastenična kriza 21
1.9 Procena težine bolesti i terapijskog efekta 21
1.10 Generalizacija 22
2 Ciljevi rada 23
3 Materijal i metode 24
3.1 Analiza kliničkih, elektrofizioloških i imunoserološkihpokazatelja toka i ishoda SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima 24

3.1.1 Pacijenti 24
3.1.2 Statistička analiza 25
3.2 Studija asocijacije polimorfizama pojedinačnih nukleotida gena *CTLA4* i njihovih haplotipova sa kliničkim tokom i ishodom lečenja SAMG 25
3.2.1 Pacijenti 25
3.2.2 Odabir polimorfizama pojedinačnih nukleotida 26
3.2.3 Genotipizacija 26
3.2.4 Statistička analiza 27
4 Rezultati 28
4.1 Analiza kliničkih, elektrofizioloških i imunoseroloških pokazatelja toka bolesti i ishoda lečenja SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima 28
4.2 Studija utvrđivanja učestalosti polimorfizama gena *CTLA4* u našoj kohorti bolesnika i njihovog uticaja na klinički tok i ishod lečenja SAMG 33
4.2.1 Karakteristike pacijenata 33
4.2.2 Udruženost polimorfizama pojedinačnog nukleotida gena *CTLA4* sa razvojem SAMG u populaciji Srbije 34
4.2.3 Asocijacija haplotipova rs231735-rs231770 gena *CTLA4* i SAMG ranog početka udruženom sa AChR autoantitelima 40
5 Diskusija 42
6 Zaključci 50
7 Literatura 52
8 Spisak skraćenica 70
9 Biografija autora 71

1 Uvod

Stečena autoimuna mijastenija gravis (SAMG) je najčešće autoimuno oboljenje nervno-mišićne spojnice (NMS), koje se karakteriše slabošću i prekomernom zamorljivošću skeletnih mišića pri stalnoj ili ponavljanoj aktivnosti, kao i oporavkom snage nakon odmora ili primene inhibitora holinesteraze. Bolest je posredovana autoantitelima usmerenim prema različitim komponentama (antigenima) postsinaptičke membrane NMS (1).

1.1 Istorijat SAMG

Iako se do najvećih saznanja o SAMG došlo u poslednjih 150 godina, prvi opisi ove bolesti datiraju iz XVII veka. Dostupni podaci pokazuju da literatura nije usaglašena po pitanju autora prvog opisa ovog nervno-mišićnog oboljenja. Neki istraživači smatraju da prvi opis datira iz 1658. godine kada je Džon Maplet (John Maplet), lekar iz Engleske, uputio pismo tada poznatom lekaru Tomasu Braunu (Thomas Brown) opisujući kliničku sliku bolesnika koja bi mogla odgovarati SAMG (2). Po drugim istraživačima, prvi opis SAMG dao je Tomas Vilis (Thomas Willis), oksfordski lekar, u svojoj knjizi „O zverinjim dušama“ (*lat. De Anima Brutorum*) objavljenoj u Londonu davne 1672. godine, opisujući bolesnike koji su se osećali dobro u jutarnjim satima i kod kojih se u toku dana javljala zamorljivost tokom govora ili bilo koje druge fizičke aktivnosti (3,4).

1.2 Epidemiologija SAMG

Epidemiološke studije SAMG predstavljaju svojevrsni izazov imajući u vidu da se radi o retkoj neurološkoj bolesti (5). Važno je istaći da incidencija i prevalencija SAMG značajno variraju među različitim geografskim regionima sa rasponom od 1,5-6,1/100.000, odnosno 2,19-36,7/100.000 stanovnika, otvarajući pitanje da li zaista postoje geografske varijacije ili su one posledica značajnih razlika u metodološkom pristupu u različitim studijama (5-7). Naime, većina epidemioloških studija koje se odnose na retke i heterogene bolesti, kao što je SAMG, nose sa sobom određena ograničenja, kao što su obuhvatanje malog broja ispitanika, razlike u dijagnostičkim i inkluzionim kriterijuma pacijenata uključenih u istraživanje, što onemogućava njihovo adekvatno poređenje. I pored toga, istraživanja su saglasna sa opservacijom da širom sveta broj obolelih od SAMG raste i da je više nego udvostručen za poslednjih 20 godina, posebno u populaciji starijih osoba (5). Kao jedan od mogućih razloga porasta učestalosti autoimunih oboljenja u starijoj populaciji navodi se starenje imunog sistema (8). Oko 10% obolelih čine populaciju pedijatrijske SAMG, koja je definisana početkom simptoma pre 18. godine života (9). U epidemiološkoj studiji koja je obuhvatila populaciju obolelih od SAMG u Srbiji u dugom tridesetogodišnjem periodu od 01. januara 1979. do 31. decembra 2008. godine registrovana je prevalenciju SAMG od 188,3/1.000.000, dok je procenjena incidencija iznosila 13,3/1.000.000. Kao i u drugim epidemiološkim studijama tendencija porasta incidencije i prevalencije je potvrđena i u našoj populaciji obolelih (10). Pomenuti trend porasta incidencije i prevalencije SAMG objašnjava se, između ostalog, boljim prepoznavanjem i dijagnostikovanjem bolesti zahvaljujući dostupnijim dijagnostičkim testovima, savremenom terapijom koja doprinosi dužem preživljavanju obolelih, kao i globalnim produženjem životnog veka populacije u celini. (5,10).

Određene epidemiološke karakteristike SAMG su konzistentne u većini studija, ali još uvek nisu dovoljno objašnjene. Jedna od njih je bimodalna starosna distribucija sa dva pika oboljevanja. Prvi pik se beleži kod mlađih odraslih osoba, dominanto ženskog pola, sa najčešćim oboljevanjem oko 30-te godine života, nakon čega incidencija opada i ponovo se povećava nakon 50-te godine sa pikom u sedmoj deceniji života, nešto češće kod osoba muškog pola (5,11,12). Druga specifičnost u do sada sprovedenim epidemiološkim istraživanjima je etnička raznolikost koja se uočava kada se porede kohorte različitih rasa (5).

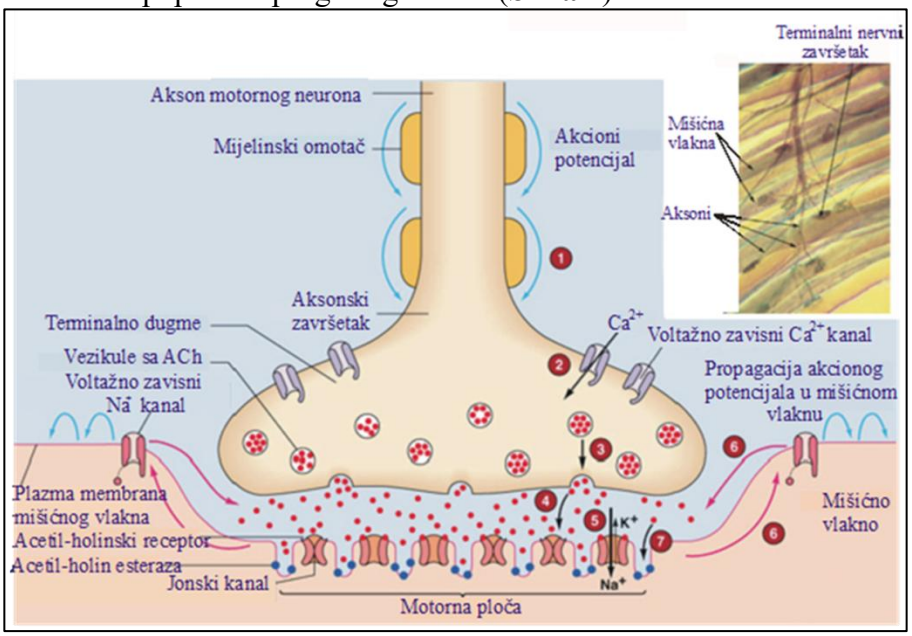
Pokazano je da rasne ili etničke karakteristike mogu uticati ne samo na učestalost javljanja, već i na inicijalnu kliničku prezentaciju SAMG i tok bolesti. U evropskoj populaciji bolest obično počinje u kasnijem životnom dobu. Među Azijatima, osobama hispano porekla i afroamerikancima

češće oboljevaju osobe ženskog pola u odnosu na evropsku populaciju (5,13). Rezultati jedne multi-rasne studije sprovedene u Južnoj Africi su pokazali da osobe crne rase češće razvijaju okularnu formu bolesti rezistentnu na terapiju, dok se kod osoba bele rase češće javlja teži generalizovani oblik SAMG sa lošijim terapijskim odgovorom i čestim mijasteničnim krizama (14). U azijskoj populaciji je utvrđena veća učestalost SAMG ranog početka sa predominantnim kliničkim ispoljavanjem u vidu izolovano okularne forme bolesti (15).

Od početka 20. veka do danas stopa mortaliteta od SAMG je dramatično opadala sa razvojem terapije, pre svega primenom inhibitora acetilholin esteraze, a zatim i imunosupresivne terapije. Pored toga, primena privremenih terapijskih postupaka, terapijskih izmena plazme (TIP) i imunoglobulina u intravenskoj infuziji (IvIg), kao i unapređenje lečenja pacijenata u jedinicama intenzivnog lečenja je u značajnoj meri uticalo na smanjenje mortaliteta SAMG. Tokom poslednje decenije uvođenje inovativne imunoterapije, inhibitora komplementa, monoklonskih antitela i blokatora neonatalnog receptora za Fc fragment imunoglobulina G, je takođe doprinelo smanjenju mortaliteta SAMG. Dosadašnje epidemiološke studije su pokazale da se stopa mortaliteta od SAMG kreće u rasponu od 5-9% i nešto je viša kod osoba muškog pola (16). Najvažniji prediktori smrtnog ishoda ovih pacijenata su godine starosti i postojanje respiratorne insuficijencije. Pored toga, pokazano je da infekcije respiratornog trakta najčešće doprinose smrtnom ishodu osoba sa SAMG (5). Sa druge strane, interesantno je zapažanje pojedinih istraživača da je učestalost srčanih, cerebrovaskularnih i malignih bolesti niža kod SAMG bolesnika u odnosu na opštu populaciju (5,17).

1.3 Anatomija i fiziologija nervno-mišićne spojnice

NMS predstavlja mesto prenosa signala između nervnih završetaka i mišićnih vlakana. Sastoji se iz presinaptičke membrane koju čini ćelijska membrana terminalnog završetka motornog nerva, sinaptičke pukotine (koja predstavlja prostor između pre- i postsinaptičke membrane) i nabrane postsinaptičke membrane poprečno-prugastog mišića (**Slika 1**).

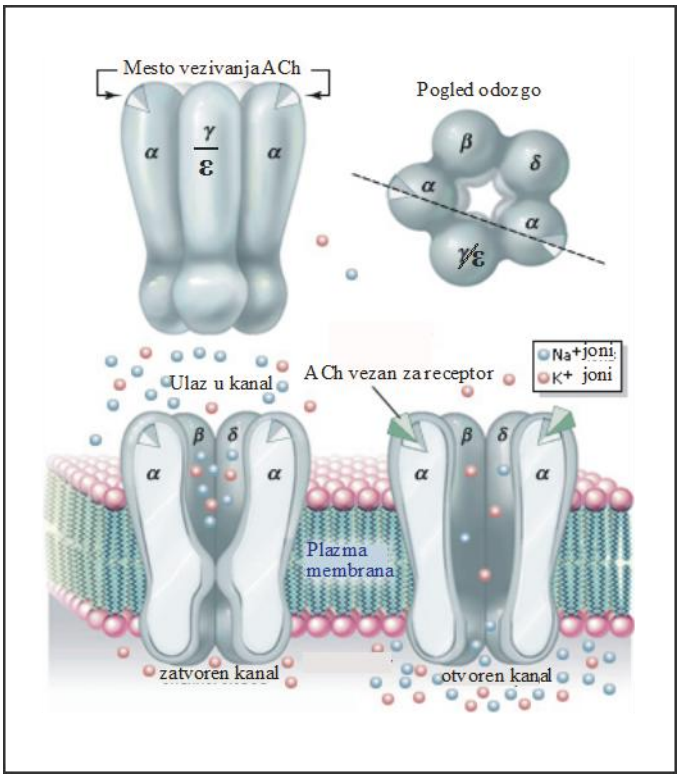


Slika 1. Anatomija i fiziologija nervno-mišićne spojnice (preuzeto iz reference 8)

Prenos signala kroz nervno-mišićnu spojnicu podrazumeva oslobađanje acetilholina (ACh) iz vezikula presinaptičke membrane egzocitozom i to nakon aktivacije voltažno zavisnih kalcijumskih kanala i influksa kalcijuma u nerve završetke. Oslobođeni ACh difunduje kroz bazalnu laminu sinaptičke pukotine i zatim se vezuje za nikotinski ACh receptor (nAChR) na postsinaptičkoj membrani mišića izazivajući akcioni potencijal miofibrila i njihovu kontrakciju. Nikotinski AChR je jonski kanal koji se nakon vezivanja ACh na kratko vreme otvara, dovodeći do influksa natrijumovih jona u mišićnu ćeliju, što dovodi do parcijalne depolarizacije postsinaptičke membrane mišića i generisanja ekscitatornog postsinaptičkog potencijala (EPSP) (**Slika 1**). Ukoliko broj otvorenih

natrijumovih kanala dostigne izvestan prag, generiše se mišićni akcioni potencijal na postsinaptičkoj membrani. Po odvajanju od nAChR molekuli ACh se u sinaptičkoj pukotini hidroliziraju uz pomoć enzima acetilholin esteraze (AChE), nakon čega se holin vraća u presinaptički nervni završetak ili molekuli ACh difunduju izvan regije motorne ploče. Količina oslobođenog ACh je obično veća od potrebne da izazove akcioni potencijal mišićnog vlakna, zbog čega je dejstvo AChE krucijalno, jer svojim efektom sprečava ponavljajuću aktivaciju nAChR. Dakle, efikasnost transmisije na nivou NMS je određena količinom oslobođenog ACh iz nervnog završetka, gustinom nAChR u postsinaptičkoj membrani, kao i gustinom voltažno-zavisnih natrijumovih kanala na postsinaptičkoj membrani mišića (18-20).

Kao što je poznato, nAChR je kompleksni transmembranski kiseli glikoprotein, koji ima veći ekstraćelijski, manji transmembranski i najmanji citoplazmatski deo (**Slika 2**).



Slika 2. Nikotinski acetilholinski receptor (preuzeto iz reference 8)

Receptor se sastoji od pet subjedinica i ima najmanje dve izoforme (21-23). U zrelom i uredno inervisanom poprečnoprugastom mišiću nalazi se izoforma sastavljena od dve α i po jedne β, δ i ε subjedinice, dok se u fetalnom i denervisanom mišiću nalazi izoforma kod koje je ε subjedinica zamenjena γ subjedinicom (24). Sve navedene subjedinice nAChR su raspoređene kružno i formiraju u sredini jonski kanal kroz koji posle vezivanja ACh za receptor dolazi do influksa natrijumovih jona u mišićno vlakno (25). Nikotinski AChR su međusobno povezani u grupe pomoću proteina rapsina, a svaka grupa receptora je vezana za citoskeletne elemente mišićnog vlakna pomoću distrofin-glikoproteinskog kompleksa (26, 27). U toku embriogeneze, a i kasnije, funkcionalnu organizaciju nAChR i njihovu postsinaptičku agregaciju ostvaruje protein agrin putem aktivacije mišićno specifične tirozin kinaze (eng. *muscle specific receptor tyrosine kinase*, MuSK) (28). Nikotinski AChR su najgušće lokalizovani u predelu motorne ploče, na vrhovima sekundarnih sinaptičkih nabora, a u znatno manjem broju i na ostalim delovima ćelijske membrane mišića (20, 29).

Poremećaji na nivou NMS ometaju niz događaja koji omogućavaju adekvatnu kontrakciju mišića. Kod pacijenata sa SAMG faktor sigurnosti nervno-mišićne transmisije narušen je na postsinaptičkom nivou, gde svi EPSP ne uspevaju da pređu prag i izazovu generisanje akcionog potencijala mišićnog vlakna. Neefikasna nervno-mišićna transmisija se u ovom slučaju klinički ogleda u mišićnoj slabosti, a elektrofiziološki se manifestuje padom amplitude zbirnog akcionog

potencijala mišića (eng. *compound muscle action potential*, CMAP) tokom testa nervno-mišićne transmisije (TNT) i produženog kašnjenja ili bloka potencijala pojedinačnih mišićnih vlakana registrovanih elektromiografijom pojedinačnog mišićnog vlakna (eng. *single-fiber electromyography*, SFEMG) (18, 30).

1.4 Patofiziologija SAMG

SAMG je autoimuna bolest posredovana autoantitelima protiv specifičnih antigena postsinaptičke membrane nervno-mišićne spojnice. Najčešća se radi o autoantitelima usmerenim prema nAChR i MuSK, a mnogo ređe su prisutna autoantitela na protein 4 srodan receptoru lipoproteina niske gustine (eng. *low-density lipoprotein receptor-related protein 4,* LRP4). (31, 32). Patogeni značaj ovih antitela je dokazan mogućnošću pasivnog prenosa SAMG sa obolelog čoveka na miša pasivnim prenosom imunoglobulina G (IgG), pojavom tranzitorne neonatalne MG kod novorođenčadi majki obolelih od SAMG, otkrivanjem depozita IgG i komplementa na motornim pločama bolesnika sa SAMG i konačno povoljnim učinkom terapijskih izmena plazme na tok bolesti (23, 33-35). Kod nekih bolesnika se u serumu ne detektuju prethodno navedena autoantitela i tada govorimo o seronegativnoj SAMG. Međutim, poznato je da kod pojedinih pacijenata iz ove grupe u serumu mogu postojati autoantitela sa niskim afinitetom za nAChR (eng. *low affinty AchR-antibodies*) koja se ne mogu detektovati standardnim dijagnostičkim testovima. Pored pomenutih autoantitela, kod obolelih od SAMG detektovana su i autoantitela usmerena prema drugim antigenima NMS, kao što su agrin, kalijumski kanal Kv1.4, rapsin, kortaktin, AChE, kolagen Q i kolagen XIII. Međutim, patogenost i specifičnost ovih autoantitela kod obolelih od SAMG, kao i njihova dijagnostička ili prognostička vrednost još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (23, 32).

1.4.1 SAMG posredovana nAChR autoantitelima

SAMG je T ćelijski zavisna i B ćelijski posredovana autoimuna bolest NMS. Najčešće su prisutna autoantitela usmerena prema nAChR koja se detektuju kod oko 85% bolesnika sa generalizovanom i kod 50-70% onih sa izolovanom okularnom formom SAMG (12, 36, 37). Anti-nAChR antitela dominantno pripadaju potklasama imunoglobulina (Ig) IgG1 i IgG3 i potiču od dugoživećih plazma ćelija koje su proizvedene od strane B ćelija u hiperplastičnom timusu i drugim tkivima retikuloendotelijalnog sistema. Anti-nAChR antitela ispoljavaju patološki efekat na NMS putem nekoliko različitih mehanizama. Pokazano je da je najvažniji mehanizam aktivacija sistema komplementa i posledična liza i destrukcija postisinaptičke membrane NMS, te smanjenje broja nAChR, a samim tim i narušenje sigurnosnog faktora NMS i oštećenje transmisije na ovom nivou. Svoj efekat anti-nAChR antitela ostvaruju i blokiranjem nAChR, kao i unakrsnim vezivanjem nAChR, što dovodi do endocitoze i posledičnog smanjenja broja nAChR na NMS. Dokazano je, takođe, da se anti-nAChR autoantitela mogu vezivati za različita mesta na nAChR, ali su najčešće usmerena prema glavnom imunogenom regionu α subjedinice ovog receptora (37-40). Dosadašnja iskustva ukazuju da ne postoji jasna korelacija između titra anti-nAChR antitela u serumu bolesnika i težine kliničke slike, što se objašnjava heterogenošću ovih antitela. Za razilku od ovoga, kod svakog pojedinačnog pacijenta titar antitela prati težinu kliničke slike, što je značajno za praćenje efekata terapije i toka bolesti (8).

1.4.2 SAMG posredovana MuSK autoantitelima

MuSK je protein mišićne membrane, koji se sastoji iz ekstracelularnog dela, transmembranskog heliksa i citoplazmatskog dela sa aktivnošću tirozin kinaze. Ekstracelularni domen uključuje tri regiona slična imunoglobulinu za koji se vezuju anti-MuSK antitela (41, 42).
Anti-MuSK antitela se detektuju u oko 6% svih SAMG pacijenata, odnosno kod oko 40% anti-nAChR seronegativnih bolesnika. Učestalost ovih antitela varira među različitim zemljama sa nižom prevalencijom u severnoj Evropi i višom u oblasti Mediterana potencijalno uslovljeno genetičkim razlikama u pomenutim sredinama. Naime, istraživanja su pokazala da u mediteranskim populacijama postoji veća učestalost HLA-DR14 i HLA-DR16 haplotipova, koji su povezani sa

većim rizikom od razvoja MuSK-SAMG (23, 43-46). Za razliku od anti-nAChR antitela, anti-MuSK antitela pripadaju pretežno IgG4 potklasi imunoglobulina G i uglavnom su funkcionalno monovalentna. Ova osobina ih čini sposobnim za vezivanje jednog specifičnog antigena zbog čega svoje dejstvo ostvaruju samo jednim mehanizmom koji ne uključuje aktivaciju sistema komplementa, a što je važno sa terapijskog stanovišta. Pokazano je da MuSK antitela svoje dejstvo ostvaruju inhibicijom interakcije MuSK i LRP4 čime sprečavaju agrin-zavisno i agrin-nezavisno grupisanje nAChR u regiji motorne ploče (23, 47-50). Neka istraživanja pokazuju da je serumska koncentracija anti-MuSK antitela u pozitivnoj korelaciji sa težinom kliničke slike SAMG, za razliku od koncentracije anti-nAChR antitela (23, 51).

1.4.3 SAMG posredovana LRP4 autoantitelima

LRP4 je transmembranski protein koji sadrži nekoliko domena lipoproteina niske gustine. On ima centralnu ulogu u razvoju nervno-mišićne spojnice i održavanju njene stabilnosti. LRP4 je receptor za agrin i prenosi njegov signal na MuSK u funkciji grupisanja nAChR na NMS (52). LRP4 autoantitela svoj efekat ostvaruju inhibicijom LRP4-agrin interakcije, ali je od značaja i činjenica da shodno tome što pripadaju IgG1 potklasi IgG, ova antitela imaju i sposobnost aktivacije komplementa što je pokazano u *in vitro* studijama (23, 53, 54).

Učestalost LRP4 antitela u bolesnika sa SAMG se značajno razlikuje u različitim studijama i kreće se u rasponu od 2-45 %. Razlog ovome verovatno leži u različitoj metodologiji koja je korišćena za detekciju antitela (ELISA, RIA ili CBA), razlikama u vrsti antigena koji je korišćen, (životinjski ili humani), kao i u različitim sredinama u kojima je istraživanje sprovedeno (23, 54-56). Studije koje su obuhvatile pacijente kineske populacije pokazale su da su LRP4 antitela zastupljena u nižem procentu u odnosu na učestalost njihovog javljanja u zapadnim zemljama i registrovana su kod svega 1-2,9% duplo seronegativnih, odnosno 0,8-1,7% svih SAMG bolesnika (57, 58). Sa druge strane, u multicentričnoj studiji koja je sprovedena na teritoriji evropskog kontinenta, a u kojoj je analizirana učestalost LRP4 antitela kod obolelih sa SAMG, pokazano je da su pomenuta antitela detektovana kod 19% duplo seronegativnih, odnosno kod 2% svih SAMG bolesnika, sa značajnom varijabilnošću njihovog prisustva u različitim sredinama (od 7% u Norveškoj i Poljskoj do 33% u Turskoj). Takođe, zabeleženo je i udruženo javljanje specifičnih antitela kod pojedinih pacijenata, pa su tako LRP4 antitela registrovana kod 15-20% SAMG bolesnika sa prisutnim anti-MuSK antitelima, kao i kod 7,5% bolesnika sa anti-nAChR antitelima (23, 59). Važno je napomenuti da je LRP4 pored NMS, prisutan i u motornim neuronima mozga i shodno tome nije neobično da su anti-LRP4 antitela detektovana i kod 10-23% obolelih od amiotrofične lateralne skleroze, što se može objasniti sekundarnim imunskim odgovorom na degeneracijom oslobođene do tada sakrivene antigene (60, 61). Dakle, LRP4 antitela nisu ekskluzivno specifična za SAMG, ali njihova detekcija u korelaciji sa kliničkom slikom može doprineti postavljanju dijagnoze SAMG (23).

1.4.4 Specifičnost NMS ekstraokularnih mišića

Kod 40-50% bolesnika sa SAMG kao inicijalni simptom bolesti javlja se slabost i zamorljivost ekstraokularnih mišića (EOM), najčešće u vidu promenljivog spuštanja kapaka i/ili postojanja duplih slika. Takođe, zahvaćenost EOM postoji kod više od polovine svih obolelih od SAMG tokom perioda trajanja bolesti (12).

Smatra se da se povećana osetljivost EOM kod SAMG može povezati sa postojanjem specifičnih strukturnih i molekularnih karakteristika ovih mišića koje su različite u odnosu na druge poprečno-prugaste mišiće. Naime, eksperimentalno je pokazano da NMS EOM ima manje izražene postsinaptičke nabore sa redukovanim brojem nAChR (62, 63), kao i da postoji snižena ekspresija regulatornih faktora, kao što je faktor koji pospešuje lizu komplementa ("decay-accelerating factor"), zbog čega dolazi do pojačane aktivacije komplementa posredovane autoantitelima na nivou NMS (64). Takođe, od značaja je i činjenica da jedino EOM eksprimiraju i adultnu ($\alpha 2\beta\varepsilon\delta$) i embrionalnu ($\alpha 2\beta\gamma\delta$) izoformu nAChR. Osobina embrionalne izoforme je da ima duže vreme otvaranja kanala i time veći afinitet za agoniste i da se pri tome i sporije oporavlja posle desenzibilizacije čime se

objašnjava manja prilagodljivost EOM na visokofrekventnu inervaciju i veću sklonost zamorljivosti nervno-mišićne transmisije (65, 66).

1.4.5 Uloga timusa u patogenezi SAMG

Timus je primarni limfoidni organ u kome se odvija diferencijacija T limfocita i uspostavlja centralna imunološka tolerancija. Ključni faktor u centralnoj toleranciji timusa je autoimuni regulator, koji kontroliše ekspresiju tkivno specifičnih antigena predstavljenih uglavnom epitelnim ćelijama medule timusa. Poseban primer autoantigena je nAChR, koji se pored ekspresije u mišićima eksprimira i u mioidnim ćelijama u meduli timusa. Normalni imuni sistem rano odstranjuje autoreaktivne T ćelije tako što se one uništavaju u timusu tokom procesa centralne tolerancije, dok autotolerantni T limfociti nastavljaju svoju diferencijaciju i oslobađaju se u perifernu cirkulaciju. Poznato je, takođe, da je timus ključni izvor i regulatornih T limfocita koji doprinose imunološkoj regulaciji u fiziološkim uslovima i smatra se da je poremećaj njihove funkcije jedan od razloga za razvoj autoimunosti (67-75).

Brojnim dosadašnjim istraživanjima je utvrđena značajna uloga timusa u patogenezi SAMG udružene sa anti-nAChR autoantitelima. Naime, kod ovih bolesnika je nađena visoka učestalost strukturnih abnormalnosti timusa u vidu limfofolikularne hiperplazije ili timoma i pokazano je da je stepen limfofolikularne hiperplazije u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom anti-nAChR antitela u serumu (76). Uloga timusa u patogenezi SAMG je potvrđena povoljnim efektom timektomije koja se sprovede u ranoj fazi bolesti u populaciji mlađih bolesnika sa ovim oboljenjem (77), kao i indukcijom eksperimentalne autoimune MG kod miševa sa teškom kombinovanom imunodeficijencijom transplantacijom timusa bolesnika sa SAMG (78, 75).

Limfofolikularnu hiperplaziju timusa karakteriše prisustvo ektopičnih germinativnih centara u meduli timusa. Germinativni centri su inače karakteristika sekundarnih limfoidnih organa. U njima se odvija intenzivna proliferacija, diferencijacija i selekcija B limfocita. U hiperplastičnom timusu prisustvo antigena nAChR, antigen prezentujućih dendritičnih ćelija, autoreaktivnih T limfocita i B limfocita objašnjava genezu imunskog odgovora na nAChR (79, 80). Suština promena timusa kod SAMG je da se histološka struktura primarnog limfoidnog organa menja i poprima karakteristike sekundarnog limfoidnog organa te ju je teško razlikovati od histoloških karakteristika slezine. Do ovih promena dolazi pod uticajem više faktora. Uticaj neuroendokrine osovine u smislu stresom indukovanih hormonskih poremećaja u osoba sa posebnim imunogenetičkim osobinama, pre svega defektnim autoimunim regulatornim genom (*AIRE* gen), uz neposrednu indukciju virusnom infekcijom ili medikamentima, može pokrenuti patološke promene u timusu. Smatra se da u uslovima izmenjene timusne mikrosredine uzrokovane najverovatnije virusnom infekcijom i oslobađanjem proinflamatornih citokina dolazi do ekspresije dotle skrivenog antigena, nAChR, koji zbog defektnog autoimunog regulatora može izbeći negativnu selekciju u timusu. Pored toga, oslobađanje hemokina u okviru inflamatornog procesa može uticati na neovaskularne promene unutar timusa i narušiti krvno timusnu barijeru sa prodorom imunokompetentnih ćelija periferne krvi u timus. Dotle neeksprimiran ili pod dejstvom različitih faktora eksprimiran izmenjen nAChR mioidnih ćelija timusa biva preuzet i procesuiran od strane antigen prezentujućih ćelija kao autoantigen sa T i B ćelijskim odgovorom na nAChR. U centru neoantigenske stimulacije nastaju limfoidni folikuli, germinativni centri sa B limfocitima koji se transformišu u plazmocite sa primarnom produkcijom specifičnih anti-nAChR antitela koja ulaze u sistemsku cirkulaciju i prepoznaju nAChR skeletnih mišića i različitim mehanizmima dejstva uzrokuju poremećaj nervno-mišićne transmisije (79, 80).

Dok se limfofolikularna hiperplazija timusa najčešće sreće kod mladih žena, timom se dijagnostikuje najčešće posle 40. godine života sa podjednakom učestalošću kod pripadnika oba pola. Timom je redak i najčešće benigni tumor koji potiče od epitelnih ćelija timusa koja su oivičena T limfocitima (81). Pretpostavlja se da timomi potiču iz kortikalnih epitelnih ćelija, a deficit medularnih epitelnih ćelija, a samim tim i odsustvo autoimunog regulatora, objašnjava negativnu selekciju i senzibilizaciju T limfocita na nAChR (82). Potvrđeno je da u timomu nastaje produkcija autoreaktivnih T limfocita koja podstiču razvoj anti-nAChR pozitivne SAMG (83). Dosadašnje

studije su pokazale da pacijenti sa SAMG udruženom sa timomom češće imaju težu kliničku formu bolesti, sa lošijim tokom i ishodom i većom stopom mortaliteta (79).

Postoje brojni dokazi koju ukazuju da su i normalno timusno tkivo (*thymus persistens*) i involutivni odn. atrofični timus uključeni u patogenezu SAMG. Mikrodisekcijama je u tkivu atrofičnog i perzistentnog timusa utvrđeno postojanje sitnih germinativnih centara sa svim karakteristikama fokalne hiperplazije, čime se objašnjava patogeneza bolesti i kod pacijenata kod kojih rutinska histološka analiza ne ukazuje na postojanje hiperplazije timusa (84-86).

1.4.6 Uloga genetičkih faktora u patogenezi SAMG

Iako SAMG i druge autoimune bolesti nisu nasledne, čini se da genetička predispozicija ima značajnu ulogu u njenoj patogenezi. Prvi dokaz o genetičkoj predispoziciji za razvoj SAMG je pojava familijarnih slučajeva bolesti. Studije blizanaca su pokazale da je učestalost SAMG među monozigotnim blizancima (35%) veća nego kod dizigotnih blizanaca (3-4%) i istakla značaj genetičke predispozicije za razvoj SAMG (87).

Genetička predispozicija SAMG zasniva se na varijantama u genima koji determinišu antigene za MHC (glavni histokompatibilni kompleks) I i II klase, α subjedinicu nAChR, teške i lake lance IgG i T ćelijske receptore (11, 88). Tokom poslednje decenije smo svedoci značajnog pomaka u otkrivanju genetičke osnove SAMG upotrebom studija asocijacija na nivou genoma (eng. *genome-wide association studies* - GWAS). Ove studije su dizajnirane sa ciljem pronalaženja genomskog regiona udruženog sa određenim fenotipom i to ispitivanjem polimorfizama/varijanti pojedinačnog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms/Variants*, SNPs/SNVs). Ovi polimorfizmi predstavljaju najčešće genetičke varijante u određenoj populaciji, a nastaju zamenom jedne baze drugom u molekulu DNK. Ukoliko su pomenuti polimorfizmi lokalizovani unutar promotorskog regiona, oni mogu imati uticaj na vezivanje transkripcionih faktora i samim tim menjati nivo ekspresije određenih gena. Tako su studije asocijacije na nivou genoma omogućile identifikaciju lokusa koji su uključeni u imunski odgovor, kao i strukturnu organizaciju NMS, čime su identifikovani kao faktori rizika za razvoj SAMG udružene sa nAChR autoantitelima. Takođe, ove studije su ukazale na različite genetičke osnove obolelih od SAMG ranog i kasnog početka (89-93).

Inicijalna ispitivanja genetičke osnove SAMG pokazala su da je SAMG kao i druge autoimune bolesti udružena sa određenim *HLA* (humani leukocitni antigen) haplotipovima. Međutim, ovu povezanost je teško precizno mapirati jer mnogi haplotipovi sadrže različite kombinacije HLA gena (88). U do sada sprovedenim studijama se posebno izdvojio haplotip HLA-A1-B8-DR3-DQ2, poznat i kao AH8.1 (ili specifični aleli unutar ovog haplotipa). Naime, analize su pokazale da je ovaj haplotip udružen sa anti-nAChR antitelima posredovanom SAMG ranog početka u nekoliko evropskih populacija, prisutan posebno kod bolesnika sa limfofolikularnom hiperplazijom timusa (11, 94-97). Važno je istaći da je ovaj haplotip udružen i sa drugim autoimunim bolestima, imunološkom hiperreaktivnošću i rapidnom progresijom sindroma stečene imunodeficijencije što potkrepljuje hipotezu o zajedničkoj genetičkoj osnovi više autoimunih bolesti (11, 98; 99).

Brojni lokusi van *HLA* regiona kodiraju gene čiji različiti polimorfizmi povećavaju podložnost za oboljevanje od različitih autoimunih bolesti uključujući SAMG. Primeri ovih gena su *PTPN22*, *FCGR2*, *CHRNA1*, *CHRNB1*, kao i lokus za antigen 4 koji je udružen sa citotoksičnim T-limfocitima (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen*-4, *CTLA4*) (11, 100-102). Gen *PTPN22* kodira protein tirozin fosfatazu ne-receptorski tip 22, citoplazmatski protein koji ima značajnu ulogu u aktivaciji T-ćelijskog receptora, kao i regulatornih T ćelija. Poznato je da je ovaj gen udružen sa brojnim autoimunim bolestima kao što su sistemski eritemski lupus, tip I dijabetes melitus, Hašimoto tireoiditis, temporalni arteritis i reumatoidni artritis, a istraživanja su pokazala da polimorfizam R620W ovog gena značajno povećava rizik od obolevanja od SAMG (89, 103, 104). *FCGR2* gen kodira tip 2 receptor za Fc fragment IgG koji vezuje nakupljene Ig i antigen-antitelo komplekse i ima glavnu ulogu u ćelijskoj aktivaciji (105-107). *CHRNA1* i *CHRNB1* geni kodiraju alfa 1, odnosno beta 1 subjedinice nAChR, a njihove mutacije dovode do razvoja kongenitalnog mijasteničnog sindroma (108). Polimorfizmi ovih gena, sa druge strane, mogu uticati na ekspresiju odgovarajućih subjedinica nAChR te na taj način mogu uticati na smanjenje broja funkcionalnih nAChR NMS. Takođe,

izmenjena struktura subjedinica pomenutog receptora, može dovesti do promena u prepoznavanju nAChR na NMS i izmenjenog imunskog odgovora (89).

CTLA4 lokus je privukao posebnu pažnju s obzirom na to da ima značajnu ulogu u održavanju imunske tolerancije i predstavlja potencijalni ciljni protein u lečenju autoimunih i malignih bolesti (109-111). CTLA-4, poznat i kao CD152, je inhibitor imunskog odgovora i ispoljava se prolazno na aktiviranim CD4+ T-ćelijama i konstitutivno na regulatornim T-ćelijama. Ovaj antigen ima identične ligande (CD80/86 poznati i kao B7-1/2), kao i homologni ko-receptor CD28 čija je uloga gotovo antagonistička ulozi CTLA-4 antigena. Naime, vezivanje CD28 za CD80/86 ispoljenim na antigen prezentujućim ćelijama pospešuje preživljavanje i proliferaciju T limfocita, produkciju citokina i omogućava da T limfociti pomažu u sazrevanju B limfocita. CTLA-4 sa druge strane ima veći afinitet za ligande CD80/86 od CD28 i deluje kao negativni regulator T ćelijskog imunskog odgovora (112, 113).

Rezultati inicijalnih GWAS studija sprovedenih u populaciji obolelih na teritoriji Evrope i Azije bili su konzistentni u pogledu identifikacije gena odgovornog za udruženost različitih ali preklapajućih *CTLA4* varijanti jednog nukleotida sa SAMG udruženom sa nAChR autoantitelima (114-122). Međutim, kasnije sprovedena opsežnija studija na evropskoj populaciji koja je obuhvatila kohortu od 1800 pacijenata dala je oprečne rezultate (89). Smatra se da je jedan od razloga nekonzistentnosti rezultata genetičkih studija SAMG najverovatnije to što su dosadašnje studije obuhvatile mali broj ispitanika sa posledičnom neadekvatnom statističkom snagom, s obzirom na to da SAMG spada u retke bolesti ili pomenuta nekonzistentnost može biti posledica varijabilnosti alela koji utiču na razvoj SAMG u različitim populacijama obolelih (5, 123). Pored toga, imajući u vidu njihov dizajn, GWAS studije ne daju informacije o potencijalnim uzročnim varijantama jednog nukleotida u identifikovanom lokusu i njihovoj potencijalnoj funkcionalnoj ulozi kojom ostvaruju molekularni efekat i utiču na razvoj bolesti. Ova ograničenja mogu biti prevaziđena dodatnim *in silico* analizama i studijama asocijacije na nezavisnim kohortama. Tako je analiza koja integriše nalaze GWAS studija sa funkcionalnim genomskim informacijama specifičnim za ćelijski tip, kao što je genska ekspresija i organizacija hromatina, istakla *CTLA4* kao značajan lokus u patogenezi SAMG udružene sa nAChR autoantitelima (124). Pored toga, preporučuje se korišćenje statističkog finog mapiranja za identifikaciju potencijalno uzročnih varijanti jednog nukleotida tako što se inkorporiraju rezultati regionalne neravnoteže vezanosti gena (eng. linkage disequilibrium (LD) - neslučajna veza između dva gena) među različitim varijantama jednog nukleotida sa statistički visoko značajnim P vrednostima (89, 109, 125).

1.4.7 Uloga faktora spoljašnje sredine

Uticaj faktora spoljne sredine na varijabilnost i tok bolesti danas se ispituje sveobuhvatnim epidemiološkim studijama. Smatra se da neki od faktora spoljne sredine, najverovatnije virusna infekcija, mogu modifikovati efekat genetičke predispozicije i pokrenuti autoimuni proces oštećenjem tkiva i eksprimiranjem sopstvenih, skrivenih antigena imunokompetentnim ćelijama, što dovodi do njihove senzibilizacije, aktivacije i oštećenja postsinaptičke membrane mehanizmom molekulske mimikrije (8, 86, 101, 126-128). Pored virusne infekcije, kao mogući precipitirajući faktori razvoja simptoma SAMG spominju se stres, upotreba različitih lekova ili toksina. Od infektivnih uzročnika posebno se izdvajaju hepatitis C virus, Epštajn-Bar virus, citomegalovirus, humani T-limfotropni virus, virus Zapadnog Nila, a od nedavno i SARS-CoV-2 virus, koji pored inicijacije može uticati i na pogoršanje bolesti (129-131). Pored ovih faktora, u nekim studijama se kao potencijalni faktori navode i bakterijske i druge respiratorne infekcije, fizička trauma, hipertireoidizam ili upotreba tireoidnih hormona, operativne procedure (posebno tireoidektomija), trudnoća, porođaj, kao i alergijske reakcije (5).

1.4.8 Epigenetički faktori

Postoji više potencijalnih načina na koji faktori spoljašnje sredine utiču na ćelijski imunitet domaćina. Jedan od njih uključuje i epigenetičke faktore – metilaciju DNK, posttranslacione

modifikacije histona i mikroRNK (miRNK), koji regulišu ekspresiju gena bez modifikacije sekvence genomske DNK (132-134).

Potencijalni mehanizam uticaja faktora spoljašnje sredine na razvoj autoimunih bolesti dat je na primeru virusne infekcije. Naime, mnogi virusi mogu biti izvori egzogene dvolančane RNK koja može predstavljati vezu između faktora spoljašnje sredine i genetičkih faktora. U ovoj paradigmi, faktori spoljašnje sredine, kao što su virusi ili lekovi, putem interakcije genoma domaćina i egzogene dvolančane RNK mogu poremetiti nivoe miRNK domaćina i posledično narušiti ravnotežu imunskog sistema, što kod osoba sa genetičkom predispozicijom dovodi do pojačanog imunskog odgovora i razvoja autoimune bolesti (134).

MikroRNK su jednolančani nekodirajući RNK molekuli, veličine 20-25 nukleotida, koji se specifično vezuju za ciljne RNK i regulišu ekspresiju gena na post-transkripcionom nivou, te na taj način utiču na ćelijske procese. Na ovaj način miRNK imaju značajnu ulogu u patogenezi mnogih autoimunih bolesti, uključujući SAMG. Zbog njihove stabilnosti, visoke senzitivnosti i specifičnosti u ekstracelularnim tečnostima, miRNK se smatraju potencijalnim biomarkerima dijagnoze i prognoze bolesti. Dosadašnje studije su pokazale da heterogeno ispoljavanje SAMG u odnosu na prisustvo različitih autoantitela, godina početka bolesti i prisustvo timoma karakteriše povišen ili snižen nivo različitih miRNK (135). Tako je u nekoliko sprovedenih istraživanja pokazano da su nivoi miRNK-150-5p i miRNK-21-5p povišeni kod SAMG udružene sa nAChR autoantitelima, dok su nivoi miRNK-20b sniženi u ovoj grupi bolesnika (136, 137). Kod pacijenata sa SAMG udruženom sa MuSK autoantitelima pokazano je postojanje povišenog nivoa miRNK iz familije let-7, dok su nivoi miRNK-210-3p i miRNK-324-3p u ovoj grupi bolesnika sniženi u poređenju sa kontrolnim grupom zdravih ispitanika (138-140). Pokazano je, takođe, da pored dijagnostičkog značaja, nivoi miRNK mogu biti pokazatelji i prognoze bolesti. Tako je u istraživanju Sabrea i saradnika registrovan povišen nivo miRNK-30e-5p kod pacijenata sa okularnom formom SAMG koji se pokazao kao visoko senzitivan pokazatelj u diferencijaciji okularne i sekundarno generalizovane forme bolesti (141). Isti istraživači su pokazali i da se nivoi miRNK-21-5p, miRNK-30e-5p i miRNK-150-5p značajno smanjuju nakon primene imunosupresivne terapije i/ili timektomije (142). Pored navedenih mi-RNK, grupa istraživača iz Italije i Izraela je utvrdila i da miRNK-323b-3p, miRNK-409-3p i miRNK-485-3p, takođe, mogu biti biomarkeri terapijskog odgovora kod bolesnika sa SAMG (143).

Smatra se da je razlog postojanja heterogenosti u registrovanim nivoima različitih miRNK kod obolelih od SAMG korišćenje različitog biološkog materijala, kao i različitih metodologija za njihovu detekciju. Zbog toga su istraživači saglasni da postoji potreba za prospektivnim studijama koje bi obuhvatile veliki broj bolesnika, a u cilju definitivne potvrde uloge cirkulišućih miRNK u patogenezi i prognozi SAMG (135).

1.5 Klinička slika i klasifikacija SAMG

Osnovna klinička prezentacija SAMG je postojanje simptoma i znakova promenljive slabosti i zamorljivosti skeletnih mišića, sa poboljšanjem snage nakon odmora ili primene antiholinesterazne terapije. Pored toga, bolest se karakteriše izuzetnom varijabilnošću u kliničkom ispoljavanju sa postojanjem jasnih fluktuacija simptoma tokom dana, kao i tokom dužih vremenskih intervala (144-146).

1.5.1 Okularni simptomi

SAMG se kod više od polovine pacijenata inicijalno manifestuje slabošću i patološkom zamorljivošću EOM u vidu promenljive semiptoze ili ptoze kapaka, najčešće uz kompenzatornu kontrahovanost mišića čela, kao i postojanja diplopija, koje se u blažoj formi mogu manifestovati zamućenjem vida (146, 147). Inicijalno su ovi simptomi najčešće intermitentni, sa pogoršanjem tokom dana, najčešće u večernjim satima, tokom čitanja ili vožnje automobila, posebno pri jakom svetlu. Po pravilu, slabost i zamorljivost EOM je promenljiva i asimetrična, a prema rezultatima dosadašnjih studija pokazano je da je najčešće zahvaćen *m. rectus medialis* (144)

Dosadašnje studije su pokazale da kod više od polovine pacijenata sa SAMG kod kojih se bolest inicijalno prezentuje izolovanim okularnim simptomima, unutar dve godine od početka prvih

tegoba dolazi do progresije bolesti sa razvojem generalizovane slabosti i zamorljivosti drugih skeletnih mišića (148).

1.5.2 Bulbarni simptomi

Slabost orofaringealne muskulature se kao inicijalni simptom bolesti javlja u oko 15% SAMG pacijenata, dok se tokom trajanja bolesti ona može registrovati u oko 60% ispitanika (146). Karakteristična bulbarna simptomatologija koja se sreće kod SAMG bolesnika obuhvata slabost i zamorljivost mišića za žvakanje, sa poteškoćama pri žvakanju čvrste hrane, smetnjama pri gutanju, posebno tečnosti, sa vraćanjem tečnosti na nos, kao i smetnjama pri govoru u smislu govora kroz nos (disfonija sa rinolalijom). Kod pacijenata sa prisutnim izraženim slabostima orofaringealne muskulature javljaju su i smetnje sa disanjem. Usled slabosti i zamorljivosti mišića lica ovi bolesnici imaju nepotpunu emotivnu ekspresiju i karakteristično „režeći“ osmeh *(risus sardonicus*) (144, 146, 149).

Slabost i zamorljivost tokom govora kod pacijenata sa SAMG manifestuje se disfonijom sa rinolalijom i postojanjem dizartrije. Zbog slabosti laringealne muskulature glas može biti promukao i smanjenog volumena, međutim, afonija se nikada ne javlja. Ovi bolesnici često imaju slabost *m. orbicularis oris* što im otežava zviždanje, naduvavanje obraza, kao i izgovaranje određenih slova (144, 147, 149).

Disfagija nastaje usled slabosti usana, jezika, mastikatorne i faringealne muskulature. Pored toga što nosi rizik od aspiracije, izražena disfagija, kako tečnosti, tako i čvrste hrane, udruženo sa znacima slabosti mastikatorne muskulature i antefleksora vrata predstavlja značajan klinički pokazatelj preteće mijastenične krize. Klinički se mijastenična kriza prezentuje tipičnim znacima kao što su: otežano žvakanje usled slabosti mastikatornih i temporalnih mišića, smetnji sa gutanjem sa postojanjem nazalne regurgitacije tečnosti usled slabosti palatinalnih mišića, osećaja zastoja hrane u grlu usled slabosti gornjih faringealnih mišića, kao i gubitka u telesnoj težini usled svih navedenih poteškoća tokom uzimanja obroka (144, 147, 149, 150).

1.5.3 Simptomi trupa, ekstremiteta i respiratorne muskulature

Bolesnici kod kojih su zahvaćeni mišići trupa i ekstremiteta obično se žale na poteškoće i zamor pri obavljanju uobičajenih svakodnevnih aktivnosti kao što su pranje kose, umivanje, brijanje, češljanje, prostiranje veša, teškoće pri penjanju ili silaženju niz stepenice, kao i ustajanju sa stolice (149).

Slabost i zamorljivost može zahvatiti bilo koji mišić trupa i ekstremiteta, ali se pojedine mišićne grupe karakterišu postojanjem izraženijih slabosti. Tako se po pravilu kod SAMG pacijenata registruje veći stepen slabosti antefleksora vrata u odnosu na ekstenzore vratne muskulature, dok su na ekstremitetima obično izraženije zahvaćeni *m. deltoideus*, *m. triceps brachii*, ekstenzori ručja i prstiju, kao i dorzifleksori stopala. Pored toga, kod ovih pacijenata se češće registruje veći stepen slabosti mišića ruku u odnosu na mišiće donjih ekstremiteta (144, 146, 147, 149).

Slabost respiratorne muskulature manifestuje se korišćenjem pomoćne muskulature tokom disanja, dok se u ležećem položaju može javiti i ortopneja kada je slabošću zahvaćena i dijafragma. U težim slučajevima slabost respiratornih mišića izaziva mijasteničnu krizu sa potrebom za intubacijom i mehaničkom ventilacijom (147, 149).

1.5.4 Atipične kliničke manifestacije SAMG

Poznato je, takođe, da se kod manjeg broja bolesnika može javiti i slabost mišića koji nisu tipično zahvaćeni kod SAMG, kao što su slušni mišići sa hiperakuzijom (*m. stapedius* ili *m. tensor tympani*), zatim, voljni mišići kao što su sfinkteri bešike i creva ili izolovana zahvaćenost distalnih mišića ekstremiteta, kao što su ekstenzori prstiju šaka, sa sindromom visećih šaka, ili dorzifleksora stopala (8, 36, 151, 152).

Iako retko, kod nekih bolesnika se klinička slika obogaćuje i znacima blage ili umerene vegetativne disfunkcije, sa hiperhidrozom, sijalorejom, arterijskom hipo- ili hipertenzijom, izmenom ukusa i sl.

SAMG može imati i izolovanu, tzv. "fokalnu formu", koju karakteriše dugotrajna izolovana slabost jednog ili grupe mišića sa istom funkcijom. Na ovu slabost se ne može značajno uticati primenjenom terapijom, što često dovodi do dijagnostičkih problema (8, 36; 151-154).

1.6 MGFA klasifikacija SAMG

Literatura opisuje više kliničkih i imunoloških podtipova SAMG. Prvu, široko prihvaćenu, kliničku klasifikaciju predložio je pedesetih godina prošlog veka Oserman (Osserman), koja je maja 1997. godine modifikovana od strane američke fondacije za MG (*eng. Myasthenia Gravis Foundation of America*, MGFA) (155-157). Prema ovoj klasifikaciji postoji pet formi SAMG, od kojih su dve glavne: okularna i generalizovana forma SAMG (**Tabela 1**). U okviru generalizovane forme postoji više podtipova generalizovanog ispoljavanja u odnosu na stepen težine bolesti (forme II, III i IV), kao i predominantno zahvaćene mišićne grupe. Forme II, III i IV imaju po 2 podtipa: podtip „a" označava predominantnu zahvaćenost mišića trupa i ekstremiteta uz moguće prisustvo blaže zahvaćenosti orofaringealnih mišića, dok podtip „b" označava predominantnu zahvaćenost orofaringealnih i/ili respiratornih mišića sa mogućom blažom afekcijom mišića trupa i ekstremiteta (157).

Tabela 1. MGFA (*eng. Myasthenia Gravis Foundation of America*) klasifikacija težine kliničke slike stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG)

Forma SAMG	**Kliničke manifestacije bolesti**
I	Isključivo okularna simptomatologija; moguća zamorljivost *m. orbicularis oculi*
II	Blaga slabost i zamorljivost koja zahvata mišiće trupa, ekstremiteta i bulbarne mišiće, sa ili bez slabosti ekstraokularnih mišića različite težine.
IIa	Blaga slabost predominantno mišića trupa i/ili ekstremiteta
IIb	Blaga slabost predominantno bulbarne i/ili respiratorne muskulature
III	Umerena slabost i zamorljivost koja zahvata mišiće trupa, ekstremiteta i bulbarne mišiće, sa ili bez slabosti ekstraokularnih mišića različite težine.
IIIa	Umerena slabost predominantno mišića trupa i/ili ekstremiteta
IIIb	Umerena slabost predominantno bulbarne i/ili respiratorne muskulature
IV	Teška slabost i zamorljivost koja zahvata mišiće trupa, ekstremiteta i bulbarne mišiće, sa ili bez slabosti ekstraokularnih mišića različite težine.
IVa	Teška slabost predominantno mišića trupa i/ili ekstremiteta
IVb	Teška slabost predominantno bulbarne i/ili respiratorne muskulature
V	Mijastenična kriza koja zahteva intubaciju sa ili bez mehaničke ventilacije. Ova forma se ne odnosi na intubaciju u toku rutinske

	operacije. Takođe, korišćenje nazogastrične sonde bez intubacije svrstava bolesnika u formu IVb.

1.7 Dijagnoza

1.7.1 Klinička dijagnoza

Klinička dijagnoza SAMG se postavlja nakon dobijanja tipičnih anamnestičkih podataka o postojanju slabosti i prekomerne zamorljivosti skeletnih mišića i neurološkog pregleda koji obavezno mora obuhvatiti i testove zamorljivosti.

Kod pacijenata sa okularnom formom bolesti neurološkim pregledom se registruje unilateralna ili bilateralna semiptoza ili ptoza, koja se može potencirati testovima zamorljivosti u vidu produženog pogleda naviše. Pored toga, u specifične dijagnostičke testove OSAMG spadaju i test ukrštene potencijacije semiptoze i Koganov test. Tokom testa ukrštene potencijacije semiptoze dolazi do spuštanja kapka nezahvaćenog oka pasivnim podizanjem spuštenog kapka zahvaćenog oka (**Slika 3**). Koganov test ("Cogan's lid twitch") se smatra specifičnijim kliničkim znakom OSAMG i podrazumeva trzaj gornjeg očnog kapka naviše pri promeni pravca pogleda ka primarnom položaju nakon relaksacije podizača kapka tokom dugotrajnog pogleda naniže (37, 157). U svakodnevnoj kliničkoj praksi koristi se i test forsiranog zatvaranja očiju tokom koga pacijent forsirano zatvori oči u trajanju od 5-10 sekundi i po otvaranju očiju fiksira predmet u primarnom položaju. Pozitivnim testom se smatra trzaj gornjeg očnog kapka naviše nakon kojeg dolazi do spuštanja kapka (37).



Slika 3. Test ukrštene potencijacije semiptoze - pasivnom elevacijom spuštenog kapka zahvaćenog oka dolazi do spuštanja kapka nezahvaćenog oka (slike iz lične arhive ustupljene ljubaznošću prof. dr Slobodana Apostolskog)

Važno je napomenuti da oftalmopareza kod OSAMG može podsećati na poremećaj motiliteta bulbusa koji se javlja i u drugim bolestima, uključujući lezije kranijalnih nerava, tireoidnu oftalmopatiju, orbitalni miozitis, okularnu miopatiju, progresivnu eksternu oftalmoplegiju, unilateralnu ili bilateralnu internuklearnu oftalmoplegiju. Osnovna karakteristika eksterne oftalmopareze ili oftalmoplegije koja se sreće kod OSAMG je pošteđenost glatkih mišića oka, kao i uredan nalaz na zenicama što se registruje u objektivnom nalazu pacijenata sa internom oftalmoplegijom (37). Takođe, od značaja je i opservacija da je devijacija očnih osovina kod pacijenata sa OSAMG uglavnom inkomitantna (nejednaka u različitim pravcima pogleda), dok komitantna devijacija (jednaka u različitim pravcima pogleda) najčešće predstavlja kongenitalnu foriju ili nastaje kao posledica oštećenja moždanog stabla ili cerebeluma (159, 160).

Imajući sve navedeno u vidu možemo zaključiti da postavljanje pravovremene dijagnoze OSAMG može u nekim slučajevima predstavljati izazov. Neretko se dešava da u ovoj populaciji obolelih postoji značajno dijagnostičko kašnjenje, često kao posledica sprovođenja ekstenzivnih dijagnostičkih postupaka, kao što su magnetna rezonanca endokranijuma, genetički i ostali laboratorijski testovi koji su često neophodni za isključenje drugih uzroka oftalmopareze (37).

Pri kliničkoj evaluaciji generalizovanih formi bolesti u neurološkom pregledu koriste se sledeći testovi zamorljivosti (161):

- ✓ Test gutanja koji podrazumeva sukcesivna četiri gutljaja vode, tj. oko polovine čaše, pri čemu se pozitivnim testom smatra postojanje minimalnog zakašljavanja, a ozbiljnijim nalazom ukoliko dođe do zagrcnjavanja ili nazalne regurgitacije tečnosti.
- ✓ Test brojanja koji se izvodi tako što se bolesniku da nalog da broji naglas do 50. Pojava dizartrije sa disfonijom i rinolalijom tokom brojanja smatra se pozitivnim nalazom.
- ✓ Zamorljivost ruku se testira produženom elevacijom ruku pod uglom od 90 stepeni u odnosu na telo tokom minimum 240 sekundi.
- ✓ Snaga stiska šake se testira dinamometrijski, pri čemu se slabošću smatra snaga stiska šake manja od 45 kgW za muškarce, odnosno 30 kgW za žene.
- ✓ Zamorljivost fleksora vrata testira se u ležećem položaju uz odignutu glavu pod uglom od 45 stepeni u odnosu na podlogu tokom trajanja od najmanje 120 sekundi.
- ✓ Zamorljivost donjih ekstremiteta se testira u ležećem položaju uz produženu elevaciju ekstendirane noge pod uglom od 45 stepeni u odnosu na podlogu u trajanju od najmanje 100 sekundi.

1.7.2 Klinički testovi

Osnova dijagnoze SAMG leži u kliničkom prepoznavanju i registrovanju simptoma i znakova promenljive slabosti i zamorljivosti skeletnih mišića, ali je dijagnozu potrebno potvrditi i specifičnim dijagnostičkim testovima. U tom smislu su test sa kockicom leda, kao i testovi odmora i spavanja od značaja za pacijente sa OSAMG (65).



Slika 4. Test sa kockom leda – nakon stavljanja leda na zatvoreno desno oko bolesnika tokom 2 minuta uočena je redukcija semiptoze desnog kapka (slike iz lične arhive ustupljene ljubaznošću prof. dr Slobodana Apostolskog)

Klinička procena semiptoze ili ptoze, kao i pokretljivosti bulbusa vrši se pre i nakon 2-5 minuta od aplikacije kockice leda na pacijentove zatvorene očne kapke (**Slika 4**), zatim nakon što je pacijent držao kapke zatvorene tokom perioda od 5 minuta (test odmora) ili nakon što je pacijent spavao ili se odmarao tokom perioda od 30 minuta (test spavanja). Test sa kockicom leda je visoko senzitivan i specifičan za OSAMG, dok su testovi odmora i spavanja specifični, ali ne i u potpunosti senzitivni, s obzirom na to da se kod nekih pacijenata sa OSAMG ne registruje pozitivan odgovor (65, 162-164).

1.7.3 Farmakološki testovi

Poznato je da kod pacijenata sa SAMG inhibitori holinesteraze poboljšavaju nervno-mišićnu transmisiju tako što produžavaju poluživot acetilholina u regiji motorne ploče. Pozitivan odgovor na primenu inhibitora holinesteraze, u smislu značajnog poboljšanja ili čak kratkotrajnog otklanjanja svih simptoma bolesti, jasno govori u prilog dijagnoze SAMG.

U svakodnevnoj kliničkoj praksi rutinski se sprovodi prostigminski test aplikacijom neostigmina (1–2 mg, s.c. ili i.m.) ili piridostigmina (60 mg, oralno). Za razliku od tenzilonskog testa

koji je brz i visoko senzitivan (u preko 90%), ali koji nosi rizik od pojave ozbiljnih komplikacija, prostigminski test je manje senzitivan i zahteva više vremena, ali je potpuno bezbedan i pristupačan za sprovođenje u svim uslovima. Daje pozitivan rezultat u oko 75% bolesnika sa SAMG (65, 166). Primer pozitivnog prostigminskog testa prikazan je na **Slici 5**.



Slika 5. Pozitivan prostigminski test (slike iz lične arhive ustupljene ljubaznošću prof. dr Slobodana Apostolskog)

U dijagnostici OSAMG specifičnost prostigminskog testa je niska, imajući u vidu da se izvesno poboljšanje mišićne snage EOM može registrovati i kod drugih oboljenja, kao što su kongenitalni mijastenični sindromi, Lambert-Eaton-ov mijastenični sindrom, botulizam, kranijalne neuropatije, mitohondrijalne miopatije, kao i kod pacijenata sa intrakranijalnim tumorima (65).

1.7.4 Seološko testiranje

Imunološka potvrda dijagnoze SAMG obuhvata primenu seroloških testova za detekciju specifičnih autoantitela. U rutinskoj dijagnostici određuje se koncentracija anti-nAChR i anti-MuSK antitela. Anti-nAChR antitela detektuju se standardnom radioimunoesej (*eng. radioimmunoassay*, RIA) metodom imunoprecipitacije humanog nAChR obeleženog alfa-bungarotoksinom i visoko su specifična za SAMG. Apsolutna koncentracija ovih antitela u serumu nije indikator težine bolesti, međutim, posmatrano individualno korelira sa težinom bolesti i povezana je sa povoljnim odgovorom na primenjenu terapiju (36).

U grupi seronegativnih nAChR SAMG bolesnika rutinski se određuje koncentracija anti-MuSK antitela RIA metodom (36, 38).

Pozitivan nalaz pomenutih antitela potvrđuje dijagnozu, bez dalje potrebe za elektrofiziološkim testiranjem.

Dosadašnje studije su pokazale da je senzitivnost laboratorijskog testa detekcije anti-nAChR antitela u serumu veoma visoka kod pacijenata sa generalizovanom formom bolesti (80-90%), dok se kod OSAMG ona dugo kretala se u rasponu od 40-70% (65). Međutim, zahvaljujući razvoju tehnika molekularne dijagnostike (eng. *cell-based assays*) u kojima se autoantitela vezuju za antigene grupisane na membrani ćelija u kulturi, učestalost pozitivnih nalaza anti-nAChR antitela u ovoj subpopulaciji pacijenata sa SAMG je porasla na preko 70% (148, 167).

Kada govorimo o anti-MuSK antitelima, ona se detektuju kod 38-54% seronegativnih nAChR pacijenata. Međutim, ona su veoma retko prisutna kod izolovano okularne forme bolesti (168).

U slučaju duplo seronegativne SAMG, sa odsustvom i anti-nAChR i anti-MuSK antitela, preporučuje se testiranje na LRP4 autoantitela, koja se u našoj zemlji još uvek ne rade rutinski imajući u vidu nedostatak komercijalnih testova za njihovu detekciju.

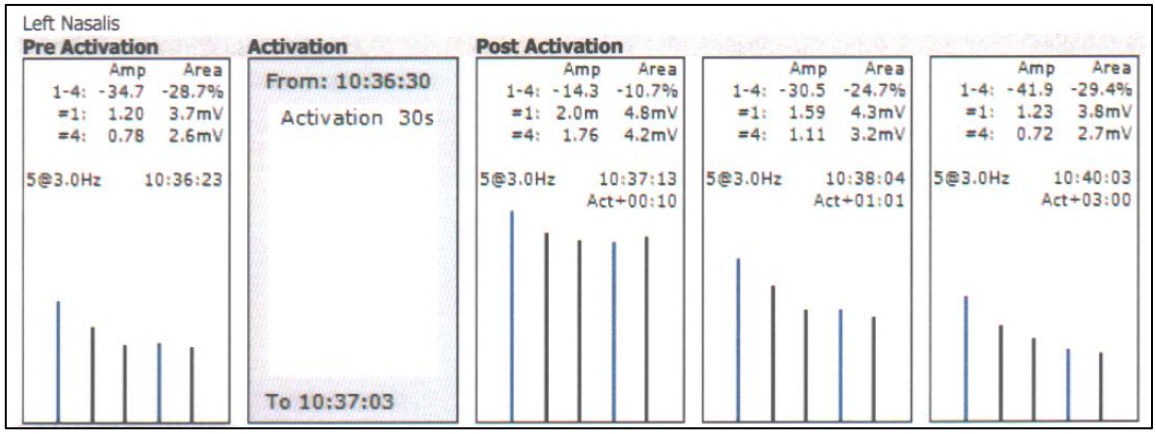
Kod svih bolesnika sa SAMG, posebno starije životne dobi sa radiološki suspektnim tumorom timusa, preporučuje se određivanje nivoa serumskih antitela na titin i rijanodinski receptor. Pored navedenih, postoje i druga retka autoantitela usmerena prema različitim antigenima postsinaptičke membrane mišića, međutim ona se još uvek ne rade rutinski u okviru dijagnostičkog postupka kod obolelih sa SAMG, što ograničava njihov značaj u dijagnostičkom smislu (169).

Kod bolesnika sa klinički suspektnom OSAMG kao potencijalni biomarker koji govori u prilog autoimunskoj patogenezi oftalmopareze pominje se i prisustvo kappa lakih lanaca imunoglobulina u serumu. Naime, u nedavno sprovedenom istraživanju zabeleženo je da su nivoi kappa lakih lanaca imunoglobulina bili značajno povišeni kod bolesnika sa SAMG, uključujući duplo seronegativne i pacijente sa OSAMG u poređenju sa zdravim kontrolama (170).

1.7.5 Elektrofiziološke studije

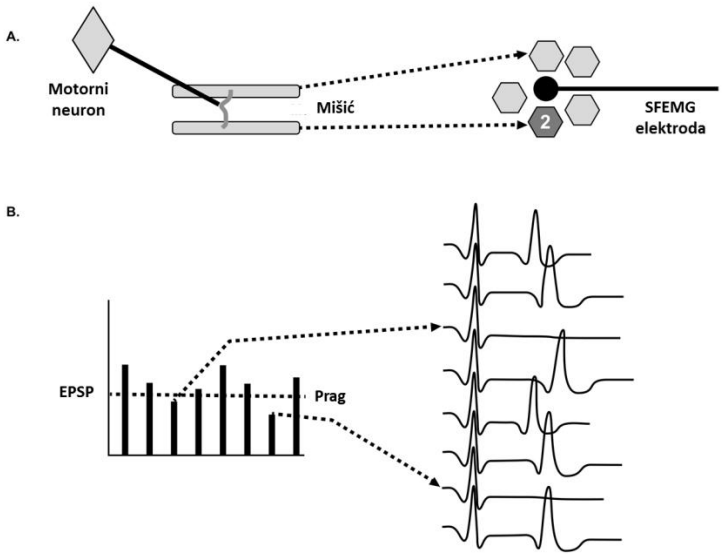
Elektrofiziološko testiranje bolesnika sa SAMG se započinje testom niskofrekventne repetitivne stimulacije nerva, tj. testom nervno-mišićne transmisije (TNT), dok je u slučaju negativnog nalaza ispitivanje potrebno dopuniti i elektromiografijom pojedinačnog mišićnog vlakna, tj. *single fibre* elektromiografijom (SFEMG).

Tokom TNT se primenom supramaksimalne stimulacije, obično frekvencijom od 3 Hz, registruje pad amplitude zbirnog akcionog potencijala mišića između prvog i četvrtog ili petog stimulusa. Pozitivnim nalazom se smatra dekrementni odgovor koji je veći od 10% (**Slika 6**). On se sreće kod oko 2/3 bolesnika sa generalizovanom i u oko 30-50% bolesnika sa okularnom formom bolesti (171).



Slika 6. Elektrofiziološki zapis tokom testa nervno-mišićne transmisije - elektrofiziološki zapis kod bolesnika sa SAMG pre i nakon aktivacije mišića u trajanju od 30s (slike iz lične arhive ustupljene ljubaznošću prof. dr Slobodana Apostolskog)

SFEMG registruje potencijale pojedinačnih mišićnih vlakana i njihovo kašnjenje-*jitter* između dva ili više vlakna iste motorne jedinice (**Slika 7**). Karakterističan nalaz kod SAMG je produženje *jittera* preko 60 mikrosekundi i fenomen bloka impulsa uz normalnu gustinu motornih vlakana. Senzitivnost SFEMG iznosi od 79–100% za okularnu i 100% za generalizovanu formu bolesti, (173). Međutim, pokazano je da se pozitivna SFEMG može javiti i kod drugih poremećaja nervno-mišićne spojnice, kao što su Lambert-Eaton-ov mijastenični sindrom, botulizam i kongenitalni mijastenični sindromi, ali i kod hronične progresivne oftalmoplegije, nepotpunog Miler-Fišerovog sindroma ili može nastati jatrogeno nakon aplikacije botulinskog toksina, što otežava postavljanje dijagnoze izolovane okularne forme SAMG samo na osnovu pozitivnosti SFEMG (174).



Slika 7. Elektrofiziološki zapis tokom *single fibre* elektromiografije (SFEMG) kod bolesnika sa stečenom autoimunom mijastenijom gravis (SAMG): A) Grafički prikaz postavke SFEMG koja beleži akcione potencijale mišićnih vlakana inervisanih od strane istog motornog neurona; B) elektrofiziološki zapis SFEMG pokazuje akcione potencijale prvog i drugog mišićnog vlakna iste motorne jedinice i njihove interpotencijalne intervale (adaptirano prema referenci 172)

Novijim radovima je pokazano da repetitivni okularni vestibularni miogeni evocirani potencijali (RoVEMPs) mogu biti od koristi u dijagnostici OSAMG, s obzirom na to da se pomenutom dijagnostičkom metodom može direktno registrovati zamor EOM (65, 175).

1.7.6 Radiološka dijagnostika timusa

Radiološka dijagnostika patologije timusa (kompjuterizovana tomografija ili magnetna rezonanca grudnog koša) omogućava otkrivanje tumora timusa, ali se na ovaj način mogu detektovati i promene koje odgovaraju folikularnoj hiperplaziji timusa. Kod SAMG kasne životne dobi se mogu videti atrofija i zamena timusa masnim tkivom što je inače tipičan nalaz kod zdravih odraslih osoba. Akcidentalno otkrivanje tumora timusa kod osobe bez simptoma SAMG može imati značaj u predikciji supkliničke forme bolesti, imajući u vidu da je opisano više slučajeva početka SAMG nakon timomektomija. Sumnju na tumor timusa uvek ukazuje pozitivan nalaz antitela na titin ili na rijanodinski receptor u serumu bolesnika sa SAMG (176).

1.8 Terapija

1.8.1 Terapija okularne forme SAMG

Terapijski pristup pacijentima sa OSAMG bazira se predominantno na ličnom kliničkom iskustvu, imajući u vidu da ne postoje vodiči zasnovani na dokazima, kao ni konsenzus za lečenje obolelih sa OSAMG, jer su sve do sada sprovedene kontrolisane randomizovane kliničke studije uključivale samo pacijente sa generalizovanom formom bolesti (65, 177).

Lečenje OSAMG kod gotovo svih bolesnika započinje primenom inhibitora AChE najčešće piridostigmina (Mestinon u dozi od 60-240 mg dnevno) ili sporo oslobađajuće forme leka (Mestinon retard 180 mg dnevno), ređe ambenonijuma (Mytelase, u dozi od 20-40 mg dnevno). Ova terapija povoljno utiče na poboljšanje mijasteničnih simptoma i znakova bolesti, pre svega blage do umerene semiptoze/ptoze, dok je efikasnost antiholinesteraznih lekova značajno niža kada su u pitanju diplopije. Ova terapija se generalno dobro toleriše i neželjene reakcije (dijareja, hiperhidroza i poigravanje mišića) se obično mogu kontrolisati prilagođavanjem doze leka. Međutim, važno je

naglasiti da inhibitori AChE predstavljaju samo simptomatski vid lečenja koji ne smanjuje rizik od razvoja sekundarne generalizacije bolesti (65, 178, 179).

Kod pacijenata kod kojih se primenom inhibitora AChE ne postiže zadovoljavajući efekat neophodna je primena imunosupresivne terapije. Prednizon i prednizolon su pokazali efikasnost u ublažavanju simptoma kod oko 66–86% ispitanika sa OSAMG, kao i u redukciji stope progresije bolesti. Oralna terapija prednizonom ili prednizolonom predstavlja terapiju prvog izbora kod pacijenata sa OSAMG kod kojih postoji funkcionalna onesposobljenost. Lečenje se može započeti punom dozom kortikosteroida ili se doza leka može postepeno povećavati, ali je važno naglasiti da su maksimalne preporučene doze kortikosteroida kod ovih pacijenata, od 25–60 mg dnevno, generalno niže nego kod obolelih sa generalizovanom formom bolesti. Sedam do deset dana nakon uvođenja kortikosteroidne terapije postoji mogućnost pogoršanja stanja usled pojave steroidne adinamije, što kod pacijenata sa OSAMG najčešće ne predstavlja veliki problem (65, 83, 180-182). Ukoliko tokom kortikosteroidne terapije dođe do pojave ranih neželjenih efekata i pored adekvatne gastroprotekcije i odgovarajućeg higijensko-dijetetskog režima ishrane sa redukcijom unosa soli, prednizon se zamenjuje deflazakortom koji daje nešto manje neželjenih efekata. Odnos ekvivalentnih doza deflazakorta i prednizona iznosi 6 mg:5 mg. Kada se postigne poboljšanje stanja sa potpunim otklanjanjem simptoma i znakova bolesti, savetuje se postepena redukcija doze prednizona za po 5 do 10 mg mesečno do najmanje doze leka kojom se održava stabilno stanje, odnosno dostigne stadijum farmakološke remisije. Ukoliko nakon redukcije kortikosteroidne terapije dođe do ponovne pojave okularnih simptoma bolesti savetuje se ponovno povećanje doze prednizona za 5 mg do doze kortikosteroida sa kojom se održava stabilno stanje bolesti. U slučajevima kada se nakon šest meseci primene imunosupresivne terapije kortikosteroidima postigne farmakološka remisija bolesti, savetuje se postepena redukcija doze održavanja kortikosteoida do obustave terapije, ukoliko se pri tome održava stabilna remisija bolesti (181, 183).

I pored jasno potvrđene efikasnosti, jedan od najvećih problema tokom dugoročne primene kortikosteroida je pojava neželjenih efekata, što značajno ograničava njihovu primenu i zahteva uvođenje druge imunosupresivne terapije. Pored toga, kao jedan od razloga za uvođenje imunosupresivne terapije druge linije je i odsustvo terapijske efikasnosti kortikosteroida sa razvojem oftalmoplegije rezistentne na terapiju, što se sreće kod oko 20% pacijenata (184). U ovim slučajevima se preporučuje primena azatioprina, mikofenolat mofetila, ciklosporina, ciklofosfamida i takrolimusa, koji se pretežno koriste u lečenju bolesnika sa generalizovanom formom bolesti (185).

Ukoliko pacijenti ne reaguju adekvatno na primenjenu imunosupresivnu terapiju ili zahtevaju primenu visokih doza lekova što je često praćeno pojavom ozbiljnih neželjenih efekata govorimo o refraktarnoj formi OSAMG. Terapijske izmene plazme i primena humanih imunoglobulina u intravenskoj infuziji nisu pokazali efikasnost u lečenju pacijenata sa ovom formom bolesti (186). Međutim, primena anti-CD20 monoklonskog antitela, rituksimaba, pokazala je značajnu efikasnost u kupiranju simptoma i znakova bolesti u ovoj grupi pacijenata, zbog čega se rituksimab preporučuje kao terapijska opcija u lečenju obolelih sa refraktarnom formom OSAMG (187).

Studije procene efikasnosti novih terapijskih modaliteta, koji se baziraju na inhibiciji komplementa ili kompeticiji sa cirkulišućim IgG imunoglobulinima za Fc neonatalni receptor imunoglobulina u lečenju bolesnika sa OSAMG, su tek započete i u narednom periodu se očekuju njihovi rezultati (65).

Kada govorimo o timektomiji, ona je bila predmet debate eksperata u ovoj oblasti, i to samo kao vid lečenja anti-nAChR seropozitivnih pacijenata sa OSAMG. Imajući u vidu da je efikasnost timektomije kod OSAMG ispitivana u retrospektivnim studijama sa dosta nekonzistentnim rezultatima, za sada se ne mogu doneti adekvatni zaključci o njenoj efikasnosti u ovoj grupi ispitanika. Danas se u svakodnevnoj kliničkoj praksi kod pacijenata sa OSAMG o timektomiji odlučuje individualizovanim pristupom, sa preporukom za sprovođenje minimalno invazivne hirurgije kod anti-nAChR seropozitivnih pacijenata, kao i kod pacijenata sa nezadovoljavajućim odgovorom na primenjenu imunosupresivnu terapiju (188, 189) Takođe, timektomija je indikovana i kod svih pacijenata sa OSAMG udruženom sa timomom (65).

Suportivne mere kao što su korišćenje naočara za spuštene kapke kod izražene ptoze, kao i prizmi kod bolesnika sa diplopijama, korisne su kod pacijenata sa OSAMG koja je rezistentna na ostale preporučene vidove lečenja (65). Takođe, hirurška korekcija ptoze se pokazala efikasnom, ali je neophodno voditi računa da ne dođe do komplikacije u vidu inflamacije rožnjače (190).

1.8.2 Terapija generalizovane forme SAMG

Lečenje generalizovanih formi SAMG zavisi od životne dobi i opšteg zdravstvenog stanja bolesnika, kao i od tipa specifičnih autoantitela koja su prisutna u serumu obolelih i stepena težine bolesti (183, 191).

Primena inhibitora holinesteraze je obavezna kod seropozitivnih bolesnika sa antitelima na nAchR, *„clustered nAchR“,* LRP-4, kao i kod seronegativnih SAMG pacijenta, dok se kod obolelih sa antitelima na MuSK, inhibitori holinesteraze ne primenjuju ili se daju u nižim dozama. Razlog tome leži u činjenici da ovi bolesnici ispoljavaju hipersenzibilnost na nikotinske efekte inhibitora holinesteraze sa dosta neželjenih efekata, a bez značajnijeg uticaja na slabošću zahvaćene mišiće (183, 191).

Uporedo sa inhibitorima AChE savetuje se započinjanje imunosupresivne terapije kortikosteroidima svakodnevnom primenom niskih doza prednizona u jednoj jutarnjoj dozi. Predlažu se dva načina indukcione terapije, brza i spora indukcija, a odluku o načinu započinjanja lečenja donosimo na osnovu kliničke prezentacije pacijenata. Kod bolesnika sa okularnom i blagom generalizovanom formom bolesti kortikosteroidi se tokom perioda od 2-4 nedelje mogu ordinirati u preporučenoj dozi od 60-100 mg dnevno, dok se spori režim uvođenja kortikosteroidne terapije predlaže kod pacijenata sa težim formama bolesti, posebno onih sa predominantnom bulbarnom simptomatologijom. Lečenje po ovom režimu podrazumeva uvođenje prednizona u dozi od 10 mg dnevno uz postepeno povećanje doze za 10 mg na svakih 5-10 dana, do dostizanja maksimalno preporučene doze od 0,5-1 mg/kg telesne težine. Važno je napomenuti da je kod pojedinih bolesnika nakon uvođenja kortikosteroidne terapije moguće prolazno pogoršanje stanja poznato kao steroidna adinamija, koje se najčešće javlja nakon 5-10 dana od početka lečenja i prolaznog je karaktera sa najčešćim trajanjem oko 10-15 dana. Pretežno se javlja kod starijih pacijenata sa težom bulbarnom formom bolesti udruženom sa timomom, koji primaju visoke doze kortikosteroida i stoga se posebno kod ovih pacijenata preporučuje postepeno uvođenje kortikosteroidne terapije. Imajući u vidu brz imunosupresivni efekat kortikosteroida, kod najvećeg broja bolesnika nakon 6-8 nedelja od započinjanja terapije dolazi do inicijalnog poboljšanja stanja i u daljem toku se savetuje nastavak terapije u odgovarajućoj individualnoj dozi tokom perioda od 2-6 meseci, što je determinisano težinom kliničke slike i odgovorom na terapiju. Nakon postizanja poboljšanja stanja savetuje se postepena redukcija doze kortikosteroida za po 5-10 mg mesečno do najniže efikasne doze sa ciljem da se nakon godinu dana lečenja doza redukuje na 10 ili 7,5 mg dnevno. Brzina redukcije doze zavisi o težine bolesti, postojanja pridruženih komorbiditeta, kao i primene ostale imunosupresivne terapije ili sprovedene timektomije, što omogućava bržu redukciju doze kortikosteroida. Pored svakodnevne primene kortikosteroida tokom terapije održavanja pojedini istraživači preporučuju da se nakon početne 2-4 nedelje od započinjanja lečenja pređe na alternativni režim davanja prednizona („*High Single Dose Aternate Day*“) svaki drugi dan, u jutarnjim satima, posle doručka, u cilju redukcije potencijalnih neželjenih efekata. Međutim, stavovi većine autora danas su da još uvek nema dovoljno dokaza da alternativni režim davanja kortikosteroida smanjuje rizik od pojave neželjenih efekata, zbog čega se novijim radovima favorizuje svakodnevna dugoročna primena kortikosteroida. U svakom slučaju važno je naglasiti da odluku oko načina sprovođenja terapije održavanja kortikosteroidima donosimo individualizovanim pristupom svakom pojedinačnom pacijentu koji je pre svega determinisan težinom kliničke slike i postojanjem pridruženih komorbiditeta. Takođe, svim pacijentima na kortikosteroidnoj terapiji neophodno je uključiti i gastroprotektivnu terapiju uz savet da se pridržavaju odgovarajućeg higijensko-dijetetskog režima, sa redukovanim unosom ugljenih hidrata i soli, uz redovno kliničku i laboratorijsku kontrolu svih potencijalnih neželjenih metaboličkih efekata. Najčešći neželjeni efekti su porast telesne težine, pojava dijabetes melitusa tipa 2, arterijska hipertenzija, osteoporoza, glaukom, nesanica i promena raspoloženja (83, 181-183, 192).

Kada govorimo o timektomiji kod pacijenata sa SAMG odluku o njenom sprovođenju donosimo u zavisnosti od forme bolesti, kao i od prisustva patološkog nalaza na kompjuterizovanoj tomografiji *(eng. computed tomography*, CT) timusne lože. Postojanje tumora timusa, timoma, nezavisno od forme bolesti, predstavlja apsolutnu indikaciju za operativno lečenje. Timektomija se, takođe, preporučuje kod svih bolesnika sa generalizovanom seropozitivnom (nAChR, „cluster AChR", LRP-4) SAMG, kao i kod seronegativnih pacijenata sa generalizovanom formom bolesti. Opšti uslov je da bolesnici sa netimomski izmenjenim timusom nisu stariji od 50 godina, ali značaj ovog kriterijuma može biti relativan, s obzirom na to da nepotpun odgovor na imunosupresivno lečenje, uz dobro opšte zdravstveno stanje, prisustvo anti-nAChR antitela i prisutno timusno tkivo na CT snimku grudnog koša može pomeriti prihvatljivu starosnu granicu i do šezdesete godine života. Timektomija se može izvesti transstrenalnim putem u vidu ekstenzivne timektomije (uklanjanje timusa i kompletnog masnog tkiva prednjeg i zadnjeg medijastinuma), što se obavezno preporučuje kod bolesnika sa timomom, dok je kod bolesnika sa netimomski izmenjenim timusom široko prihvaćena manje agresivna torakoskopska metoda operativnog lečenja (*eng. video assisted thoracoscopic surgery*, VATS) (83, 183).

U slučaju postojanja nepotpunog terapijskog odgovora, kontraindikacija ili ispoljavanja neželjenih dejstava na primenu kortikosteroidne terapije, sa ili bez timektomije, neophodno je uvođenje imunosupresivne terapije druge linije (azatioprin, mikofenolat mofetil, ciklosporin, ciklofosfamid, takrolimus). Najčešće se kortikosteroidna terapija kombinuje sa azatioprinom imajući u vidu da azatioprin ima odloženi terapijski efekat, koji se očekuje tek nakon šest 6-18 meseci od njegove primene. Lečenje se započinje dozom od 50 mg dnevno uz postepeno povećanje doze do maksimalno preporučene doze koja iznosi 2-3 mg/kg telesne težine dnevno. Posle godinu dana kombinovane imunosupresije savetuje se obustava kortikosteroida i održavanje terapijskog efekta samo azatioprinom u dozi od 1-2 mg/kg telesne težine. Tokom lečenja azatioprinom neophodno je praćenje neželjenih efekata. Neki od njih se javljaju odmah i manifestuju se u vidu mučnine i povraćanja, kao i pojave hepatotoksičnosti i mijelosupresije, zbog čega je važno pratiti laboratorijske parametre (kompletna krvna slika, posebno nivoi leukocita i limfocita, kao i hepatogram). Kod 10-20% pacijenata javlja se idiosinkratska reakcija na lek koja se manifestuje pojavom povišene telesne temperature, mučnine, povraćanja, a nekada i razvojem septičnog stanja, što zahteva hitnu obustavu leka nakon čega se tegobe brzo povlače. Značajno je naglasiti da azatioprin nema teratogeni efekat što omogućava njegovu primenu i kod pacijentkinja u generativnom periodu (181, 183, 191, 193-195).

Ciklosporin se uglavnom koristi kod bolesnika koji kojih postoji intolerancija na azatioprin i njegova primena, takođe, omogućava bitno smanjenje doze kortikosteroida. Lečenje se započinje dozom od 200 mg dnevno, podeljeno u dve doze, sa postepenim povećanjem doze leka za 0,5 mg po kg telesne težine dnevno na svakih 4-8 nedelja. Ciklosporin ostvaruje brz imunosupresivni efekat već posle mesec dana od početka njegove primene, Međutim, pored brze i značajne efikasnosti pomenute terapije, neophodan je oprez zbog mogućeg razvoja brojnih neželjenih efekata, pre svega pojave nefrotoksičnosti zbog čega je neophodna redovna kontrola laboratorijskih parametara, posebno azotemije. Drugi značajni neželjeni efekti su hirzutizam, posturalni tremor, sklonost ka malignitetima kože, hiperplazija gingiva i slično. Važno je istaći da se i ovaj lek može primenjivati tokom trudnoće (83, 182, 183, 192, 195, 196).

Mikofenolat mofetil je efikasan imunosupresivni lek koji se preporučuje za lečenje generalizovane forme SAMG. Lečenje se započinje dozom od 500 mg dnevno uz povećanje doze za 500 mg na 7-14 dana do maksimalne preporučene doze od 3000 mg dnevno. Imajući u vidu teratogeni efekat, primena mikofenolat mofetila se ne preporučuje u trudnoći (183, 191, 196).

Metotreksat se može koristiti kao alternativni vid imunosupresivne terapije kod pacijenata kod kojih ostali imunosupresivni lekovi nisu efikasni ili kod postojanja njihovog nepodnošenja, posebno kod pacijenata sa pridruženom sistemskom bolesti vezivnih tkiva. Međutim, ne postoje jasni dokazi iz randomizovanih kontrolisanih studija o značajno pozitivnom efektu ovog vida terapije. Pored toga, poznati neželjeni efekti, posebno teratogeni efekat, značajno ograničavaju njegovu primenu u lečenju SAMG bolesnika (183, 196, 197).

Takrolimus je imunosupresiv koji ostvaruje efekat sličan ciklosporinu i široko se primenjuje tokom lečenja pacijenata sa SAMG u cilju smanjenja doze kortikosteroida, posebno kod refraktarnih bolesnika sa timomom. Pored toga, u zemljama azijskog kontinenta takrolimus se često koristi kao monoterapija kod pacijenata sa okularnom formom bolesti. Ovaj T ćelijski supresor ima brz terapijski efekat sa evidentnim kliničkim poboljšanjem već nakon 10-28 dana od njegovog uvođenja. Lečenje se započinje dozom od 1 mg dnevno koja se postepeno povećava do maksimalno preporučene doze od 3 mg na dan podeljeno u dve dnevne doze. U cilju praćenja potencijalnih neželjenih efekata neophodna je redovna kontrola metaboličkog profila obolelih (181, 183, 196).

1.8.3 Terapija refraktarne forme SAMG

Iako se kod najvećeg broja SAMG pacijenata postiže značajno poboljšanje stanja i klinički oporavak primenom različitih modaliteta imunosupresivne terapije, poznato je da se samo kod 10-20% njih postiže stadijum kompletne stabilne remisije. Ovaj procenat se povećava na oko 30% ukoliko se u okviru terapijskog postupka sprovede i timektomija, ali ostaje 10-20% pacijenata kod kojih se produženom imunosupresivnom terapijom kortikosteroidima i drugim imunosupresivnim lekovima ne postiže efikasnost u lečenju. To je grupa obolelih kod kojih postoje perzistentne slabosti i pored primene odgovarajuće terapije u preporučenim dozama ili kod kojih dolazi do pojave čestih egzacerbacija bolesti pri svakom pokušaju smanjenja doze imunosupresivnih lekova, uz postojanje ozbiljnih neželjenih efekat, kada govorimo o refraktarnoj formi generalizovane SAMG (183, 191, 198). U novijim klasifikacijama ova forma je označena kao SAMG sa visokom aktivnošću bolesti (199).

U ovom slučaju predlaže se primena privremenih terapijskih postupaka tokom ograničenog vremenskog perioda, kao i primena novih terapijskih modaliteta. Privremeni terapijski postupci se odnose na lečenje IvIg ili TIP. Lečenje IvIg se započinje indukcionom dozom od 0,4 g po kg telesne težine dnevno koja se primenjuje tokom pet uzastopnih dana, a zatim se nastavlja terapija održavanja IvIg u jednokratnoj dozi od 0,4 g po kg telesne težine na svake 3-4 nedelje tokom dugoročnog perioda od nekoliko meseci do godinu dana. Kada je reč o TIP, preporučuje se inicijalna serija od 5-7 procedura TIP koje se sprovede svakog drugog dana, uz nastavak jednog ciklusa TIP na 3-4 nedelje tokom dugoročnog perioda od nekoliko meseci do godinu dana u zavisnosti od težine kliničke slike. Najređe se preporučuje lečenje visokim dozama ciklofosfamida (1000 mg parenteralno mesečno, tokom perioda od šest meseci) imajući u vidu visok rizik od nastanka ozbiljnih neželjenih dejstava (83, 183, 196, 200).

Navedena terapija predstavlja osnovu međunarodnog vodiča za lečenje SAMG iz 2020. godine (191). Međutim, poznavanje patofiziološkog mehanizma omogućilo je razvoj individualizovanog pristupa u lečenju primenom novih ciljanih terapija, sa povoljnijim profilom neželjenih efekata. U tom smislu se i pretpostavlja da će buduće preporuke i algoritam lečenja SAMG verovatno biti izmenjen. Nove terapije imaju nekoliko ciljnih efekata kao što su: deplecija B ćelija, inhibicija sistema komplementa, antagonizam neonatalnog Fc receptora, inhibicija interleukina 6, terapija usmerena na T ćelije i slično (201, 202).

Prvi predstavnik B ćelijskih depletora je rituksimab, IgG1 kappa monoklonsko antitelo koje se vezuje za CD20 molekul na B limfocitima. Više studija je pokazalo da je rituksimab bezbedan i efikasan u lečenju refraktarne SAMG, posebno one posredovane anti-MuSK autoantitelima, dok rezultati ispitivanja njegove efikasnosti kod bolesnika sa anti-nAChR autoantitelima nisu tako ubedljivi (201, 202). Potencijalni drugi predstavnik ove terapijske grupe je inebilizumab, monoklonsko antitelo usmereno na CD19 molekul kojim indukuje B ćelijsku depleciju. Nedavno objavljeni rezultati treće faze randomizovane dvostruko slepe kontrolisane studije (MINT – Myasthenia Gravis Inebilizumab Trial) pokazali su da inebilizumab smanjuje težinu bolesti i upotrebu kortikosteroidne terapije, uz dobar bezbednosni profil (201, 203).

Kada su u pitanju bolesnici sa refraktarnom formom generalizovane SAMG udružene sa nAChR autoantitelima, izuzetne rezultate pokazala je primena anti-C5 monoklonskog antitela, ekulizumaba, sa postizanjem značajnog poboljšanja, minimalnim manifestacijama bolesti i postizanjem farmakološke remisije kod dve trećine bolesnika (204). Iz ekulizumaba je proistekao i

ravulizumab sa produženim poluživotom i mehanizmom dejstva. Produžena, otvorena faza studije tokom koje su svi bolesnici dobijali lek, CHAMPION, pokazala je da se primenom ravulizumaba postiže dugoročno kliničko poboljšanje uz dobru toleranciju leka (201, 205). Treći predstavnik ove grupe je zilukoplan. Prednost ovog medikamenta je u tome što za razliku od prethodna dva leka koja se primenjuju intravenski, zilukoplan se primenjuje subkutano jednom dnevno, što povoljno utiče na terapijsku komplijansu i svakako se veoma povoljno odražava i na kvalitet života obolelih imajući u vidu činjenicu da se može primenjivati samostalno u kućnim uslovima (201, 202).

Poznato je da neonatalni Fc receptori imaju centralnu regulatornu ulogu u humoralnom imunskom odgovoru. Oni se selektivno vezuju za IgG antitela, štite ih od lizozomalne degradacije, recikliraju ih i vraćaju u cirkulaciju. Zbog toga blokiranje neonatalnih Fc receptora promoviše degradaciju IgG antitela, a samim tim dovodi do redukcije specifičnih patogenih autoantitela kod obolelih sa SAMG (201). U nedavno sprovedenim kliničkim studijama u kojima je ispitivana efikasnost antagoniste neonatalnog Fc receptora, efgartigimoda, dobijeni su ohrabrujući rezultati u smislu redukcije specifičnih mijasteničnih simptoma i znakova bolesti i značajnog poboljšanja kvaliteta života bolesnika sa generalizovanom formom SAMG.(206). Ovaj lek se primenjuje intravenski i subkutano i u Sjedinjenim Američkim Državama i Evropskoj uniji je odobren za lečenje generalizovane SAMG udružene sa nAChR autoantitelima, dok je u Japanu odobren za lečenje generalizovane SAMG nezavisno od prisustva specifičnih autoantitela u serumu (207). Nešto efikasniji, prema rezultatima kliničkih studija, pokazao se rozanoliksizumab, antagonista neonatalnog Fc receptora za subkutanu primenu. Ovaj lek je takođe odobren u Sjedinjenim Američkim Državama i Evropskoj uniji za lečenje generalizovane SAMG posredovane nAChR autoantitelima, ali i za generalizovanu SAMG udruženu sa MuSK autoantitelima po čemu je jedinstven (201, 208). Drugi potencijalni predstavnici ove terapijske grupe, batoklimab i nipokalimab, su još uvek u fazi kliničkog ispitivanja. Objavljeni rezultati treće faze studije procene efikasnosti batoklimaba sprovedene u Kini su pokazali efikasnost ovog leka kod bolesnika sa generalizovanom SAMG u odnosu na placebo dok se rezultati ostalih kliničkih studija očekuju (201, 202).

Druge terapijske opcije kao što je terapija usmerena na inhibiciju IL-6 sa posledičnom redukcijom proinflamatorne T i B ćelijske diferencijacije, kao i terapija usmerena na modifikaciju T ćelija i njihovu regulaciju na nivou maturacije B limfocita su u fazi kliničkih ispitivanja i rezultati pomenutih studija će ukazati na njihov značaj u lečenju SAMG (201).

1.8.4 Mijastenična kriza

Bolesnici sa kliničkom formom V (MGFA) ispoljavaju sliku mijastenične krize sa nemogućnošću spontanog disanja zbog čega se sprovodi asistirana ventilacija u jedinicama intenzivnog lečenja. Slabost respiratornih mišića uzrokuje hipoventilaciju, a skoro uvek postoji i slabost orofaringealnih mišića sa aspiracijom sekreta i nemogućnošću iskašljavanja (183).

Kod pacijenata sa mijasteničnom krizom postoji potpuni gubitak nAChR na postsinaptičkoj membrani vitalnih mišića, te primena inhibitora holinesteraze ne ostvaruje svoj efekat, a istovremeno dovodi do povećanja neželjenih muskarinskih efekata i pogoršava prolaznost disajnih puteva. Stoga se posle intubacije savetuje obustava primene inhibitora holinesteraze i uz sve principe lečenja u jedinicama intenzivnog lečenja ordiniraju se kortikosteroidi u visokim dozama uz ostalu imunosupresivnu terapiju, u kombinaciji sa primenom IvIg ili TIP (183).

1.9 Procena težine bolesti i terapijskog efekta

Procena terapijske efikasnosti, a samim tim i dugoročno kliničko praćenje bolesnika sa SAMG oslanja se na primenu specifičnih kvantifikacionih testova. Najšire prihvaćeni testovi su skala dnevne onesposobljenosti (*eng. MG–Activities of Daily Living,* MG-ADL), kvantitativni MG skor (*eng. Quantitative MG,* QMG), MG kompozitni skor (*eng. MG Composite,* MGC), kao i MG skala za procenu kvaliteta života (*eng. MG–Quality of Life–15,* MG-QOL15). U kombinaciji, ove skale odražavaju težinu kliničke slike SAMG i predstavljaju osnovu praćenja bolesnika, kako u svakodnevnoj kliničkoj praksi tako i u kliničkim studijama (161).

MG skala dnevne onesposobljenosti je funkcionalna skala kojom se procenjuje težina kliničke slike na osnovu simptoma koje prijavljuje sam pacijent, a odnosi se na 8 kategorija različitih aktivnosti i to: govora, žvakanja, gutanja, disanja, poteškoća sa pranjem zuba ili češljanjem, teškoća ili nemogućnosti ustajanja sa stolice, pojave duplih slika i spuštanja kapaka. Promena u konačnom zbiru ove skale predstavlja najčešću primarnu meru ishoda u dosadašnjim kliničkim studijama, ali je potrebno istaći da dugo nisu postojale jasne instrukcije koje je pacijent dobijao pri korišćenju pomenute skale, a koje se odnose na to da li se odgovori pacijenata baziraju na iskustvu stečenom tokom poslednjih sedam ili deset dana ili pak dužeg vremenskog perioda, kao i da li postojeće simptome pacijenti definišu samo u odnosu na SAMG, što je smatrano njenim glavnim nedostatkom (161, 209). Ukupan zbir se kreće u rasponu od 0 (normalan nalaz) do 24 (stanje teške slabosti). MG-ADL zbir 0 ili 1 označava stanje minimalnih manifestacija bolesti (*eng. Minimal symptom expression,* MSE) što je najčešći primarni cilj lečenja bolesnika sa SAMG (210, 211)

Kvantitativni MG skor predstavlja skalu koja se odnosi na kliničku procenu snage i zamorljivosti okularne, bulbarne i respiratorne muskulature, kao i mišića trupa i ekstremiteta. Testiranje zahteva specifičnu opremu i oko 30 minuta za izvođenje. Originalna verzija ove skale je imala nekoliko nedostataka koji su se pre svega odnosili na tehničke zahteve, kao i nedostatak standardizacije instrukcija tokom testiranja zbog čega je predložena revidirana verzija skale koja se aktuelno koristi (161, 212).

MG kompozitni skor procenjuje simptome specifične za bolest, a sastoji se od 10 domena koji predstavljaju kombinaciju funkcionalne MG skale dnevne onesposobljenosti i kvantitativnog MG skora sa procenom snage mišića koju izvodi lekar (161).

MG skala za procenu kvaliteta života je upitnik koji popunjava bolesnik, a sadrži 15 pitanja koja se odnose na fizičke, psihološke i socijalne aspekte života obolelih sa SAMG (161).

Prepoznajući značaj navedenih skala u proceni efikasnosti lečenja SAMG, a u eri ekspanzije novih terapijskih modaliteta, MGFA je 2019. godine imenovala radnu grupu u cilju njihove standardizacije. Preporuke ove radne grupe objavljene su aprila 2025. godine, a naredni koraci podrazumevaju njihovo usvajanje i primenu od strane šire profesionalne zajednice (213).

1.10 Generalizacija

Okularni simptomi, spuštanje kapaka i/ili dvoslike ostaju i jedini znaci SAMG kod oko 5-25% pacijenata kod kojih se postavlja dijagnoza izolovano okularne forme bolesti. Međutim, kod većine pacijenata (70-80%) bolest se tokom prve dve godine generalizuje, sa pojavom promenljive slabosti i zamorljivosti i ostalih mišićnih grupa (mišića lica, bulbarne muskulature, mišića vrata i ekstremiteta) (37)

U dosadašnjim studijama je pokazano da se kao prediktivni faktori generalizacije bolesti izdvajaju sledeći faktori: anti-nAChR seropozitivnost, visoka koncentracija pomenutih antitela u serumu, postojanje timoma ili hiperplazije timusa, starija životna dob, kao i pozitivan TNT (214-216). U nekoliko do sada sprovedenih retrospektivnih kliničkih studija analiziran je i uticaj rane primene imunosupresivne, kortikosteroidne terapije na razvoj generalizacije bolesti kod pacijenata sa inicijalno OSAMG, sa dosta nekonzistentnim zaključcima (37). Pored toga, nedavno sprovedena istraživanja su pokazala da pojedine nekodirajuće RNK, mikro-RNK, posebno miR150-5p, miR-21-5p i miR-30e-5p koreliraju sa razvojem generalizacije SAMG, kao i sa povoljnim odgovorom na imunosupresivnu terapiju (141, 217).

2 Ciljevi rada

Pored svih napora da se uz rezultate sprovedenih ispitivanja i kliničku sliku napravi adekvatan plan lečenja bolesnika sa SAMG, nepredvidivost kliničkog toka ove nervno-mišićne bolesti nekada iznenađuje i najiskusnije kliničare. Do danas su sprovedena brojna istraživanja sa ciljem identifikacije pokazatelja koji bi nam pomogli da predvidimo tok i ishod bolesti kod svakog pojedinačnog bolesnika, a posebno u smislu postojanja egzarcerbirajućeg ili povoljnog toka bolesti sa postizanjem kompletne remisije. Među ovim pokazateljima najčešće se navode starost na početku bolesti, pol, dužina trajanja bolesti, prisustvo, tip i koncentracija specifičnih autoantitela, patološke promene timusa i udruženost sa drugim autoimunim bolestima (148, 216, 218-220). Međutim, rezultati ovih istraživanja nisu uniformni, čak su u nekim slučajevima i kontradiktorni, zbog čega još uvek nedostaju konzistentni podaci o značajnim pokazateljima toka bolesti i ishoda lečenja SAMG.

U poslednjih nekoliko godina svedoci smo pokušaja identifikacije genetičkih prediktora razvoja i progresije SAMG. Među ovim faktorima posebno se izdvojio gen *CTLA4*. Naime, istraživanja su pokazala da je izmenjena ekspresija *CTLA4* gena povezana sa razvojem SAMG, dok je nivo proteina CTLA-4 u serumu u pozitivnoj korelaciji sa nivoom antitela na nAChR što može uticati na težinu kliničke slike kod ovih pacijenata (221).

Imajući u vidu navedene činjenice ciljevi našeg istraživanja bili su:

- Utvrđivanje kliničkih, elektrofizioloških i imunoseroloških pokazatelja toka bolesti i ishoda lečenja SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima.
- Utvrđivanje asocijacije polimorfizama pojedinačnog nukleotida gena *CTLA4* i njihovih haplotipova sa rizikom za razvoj SAMG u našoj kohorti analiziranih bolesnika.
- Utvrđivanje uticaja prisustva polimorfizama pojedinačnog nukleotida gena *CTLA4* i njihovih haplotipova na klinički tok i ishod lečenja SAMG u našoj kohorti bolesnika.

3 Materijal i metode

Naša studija se sastojala iz dva dela istraživanja. Prvi deo čini retrospektivna studija koja se odnosi na analizu kliničkih, elektrofizioloških i imunoseroloških pokazatelja kliničkog toka i ishoda SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima. Drugi deo istraživanja predstavlja studija slučajeva i kontrola, koja se odnosi na ispitivanje asocijacije polimorfizama pojedinačnih nukleotida gena *CTLA4* i njihovih haplotipova sa rizikom za razvoj SAMG i utvrđivanje njihovog uticaja na klinički tok i ishod lečenja SAMG.

3.1 Analiza kliničkih, elektrofizioloških i imunoseroloških pokazatelja toka i ishoda SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima

3.1.1 Pacijenti

Retrospektivna kohortna studija obuhvatila je SAMG bolesnike sa inicijalnim okularnim simptomima bolesti koji su dijagnostikovani i lečeni u Klinici za neurologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS) u Beogradu, u periodu od 1. januara 2007. do 1. januara 2018. godine i praćeni najmanje 24 meseca. Imajući u vidu da je odeljenje za nervno-mišićne bolesti Klinike za neurologiju UKCS nacionalni referentni centar za nervno-mišićne bolesti u Srbiji i mesto gde se većina bolesnika sa SAMG u Srbiji dijagnostikuje i leči, bili smo u mogućnosti da našim istraživanjem obuhvatimo najveći broj pacijenata sa izolovano okularnom formom SAMG na početku bolesti. Dijagnoza SAMG postavljena je od strane iskusnih neurologa ovog odeljenja, eksperata u oblasti nervno-mišićnih bolesti, a na osnovu kliničke slike, pozitivnog farmakološkog testa u vidu poboljšanja snage zahvaćenih mišića nakon primene reverzibilnog inhibitora acetilholinesteraze, kao i nalaza elektrofiziološkog i serološkog testiranja. Forma bolesti SAMG je definisana na osnovu opšte prihvaćenih MGFA kriterijuma za postavljanje njene dijagnoze (157). Na osnovu godina početka bolesti, pacijenti uključeni u studiju su podeljeni u dve grupe – SAMG ranog početka, ukoliko je bolest počela pre 50. godine života i SAMG kasnog početka, ukoliko je bolest počela u 50-oj godini života ili kasnije. Iz istorija bolesti pacijenata prikupljeni su sledeći podaci: demografske karakteristike bolesnika, klinički tok bolesti, rezultat TNT, prisustvo autoantitela na nAChR i MuSK u serumu obolelih, rezultat kompjuterizovane tomografije timusne lože, primenjen terapijski protokol, kao i prisustvo autoimunih komorbiditeta.

Klinički tok bolesti definisan je kao: povoljan, SAMG sa egzacerbacijama i refraktarna forma SAMG. Povoljan klinički tok je podrazumevao značajno poboljšanje simptoma i znakova bolesti primenom adekvatne terapije do postizanja farmakološke remisije (bez simptoma i znakova SAMG tokom perioda od godinu dana uz primenu imunosupresivne terapije u dozi održavanja) ili kompletne remisije (bez simptoma i znakova SAMG tokom perioda od godinu dana uz obustavu imunosupresivne terapije). Egzacerbacija SAMG je definisana objektivnim pogoršanjem simptoma SAMG potvrđenim od strane neurologa. Refraktarni oblici SAMG su uključili bolesnike kod kojih je post-intervencioni status nepromenjen ili pogoršan nakon primene kortikosteroidne terapije i najmanje druga dva imunosupresivna leka u adekvatnoj dozi i adekvatnom vremenskom periodu, sa stalnim simptomima ili neželjenim efektima primenjene terapije uz postojanje funkcionalne onesposobljenosti bolesnika prema njihovom opisu i nalazu lekara (157).

Elektrofiziološko testiranje, TNT, je sprovedeno od strane sertifikovanog neurologa u oblasti nervno-mišićnih bolesti sa edukacijom iz elektromioneurografije. Pacijentima je data instrukcija da ne primenjuju piridostigmin najmanje 12h pre testiranja. Supramaksimalna repetitivna stimulacija niske frekvencije (3Hz) primenjena je na tri sistema: *n. facialis – m. nasalis*, *n. axillaris – m. deltoideus* i *n. ulnaris – m.abductor digiti minimi*. Dekrement je definisan kao odnos amplituda između prvog i četvrtog, odnosno petog zbirnog akcionog potencijala mišića (eng. *compound muscle action potential*, CMAP) i patološkim nalazom je smatran dekrement od najmanje 10% u bar jednom ispitanom sistemu.

Analiza seruma na prisustvo antitela na nAChR sprovedena je u Institutu za primenu nuklearne energije (INEP) u Beogradu, RIA metodom, korišćenjem komercijalnog dijagnostičkog

testa, CIS Biointernational, Francuska. Pozitivnim nalazom je smatrana vrednost koncentracije antitela u seruma veća od 0,2 nmol/l.

Anti-MuSK antitela detektovana su kod seronegativnih pacijenata takođe u Institutu za primenu nuklearne energije (INEP) u Beogradu, RIA metodom, korišćenjem komercijalnog dijagnostičkog testa, CIS Biointernational, Francuska. Pozitivnim nalazom je smatrana vrednost koncentracije antitela u serumu veća od 0,01 nmol/l.

Studija je odobrena od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odluke 17/IV-5), kao i Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (broj odluke 1880/47).

3.1.2 Statistička analiza

U cilju ispitivanja normalnosti podataka koristili smo Šapiro-Vilk test. S obzirom na to da su numerički podaci neparametarski predstavljeni su u vidu medijane i opsega. Kategorijalni podaci su predstavljeni u vidu frekvencija i procenata.

Da bismo ispitali postojanje statistički značajne razlike između demografskih i kliničkih parametara bolesnika sa izolovanom OSAMG i onih sa generalizacijom bolesti koristili smo neparametarske testove (Hi kvadrat test, Mann-Whitney U test). Nakon toga smo koristili multivarijantnu binarnu logističku regresionu analizu da bismo ispitali odnos između potencijalnih prediktivnih varijabli identifikovanih neparametarskim testovima i generalizacije OSAMG. Vreme bez generalizacije je procenjeno upotrebom Kaplan-Majerove metode i poređeno među polovima upotrebom log-rank testa. Prediktivni učinak nAChR autoantitela na generalizaciju OSAMG procenjen je analizom ROC (eng. *Receiver Operating Characteristic*) krive. P vrednost <0,05 smatrana je statistički značajnom.

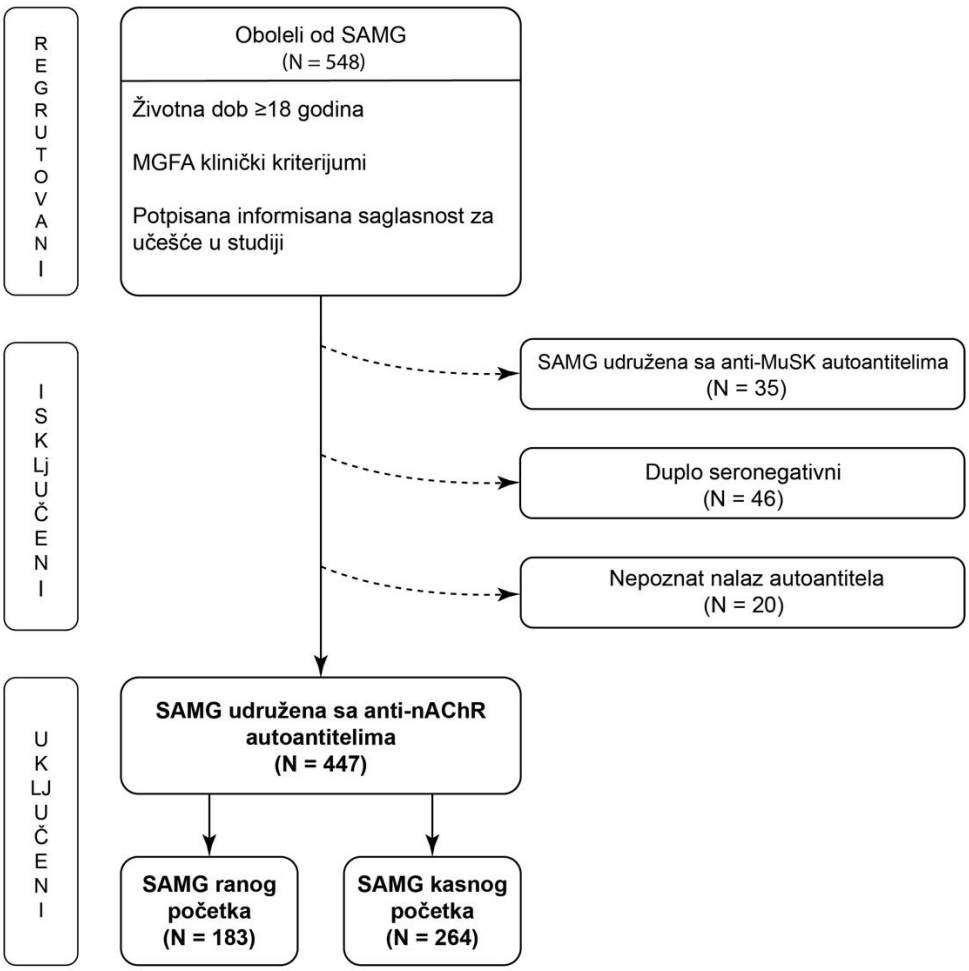
3.2 Studija asocijacije polimorfizama pojedinačnih nukleotida gena *CTLA4* i njihovih haplotipova sa kliničkim tokom i ishodom lečenja SAMG

3.2.1 Pacijenti

Studija po dizajnu slučajeva i kontrola (eng. *case-control study*) u kojoj su bolesnici i kontrole upareni prema polu i starosti, obuhvatila je pacijente sa SAMG koji su lečeni i ambulantno praćeni u Klinici za neurologiju, UKCS u Beogradu, u periodu od decembra 2013. do oktobra 2021. godine. S obzirom na to da je odeljenje za nervno-mišićne bolesti Klinike za neurologiju UKCS nacionalni referentni centar za nervno-mišićne bolesti ispitivanjem su obuhvaćeni bolesnici iz cele Srbije koji su lečeni u ovoj ustanovi, a najvećim delom pacijenti iz Beograda.

Studija je obuhvatila samo bolesnike sa pozitivnim autoantitelima na nAChR. Bolesnici sa registrovanim autoantitelima na MuSK, duplo seronegativni bolesnici, kao i oni čiji nalaz autoantitela nije bio poznat bili su isključeni iz studije. Od ukupno 548 bolesnika, njih 447 je bilo pozitivno na autoantitela prema nAChR, dok je 35 pacijenata imalo pozitivna MuSK autoantitela, 46 bolesnika je bilo duplo-seronegativno, a za 20 ispitanika je nedostajao podatak o prisustvu autoantitela u serumu) (**Slika 8**).

Bolesnici koji su uključeni u studiju su dalje podeljeni u dve grupe u zavisnosti od starosti na početku bolesti: SAMG ranog početka (ukoliko je bolest počela pre 40. godine života) i SAMG kasnog početka (ukoliko je bolest počela u 40. godini života ili kasnije) (89, 91). Grupu SAMG ranog početka činilo je 183, a grupu SAMG kasnog početka 264 bolesnika.



Slika 8. Dijagram selekcije bolesnika uključenih u studiju. SAMG – stečena autoimuna mijastenija gravis

Svaki bolesnik koji je uključen u studiju je uparen prema polu i starosti (± 3 godine) sa kontrolnom grupom zdravih osoba iz opšte populacije.

Nakon što je detaljno objašnjen cilj istraživanja i protokol studije, svaki učesnik je potpisao informisani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj odluke 17/IV-5), kao i Etičkog odbora Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (broj odluke 1880/47).

3.2.2 Odabir polimorfizama pojedinačnih nukleotida

U našoj studiji izučavana su dva polimorfizma pojedinačnih nukleotida (rs231735 i rs231770) gena *CTLA4* koje su studije asocijacije na nivou genoma povezale sa razvojem SAMG udružene sa nAChR autoantitelima (91, 124). Obe varijante, rs231735 i rs231770, nalaze se na hromozomu 2 na udaljenosti od 35,5 kb, odnosno 3,3 kb uzvodno od gena *CTLA4*. Koeficijenti D' i r^2 neravnoteže vezanosti gena (eng. *linkage disequlibrium*, LD) između pomenute dve varijante gena određene su primenom softvera Haploview (verzija 4.2). Učestalosti minornih alela ovih varijanti veće su od 0,05 u evropskoj populaciji (https: //www. Ensembl .org /index .html).

3.2.3 Genotipizacija

Svim ispitanicima koji su uključeni u studiju uzeti su uzorci periferne venske krvi (3-5 ml) sa EDTA kao antikoagulansom i iz njih je izolovana DNK korišćenjem QIAamp DNA Blood Mini kita (Qiagen, Hilden, Nemačka). Genotipizacija varijanti rs231735 i rs231770 izvršena je esejem za alelsku diskriminaciju zasnovanim na korišćenju specifičnih probi TaqMan® (Pre-Designed

C___2821048_10) i posebno dizajniranog SNP Genotyping Assay testa (ThermoFisher Scientific, SAD) i kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze *(eng. Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) u realnom vremenu u aparatu StepOnePlus System (Applied Biosystems, Foster, SAD). Doprinos fluorescentnog signala svakog alela u svakom uzorku analiziran je pomoću softvera SDS, verzija 1.2 (Applied Biosystems, Warrington, Velika Britanija). Genotipizaciju je obavilo laboratorijsko osoblje koje je bilo slepo za status ispitanika (bolesnik/kontrola) pri analizi pomoću oba eseja. Približno 10% nasumično odabranih uzoraka je analizirano u duplikatu sa podudarnošću od 100%.

3.2.4 Statistička analiza

Kategorijske varijable su prikazane kao učestalost za svaku kategoriju, a kontinuirane promenljive su date kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Distribucija učestalosti obe varijante (rs231735 i rs231770) u kontrolnoj grupi i populaciji obolelih (Hardi-Vajnbergova ravnoteža) testirana je primenom Pirsonovog χ^2 testa.

Razlika u učestalosti polova između dve grupe ispitanika testirana je upotrebom Pirsonovog $\chi 2$ testa, dok je razlika između prosečnih vrednosti životne dobi testirana pomoću *t*-testa za nezavisne uzorke. Testovi su sprovedeni uz pomoć R softverskog paketa, verzija 4.1.2 (222). Za genetičku statističku analizu korišćeni su testovi implementirani na platformi PLINK, verzija 1.07 (http://pngu.mgh.harvard. edu/~purcell/plink/) (223). Pirsonov χ^2 test je korišćen za testiranje asocijacija alela, dok je logistička regresija korišćena za testiranje asocijacije genotipova prema opštem, aditivnom, dominantnom i recesivnom modelu. Pol i uzrast su korišćeni kao kovarijate u analizi logističkog regresionog modela za bolesnike sa SAMG ranog, odnosno kasnog početka i to samo kada su upoređivani sa neuparenim kontrolama. Za određivanje modela koji najbolje uklapa podatke, korišćen je informacioni kriterijum Akaike (*eng. Akaike Information Criterion,* AIC*),* pri čemu model sa najnižim AIC najbolje uklapa podatke. Verovatnoća mogućeg haplotipa procenjena je upotrebom E-M algoritma implementiranog na platformi PLINK. Da bi se uzeli u obzir samo česti haplotipovi (≥5%), uzeto je da je granična vrednost učestalosti haplotipova 0,05. Analiza haplotipova izvršena je primenom Pirsonovog $\chi 2$ testa i logističkom regresijom korigovanom za pol i uzrast. Da bi se korigovala pristrasnost višestrukog testiranja, primenjen je test permutacije sa $10e^6$ iteracija za sve analize asocijacije korišćenjem maksimalne (T) procedure permutacije implementiranog u platformi PLINK. Za sve analize je uzet nivo značajnosti od 0,05. Odnos šanse (OR) sa 95% intervalom poverenja korišćen je kao mera snage povezanosti.

Snaga studije asocijacije procenjena je *post-hoc* analizom nakon što je određen genetički model za ispitivane varijante. Da bi se izračunala snaga analize u kojoj su uočene povezanosti rs231735 i rs231770 sa SAMG ranog početka, faktori kao što su veličina uzorka (N=630, od čega je 183 bolesnika sa SAMG ranog početka i 447 kontrola), veličina uočenog efekta (odnos šanse od 0,548 za rs231735 i 0,563 za rs231770) i učestalost alela u celoj analiziranoj grupi (slučajevi sa SAMG ranog početka i kontrole) izračunata pomoću PLINK softvera (0,4944 za rs231735 i 0,3462 za rs231770) uzeti su u obzir pored odgovarajućeg genetičkog modela (recesivni kao najbolji model za rs231735 i recesivan za rs231770 kao jedini značajan). Za ovu analizu je korišćena genpvr.calc funkcija, integrisana u genpvr paket za proračune snage u studijama genetičkih asocijacija, korišćenjem R softvera verzija 4.1.2 (222, 224).

4 Rezultati

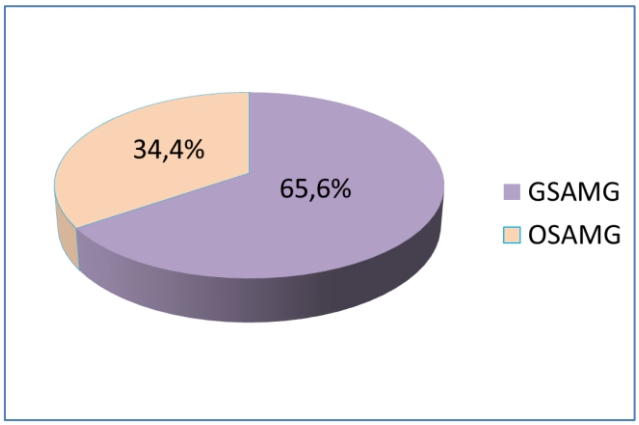
4.1 Analiza kliničkih, elektrofizioloških i imunoseroloških pokazatelja toka bolesti i ishoda lečenja SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima

Studija je obuhvatila ukupno 209 SAMG bolesnika sa inicijalnim izolovanim okularnim simptomima i znacima bolesti, kao što su postojanje semiptoze ili ptoze i/ili diplopija. Grupu SAMG ranog početka sa početkom bolesti pre 50. godine života činilo je 77 bolesnika, dok je 132 pacijenta pripadalo grupi SAMG kasnog početka kod kojih su prvi simptomi bolesti počeli u 50-oj godini života ili kasnije (**Tabela 2**). Grupu SAMG ranog početka predominantno su činile osobe ženskog pola (odnos muškaraca i žena u ovoj grupi iznosio je 1:2,3), dok je u grupi SAMG kasnog početka bilo više muškaraca (odnos muškaraca i žena bio je 1,6:1).

Tabela 2. Demografske i kliničke karakteristike stečene forme autoimune mijastenije gravis (SAMG) bolesnika sa inicijalnim okularnim simptomima i znacima bolesti. Vrednosti su prikazane kao učestalosti i procenti ili kao medijana i opseg.

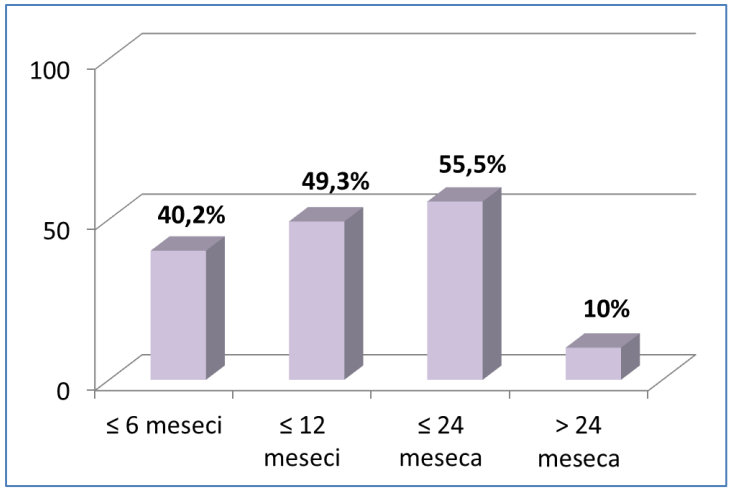
Ukupno (n)	209
Pol	
- Muškarci	104 (49,8%)
- Žene	105 (50,2%)
Klasifikacija SAMG prema godinama na početku bolesti	
- SAMG ranog početka	77 (36,8%)
- SAMG kasnog početka	132 (63,2%)
Godine starosti na početka bolesti	59 (16-86)
Godine starosti na poslednjem kontrolnom pregledu	65 (20-90)
Period praćenja (meseci)	74 (24-206)
Simptomi na početku bolesti	
- Semiptoza/ptoza	80 (38,3%)
- Diplopije	50 (23,9%)
- Semiptoza/ptoza i diplopije	79 (37,8%)
Autoantitela	
- AChR	163 (78%)
- MuSK	6 (2,9%)
- Duplo seronegativni	19 (9,1%)
- Nedostaju podaci	21 (10%)

U toku perioda praćenja koji je iznosio od 24-206 meseci kod 137 bolesnika je došlo do generalizacije bolesti, dok je kod 72 pacijenta potvrđena dijagnoza izolovane OSAMG (**Slika 9**). Vreme proteklo od pojave prvih tegoba do postavljanja dijagnoze bolesti je bilo kraće kod bolesnika sa izolovanom OSAMG (medijana 2 meseca, raspon 0-100 meseci) u odnosu na bolesnike sa sekundarno generalizovanom formom bolesti (medijana 4 meseca, raspon 0-101 mesec), pri čemu je ova razlika bila statistički značajna (U=3874,5, p=0,01).



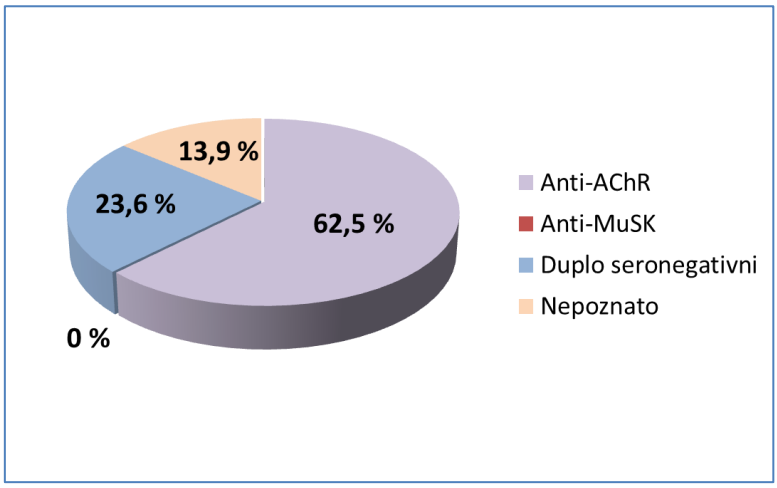
Slika 9. Učestalost generalizacije stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) u našoj kohorti ispitanika. GSAMG – generalizovana forma SAMG, OSAMG – očna forma SAMG.

Period generalizacije bolesti kretao se u rasponu od 1 do 96 meseci, sa srednjim vremenskim periodom od 4 meseca. Do generalizacije bolesti, unutar 6 meseci od pojave prvih simptoma, došlo je kod 84 (40,2%) bolesnika naše kohorte. U periodu od 6 do 12 meseci od pojave prvih okularnih simptoma, kliničke znake generalizacije bolesti razvilo je 19 (9,1%) bolesnika, dok su kod dodatnih 34 (16,3%) ispitanika simptomi generalizovane SAMG nastali nakon godinu dana od početka bolesti. Trinaest (6,2%) bolesnika je razvilo znake generalizacije bolesti u periodu od 12-24 meseca od pojave prvih simptoma bolesti, dok je kod 21 (10%) bolesnika generalizacija nastupila nakon dve godine od pojave prvih simptoma bolesti. Učestalost generalizacije SAMG u našoj kohorti ispitanika prikazana je na **Slici 10**.



Slika 10. Učestalost generalizacije stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) u našoj kohorti ispitanika u toku perioda praćenja

U grupi izolovane OSAMG (72 bolesnika) većina je imala pozitivan nalaz titra anti-nAChR autoantitela u serumu [45 (62,5%) bolesnika)]. Anti-MuSK autoantitela nije imao ni jedan pacijent ove kohorte, dok kod 17 (23,6%) bolesnika nisu registrovana ni jedna autoantitela u serumu. Podaci o prisustvu serumskih autoantitela nedostajali su kod 10 (13,9%) bolesnika sa izolovanom OSAMG (**Slika 11**).



Slika 11. Učestalost prisustva različitih autoantitela u grupi bolesnika sa izolovanom okularnom formom stečene autoimune mijastenije gravis (OSAMG)

U toku perioda praćenja približno 64% (46) bolesnika sa izolovanom OSAMG imalo je povoljan klinički tok bolesti. Egzacerbacije su zabeležene kod 25 bolesnika (34,7%) ove kohorte, dok je kod jednog pacijenta (1,4%) postavljena dijagnoza refraktarne forme bolesti.

U kohorti bolesnika sa izolovanom OSAMG (72) petoro (7%) je lečeno monoterapijom inhibitorima acetilholinesteraze, bez potrebe za uvođenjem imunosupresiva, dok je imunosupresivna terapija primenjena kod 67 (93%) bolesnika. Pored primene simptomatske terapije, imunosupresivnom terapijom prve linije lečeno je 32 (44,4%) bolesnika, dok je 35 (48,6%) pacijenata zahtevalo i lečenje imunosupresivnom terapijom druge linije (33 bolesnika je lečeno azatioprinom, a kod dva bolesnika primenjen je i ciklosporin A). Timektomija je sprovedena kod šest ispitanika (8,3%) sa izolovanom OSAMG.

U kohorti bolesnika sa sekundarnom generalizacijom bolesti, njih 14 (10,2%) je uz simptomatsku terapiju lečeno i kortikosteroidima, dok je kod ostalih pacijenata primenjena i nesteroidna imunosupresivna terapija, azatioprinom [112 (81,8%) bolesnika] i ciklosporinom A [11 (8%) bolesnika). Uz navedenu terapiju jedan bolesnik je lečen i mikofenolat mofetilom (0,7%). Intravenska primena imunoglobulina sprovedena je 4 (2,9%) pacijenta, dok je terapijskom izmenom plazme lečeno 11 (8%) bolesnika analizirane kohorte. Timektomija je sprovedena kod 54 (39,4%) bolesnika sa razvijenom generalizovanom formom SAMG.

Analizirajući timusnu patologiju u našoj grupi ispitanika multislajsnom kompjuterizovanom tomografijom grudnog koša, postojanje timoma je potvrđeno kod dva bolesnika (2,8%) sa izolovanom OSAMG. Učestalost limfofolikularne hiperplazije nije bilo moguće precizno utvrditi, s obzirom na to da je histopatološki nalaz nedostajao kod većine ispitanika naše kohorte.

Autoimuni komorbiditeti registrovani su kod 41 (29,9%) bolesnika kohorte sa sekundarnom generalizacijom SAMG. Autoimunu bolest štitne žlezde imalo je 36 (26,3%) bolesnika, kod dvoje (1,5%) pacijenata dijagnostikovana je psorijaza, dok je po jedan bolesnik imao ANCA vaskulitis (0,7%), antifosfolipidni sindrom (0,7%) i astmu (0,7%). Jedan pacijent je od pridruženih autoimunih bolesti, pored autoimune bolesti štitne žlezde, imao i sistemsku bolest vezivnog tkiva i rozaceu. U grupi bolesnika sa izolovanom OSAMG 16 (22,2%) pacijenata je imalo pridruženu autoimunu bolest štitne žlezde. Nije bilo drugih autoimunih komorbiditeta u ovoj grupi bolesnika.

Udruženost godina početka bolesti, distribucije po polu i različitih kliničkih parametara sa generalizacijom OSAMG prikazana je u **Tabeli 3**. Naši rezultati su pokazali da su ženski pol, viša koncentracija nAChR autoantitela u serumu, pozitivan TNT u vreme postavljanja dijagnoze bili statistički značajno udruženi sa generalizacijom bolesti, pri čemu treba naglasiti da je udruženost više koncentracije nAChR autoantitela i pozitivnog nalaza TNT bila statistički visoko značajna. Takođe, generalizacija SAMG se češće javljala kod osoba sa timomom, iako statistička značajnost u ovom slučaju nije dostignuta (**Tabela 3**). Uticaj rane primene imunosupresivne terapije i timektomije na generalizaciju bolesti nije bilo moguće ispitati jer su, za veliki broj bolesnika, nedostajali podaci o

vremenu započinjanja terapije u odnosu na vreme pojave prvih simptoma i postavljanja dijagnoze bolesti.

Tabela 3. Povezanost različitih faktora sa generalizacijom stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG). Vrednosti su prikazane kao učestalosti i procenti ili kao medijana i opseg.

Karakteristike	OSAMG N=72 (34,4%)	GSAMG N=137 (65,6%)	Statistička značajnost*
Godine na početku bolesti	59,5 (17-81)	59 (16-86)	U=4604,5, p=0,43
Pol - Muškarci - Žene	 44 (61,1%) 28 (38,9%)	 60 (43,8%) 77 (56,2%)	X^2 (1, N=209)=5,66, p=0,017
Simptomi na početku bolesti - Semiptoza/ptoza - Diplopije - Semiptoza/ptoza i diplopije	 25 (34,7%) 22 (30,6%) 25 (34,7%)	 55 (40,1%) 28 (20,4%) 54 (39,4%)	X^2 (2, N=209) =2,657, p=0,265
Koncentracija anti-nAChR autoantitela**	3,6 (0-19)	7,7(1-22)	U=1368,5, p<0,001
TNT na početku bolesti - Negativan - Pozitivan - Nepoznato	 50 (69,4%) 19 (26,4%) 3 (4,2%)	 18 (13,1%) 102 (74,5%) 17 (12,4%)	X^2 (1, N=189) =62,804, p<0,001
Timom - Prisutan - Odsutan	 2 (2,8%) 70 (97,2%)	 14 (10,2%) 123 (89,8%)	X^2 (1, N=209) =3,697, p=0,055
Autoimuni komorbiditeti - Prisutni - Odsutni	 16 (22,2%) 56 (77,8%)	 41 (29,9%) 96 (70,1%)	X^2 (1, N=209) =1,413, p=0,235

GSAMG – generalizovana forma SAMG, OSAMG – očna forma SAMG.
*Korišćeni su Mann-Whitney U test i $\chi 2$ (Hi kvadrat) test. ** Uključeni su samo bolesnici sa anti-nAChR autoantitelima

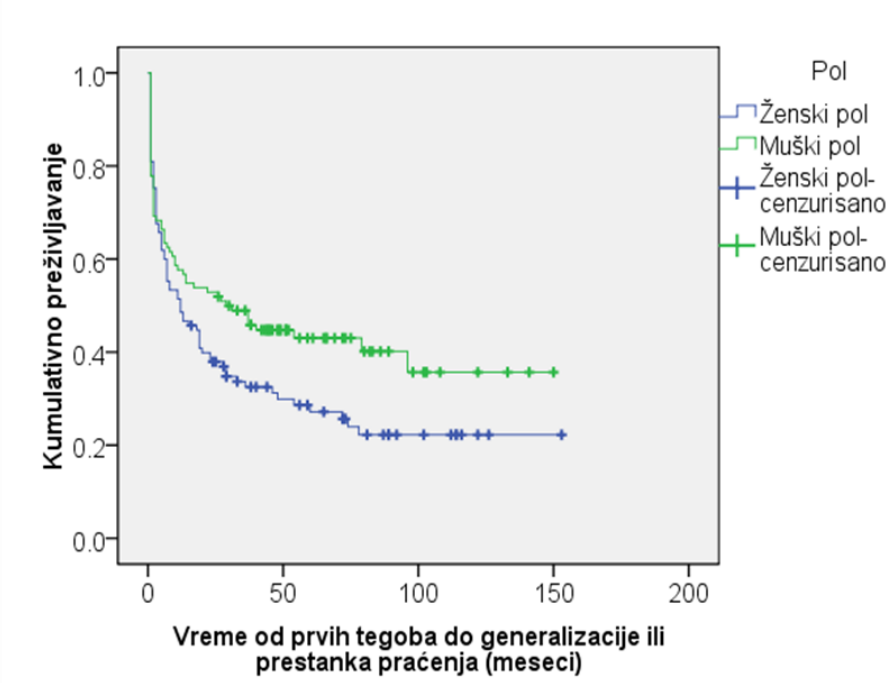
U cilju ispitivanja povezanosti pola bolesnika, koncentracije anti-nAChR autoantitela, nalaza TNT i prisustva timoma i generalizacije SAMG, koristili smo multivarijantnu binarnu logističku regresionu analizu. Celokupan model je bio statistički značajan (vrednost Hi kvadrat testa (4)=66,754, p<0,001), sa Nagelkerke R^2 vrednošću od 0,536. Utvrđeno je da su pol, koncentracija autoantitela na AChR i nalaz TNT statistički značajno, a nalaz TNT visoko statistički značajno povezani sa generalizacijom bolesti (**Tabela 4**).

Tabela 4. Varijable u logističkoj regresionoj analizi koje doprinose modelu.

Varijable		Koef. (B)	SE	OR [eksp (B)]	95% CI za eksp (B)		P-vrednost
					Donji	Gornji	
Pol	Muškarci			1			
	Žene	1,297	0,554	3,659	1,235	10,842	0,019
Koncentracija anti-nAChR autoantitela		0,234	0,075	1,264	1,091	1,463	0,002
Pozitivan TNT		3,072	0,550	21,585	7,340	63,479	<0,001

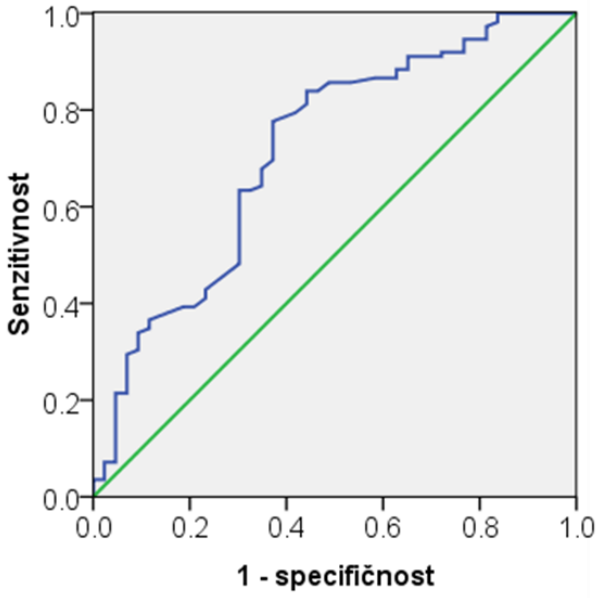
TNT – test nervno-mišićne transmisije, SE (*eng. standard error* – standardna greška), OR (*eng. odds ratio* – odnos šansi); CI (*eng. confidence interval* – interval poverenja)

Bolesnici ženskog pola imali su 3,7 puta veću šansu da razviju generalizovanu formu SAMG, dok su pacijenti sa pozitivnim TNT imali 21,6 puta veću verovatnoću za generalizaciju bolesti nakon kontrole za druge varijable (redom, OR = 3,659, 95% CI = 1,235 – 10,842 i OR = 21,585, 95% CI = 7,340 – 63,479). Takođe, analiza je pokazala da se šanse za generalizaciju bolesti povećavaju za 26,4% sa svakim jediničnim povećanjem titra anti-nAChR autoantitela, nakon kontrole za druge varijable (OR = 1,264, 95% CI = 1,091 – 1,463). Kontrola za druge varijable podrazumeva da je u statističkoj analizi uzet u obzir uticaj drugih faktora koji su povezani sa ishodom, kako bi se procenio nezavisan uticaj posmatranog faktora na ishod. Tokom desetogodišnjeg perioda praćenja, 77 od 105 pacijenata ženskog pola (73,3%) i 60 od 104 pacijenata muškog pola (57,7%) razvilo je generalizovanu formu SAMG. Srednje ukupno vreme do generalizacije SAMG iznosilo je 29 meseci za muškarce i 12 meseci za žene (p=0,046) (**Slika 12**).



Slika 12. Kaplan-Majerova kriva vremena do generalizacije stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) u odnosu na distribuciju po polu

Koncentracija anti-nAChR antitela imala je slabu diskriminatornu sposobnost za predikciju generalizacije SAMG (C statistika, 0,716; 95% IP, 0,622-0,810, P < 0,001) (**Slika 13**). Štaviše, koncentracija anti-nAChR autoantitela u serumu nije se statistički značajno razlikovala između bolesnika koji jesu i onih koji nisu razvili generalizovanu formu bolesti, kako u grupi bolesnika muškog, tako i u grupi bolesnika ženskog pola (redom, U = 1476,5, p = 0,626 i U = 158,5, p = 0,148).



Slika 13. ROC kriva koja pokazuje uticaj koncentracije anti-nAChR autoantitela u serumu u predviđanju verovatnoće generalizacije stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG)

4.2 Studija utvrđivanja učestalosti polimorfizama gena *CTLA4* u našoj kohorti bolesnika i njihovog uticaja na klinički tok i ishod lečenja SAMG

4.2.1 Karakteristike pacijenata

Ukupno 447 SAMG bolesnika (249 ženskog i 198 muškog pola) prosečne starosne dobi 55,49±17,49 godina i 447 kontrolne grupe ispitanika uparenih po polu i starosti (249 ženskog i 198 muškog pola) podvrgnuto je genotipizaciji za varijante rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* (**Tabela 5**). U našoj grupi obolelih približno 40% ispitanika je razvilo SAMG pre 40. godine života (183 bolesnika sa SAMG ranog početka), dok se kod 60% njih bolest javila u kasnijoj životnoj dobi (264 bolesnika sa SAMG kasnog početka). Grupu SAMG ranog početka uglavnom su činile žene (~85%) prosečne starosne dobi u vreme testiranja 39,64±10,53 godina, dok je u grupi bolesnika sa SAMG kasnog početka bilo više muškaraca (~65%) prosečne starosne dobi u vreme testiranja 66,45±12,16 godina. Prosečna starost osoba kontrolne grupe za obe grupe ispitanika iznosila je redom 40,13±11,08 i 66,45±12,16 godina.

Tabela 5. Demografske karakteristike bolesnika sa stečenom autoimunom mijastenijom gravis (SAMG) udruženom sa nAChR autoantitelima i kontrolne grupe ispitanika uparenih po polu i starosti. Vrednosti su prikazane kao učestalosti i procenti ili kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

	SAMG	**Kontrole**
Ukupan broj	447	447
Prosečna starost (godine)	55,49±17,49	55,36±17,16
Pol - Muškarci - Žene	 198 (44,29%) 249 (55,71%)	 198 (44,29%) 249 (55,71%)
SAMG ranog početka	183	183
Prosečna starost (godine)	39,64±10,53	40,13±11,08
Pol - Muškarci - Žene	 28 (15,3%) 155 (84,7%)	 28 (15,3%) 155 (84,7%)
SAMG kasnog početka	264	264
Prosečna starost (godine)	66,45±12,16	65,92±11,90
Pol - Muškarci - Žene	 170 (64,39%) 94 (35,61%)	 170 (64,39%) 94 (35,61%)

4.2.2 Udruženost polimorfizama pojedinačnog nukleotida gena *CTLA4* sa razvojem SAMG u populaciji Srbije

Grupa obolelih i kontrola bili su u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži za oba ispitivana polimorfizma, rs231735 i rs213770 (P>0,05), gena *CTLA4*. Kada je analizirana čitava grupa obolelih nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u učestalosti alela i genotipova rs231735 i rs231770 između obolelih od SAMG udružene sa nAChR autoantitelima i kontrolne grupe ispitanika (**Tabele 6 i 7**).

Tabela 6. Učestalosti alela polimorfizama rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* kod anti-AChR pozitivne stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) (447 bolesnika) i kontrola (447 osoba) i njihova udruženost sa bolešću. Nije pokazana statistički značajna povezanost između alela rs231735 i rs231770 i anti-AChR pozitivne mijastenije gravis.

	NCBI SNV ID (rizični alel, lokus)	
	rs231735 (T, *CTLA4*)	rs231770 (T, *CTLA4*)
Učestalost rizičnog alela		
Pacijenti	0,506	0,387
Kontrole	0,483	0,389
Alelska udruženost		
χ^2	0,895	0,009
P[a]	0,344	0,923
OR (95% CI)	0,914 (0,760-1,101)	0,991 (0,819-1,198)

χ^2 (parametar χ^2 statistike); OR (*eng. odds ratio* – odnos šansi); CI (*eng. confidence interval* – interval poverenja); [a]Pirsonov χ^2-test

Tabela 7. Učestalosti genotipova polimorfizama rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* kod anti-AChR pozitivne stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) (447 bolesnika) i kontrola (447 osoba) i njihova udruženost sa bolešću. Nije pokazana statistički značajna povezanost između genotipova rs231735 i rs231770 i anti-AChR pozitivne mijastenije gravis.

	NCBI SNV ID (aleli, lokus)	
	rs231735 (T[a]/G, *CTLA4*)	rs231770 (T[a]/C, *CTLA4*)
Genotipske frekvencije	TT/ GT/GG	TT/CT/CC
- Pacijenti	0,248/0,514/0,237	0,152/0,470/0,378
- Kontrole	0,237/0,492/0,271	0,152/0,474/0,374
Genetički modeli		
Opšti (2df)	TT vs. GT vs. GG	TT vs. CT vs. CC
- t	1,327	0,021
- P[b]	0,515	0,989
Aditivni (1df)	TT > GT > GG	TT > CT > CC
- t	0,494	-0,097
- P[b]	0,343	0,923
- OR (95% CI)	0,914 (0,758-1,101)	0,991 (0,819-1,198)
Dominantni (1df)	TT + GT vs. GG	TT + CT vs. CC
- t	1,152	-0,138
- P[b]	0,249	0,890
- OR (95% CI)	0,837 (0,619-1,132)	0,981 (0,748-1,286)
Recesivni (1df)	TT vs. GT + GG	TT vs. CT + CC
- t	0,390	-2,51e-015
- P[b]	0,697	1
- OR (95% CI)	0,941 (0,693-1,277)	1 (0,694-1,441)

df (eng. *degrees of freedom* – stepeni slobode), t (parametar t statistike), OR (eng. *odds ratio* – odnos šansi), CI (eng. *confidence interval* – interval poverenja).
[a]Manje učestali alel je podvučen, [b]Logistička regresiona analiza.

U daljem toku je posebno analizirana grupa obolelih prema godinama početka bolesti. Rezultati su pokazali da bolesnici sa SAMG ranog početka imaju statistički značajno manju učestalost alela T polimorfizma rs231735 u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika (44% nasuprot 51,4%; P=0,046; OR=0,744; 95% CI=0,556-0,995), ali pokazuju statistički trend nakon korekcije testom permutacije sa $10e^6$ iteracija (P=0,053) (**Tabela 8**). U cilju podizanja statističke snage ove analize povećali smo veličinu kontrolne grupe (slučajevi:kontrole ~ 1:2,5) i potvrdili da alel T polimorfizma rs231735 smanjuje rizik od pojave SAMG ranog početka sa odnosom šansi od 0,734 (P=0,013; 95% CI=0,575-0,938; P=0,015 nakon korekcije sa $10e^6$ permutacija) (**Tabela 9**).

Tabela 8. Učestalosti alela polimorfizama rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* kod stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) ranog početka (183 bolesnika) i kontrola (183 osobe) i njihova udruženost sa bolešću. Postoji povezanost, na granici statističke značajnosti, između T alela rs231735 i anti-AChR pozitivne mijastenije gravis ranog početka.

	NCBI SNV ID (rizični alel, lokus)	
	rs231735 (T, *CTLA4*)	rs231770 (T, *CTLA4*)
Učestalost rizičnog alela		
- SAMG ranog početka	0,440	0,344
- Kontrole	0,514	0,402
Alelska udruženost		
- χ^2	3,992	2,576
- P[a]	**0,046**	0,108
- OR (95% CI)	**0,744 (0,556-0,995)**	0,782 (0,579-1,056)
- P[b]	**0,053**	

χ^2 (parametar χ^2 statistike); OR (*eng. odds ratio* – odnos šansi); CI (*eng. confidence interval* – interval poverenja); [a]Pirsonov χ^2-test, [b]$10e^6$ test permutacije

Tabela 9. Učestalosti alela polimorfizama rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* kod stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) ranog početka (183 bolesnika) i kontrola (447 osoba) i njihova udruženost sa bolešću.

	NCBI SNV ID (rizični alel, lokus)	
	rs231735 (T, *CTLA4*)	rs231770 (T, *CTLA4*)
Učestalost rizičnog alela		
- SAMG ranog početka	0,440	0,344
- Kontrole	0,517	0,389
Alelska udruženost		
- χ^2	6,142	2,241
- P[a]	**0,013**	0,134
- OR (95% CI)	**0,734 (0,575-0,938)**	0,824 (0,639-1,062)
- P[b]	**0,015**	

χ^2 (parametar χ^2 statistike); OR (*eng. odds ratio* – odnos šansi); CI (*eng. confidence interval* – interval poverenja); [a]Pirsonov χ^2-test, [b]$10e^6$ test permutacije

Imajući u vidu da je pokazana razlika u srednjoj vrednosti životne dobi i distribucije po polu između čitave kontrolne grupe ispitanika i grupe obolelih sa SAMG ranog početka (t=13,933 i

$\chi 2$=47,451, P<0,05), ispitana je asocijacija genotipova rs231735 i rs231770 sa SAMG ranog početka udruženom sa nAChR autoantitelima korišćenjem logističke regresione analize sa godinama života i polom kao kovarijatama. Genotip TT polimorfizma rs231735 pokazao je značajnu asocijaciju sa SAMG ranog početka prema opštem (t=6,07; P=0,048), aditivnom (OR=0,738, 95% CI=0,561-0,972, P=0,031) i recesivnom modelu (OR=0,548, 95% CI=0,339-0,888; P=0,014) (**Tabela 10**). Naši rezultati su pokazali da osobe sa rs231735 genotipom TT imaju niži rizik za razvoj SAMG (OR=0,548, 95% CI=0,339-0,888) prema recesivnom modelu koji najbolje uklapa podatke (AIC=626,4) (**Tabela 10**). Genotip TT polimorfizma rs231770 pokazao je statistički trend asocijacije sa SAMG ranog početka udruženom sa nAChR autoantitelima prema recesivnom modelu (OR=0,563, 95% CI=0,314-1,011; P=0,055) (**Tabela 10**). Korekcija za višestruko testiranje sa $10e^6$ permutacijama potvrdila je dobijene rezultate (P<0,05) (**Tabela 10**). Procenjena snaga naše studije za određivanje asocijacije polimorfizama rs213735 i rs231770 u recesivnom modelu bila je redom 95,94% i 85,64%.

Tabela 10. Učestalosti genotipova polimorfizama rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* kod stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) ranog početka (183 bolesnika) i kontrola (447 osoba) i njihova udruženost sa bolešću prilagođena u odnosu na distribuciju po polu i životnu dob ispitanika uključenih u studiju.

	NCBI SNV ID (aleli, lokus)	
	rs231735 (T[a]/G, *CTLA4*)	rs231770 (T[a]/C, *CTLA4*)
Genotipske frekvencije	TT/GT/GG	TT/CT/CC
- SAMG ranog početka	0,295/0,530/0,175	0,109/0,470/0,421
- Kontrole	0,237/0,492/0,271	0,152/0,474/0,374
Genetički modeli		
Opšti (2df)	TT vs. GT vs. GG	TT vs. CT vs. CC
- t	6,070	4,044
- P[b]	**0,048**	0,132
Aditivni (1df)	TT > GT > GG	TT > CT > CC
- t	-2,158	-1,830
- P[b]	**0,031**	0,067
- OR (95% CI)	0,738 (0,561-0,972)	0,767 (0,577-1,019)
- P[c]	**0,031**	0,068
- AIC	628	
Dominantni (1df)	TT + GT vs. GG	TT + CT vs. CC
- t	-1,099	-1,192
- P[b]	0,272	0,233
- OR (95% CI)	0,785 (0,511-1,208)	0,787 (0,531-1,166)
Recesivni (1df)	TT vs. GT + GG	TT vs. CT + CC
- t	**-2,445**	**-1,922**
- P[b]	**0,014**	**0,055**
- OR (95% CI)	**0,548 (0,339-0,888)**	**0,563 (0,314-1,011)**
- P[c]	**0,014**	**0,047**
- AIC	**626,4**	/
- GSP[d] (%)	**95,94**	**85,64**

df (eng. *degrees of freedom* – stepeni slobode), t (parametar t statistike), OR (eng. *odds ratio* – odnos šansi), CI (eng. *confidence interval* – interval poverenja), AIC (eng. *Akaike information criterion* – Akaike informacioni kriterijum).
[a]Manje učestali alel je podvučen, [b]Logistička regresiona analiza, [c]$10e^6$ permutacioni test, [d]Statistička snaga studije (*post-hoc*).

Suprotno dobijenim rezultatima za obolele od SAMG ranog početka, nije utvrđena razlika u učestalosti alela ni genotipova polimorfizama rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* između grupe bolesnika sa SAMG kasnog početka i kontrolne grupe ispitanika. Rezultati alelskih i genotipskih testova asocijacija za rs231770 i rs231735 kod bolesnika sa SAMG kasnog početka prikazani su u **Tabelama 11 i 12**.

Tabela 11. Učestalosti alela polimorfizama rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* kod stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) kasnog početka udružene sa anti-nAChR antitelima (264 bolesnika) i kontrola (264 osoba) i njihova udruženost sa bolešću.

	NCBI SNV ID (rizični alel, lokus)	
	rs231735 (T, *CTLA4)*	rs231770 (T, *CTLA4*)
Učestalost rizičnog alela		
SAMG kasnog početka	0,468	0,417
Kontrole	0,481	0,380
Alelska udruženost		
χ^2	0,186	1,426
P^a	0,666	0,232
OR (95% CI)	1,054 (0,828-1,342)	1,162 (0,908-1,487)

χ^2 (parametar χ^2 statistike) OR (*eng. odds ratio* – odnos šansi), CI (*eng. confidence interval* – interval poverenja)
[a]Pirsonov χ2-test

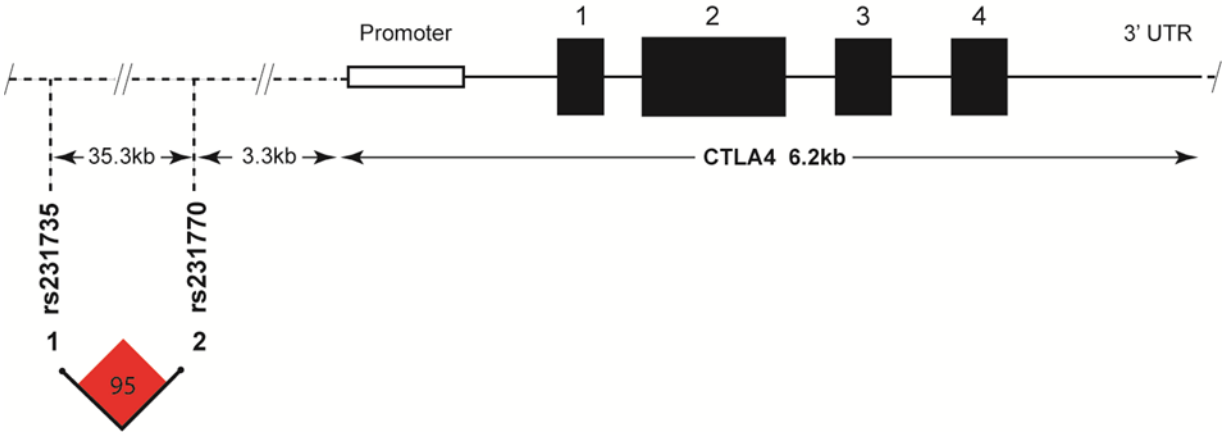
Tabela 12. Učestalosti genotipova polimorfizama rs231735 i rs231770 gena *CTLA4* kod stečene autoimune mijastenije gravis (SAMG) kasnog početka (264 bolesnika) i kontrola (264 osoba) i njihova udruženost sa bolešću.

	NCBI SNV ID (aleli, lokus)	
	rs231735 (T[a]/G, *CTLA4)*	rs231770 (T[a]/C, *CTLA4*)
Genotipske frekvencije	TT/GT/GG	TT/CT/CC
- SAMG kasnog početka	0,216/0,503/0,280	0,181/0,470/0,348
- Kontrole	0,231/0,500/0,269	0,148/0,466/0,386
Genetički modeli		
Opšti (2df)	TT *vs*. GT *vs*. GG	TT *vs*. CT *vs*. CC
- T	0,201	1,447
- *P*[b]	0,904	0,485
Aditivni (1df)	TT > GT > GG	TT > CT > CC
- T	-0,433	1,179
- *P*[b]	0,665	0,238
- OR (95% CI)	1,055 (0,827-1,344)	1,158 (0,907-1,478)
Dominantni (1df)	TT + GT *vs*. GG	TT + CT *vs*. CC
- T	-0,292	0,902
- *P*[b]	0,770	0,367
- OR (95% CI)	1,059 (0,722-1,553)	1,177 (0,826-1,677)
Recesivni (1df)	TT *vs*. GT + GG	TT *vs*. CT + CC
- T	-0,418	1,054
- *P*[b]	0,676	0,292
- OR (95% CI)	1,092 (0,725-1,645)	1,282 (0,808-2,035)

df *(eng. degrees of freedom* – stepeni slobode*),* t (parametar t statistike)*,* OR *(eng. odds ratio* – odnos šansi*);* CI *(eng. confidence interval* – interval poverenja*.*
[a]Manje učestali alel je podvučen, [b]Logistička regresiona analiza

4.2.3 Asocijacija haplotipova rs231735-rs231770 gena *CTLA4* i SAMG ranog početka udruženom sa AChR autoantitelima

Sledeći korak u našem istraživanju odnosio se na analizu haplotipova rs231735-rs231770 u grupi obolelih sa SAMG ranog početka. Rezultati su pokazali visok stepen neravnoteže vezanosti gena između polimorfizama rs231735 i rs231770 (D'=0,952, R^2=0,550) (**Slika 14**). Identifikovana su tri haplotipa rs231735-rs231770 sa učestalošću ≥ 5% (T-T, T-C i G-C). Njihova učestalost u grupi obolelih sa SAMG ranog početka i kontrolnoj grupi ispitanika prikazana je u **Tabeli 13**. Pirsonov χ^2 test i logistička regresija prilagođena prema polu i životnoj dobi analiziranih ispitanika pokazali su graničnu statističku značajnost u učestalosti haplotipova između obolelih sa SAMG ranog početka i kontrola (globalni skor, je redom iznosio P=0,049 i P=0,087) (**Tabela 13**). Među ispitivanim haplotipovima, naši rezultati su pokazali da je haplotip G-C udružen sa SAMG ranog početka (P=0,015, Pirsonov χ^2 test) (**Tabela 13**), a logistička regresiona analiza prilagođena prema polu i životnoj dobi pokazala je da su osobe sa G-C haplotipom imale povećan rizik za razvoj SAMG ranog početka (P=0,027 nakon korekcije sa $10e^6$ permutacijom).



Slika 14. Analiza vezanosti i prikaz haplobloka dva polimorfizma u lokusu *CTLA4*. Haploblok rs231770-rs231735 se nalazi u regionu niske stope rekombinacije (nije prikazano) 3341 bp uzvodno od gena *CTLA4*, dok su polimorfizmi rs231770-rs231735 udaljeni međusobno 35277 bp i imaju visok stepen neravnoteže vezanosti gena (eng. *linkage disequilibrium*, LD) (D' = 0,952, R2 = 0,550, procenjeno korišćenjem softvera Haploview verzija 4.2). Pozicija svakog polimorfizma označena je isprekidanim linijama. Kvadrat predstavlja D' vrednost između varijanti (od 0 do 1), dok tamno crvena boja označava jaku neravnotežu vezanosti.

Tabela 13. Učestalost haplotipova rs231735-rs231770 kod bolesnika sa stečenom autoimunom mijastenijom gravis (SAMG) ranog početka (183 obolelih) i kontrolne grupe ispitanika (447 osoba) i njihova udruženost sa bolešću.

Haplotipovi	Slučajevi	Kontrole	χ^2	df	P^a	T	P^b	OR	P^c
Globalni skor	/	/	6,046	2	**0,049**	4,87	**0,087**	/	**0,086**[d]
T-T	0,337	0,385	2,551	1	0,110	3,23	0,072	0,768	0,072
T-C	0,108	0,135	1,739	1	0,187	0,476	0,490	0,855	0,493
G-C	0,555	0,480	5,867	1	**0,015**	4,860	**0,027**	1,360	**0,027**[e]

df (*eng. degrees of freedom* – stepeni slobode), t (parametar t statistike), OR (*eng. odds ratio* – odnos šansi); CI (*eng. confidence interval* – interval poverenja)
[a]Pirsonov χ^2-test, [b]Logistička regresiona analiza prilagođena, prema polu životnoj dobi, [c]10e^6 permutacioni test, [d]Razlika u frekvencijama haplotipova između slučajeva i kontrola dostigla je graničnu statističku značajnost (globalni skor), [e]Među haplotipovima sa učestalošću većom od 5%, haplotip G-C povećava rizik za razvoj SAMG ranog početka.

5 Diskusija

Stečena autoimuna mijastenija gravis se ubraja u grupu retkih neuroloških oboljenja i javlja se najčešće od svih poremećaja nervno-mišićne spojnice. I pored toga što je SAMG bolest koja se može javiti u bilo kom uzrastu, kod pripadnika oba pola, poznato je da se SAMG ranog početka nešto češće javlja kod žena, za razliku od SAMG kasnog početka koja je češće prisutna kod osoba muškog pola. Iako procentualna zastupljenost polova u različitim studijama varira, zajedničko zapažanje istraživača u ovoj oblasti je da je učestalost oboljevanja osoba ženskog pola dva do tri puta veća (8, 152, 225). U skladu sa tim su i podaci epidemiološke studije koja je sprovedena u našoj sredini, na teritoriji grada Beograda, u dugoročnom tridesetogodišnjem periodu od 1979. do 2008. godine, u kojoj je odnos obolelih žena i muškaraca iznosio 1,5:1 u korist osoba ženskog pola. Pored toga, u pomenutom istraživanju je pokazano da je u grupi mlađih pacijenata sa SAMG, obolelih pre pedesete godine života, zabeležena značajna predominacija osoba ženskog pola (3,7:1), dok je kod bolesnika obolelih posle pedesete godine života postojala podjednaka zastupljenost pripadnika oba pola (1:1) (8). Jedna od najkonzistentnijih epidemioloških karakteristika SAMG je bimodalna distribucija oboljevanja kod žena u odnosu na godine početka bolesti. Naime, pokazano je da kod osoba ženskog pola postoje dva pika učestalosti oboljevanja od SAMG, prvi između 20. i 40. godine života i drugi između 60. i 80. godine života. Kada je reč o pacijentima muškog pola učestalost javljanja bolesti raste sa godinama starosti (5, 6). Interesantno je napomenuti da slične krivulje uzrasne distribucije imaju i ostala autoimuna oboljenja, kao npr. reumatoidni artritis i sistemski eritemski lupus (8, 226). Prema podacima iz literature, postoji nekoliko objašnjenja za navedene epidemiološke razlike u odnosu na distribuciju po polu, a to su pre svega uticaj polnih hormona i narušena inaktivacija X hromozoma (227, 228). Značaj hormonskog statusa u indukciji SAMG potvrđen je činjenicom da trećina žena ispoljava jasna perimenstrualna pogoršanja bolesti, kao i varijacije u kliničkom ispoljavanju u toku trudnoće i periodu posle porođaja (229). Naime, pokazano je da ženski polni hormoni imaju kvalitativni i kvantitativni uticaj na ćelije imunskog sistema, sa jasnim uticajem na produkciju citokina, imunoglobulina, kao i na maturaciju, selekciju i sekreciju antitela od strane B limfocita (227, 230). Pored toga, eksperimentalno je potvrđeno postojanje povećanog broja estrogenih receptora na timocitima i perifernim limfocitima bolesnika sa SAMG (8, 231). U odnosu na patogenetski proces koji leži u osnovi bolesti poznato je da se hiperplazija timusa prvenstveno javlja kod mlađih žena što sugeriše da ženski polni hormoni mogu imati direktan uticaj na patogenezu SAMG, a čime se objašnjava povoljan efekat timektomije u lečenju ovih pacijenata. (1, 79, 83, 227). Pojedini autori ukazuju da estrogeni hormoni u zavisnosti od njihove koncentracije u određenom periodu života obolelih, kao i uticaja mikrookoline, mogu uticati na indukciju antiinflamatornog i proinflamatornog imunskog odgovora (83, 232, 233). Nadalje, testosteron i estrogen mogu imati uticaj i na ekspresiju timusnih faktora transkripcije, kao što je autoimuni regulator, pa samim tim i na rizik za razvoj SAMG udružene sa nAChR autoantitelima (83).

Pored polnih hormona, inaktivacija X hromozoma daje objašnjenje za predominaciju ženskog pola među mlađim pacijentima sa SAMG (228). Pokazano je da se ovaj proces dešava u ranom razvoju ženskog embriona i predstavlja inaktivaciju jedne od dve kopije X hromozoma putem pakovanja inaktiviranog X hromozoma u transkripciono neaktivni heterohromatin. Izbor inaktivacije X hromozoma je najčešće nasumičan, dok je odnos aktivnih X hromozoma dobijenih od oba roditelja podjednak (234). Neretko dolazi do preferencijalne ili narušene inaktivacije X hromozoma, pri čemu oko 75-90% svih ćelija tkiva inaktivira isti X hromozom nasleđen od roditelja ili pak dolazi do zaobilaženja procesa inaktivacije (235). Poznato je, takođe, da je X hromozom bogat genima koji su u vezi sa imunskim odgovorom, zbog čega narušen put inaktivacije X hromozoma, bilo da je reč o preferencijalnoj inaktivaciji ili odsustvu inaktivacije, može uticati na proces imunološke tolerancije u timusu. Ovim mehanizmom se ostvaruju uslovi za razvoj mnogih autoimunskih bolesti, što je pokazano na primeru primarne bilijarne ciroze, sistemskog eritemskog lupusa, Sjögrenovog sindroma i autoimunskog tireoiditisa (228, 236-238). Prva studija koja je ispitivala uticaj narušene inaktivacije X hromozoma kod obolelih od SAMG objavljena je pre tri godine od strane italijanskih istraživača. Istraživanjem je obuhvaćeno 284 SAMG bolesnika ženskog pola kod kojih je ispitivana učestalost

preferencijalne inaktivacije X hromozoma obolelih u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Rezultati su pokazali da je učestalost preferencijalne inaktivacije X hromozoma statistički značajno veća među obolelim od SAMG u odnosu na kontrolnu grupu, kao i da je ovaj fenomen statistički značajno češći kod osoba mlađih od 45 godina života. Shodno ovakvim rezultatima autori su u zaključku ukazali na potencijalnu ulogu narušene inaktivacije X hromozoma u etiopatogenezi razvoja SAMG kod obolelih osoba ženskog pola (228).

Iako je SAMG bolest čija je osnovna karakteristika postojanje izrazite varijabilnosti kliničkih simptoma i znakova, veliki broj dosadašnjih studija je pokazao da su najčešći inicijalni simptomi bolesti bili slabost ekstraokularnih mišića u vidu semiptoze ili ptoze i/ili diplopija koji su registrovani kod 39% do 57% obolelih, ređe i u višem procentu (85-90%) nezavisno od uzrasta, pola ili rasne pripadnosti (8, 14, 83). U skladu sa tim su i rezultati zabeleženi u našem istraživanju koji su pokazali da je okularna simptomatologija bila inicijalni simptom SAMG kod više od polovine pacijenata (59,2%). Visoka učestalost okularnih simptoma na početku i tokom bolesti, objašnjena je prisustvom veće koncentracije „fetalnog tipa" nAChR na postsinaptičkoj membrani ekstraokularnih mišića, koji je identične strukture kao i timusni receptor i samim tim predstavlja primarni cilj imunskog odgovora (20). Takođe, pojedini autori ističu i postojanje specifičnosti u građi nervno-mišićne spojnice ekstraokularnih mišića, sa sniženom ekspresijom komplement zavisnih regulatornih signalnih mehanizama, što ih čini senzitivnijim za oštećenje posredovano aktivacijom sistema komplementa (152).

Poslednjih godina autori ističu i postojanje fenotipskih varijacija bolesti među pripadnicima različitih rasa što je bila polazna osnova za isticanje značaja bioloških faktora u razvoju SAMG (8, 14, 239). Tako je kod pripadnika crne rase zapaženo češće prisustvo okularne simptomatologije, a u studiji Heckmana i sar. uočena je i njena znatno veća rezistentnost na primenjenu terapiju (14). Specifičnosti u kliničkom ispoljavanju uočene su i kod pacijenata žute rase u kojoj se OSAMG javlja sa većom učestalošću i retko se generalizuje, kada poprima oblik blage generalizovane forme bolesti (8, 240-242).

Poznato je da se tokom prve dve godine od početka tegoba kod većine pacijenata (70-80%) bolest generalizuje sa pojavom promenljive slabosti i zamorljivosti i ostalih mišićnih grupa (16, 83, 148, 218, 219, 243). U skladu sa tim su i podaci koji su zabeleženi u našoj kohorti analiziranih bolesnika kod kojih je učestalost generalizacije OSAMG registrovana u 65,6% slučajeva tokom perioda praćenja od 24 do 206 meseci, dok se u 84% ispitanika koji su razvili generalizovanu formu bolesti, generalizacija razvila unutar 24 meseca od pojave prvih simptoma SAMG. Ukoliko okularni simptomi, kao što su spuštanje kapaka i/ili duple slike, ostaju i jedini znaci bolesti i nakon dve godine od početka prvih tegoba može se postaviti dijagnoza izolovane OSAMG (9). Učestalost izolovane OSAMG se značajno razlikuje među različitim analiziranim kohortama obolelih i najčešće se kreće u rasponu od 20 do 60%, s tim da nisu svi bolesnici imali isti period praćenja (83). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je ova forma bolesti potvrđena kod 34,4% obolelih, što odgovara nalazima i ostalih istraživača.

Imajući u vidu nepredvidljiv klinički tok bolesti, poslednjih godina su sprovedena brojna istraživanja sa ciljem utvrđivanja potencijalnih pokazatelja generalizacije SAMG. Većina autora je saglasna da bi identifikacija ovih pokazatelja omogućila tačnu i pravovremenu primenu adekvatne terapije u cilju sprečavanja razvoja teških kliničkih formi bolesti, kao i smanjenje učestalosti pojave neželjenih efekata i komplikacija dugoročne primene imunosupresivne terapije (214-216, 244, 245).

Među prvim ispitivanim pokazateljima generalizacije OSAMG je životno doba na početku bolesti. Prosečna starosna dob na početku bolesti u našoj kohorti ispitanika bila je gotovo identična u obe grupe bolesnika, kako kod onih koji su razvili generalizovanu formu bolesti, tako i u grupi pacijenta sa izolovano OSAMG. Povezanost između starosti u trenutku razvoja prvih simptoma bolesti i rizika od generalizacije SAMG zaslužuje posebnu pažnju, s obzirom na to da je poslednjih godina zabeležen značajan porast incidencije i prevalencije SAMG u starijoj populaciji. Smatra se da je ovakav trend najverovatnije posledica povećanja očekivane dužine života, pri čemu proces starenja utiče na porast obolevanja od SAMG. U prilog ovome govori i češća pojava drugih autoimunih bolesti

kod starijih osoba, ukazujući da starenje može imati značajnu ulogu u razvoju autoimunosti uopšte (8, 246).

I dok nekoliko autora navodi da je starije životno doba povezano sa većim rizikom od razvoja generalizovane forme bolesti, Kamarajah i sar. u svom istraživanju ističu da početak bolesti pre 50. godine života predstavlja faktor rizika za razvoj generalizacije SAMG kod pacijenata sa inicijalno prisutnom izolovanom okularnom simptomatologijom (HR 3.58; 95% CI 1.18–10.90; P = 0.035) (141, 218, 227, 247, 248). Diaz-Maroto sa saradnicima u svom istraživanju koje se bavilo utvrđivanjem faktora rizika za generalizaciju OSAMG nalazi da je srednja vrednost starosti obolelih niža, ali ne i statistički značajno niža u grupi bolesnika koja je razvila generalizovanu formu bolesti u odnosu na ispitanike sa izolovanom OSAMG (249). Imajući sve navedeno u vidu, uključujući i rezultate našeg istraživanja, možemo zaključiti da je uticaj životne dobi na razvoj generalizacije OSAMG u ovom trenutku diskutabilan i zahteva opsežniju analizu na većem uzorku bolesnika.

Uticaj pola na generalizaciju SAMG bio je predmet brojnih istraživanja (215, 227, 249). U našem istraživanju su tokom čitavog perioda praćenja žene češće razvijale generalizovani oblik SAMG. Dodatno, pokazali smo da je ženski pol povezan sa generalizacijom bolesti. Sa ovim rezultatima saglasni su i nalazi drugih studija koje su se bavile ovom temom (215, 227, 249). Iako tačan mehanizam kojim ženski pol utiče na razvoj generalizacije SAMG nije u potpunosti jasan u dosadašnjoj literaturi se može pronaći nekoliko potencijalnih objašnjenja. Kao i u slučaju predominacije ženskog pola među mlađim obolelim osobama, jedno od objašnjenja se odnosi na uticaj ženskih polnih hormona na imunski sistem (227, 230), dok se kao drugi potencijalni razlog navodi veća učestalost limfofolikularne hiperplazije timusa kod osoba ženskog pola, o čijem će uticaju na generalizaciju SAMG biti reči u daljem tekstu (227, 233). U nekim studijama je pokazano da osobe ženskog pola imaju višu koncentraciju anti-nAChR autoantitela, što se takođe navodi kao jedan od razloga veće učestalosti generalizacije SAMG u ženskoj populaciji (227). Međutim, naši rezultati ovo zapažanje nisu potvrdili. Naime, vrednosti koncentracije anti-nAChR autoantitela se nije značajno razlikovala u odnosu na distribuciju po polu u našoj kohorti analiziranih SAMG ispitanika.

Koncentracija anti-nAChR autoantitela u serumu pacijenata sa SAMG je jedan od najčešće prepoznatih pokazatelja generalizacije ove bolesti u do sada sprovedenim ispitivanjima (141, 148, 219, 227, 247-252). Distribucija učestalosti pozitivnog nalaza specifičnih autoantitela u serumu naših bolesnika, kako onih sa sekundarno generalizovanom formom bolesti (78% bolesnika sa anti-nAChR antitelima i 24% bolesnika sa anti-MuSK autoantitela u grupi anti-nAChR seronegativnih bolesnika), tako i onih sa izolovanom OSAMG (65,2% bolesnika sa anti-nAChR antitelima i 23,6% duplo seronegativnih, dok anti-MuSK autoantitela nisu detektovana) bila je u skladu sa podacima objavljenim u drugim studijama (16, 83, 148, 218, 219, 243). Važno je naglasiti da u vreme sprovođenja istraživanja u Srbiji nije bila moguća analiza seruma na prisustvo anti-LRP4 autoantitela, zbog čega učestalost ovih autoantitela u našoj kohorti bolesnika nije ispitana. Naši rezultati su ukazali na statistički značajnu povezanost više koncentracije anti-nAChR autoantitela i generalizacije SAMG koja se prezentovala inicijalnom okularnom simptomatologijom. Takođe, pokazali smo da je koncentracija anti-AChR autoantitela povezana sa razvojem generalizovane forme SAMG, imajući u vidu da šansa za generalizaciju bolesti raste za čak 26,4% sa svakom jedinicom povećanja koncentracije antitela. Uprkos povezanosti porasta koncentracije anti-nAChR autoantitela i generalizacije bolesti, nismo pokazali postojanje određene granične vrednosti koncentracije anti-nAChR autoantitela koja bi imala dovoljno dobru senzitivnost i specifičnost za razlikovanje bolesnika koji su razvili generalizovanu formu bolesti od onih koji nisu.

Prvo istraživanje koje je ukazalo na povezanost više koncentracije anti-nAChR autoantitela i generalizacije SAMG sprovedeno je, od strane nemačkih autora, pre skoro 30 godina, retrospektivno je analiziralo 78 bolesnika sa inicijalno okularnom prezentacijom SAMG (254). Opsežnije istraživanje, ali na azijskoj populaciji, kasnije je sprovela grupa korejskih istraživača koja je u studiju uključila 202 bolesnika sa inicijalno okularnim manifestacijama bolesti i potvrdila prediktivni značaj više koncentracije anti-nAChR autoantitela na generalizaciju SAMG (219). Nakon ove studije usledio je čitav niz istraživanja koja su obuhvatala različite kohorte bolesnika sa ovim nervno-mišićnim oboljenjem. Jednu od opsežnijih sproveo je Peeler sa saradnicima tokom protekle decenije. Ova

retrospektivna opservaciona kohortna studija obuhvatila je 223 bolesnika sa inicijalnom okularnom prezentacijom SAMG i pokazala je da su pacijenti koji su razvili generalizovanu formu bolesti imali značajno višu koncentraciju anti-nAChR autoantitela u poređenju sa bolesnicima sa izolovanom OSAMG (srednja vrednost je redom iznosila 12,7 i 4,2 nmol/L; $p < 0,05$) (167). Pet godina kasnije je ove rezultate potvrdio i Feng sa saradnicima. Ova grupa kineskih istraživača je u studiju uključila bolesnike sa izolovano okularnim simptomima tokom perioda praćenja od najmanje dve godine uz njihovo dalje kontinuirano praćenje. Njihovi rezultati ne samo da su pokazali da je viša koncentracije anti-nAChR autoantitela bila udružena sa generalizacijom SAMG, već su utvrdili i da je vrednost koncentracije ovih antitela ≥6.13 nmol/L povezana sa generalizacijom bolesti (255). Međutim, prediktivni značaj ove vrednosti koncentracije anti-nAChR antitela nije potvrđen u narednim studijama, sve do nedavno kada su istraživači sa Tajlanda pokazali da prediktivni značaj za generalizaciju SAMG ima vrednost koncentracije anti-nAChR antitela preko od 8,11 nmol/L (OR: 3,66, 95% CI: 1,19–11,26; $p = 0,023$) (245). Uprkos nekonzistentnim rezultatima različitih studija, kada govorimo o specifičnoj vrednosti koncentracije anti-nAChR autoantitela koja bi imala prediktivni značaj za generalizaciju SAMG, sve studije su saglasne je viša koncentracija pomenutih antitela povezana sa generalizacijom bolesti.

Kada je reč o patologiji timusa, u našem istraživanju smo ispitivali udruženost timoma sa generalizacijom SAMG. Sa dva bolesnika kod kojih je dijagnostikovan timom u grupi izolovane OSAMG i 14 ispitanika u grupi koja je razvila generalizovanu formu bolesti, naši rezultati su pokazali veću učestalost timoma u grupi generalizovane forme SAMG. Međutim, statistička značajnost nije dostignuta, što se može objasniti malim uzorkom bolesnika. Do sličnih rezultata došla je i Lina Nagia sa saradnicima u retrospektivnoj multicentričnoj analizi objavljenoj 2015. godine koja je obuhvatila 158 bolesnika sa inicijalnom okularnom prezentacijom bolesti. Rezultati ove studije su takođe pokazali da je učestalost timoma veća u grupi pacijenata kod kojih se bolest generalizovala, ali bez dostizanja statističke značajnosti. Interesantno je da u ovom istraživanju korišćenjem multivarijantne i univarijantne regresione analize ni jedan ispitivan parametar uključujući pol, godine početka bolesti ili pozitivan titar anti-nAChR autoantitela nije dostigao statistički prediktivni značaj kada je reč o generalizaciji OSAMG (214). Dve godine kasnije je grupa autora iz Pekinga analizirala faktore generalizacije OSAMG kod 59 bolesnika i takođe utvrdila veću učestalost timoma u grupi pacijenata koja je tokom perioda praćenja razvila generalizovanu formu bolesti, ali bez dostizanja statističke značajnosti što je takođe objašnjeno malim ispitivanim uzorkom (218). Sa druge strane, rezultati nekih kasnije sprovedenih studija su potpuno oprečni. Naime, dok su dve nezavisne studije iz Nemačke i Singapura iste, 2018. godine, ukazale da prisustvo timoma nedvosmisleno ima prediktivni značaj na generalizaciju OSAMG, godinu dana kasnije grupa istraživača iz SAD ne samo da nije ukazala na prediktivni značaj timoma, već nije pokazala ni trend veće učestalosti timoma među bolesnicima koji su razvili generalizovanu formu bolesti (148, 216, 252). Jedno od mogućih objašnjenja dobijenih oprečnih rezultata i zaključaka može biti činjenica da su sve studije obuhvatile uglavnom kohorte sa malim brojem bolesnika i varijabilnim periodom praćenja. Pored toga, pokazano je da se klinički tok anti-nAChR pozitivne SAMG udružene sa timomom i one bez timoma ne razlikuje značajno ukoliko se sprovodi adekvatan terapijski protokol, što je važno imati na umu tokom praćenja i lečenja ovih pacijenata. Takođe, dijagnoza timoma sa sobom povlači i agresivniji terapijski pristup uz obaveznu timektomiju, koja sa druge strane nije obavezna kod OSAMG udružene sa anti-nAChR autoantitelima bez timoma, što zajedno može uticati na klinički tok i učestalost generalizacije SAMG.

Imajući u vidu da dijagnoza limfofolikularne hiperplazije zahteva histopatološku potvrdu čiji je nalaz nedostajao kod većine bolesnika, nismo bili u mogućnosti da uradimo adekvatnu analizu njenog uticaja na generalizaciju SAMG u našoj kohorti analiziranih pacijenata. Ako se osvrnemo na rezultate sprovedenih studija koje su ispitivale ovu povezanost, kao i u slučaju timoma, rezultati i zaključci nisu u potpunosti koherentni. Tako su u svojim nezavisnim istraživanjima Kisabaj, Li i Vang sa saradnicima ukazali na povećan rizik od generalizacije bolesti kod pacijenata sa timusnom hiperplazijom, dok su, kontradiktorno, rezultati do kojih je došao Hong pokazali veću učestalost limfofolikularne hiperplazije timusa u grupi bolesnika sa izolovanom OSAMG (216, 218, 256).

Autori nedavno objavljenog revijalnog rada su, analizirajući nekonzistentnost zaključaka različitih studija, istakli da za razliku od timoma, gde je mnogo više argumenata na strani njegovog pozitivnog uticaja na generalizaciju SAMG, u slučaju limfofolikularne hiperplazije dokazi i nisu tako čvrsti, zbog čega se sugeriše sprovođenje opsežnijih istraživanja na ovu temu na većoj populaciji analiziranih ispitanika (244).

Kao jedan od pokazatelja generalizacije SAMG u dosadašnjim istraživanjima izdvojio se i patološki nalaz TNT (219, 252, 253, 257, 258). U našoj kohorti analiziranih bolesnika patološki nalaz ovog elektrofiziološkog testa imalo je skoro 30% bolesnika sa izolovanom OSAMG, pri čemu su svi bolesnici testirani prema standardizovanom protokolu na tri sistema: *n. facialis – m. nasalis*, *n. axillaris – m. deltoideus* i *n. ulnaris – m.abductor digiti minimi*. Naši rezultati su u skladu sa podacima iz literature gde se učestalost pozitivnog nalaza TNT sreće kod oko 30-50% bolesnika sa izolovano okularnom formom bolesti (258-260). Sa druge strane, naši rezultati su pokazali da TNT ima prediktivni značaj za generalizaciju bolesti. Naime, bolesnici sa pozitivnim nalazom bili su u skoro 22 puta većem riziku od razvoja generalizovane forme bolesti u odnosu na bolesnike sa negativnim nalazom TNT. Do sličnih zaključaka došla je i grupa korejskih autora u istraživanju koje se odnosilo na ulogu TNT u predikciji generalizacije SAMG kod pacijenata sa inicijalnom okularnom simptomatologijom. Ova retrospektivna studija je obuhvatila 112 bolesnika, od kojih je 24 (21.4%) razvilo generalizovanu formu SAMG tokom perioda praćenja od minimum 6 meseci. Kod svih bolesnika testiranje je sprovedeno na pet mišića i to: *m. nasalis*, *m. abductor digiti minimi*, *m. flexor carpi ulnaris* i *m. trapezius*. Rezultati su pokazali da je učestalost patološkog nalaza na ispitanim mišićima ekstremiteta statistički značajno češća u grupi pacijenta koja je razvila generalizovanu formu bolesti u odnosu na one sa izolovano OSAMG ($p<0,001$, $p=0,002$, i $p<0,001$ redom za *m. trapezius*, *m. abductor digiti minimi* i *m. flexor carpi ulnaris*). Takođe, Koksov model proporcionalnog rizika je pokazao da je patološki nalaz TNT značajno udružen sa generalizacijom SAMG (OR=3,13, 95% CI=1,18–8,32), pri čemu je odnos rizika bio značajno viši za patološki nalaz TNT na ispitanim mišićima ekstremiteta u odnosu na mišiće lica (257). Smatra se da patološki nalaz TNT, posebno na mišićima ekstremiteta može biti pokazatelj supkliničke generalizacije bolesti koja se kliničkim neurološkim pregledom u tom momentu ne može registrovati, ali koja u daljem toku bolesti postaje i klinički manifestna. Međutim, potrebno je naglasiti da se klasifikacija SAMG odnosi isključivo na manifestnu kliničku prezentaciju bolesti, pa se stoga kod ovih pacijenata sa izolovanom očnom simptomatologijom postavlja dijagnoza okularne forme SAMG uprkos pozitivnom nalazu TNT. Sa ovim zapažanjem saglasni su i autori pomenutog rada, koji sugerišu da se TNT obavezno sprovodi i na mišićima ekstremiteta i kod bolesnika sa izolovanim okularnim simptomima što je bio obavezan deo protokola i u našem istraživanju (257). Rezultati nekoliko drugih radova koji su ispitivali uticaj TNT na generalizaciju SAMG uglavnom govore o pozitivnoj korelaciji patološkog nalaza i generalizacije bolesti, ali ona nije u svim slučajevima bila i statistički značajna. U ovim radovima, međutim, TNT nije rađen na konzistentan način kod svih uključenih bolesnika, što nosi rizik od postojanja selekcione pristrasnosti i zahteva oprez pri tumačenju njihovih rezultata i zaključaka (219, 252, 253).

Kao što smo naveli u uvodnom delu disertacije, terapija bolesnika sa SAMG i izolovanim okularnim simptomima bolesti najčešće se započinje primenom inhibitora holinesteraze, a u slučaju nezadovoljavajućeg efekta uvodi se i imunosupresivna terapija (65, 83). Sa ranom primenom imunosupresivne terapije kod ovih pacijenata saglasno je više autora, sa obrazloženjem da ona može sprečiti generalizaciju bolesti, iako za to dugo nisu postojali jasni dokazi (192, 250, 254, 261-263) Glavna ograničenja studija koje zagovaraju tezu o ranoj primeni imunosupresivne terapije je nedostatak podataka o vremenu započinjanja terapije u odnosu na početak prvih tegoba bolesti, inicijalne terapijske doze, kao i dužina praćenja bolesnika (250, 254, 262-264). Imajući u vidu sva ograničenja ranije sprovedenih ispitivanja Menin sa saradnicima se u nedavno objavljenoj retrospektivnoj kohortnoj studiji ciljano bavio ovom temom. Njihovo istraživanje je obuhvatilo 154 bolesnika sa izolovanim okularnim simptomima na početku bolesti, od koji se tokom perioda praćenja, koje je iznosilo 87.4 ± 73 meseci, generalizovalo 43 (28%) bolesnika. Autori su inicijalno analizirali grupu pacijenata koja je lečena imunosupresivnom terapijom (steroidnom i/ili

nesteroidnom) i poredili je sa neuparenom grupom bolesnika koja nije dobijala imunosupresive pre generalizacije bolesti. Dalju analizu upotpunili su uparivanjem ove dve grupe bolesnika po polu, životnoj dobi na početku bolesti, dužini trajanja bolesti, serološkom statusu i primeni inhibitora acetilholinesteraze. Njihovi rezultati su nedvosmisleno pokazali da rana primena imunosupresivne terapije vremenom značajno smanjuje rizik od generalizacije bolesti (264). Iako u našem istraživanju nismo mogli da se detaljnije bavimo ovom analizom, jer su nedostajali podaci o tačnom vremenu započinjanja imunosupresivne terapije kod velikog broja bolesnika, naši rezultati su pokazali da je vreme od inicijalnih simptoma do postavljanja dijagnoze u grupi izolovane OSAMG bilo statistički značajno kraće u odnosu na grupu pacijenata kod kojih je došlo do generalizacije bolesti. Imajući u vidu da je u grupi izolovane OSAMG veliki broj bolesnika (93%) lečen upravo imunosupresivnom terapijom, indirektno zaključujemo da i naši rezultati podržavaju tezu o ranoj primeni imunosupresivne terapije kao indikatoru smanjenog rizika od generalizacije bolesti. Međutim, ovaj zaključak je neophodno potkrepiti detaljnijim istraživanjem, koje bi ciljano analiziralo uticaj lečenja imunosupresivima na generalizaciju bolesti, po mogućstvu na većem broju ispitanika.

Dobro je poznato da bolesnici sa SAMG često imaju pridružene autoimune bolesti. Najčešće je reč o udruženom javljanju Grejvsove bolesti, Hašimoto tireoiditisa, reumatoidnog artritisa, multiple skleroze, sistemskog eritemskog lupusa, tip I dijabetes melitusa, perniciozne anemije, Sjögrenovog sindroma, Kronove bolesti i ulceroznog kolitisa (265). Ovakvo udruženo javljanje drugih autoimunih bolesti, podatak da oko 30% bolesnika ima rođake sa SAMG ili drugim autoimunim oboljenjem, kao i nalaz češćeg prisustva određenih HLA haplotipova kod obolelih od SAMG, jasno upućuju na postojanje genetičke osnove za razvoj ove bolesti (8, 9, 266, 267). Uticaj autoimunih komorbiditeta na razvoj generalizacije OSAMG još uvek je predmet debate među istraživačima u ovoj oblasti. U skladu sa nalazima većine istraživača u studiji koja je ranije sprovedena u populaciji obolelih sa SAMG u Beogradu, udružene bolesti sa jasnom autoimunom osnovom registrovane su kod 18,2% obolelih. Kod najvećeg broja pacijenata radilo se o udruženoj pojavi oboljenja štitaste žlezde (8,9%), dok su druge imunski posredovane bolesti bile prisutne znatno ređe. Tako je reumatoidni artritis potvrđen kod 1,5% ispitanika, multipla skleroza kod 0,9%, a sistemski eritemski lupus kod samo 0,3% obolelih (8). Rezultati aktuelnog istraživanja su pokazali da je približno 30% bolesnika sa sekundarnom generalizacijom SAMG imalo neku od pridruženih autoimunih bolesti i u 90 % slučajeva se radilo o udruženom oboljenju štitaste žlezde, dok je udruženost sa ostalim autoimunim bolestima bila zanemarljiva. U grupi obolelih sa izolovanom OSAMG, udruženost sa autoimunim bolestima je registrovana u 22% slučajeva i svi pacijenti su imali oboljenje štitaste žlezde. Stoga, na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da se učestalost autoimunih komorbiditeta nije statistički značajno razlikovala u obe analizirane grupe ispitanika naše kohorte. Uticaj pridruženih autoimunih bolesti na generalizaciju SAMG ispitivao je i Guo sa saradnicima u svojoj retrospektivnoj multicentričnoj studiji koja je obuhvatila 572 bolesnika sa inicijalnom okularnom prezentacijom bolesti, od kojih je samo njih 17 (3%) imalo pridruženi autoimuni komorbiditet – 12 bolesnika kod kojih je došlo do generalizacije bolesti (428 bolesnika, 2,8%) i 5 bolesnika sa izolovanom OSAMG (144 bolesnika, 3,5%) (268). Nasuprot tome, Li i Wong su u svojim nezavisnim istraživanjima ukazali na prediktivni značaj autoimunih komorbiditeta na generalizaciju OSAMG (247, 269). Dakle, kao i u slučaju mnogih drugih potencijalnih pokazatelja generalizacije SAMG i uticaj autoimunih komorbiditeta zahteva potvrdu na većem uzorku bolesnika po mogućstvu u prospektivnoj studiji.

Naša studija analize kliničkih, elektrofizioloških i imunoserološkh pokazatelja toka bolesti i ishoda lečenja SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima ima nekoliko ograničenja. Na prvom mestu radi se o retrospektivnoj studiji sa relativnom malim uzorkom ispitanika. Ipak, možemo smatrati da je uzorak na kome je sprovedeno aktuelno istraživanje reprezentativan za populaciju bolesnika u našoj zemlji imajući u vidu da je Klinika za neurologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije u Beogradu referentni nacionalni centar za dijagnostikovanje i lečenje pacijenata sa SAMG i da ka njemu gravitiraju skoro svi pacijenti sa sumnjivom ili potvrđenom dijagnozom ove bolesti sa teritorije grada Beograda i centralne Srbije, ali i određen broj pacijenata iz ostalih delova Srbije. Drugo, iako su za određene pacijente koje smo uključili u istraživanje nedostajali imunoserološki i/ili

elektrofiziološki podaci, oni nisu značajno uticali na izvedene zaključke imajući u vidu da je njihova učestalost bila niska.

CTLA-4 je poznat kao važna imunološka kontrolna tačka uključena u ko-inhibitorni signalni put koji doprinosi imunološkoj homeostazi. Iako je CTLA-4 povezan sa autoimunim bolestima uključujući multiplu sklerozu, reumatoidni artritis, inflamatorne bolesti creva i tip I dijabetes melitus, udruženost sa SAMG do danas nije u potpunosti razjašnjena (111). Jedna od prvih studija asocijacija na nivou genoma koja je uključila 972 SAMG bolesnika iz Severne Amerike, a koju je sproveo Renton sa saradnicima identifikovala je *CTLA4* kao lokus rizika za razvoj SAMG udružene sa nAChR autoantitelima. U ovom lokusu je identifikovano 40 polimorfizama pojedinačnog nukleotida čija P vrednost dostiže vrednost $<10^{-6}$, a među kojima je strožiji prag značajnosti od $<5\times10^{-8}$ dostigla varijanta rs231770 (91). Međutim, opsežnija studija asocijacija na nivou genoma sa nezavisnim dizajnom za pol i životnu dob, koja je uključila 1873 pacijenta iz Severne Amerike nije identifikovala *CTLA4* kao lokus udružen sa SAMG (89). Nedavno je *in silico* analiza identifikovala rs231770 i rs231735 kao verovatno uzročne SAMG polimorfizme (124). Međutim, pretraživanjem literature nismo pronašli studiju koja je istraživala potencijalnu udruženost navedenih genetičkih varijanti, rs231735 i rs231770, i SAMG. S tim u vezi, sproveli smo studiju slučajeva i kontrola sa ciljem da istražimo potencijalnu udruženost ovih genetičkih varijanti i SAMG udružene sa anti-nAChR autoantitelima u velikoj nezavisnoj kohorti pacijenata iz srpske populacije. Naši rezultati su pokazali da su polimorfizmi rs231770 i rs231735 u lokusu *CTLA4* udruženi sa SAMG ranog početka. Pokazali smo da se učestalost alela T varijante rs231735 kod SAMG ranog početka statistički značajano razlikuje u odnosu na kontrole, kao i da genotipovi TT varijanti rs231735 i rs231770 imaju protektivni efekat na razvoj SAMG ranog početka. Posledično, pokazali smo da rs231735-rs231770 haplotip G-C povećava rizik za razvoj SAMG ranog početka.

Iako nisu u saglasnosti sa rezultatima do kojih je došao Renton sa saradnicima, a koji su pokazali da je lokus *CTLA4* udružen sa SAMG kasnog početka, naši rezultati su potvrdili da SAMG ranog i kasnog početka imaju različite genetičke osnove (91, 124). Uzimajući u obzir da T ćelije koje eksprimiraju protein CTLA-4 migriraju u timus radi sazrevanja, maturacije i kasnije ekskrecije na periferiju, naši rezultati podržavaju koncept intratimične patogeneze u inicijaciji SAMG ranog početka udružene sa nAChR autoantitelima (152, 270). Povoljan efekat timektomije kod većine bolesnika sa SAMG ranog početka objašnjava se otklanjanjem limfoidnih folikula i germinativnih centara u timusu koji promovišu hipermutaciju gena receptora B-ćelija i intratimusnu proizvodnju anti-nAChR antitela visokog afiniteta (79). Poznato je da funkcija timusa postepeno opada sa godinama, što je povezano sa gubitkom organizovane arhitektonike i povećanim taloženjem masnih ćelija u ovom organu. Iako preostali parenhim kod obolelih od SAMG kasnog početka i dalje može eksportovati pojedine T ćelije, morfometrijska analiza nije pokazala značajnu razliku u timusnoj arhitektonici obolelih i zdravih osoba (271). Nadalje, timus igra važnu ulogu u centralnoj autotoleranciji zasnovanoj na klonskoj deleciji autoreaktivnih T ćelija (272). Tokom sazrevanja imunskih T ćelija, CTLA-4 utiče na modulaciju repertoara T ćelijskog receptora (TCR) i na preživljavanje (pozitivnu selekciju) samo onih T ćelija koje ne reaguju na sopstvene antigene (272, 273). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da gubitak B-ćelijske tolerancije koja utiče na razvoj SAMG zavisi od autoreaktivnih T ćelija (274). Štaviše, u skorašnjim studijama je otkriveno prisustvo nAChR-reaktivnih T ćelija kod obolelih od SAMG, ukazujući na njihov doprinos u aktivaciji i maturaciji nAChR autoantitela koje proizvode B ćelije (275). Pored modulacije repertoara T ćelijskog receptora, uloga CTLA-4 u ranom razvoju SAMG mogla bi se objasniti i činjenicom da je koinhibitorna funkcija CTLA-4 značajnija za T ćelije u mlađem uzrastu imajući u vidu da aktivacija T ćelija slabi sa starenjem (276).

Do danas je sprovedeno više studija slučajeva i kontrola koje su ispitivale varijante gena *CTLA4* ukazujući da su različiti polimorfizmi pojedinačnog nukleotida specifični za različite kliničke forme bolesti, dok je skorašnja meta-analiza ukazala da varijanta rs231775 generalno povećava rizik za razvoj SAMG (277). Pokazano je da je polimorfizam rs231775 lokalizovan na poziciji +49 egzona 1 gena *CTLA4* i da je u visokoj neravnoteži vezanosti sa polimorfizmima rs231735 i rs231770 u evropskoj populaciji. Ranije studije sprovedene u populaciji obolelih u Kini ukazale su da je

polimorfizam rs231775 udružen sa opštim rizikom za razvoj SAMG, kao i za pojavu okularne forme bolesti i nastanak SAMG udružene sa timomom (119-121, 221). Iako dve studije u evropskoj populaciji nisu uspele da potvrde pretpostavljenu udruženost, Chuang je sa saradnicima pokazao udruženost varijante rs231775 i SAMG kasnog početka udružene sa timomom u populaciji SAMG pacijenata u Nemačkoj (115, 116, 118, 278). Ova nekonzistentnost u vezi sa rs231775 može biti posledica malog broja slučajeva koji su analizirani u različitim istraživanjima. Nadalje, rezultati sprovedenih studija ukazuju da i polimorfizmi rs231770 i rs231735 mogu biti od značaja za razvoj različitih kliničkih formi SAMG. Pored toga, postoje i dokazi da različite podgrupe SAMG mogu različito reagovati na primenjenu terapiju (152). Smatra se da opsežnije i multicentrične studije genetičke osnove različitih kliničkih formi SAMG mogu pomoći u identifikaciji dodatnih gena koji bi mogli biti ciljna mesta u personalizovanom pristupu u lečenju ovih pacijenata (279). Takođe, većina istraživača je saglasna da su potrebne nove studije slučajeva i kontrola kako da bi se istražila povezanost polimorfizama rs231735, rs231770 i rs231775 sa različitim kliničkim oblicima bolesti, kao i da bi se razjasnio potencijalni udruženi efekat etničke pripadnosti na ishod lečenja SAMG u odnosu na različite podgrupe ove bolesti. Dobro je poznato da smanjena ekspresija *CTLA4* može dovesti do pada imunske tolerancije i uticati na razvoj autoimunih bolesti kao što su reumatoidni artritis, tip I dijabetes melitusa, multipla skleroza i sistemski eritemski lupus (280-283). Nedavna *in silico* analiza je pokazala da su rs231770 genotip TT i rs231735 genotip TT povezani sa nešto nižom ekspresijom *CTLA4* gena u CD4+ T ćelijama pacijenata sa SAMG, što sugeriše da ove varijante utiču na patogenetski proces koji leži u osnovi SAMG (124). Pored toga, pokazalo se da genotip GG rs231775 dovodi do smanjene funkcije CTLA-4, doprinoseći patogenezi Grejvsove bolesti (284). Pošto fizički region između rs231770, rs231735 i rs231775 (koji su u visokoj neravnoteži vezanosti) obuhvata kodirajući region, promoter i pojačivače gena *CTLA4*, pojedini istraživači sugerišu potrebu za finim bioinformatičkim mapiranjem i funkcionalnom procenom ovog regiona u cilju utvrđivanja patogenetske uloge pomenutih genetičkih varijanti putem smanjenja nivoa CTLA-4 kod pacijenata sa SAMG ranog početka (109).

Naša kohorta je obuhvatila skoro 900 ispitanika i homogena je u pogledu njihovog serološkog statusa odnosno nivoa anti-nAChR antitela u serumu, a, takođe, predstavlja i kohortu sa značajnim brojem obolelih kada se u obzir uzme činjenica da SAMG pripada grupi retkih neuroloških oboljenja. Mišljenja smo da bi naš pristup u sprovođenju studije slučajeva i kontrola, koji su upareni prema starosti, polu i etničkoj pripadnosti, mogao pružiti sveobuhvatniji uvid u genetičku osnovu SAMG. Međutim, glavno ograničenje naše studije je nemogućnost sveobuhvatnijeg istraživanja heterogenosti SAMG. Proučavanje povezanosti lokusa *CTLA4* sa timusnim statusom, kliničkim manifestacijama, kliničkim skalama ili odgovorom na terapiju u našoj kohorti bolesnika može usloviti donošenje lažno pozitivnih ili lažno negativnih zaključaka, a ponavljanje analize ne bi bilo moguće zbog ograničene veličine uzoraka podgrupa. Uzimajući u obzir da je SAMG retka bolest, a da sveobuhvatnija istraživanja zahtevaju adekvatnu veličinu uzorka, smatramo da bi saradnja različitih centara za nervno-mišićne bolesti omogućila udruživanje studijskih grupa kako bi se sprovele sveobuhvatnije genetičke analize.

Potrebno je naglasiti da je značaj naše studije u tome što je po prvi put iznela podatke o genetičkoj strukturi koja leži u osnovi SAMG u srpskoj populaciji i pokazala da su varijante rs231735 i rs231770 unutar lokusa *CTLA4* povezane sa SAMG ranog početka. Ipak, potrebne su dalje multicentrične studije u različitim populacijama, koje bi obuhvatile veći broj pacijenata u cilju procene značajnosti učešća CTLA-4 u patogenezi SAMG, s obzirom na to da CTLA-4 postaje ciljno mesto za lečenje različitih autoimunih bolesti što bi moglo doprineti personalizovanom pristupu u lečenju ovih pacijenata (111).

6 Zaključci

- Retrospektivna studija analize kliničkih, elektrofizioloških i imunoseroloških pokazatelja toka bolesti i ishoda lečenja SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima obuhvatila je 209 bolesnika.
- Učestalost generalizacije SAMG sa inicijalnim okularnim simptomima tokom perioda praćenja iznosila je 65,6%, dok su kod 34,4% bolesnika perzistirali isključivo okularni simptomi i znaci bolesti tokom čitavog perioda praćenja.
- U 84% pacijenata koji su razvili generalizovanu formu bolesti, generalizacija se razvila unutar 24 meseca od pojave prvih simptoma i znakova bolesti.
- Tokom čitavog perioda praćenja žene su češće razvijale generalizovani oblik SAMG. Takođe, pokazali smo da ženski pol ima prediktivni značaj za generalizaciju bolesti.
- Prosečna starosna dob u našoj kohorti bolesnika bila je gotovo identična u obe grupe pacijenata, kod onih koji su razvili generalizovanu formu bolesti, kao i u grupi obolelih sa izolovanom OSAMG, te njen uticaj na generalizaciju SAMG nije dokazan.
- Naši rezultati su ukazali na značajnu udruženost više koncentracije anti-nAChR autoantitela u serumu i razvoja generalizacije bolesti kod pacijenata sa inicijalnom okularnom prezentacijom. Takođe, utvrdili smo da koncentracija anti-nAChR autoantitela u serumu ima prediktivni značaj, imajući u vidu da šansa za generalizaciju bolesti raste za čak 26,4% sa svakom jedinicom povećanja koncentracije pomenutih autoantitela. Međutim, pokušavajući da odredimo vrednost koncentracije antitela ispod koje bi rizik za generalizaciju SAMG bio nizak, nismo uspeli da definišemo vrednost koja bi imala adekvatnu senzitivnost i specifičnost.
- Sa dva bolesnika, u grupi izolovane OSAMG, kod kojih je dijagnostikovan timom i četrnaest ispitanika u grupi koja je razvila generalizovanu formu bolesti, naši rezultati su pokazali veću učestalost timoma kod pacijenata kod kojih je došlo do generalizacije SAMG, međutim, bez dostizanja statističke značajnosti.
- Uticaj prisustva limfofolikularne hiperplazije timusa na generalizaciju SAMG nismo ispitivali imajući u vidu da je za njenu potvrdu neophodna histopatološka analiza koja je nedostajala za većinu bolesnika uključenih u studiju.
- Patološki nalaz na TNT imalo je skoro 30% bolesnika sa izolovanom OSAMG. Dodatno, naši rezultati su pokazali da TNT ima prediktivni značaj za generalizaciju SAMG. Naime, bolesnici sa pozitivnim TNT nalazom bili su u skoro 22 puta većem riziku da razviju generalizovanu formu bolesti.
- Vreme proteklo od pojave prvih tegoba do postavljanja dijagnoze bolesti bilo je kraće kod bolesnika sa izolovanom OSAMG, pri čemu je ova razlika bila statistički značajna ($U=3874,5$, $p=0,01$). Ako uz to dodamo da je najveći broj bolesnika sa izolovanom OSAMG lečen imunosupresivnom terapijom, naši rezultati indirektno sugerišu da rana primena imunosupresivne terapije smanjuje rizik od generalizacije bolesti.
- Približno 30% bolesnika sa razvijenom generalizovanom formom SAMG imalo je neku od pridruženih autoimunih bolesti, najčešće oboljenje štitaste žlezde, dok je u grupi izolovane OSAMG učestalost ovog poremećaja iznosila oko 22%. Uticaj autoimunih komorbiditeta na generalizaciju SAMG u našoj studiji nije dokazana, imajući u vidu da se njena učestalost nije statistički značajno razlikovala u obe analizirane grupe ispitanika.
- Genetička studija asocijacije po dizajnu slučajeva i kontrola sa ciljem utvrđivanja učestalosti polimorfizama gena *CTLA4* u našoj kohorti bolesnika i njihovog uticaja na klinički tok i ishod

lečenja SAMG obuhvatila je 447 SAMG bolesnika (249 ženskog i 198 muškog pola) i 447 kontrola uparenih po polu i starosti.

- Ova studija je po prvi put iznela podatke o genetičkoj strukturu koja leži u osnovi SAMG u populaciji Srbije. Naši rezultati su pokazali da su varijante rs231770 i rs231735 u lokusu *CTLA4* udružene sa SAMG ranog početka, kao i da se učestalost alela T polimorfizma rs231735 kod SAMG ranog početka statistički značajno razlikuje u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.
- Naši rezultati su ukazali da genotip TT polimorfizma rs231735 i genotip TT polimorfizma rs231770 imaju protektivni efekat na razvoj SAMG ranog početka, kao i da rs231735-rs231770 haplotip G-C povećava rizik za razvoj SAMG ranog početka.
- Proučavanje povezanosti lokusa *CTLA4* sa patološkim promenama timusa, kliničkim manifestacijama i stepenom težine bolesti procenjene odgovarajućim skalama, kao i odgovorom na terapiju u našoj kohorti obolelih nije bilo moguće, s obzirom na to da ponovljivost analize ne bi bila moguća zbog ograničenih veličina uzoraka podgrupa, kao i činjenice da bi takva analiza mogla ukazati na lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate.
- Uzimajući u obzir da SAMG spada u grupu retkih bolesti, kao i da sveobuhvatnija istraživanja zahtevaju adekvatnu veličinu uzorka, smatramo da bi multicentrična saradnja većeg broja centara za nervno-mišićne bolesti omogućila udruživanje grupa ispitanika kako bi se sprovele sveobuhvatnije genetičke i kliničke analize i doneli konzistentni zaključci.

7 Literatura

1. Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol*. 2015;14(10):1023-1036. doi:10.1016/S1474-4422(15)00145-3.
2. Apostolski S, Lavrnić D, Đukić P. Myasthenia gravis. Beograd: Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 1998.
3. Hughes T. The early history of myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord*. 2005;15(12):878–886. doi:10.1016/j.nmd.2005.08.007.
4. Deymeer F. History of myasthenia gravis revisited. *Noro Psikiyatr Ars*. 2020;58(2):154-162. doi:10.29399/npa.27315.
5. Bubuioc AM, Kudebayeva A, Turuspekova S, et al. The epidemiology of myasthenia gravis. *J Med Life*. 2021;14(1):7-16. doi:10.25122/jml-2020-0145.
6. Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO, et al. A systematic review of population-based epidemiological studies in myasthenia gravis. *BMC Neurol*. 2010;10:46. doi:10.1186/1471-2377-10-46.
7. Joensen P. Myasthenia gravis incidence in a general North Atlantic isolated population. *Acta Neurol Scand*. 2014;130(4):222–228. doi:10.1111/ane.12270.
8. Basta I. Studija kvaliteta života bolesnika sa mijastenijom gravis u definisanoj populaciji [doktorska disertacija]. Beograd: Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2010.
9. Phillips LH. The epidemiology of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;998:407–412. doi:10.1196/annals.1254.053.
10. Lavrnic D, Basta I, Rakocevic-Stojanovic V, et al. Epidemiological study of adult-onset myasthenia gravis in the area of Belgrade (Serbia) in the period 1979–2008. *Neuroepidemiology*. 2013;40(3):190–194. doi:10.1159/000342777.
11. Avidan N, Le Panse R, Berrih-Aknin S, et al. Genetic basis of myasthenia gravis — a comprehensive review. *J Autoimmun*. 2014;52:146-153. doi:10.1016/j.jaut.2013.12.001.
12. Dresser L, Wlodarski R, Rezania K, et al. Myasthenia gravis: epidemiology, pathophysiology and clinical manifestations. *J Clin Med*. 2021;10(11):2235. doi:10.3390/jcm10112235.
13. Peragallo JH, Bitrian E, Kupersmith MJ, et al. Relationship between age, gender, and race in patients presenting with myasthenia gravis with only ocular manifestations. *J Neuro-Ophthalmol*. 2016;36(1):29–32. doi: 10.1097/WNO.0000000000000276.
14. Heckmann JM, Owen EP, Little F. Myasthenia gravis in South Africans: racial differences in clinical manifestations. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(11–12):929–934. doi: 10.1016/j.nmd.2007.07.002.
15. Keesey JC. Clinical evaluation and management of myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2004;29(4):484–505. doi: 10.1002/mus.20030.
16. Grob D, Brunner N, Namba T, et al. Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2008;37:141–149. doi:10.1002/mus.20950.
17. Owe JF, Daltveit AK, Gilhus NE. Causes of death among patients with myasthenia gravis in Norway between 1951 and 2001. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(2):203–207. doi: 10.1136/jnnp.2005.072355.
18. Phillips WD, Vincent A. Pathogenesis of myasthenia gravis: update on disease types, models, and mechanisms. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-1513. doi:10.12688/f1000research.8206.1.

19. Engel AG. The neuromuscular junction. In: Engel AG, Banker BQ, editors. *Myology*. New York: McGraw-Hill; 1986:209-253.

20. Kaminski HJ, Kusner LL, Block CH. Expression of acetylcholine receptor isoforms at extraocular muscle endplates. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:345–351.

21. Guy HR, Hucho F. The ion channel of nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurosci*. 1987;10:318-321. doi:10.1016/0166-2236(87)90006-1.

22. Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, et al. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structure, function and pathogenicity. *FEBS J*. 2007;274:3799–3845. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05935.x.

23. Lazaridis K, Tzartos SJ. Autoantibody specificities in myasthenia gravis; implications for improved diagnostics and therapeutics. *Front Immunol*. 2020;11:212. doi:10.3389/fimmu.2020.00212.

24. Sakmann B, Witzemann V, Brenner HR. Developmental changes in acetylcholine receptor channel structure and function as a model for synaptic plasticity. U: Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures. 1992;6:51–103.

25. Unwin N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*. 1995;373:37–43. doi:10.1038/373037a0.

26. Froehner SC. The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. J Cell Biol. 1991;114:1–7. doi:10.1083/jcb.114.1.1.

27. Appel ED, Roberts SL, Campbell KP, et al. Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron*. 1995;15(1):115-126. doi: 10.1016/0896-6273(95)90069-1.

28. Hopf C, Hoch W. Tyrosine phosphorylation of the muscle-specific kinase is exclusively induced by acetylcholine receptor-aggregating agrin fragments. *Eur J Biochem*. 1998;253:382–389. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2530382.x.

29. Land BR, Salpeter EE, Salpeter MM. Kinetic parameters for acetylcholine interaction in intact neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:7200–7204. doi:10.1073/pnas.78.11.7200.

30. Juel VC. Single fiber electromyography. *Handb Clin Neurol*. 2019;160:303–310. doi:10.1016/B978-0-444-64032-1.00019-9.

31. Zisimopoulou P, Brenner T, Trakas N, et al. Serological diagnostics in myasthenia gravis based on novel assays and recently identified antigens. *Autoimmun Rev*. 2013;12:924–930. doi: 10.1016/j.autrev.2013.03.002.

32. Verschuuren JJ, Huijbers MG, Plomp JJ, et al. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):918–923. doi:10.1016/j.autrev.2013.03.001.

33. Lindstrom JM, Engel AG, Seybold ME, et al. Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis. II Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats with anti-acetylcholine receptor antibodies. *J Exp Med*. 1976;144:739–753. doi:10.1084/jem.144.3.739.

34. Newsom-Davis J, Wilson SG, Vincent A, et al. Long-term effects of repeated plasma exchange in myasthenia gravis. *Lancet*. 1979;1:464–468. doi:10.1016/S0140-6736(79)90823-7.

35. Kordas G, Lagoumintzis G, Sideris S, et al. Direct proof of the in vivo pathogenic role of the AChR autoantibodies from myasthenia gravis patients. *PLoS ONE*. 2014;9:e108327. doi:10.1371/journal.pone.0108327.

36. Lavrnić D, Đukić P, Stojanović-Rakočević V, et al. Stečena autoimuna miastenija gravis. *Acta Clinica*. 2006;6(2):27–49.

37. Behbehani R. Ocular myasthenia gravis: a current overview. *Eye Brain*. 2023;15:1-13. doi: 10.2147/EB.S389629.

38. Koneczny I, Herbst R. Myasthenia gravis: pathogenic effects of autoantibodies on neuromuscular architecture. *Cells*. 2019;8:671. doi:10.3390/cells8070671.

39. Tzartos SJ, Seybold ME, Lindstrom JM. Specificities of antibodies to acetylcholine receptor in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:188–192. doi:10.1073/pnas.79.1.188.

40. Tzartos SJ, Cung MT, Demange P, et al. The main immunogenic region (MIR) of the nicotinic acetylcholine receptor and the anti-MIR antibodies. *Mol Neurobiol*. 1991;5:1–29. doi: 10.1007/BF02935610.

41. Hoch W, McConville J, Helms S, et al. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*. 2001;7:365–368. doi:10.1038/85520.

42. Skriapa L, Zisimopoulou P, Trakas N, et al. Expression of extracellular domains of muscle specific kinase (MuSK) and use as immunoadsorbents for the development of an antigen-specific therapy. *J Neuroimmunol*. 2014;276:150–158. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.09.013.

43. Sanders DB, El-Salem K, Massey JM, et al. Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology*. 2003;60:1978–1980. doi:10.1212/01.WNL.0000065882.63904.53.

44. Niks EH, Kuks JB, Verschuuren JJ. Epidemiology of myasthenia gravis with anti-muscle specific kinase antibodies in The Netherlands. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78:417–418. doi:10.1136/jnnp.2006.102517.

45. Kostera-Pruszczyk A, Kaminska A, Dutkiewicz M, et al. MuSK-positive myasthenia gravis is rare in the Polish population. *Eur J Neurol*. 2008;15:720–724. doi:10.1111/j.1468-1331.2008.02176.x.

46. Tsiamalos P, Kordas G, Kokla A, et al. Epidemiological and immunological profile of muscle-specific kinase myasthenia gravis in Greece. *Eur J Neurol*. 2009;16:925–930. doi:10.1111/j.1468-1331.2009.02624.x.

47. Gomez AM, Van Den Broeck J, Vrolix K, et al. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis pathogenesis at the neuromuscular junction. *Autoimmunity*. 2010;43:353–370. doi:10.3109/08916930903555943.

48. Koneczny I, Stevens JA, De Rosa A, et al. IgG4 autoantibodies against muscle-specific kinase undergo Fab-arm exchange in myasthenia gravis patients. *J Autoimmun*. 2017;77:104–115. doi:10.1016/j.jaut.2016.11.005.

49. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology*. 2011;77:1819–1826. doi:10.1212/WNL.0b013e318237f660.

50. Huijbers MG, Zhang W, Klooster R, et al. MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:20783–20788. doi:10.1073/pnas.1313944110.

51. Bartoccioni E, Scuderi F, Minicuci GM, et al. Anti-MuSK antibodies: correlation with myasthenia gravis severity. *Neurology*. 2006;67(3):505-507. doi:10.1212/01.wnl.0000228225.23349.5d.

52. Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, et al. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*. 2008;135:334–342. doi:10.1016/j.cell.2008.10.002.

53. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, et al. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 2011;69:418–422. doi:10.1002/ana.22312.

54. Shen C, Lu Y, Zhang B, et al. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 2013;123:5190–5202. doi:10.1172/JCI66039.

55. Pevzner A, Schoser B, Peters K, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol*. 2012;259:427–435. doi:10.1007/s00415-011-6194-7.

56. Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol*. 2012;69:445–451. doi:10.1001/archneurol.2011.2393.

57. Li M, Han J, Zhang Y, et al. Clinical analysis of Chinese anti-low-density-lipoprotein-receptor-associated protein 4 antibodies in patients with myasthenia gravis. *Eur J Neurol*. 2019;26:1296–e84. doi:10.1111/ene.13979.

58. Li Y, Zhang Y, Cai G, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in Chinese patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2017;56:938–942. doi:10.1002/mus.25591.

59. Zisimopoulou P, Evangelakou P, Tzartos J, et al. A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2014;52:139–145. doi:10.1016/j.jaut.2013.12.004.

60. Tzartos SJ, Zisimopoulou P, Rentzos M, et al. LRP4 antibodies in serum and CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1:80–87. doi:10.1002/acn3.26.

61. Rivner MH, Liu S, Quarles B, et al. Agrin and low-density lipoprotein-related receptor protein 4 antibodies in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve*. 2017;55:430–432. doi:10.1002/mus.25438.

62. Khanna S, Richmonds CR, Kaminski HJ, et al. Molecular organization of the extraocular muscle neuromuscular junction: partial conservation of and divergence from the skeletal muscle prototype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:1918–1926. doi: 10.1167/iovs.02-0890.

63. Liu R, Xu H, Wang G, et al. Extraocular muscle characteristics related to myasthenia gravis susceptibility. *PLoS ONE*. 2013;8:e55611. doi:10.1371/journal.pone.0055611.

64. Kaminski HJ, Li Z, Richmonds C, et al. Complement regulators in extraocular muscle and experimental autoimmune myasthenia gravis. *Exp Neurol*. 2004;189:333–342. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.06.005.

65. Evoli A, Iorio R. Controversies in ocular myasthenia gravis. *Front Neurol*. 2020;11:605902. doi:10.3389/fneur.2020.605902.

66. Spencer RF, Porter JD. Biological organization of the extraocular muscles. *Prog Brain Res*. 2006;151:43–80. doi:10.1016/S0079-6123(05)51003-0.

67. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJ. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med*. 2000;191:1051–1056. doi:10.1084/jem.191.6.1051.

68. Le Panse R, Berrih-Aknin S. Thymic myoid cells protect thymocytes from apoptosis and modulate their differentiation: implication of the ERK and Akt signaling pathways. *Cell Death Differ*. 2005;12:463–472. doi: 10.1038/sj.cdd.4401611.

69. Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, et al. Fezf2 orchestrates a thymic program of self-antigen expression for immune tolerance. *Cell*. 2015;163:975–987. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.013.

70. Giraud M, Taubert R, Vandiedonck C, et al. An IRF8-binding promoter variant and AIRE control CHRNA1 promiscuous expression in thymus. *Nature*. 2007;448:934–937. doi: 10.1038/nature06066.

71. Zumer K, Saksela K, Peterlin BM. The mechanism of tissue-restricted antigen gene expression by AIRE. *J Immunol*. 2013;190:2479–2482. doi: 10.4049/jimmunol.1203210.

72. Gavanescu I, Kessler B, Ploegh H, et al. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:4583–4587. doi: 10.1073/pnas.0700259104.

73. Salmon AM, Bruand C, Cardona A, et al. An acetylcholine receptor alpha subunit promoter confers intrathymic expression in transgenic mice: implications for tolerance of a transgenic self-antigen and for autoreactivity in myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 1998;101:2340–2350. doi: 10.1172/JCI1615.

74. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev*. 2014;259:88–102. doi:10.1111/imr.12160.

75. Berrih-Aknin S. Role of the thymus in autoimmune myasthenia gravis. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2016;7:226-237. doi: 10.1111/cen3.12319.

76. Truffault F, de Montpreville V, Eymard B, et al. Thymic germinal centers and corticosteroids in myasthenia gravis: an immunopathological study in 1035 cases and a critical review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;52:108-124. doi: 10.1007/s12016-016-8558-3.

77. Mao Z, Hu X, Lu Z, et al. Prognostic factors of remission in myasthenia gravis after thymectomy. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015;48:18–24. doi: 10.1093/ejcts/ezu309.

78. Aricha R, Feferman T, Fuchs S, et al. Ex vivo generated regulatory T cells modulate experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*. 2008;180(3):2132-2139. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2132.

79. Marx A, Pfister F, Schalke B, et al. The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):875–884. doi:10.1016/j.autrev.2013.03.007.

80. Weiss JM, Cufi P, Le Panse R, et al. The thymus in autoimmune myasthenia gravis: paradigm for a tertiary lymphoid organ. *Rev Neurol (Paris)*. 2013;169(8–9):640–649. doi:10.1016/j.neurol.2013.02.005.

81. Yamada Y, et al. Thymoma-associated myasthenia gravis (TAMG): differential expression of functional pathways in relation to MG status in different thymoma histotypes. *Front Immunol*. 2020;11:664. doi:10.3389/fimmu.2020.00664.

82. Okumura M, et al. Immunological function of thymoma and pathogenesis of paraneoplastic myasthenia gravis. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;56(4):143–150. doi:10.1007/s11748-007-0185-8.

83. Gilhus NE, Tzartos S, Evoli A, et al. Myasthenia gravis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5:30-43. doi:10.1038/s41572-019-0079-y.

84. Engel AG, Sahashi K, Fumagalli G. The immunopathology of acquired myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci*. 1981;377:158-174. doi: 10.1111/j.1749-6632.1981.tb33730.x.

85. Myking AO, Skeie GO, Varhaug JE, et al. The histomorphology of the thymus in late onset, non-thymoma myasthenia gravis. *Eur J Neurol*. 1998;5:401–405. doi: 10.1046/j.1468-1331.1998.540401.x

86. Yi Q, Ahlberg R, Pirskanen R, et al. Acetylcholine receptor-reactive T cells in myasthenia gravis: evidence for the involvement of different subpopulations of T helper cells. *J Neuroimmunol*. 1994;50(2):177–186. doi:10.1016/0165-5728(94)90066-0.

87. Ramanujam R, Pirskanen R, Ramanujam S, et al. Utilizing twins concordance rates to infer the predisposition to myasthenia gravis. *Twin Res Hum Genet*. 2011;14:129–136. doi:10.1375/twin.14.2.129.

88. Zhong H, Zhao C, Luo S. HLA in myasthenia gravis: from superficial correlation to underlying mechanism. *Autoimmun Rev*. 2019;18:102349. doi:10.1016/j.autrev.2019.102349.

89. Chia R, Saez-Atienzar S, Murphy N, et al. Identification of genetic risk loci and prioritization of genes and pathways for myasthenia gravis: a genome-wide association study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(5):e2108672119. doi:10.1073/pnas.2108672119.

90. Gregersen PK, Kosoy R, Lee AT, et al. Risk for myasthenia gravis maps to a (151) Pro→Ala change in TNIP1 and to human leukocyte antigen-B*08. *Ann Neurol*. 2012;72(6):927-935. doi:10.1002/ana.23691.

91. Renton AE, Pliner HA, Provenzano C, et al. A genome-wide association study of myasthenia gravis. *JAMA Neurol*. 2015;72(4):396–404. doi:10.1001/jamaneurol.2014.4103.

92. Seldin MF, Alkhairy OK, Lee AT, et al. Genome-wide association study of late-onset myasthenia gravis: confirmation of TNFRSF11A and identification of ZBTB10 and three distinct HLA associations. *Mol Med*. 2016;21:769–781. doi:10.2119/molmed.2015.00232.

93. Topaloudi A, Zagoriti Z, Flint AC, et al. Myasthenia gravis genome-wide association study implicates AGRN as a risk locus. *J Med Genet*. 2022;59(8):801–809. doi:10.1136/jmedgenet-2021-107953.

94. Horton R, Gibson R, Coggill P, et al. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. *Immunogenetics*. 2008;60:1–18. doi: 10.1007/s00251-007-0262-2.

95. Vandiedonck C, Beaurain G, Giraud M, et al. Pleiotropic effects of the 8.1 HLA haplotype in patients with autoimmune myasthenia gravis and thymus hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:15464–15469. doi: 10.1073/pnas.0406756101.

96. Giraud M, Beaurain G, Eymard B, et al. Genetic control of autoantibody expression in autoimmune myasthenia gravis: role of the self-antigen and of HLA-linked loci. *Genes Immun*. 2004;5:398-404. doi: 10.1038/sj.gene.6364110.

97. Janer M, Cowland A, Picard J, et al. A susceptibility region for myasthenia gravis extending into the HLA-class I sector telomeric to HLA-C. *Hum Immunol*. 1999;60:909–917. doi: 10.1016/s0198-8859(99)00062-2.

98. Candore G, Modica MA, Lio D, et al. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: a genetically determined defect of C4 influences immunological parameters of healthy carriers of the haplotype. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(5-6):274-277. doi: 10.1016/s0753-3322(03)00079-9.

99. Candore G, Lio D, Colonna-Romano G, et al. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmun Rev*. 2002;1(1-2):29-35. doi: 10.1016/s1568-9972(01)00004-0.

100. Mantegazza R, Oksenberg JR, Baggi F, Antozzi C, et al. Increased incidence of certain TCR and HLA genes associated with myasthenia gravis in Italians. *J Autoimmun*. 1990;3:431–440. doi: 10.1016/S0896-8411(05)80010-1.

101. Compston AS, Vincent A, Newsom-Davis J, et al. Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain*. 1980;103:579-590. doi:10.1093/brain/103.3.579.

102. Guyon T, Levasseur P, Truffault F, et al. Regulation of acetylcholine receptor alpha subunit variants in human myasthenia gravis: quantification of steady-state levels of messenger RNA in muscle biopsy using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1994;94:16–24. doi: 10.1172/JCI117302.

103. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, et al. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46:49–56. doi: 10.1093/rheumatology/kel170.

104. Xiong X, Xiang M, Cheng X, et al. PTPN22 R620W polymorphism is associated with myasthenia gravis risk: a systematic review and meta-analysis. *Med Sci Monit*. 2015;21:2567–2571. doi: 10.12659/MSM.894307.

105. Raknes G, Skeie GO, Gilhus NE, et al. FcgammaRIIA and FcgammaRIIIB polymorphisms in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 1998;81(1–2):173–176. doi: 10.1016/s0165-5728(97)00174-4.

106. van der Pol WL, Jansen MD, Kuks JB, et al. Association of the Fc gamma receptor IIA–R/R131 genotype with myasthenia gravis in Dutch patients. *J Neuroimmunol*. 2003;144:143–147. doi: 10.1016/j.jneuroim.2003.08.043.

107. Rasool S, Khan T, Haq A. Genes involved in autoimmune disease myasthenia gravis. *J Neurol Stroke*. 2019;9(2):53–55. doi: 10.15406/jnsk.2019.09.00347.

108. Finsterer J. Congenital myasthenic syndromes. Orphanet J Rare Dis. 2019;14:57. doi:10.1186/s13023-019-1025-5.

109. Schaid DJ, Chen W, Larson NB. From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nat Rev Genet*. 2018;19(8):491–504. doi:10.1038/s41576-018-0016-z.

110. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131(1):58–67. doi:10.1182/blood-2017-06-741033.

111. Hosseini A, Gharibi T, Marofi F, et al. CTLA-4: from mechanism to autoimmune therapy. *Int Immunopharmacol*. 2020;80:106221. doi:10.1016/j.intimp.2020.106221.

112. Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):852–863. doi:10.1038/nri3108.

113. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:65–97. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090535.

114. Huang D, Liu L, Noren K, et al. Genetic association of CTLA-4 to myasthenia gravis with thymoma. *J Neuroimmunol*. 1998;88(1-2):192–198. doi:10.1016/S0165-5728(98)00119-2.

115. Wang XB, Kakoulidou M, Qiu Q, et al. CDS1 and promoter single nucleotide polymorphisms of the CTLA-4 gene in human myasthenia gravis. *Genes Immun*. 2002;3(1):46–49. doi:10.1038/sj.gene.6363816.

116. Chuang WY, Strobel P, Gold R, et al. A CTLA4(high) genotype is associated with myasthenia gravis in thymoma patients. *Ann Neurol*. 2005;58(4):644-648. doi:10.1002/ana.20577.

117. Wang XB, Pirskanen R, Giscombe R, et al. Two SNPs in the promoter region of the CTLA-4 gene affect binding of transcription factors and are associated with human myasthenia gravis. *J Intern Med*. 2008;263:61–69. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01879.x.

118. Chuang WY, Strobel P, Bohlender-Willke AL, et al. Late-onset myasthenia gravis — CTLA4(low) genotype association and low-for-age thymic output of naive T cells. *J Autoimmun*. 2014;52:122-129. doi:10.1016/j.jaut.2013.12.006.

119. Zheng K, Zhang J, Zhang P, et al. PTPN22 and CTLA-4 gene polymorphisms in resected thymomas and thymus for myasthenia gravis. *Thorac Cancer*. 2012;3(4):307–312. doi:10.1111/j.1759-7714.2012.00121.x.

120. Sun L, Meng Y, Xie Y, et al. CTLA4 variants and haplotype contribute genetic susceptibility to myasthenia gravis in northern Chinese population. *PLoS One*. 2014;9(7):e101986. doi:10.1371/journal.pone.0101986.

121. Kong X, Wang WL, Shan X, et al. Correlation between single nucleotide polymorphisms of multi-loci and multi-genes and myasthenia gravis. *Chin J Neurol.* 2016;307–311. doi: 10.3760/CMA.J.ISSN.1006-7876.2016.04.010.

122. Li HF, Hong Y, Zhang X, et al. Gene polymorphisms for both auto-antigen and immune-modulating proteins are associated with the susceptibility of autoimmune myasthenia gravis. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4771–4780. doi:10.1007/s12035-016-0024-y.

123. Hong EP, Park JW. Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. *Genomics Inform*. 2012;10(2):117–122. doi:10.5808/gi.2012.10.2.117.

124. Handunnetthi L, Knezevic B, Kasela S, et al. Genomic insights into myasthenia gravis identify distinct immunological mechanisms in early and late onset disease. *Ann Neurol*. 2021;90(3):455–463. doi:10.1002/ana.26169.

125. Wang QS, Huang H. Methods for statistical fine-mapping and their applications to autoimmune diseases. *Semin Immunopathol*. 2022;44:101–113. doi:10.1007/s00281-021-00902-8.

126. Brenner T, Nizri E, Irony-Tur-Sinai M, et al. Acetylcholinesterase inhibitors and cholinergic modulation in myasthenia gravis and neuroinflammation. *J Neuroimmunol*. 2008;201-202:121-127. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.05.022.

127. Kadota Y, Okumura M, Miyoshi S, et al. Altered T cell development in human thymoma is related to impairment of MHC class II transactivator expression induced by interferon-gamma (IFN-γ). *Clin Exp Immunol*. 2000;121:59–68. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01235.x. doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01256.x.

128. Fuji Y, Monden K, Nakahara H, et al. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: production of lymphocytes from thymus and thymoma. *Neurology*. 1984;34:1182-1186. doi:10.1212/WNL.34.9.1182.

129. Meyer A, Levy Y. Chapter 33: Geoepidemiology of myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2010;9:A383–386. doi:10.1016/j.autrev.2009.11.011.

130. Restivo DA, Centonze D, Alesina A, et al. Myasthenia gravis associated with SARS-CoV-2 infection. *Ann Intern Med*. 2020;2(August):2019–2020. doi: 10.7326/L20-0845.

131. Anand P, Slama MCC, Kaku M, et al. COVID-19 in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2020;62(2):254-258. doi: 10.1002/mus.26918.

132. De Santis M, Selmi C. The therapeutic potential of epigenetics in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012;42:92-101. doi: 10.1007/s12016-011-8293-8.

133. Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Trends Mol Med*. 2011;17:714–724. doi: 10.1016/j.molmed.2011.07.005.

134. Bao S, Rajotte-Caron J, Hammoudi D, et al. Implications of epigenetics in myasthenia gravis. *J Autoimmune Disord*. 2016;2(3):1-9. doi: 10.21767/2471-8513.100022

135. Wang L, Zhang L. Emerging roles of dysregulated microRNAs in myasthenia gravis. *Front Neurosci*. 2020;14:507. doi:10.3389/fnins.2020.00507.

136. Punga AR, Andersson M, Alimohammadi M, et al. Disease specific signature of circulating miR-150-5p and miR-21-5p in myasthenia gravis patients. *J Neurol Sci*. 2015;356:90–96. doi:10.1016/j.jns.2015.06.019.

137. Chunjie N, Huijuan N, Zhao Y, et al. Disease-specific signature of serum miR-20b and its targets IL-8 and IL-25 in myasthenia gravis patients. *Eur Cytokine Netw*. 2015;26:61–66. doi:10.1684/ecn.2015.0367.

138. Punga T, Bartoccioni E, Lewandowska M, et al. Disease specific enrichment of circulating let-7 family microRNA in MuSK+ myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2016;292:21–26. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.01.003.

139. Punga AR, Punga T. Circulating microRNAs as potential biomarkers in myasthenia gravis patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1412:33–40. doi:10.1111/nyas.13510.

140. Sabre L, Guptill JT, Russo M, et al. Circulating microRNA plasma profile in MuSK+ myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2018;325:87–91. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.10.003.

141. Sabre L, Maddison P, Wong SH, et al. miR-30e-5p as predictor of generalization in ocular myasthenia gravis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(2):243–251. doi: 10.1002/acn3.692.

142. Sabre L, Maddison P, Sadalage G, et al. Circulating microRNA miR-21-5p, miR-150-5p and miR-30e-5p correlate with clinical status in late-onset myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2018;321:164–170. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.05.003.

143. Cavalcante P, Mizrachi T, Barzago C, et al. MicroRNA signature associated with treatment response in myasthenia gravis: a further step towards precision medicine. *Pharmacol Res*. 2019;148:104388. doi:10.1016/j.phrs.2019.104388.

144. Daroff RB, Jankovic J, Mazziotta JC, Pomeroy SL, editors. *Bradley's Neurology in Clinical Practice*. 7th ed. London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto: Elsevier; 2016. ISBN 978-0-323-28783-8.

145. Angelini C, Martignago S, Biscigli M, Albertini E. Myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies: clinical features and histopathological changes. In: Pruitt JA, editor. *A Look into Myasthenia Gravis*. Rijeka: InTech; 2011.

146. Trouth AJ, Dabi A, Solieman N, et al. Myasthenia gravis: a review. *Autoimmune Dis*. 2012;2012:874680. doi:10.1155/2012/874680.

147. Engel AG, editor. *Myasthenia Gravis and Myasthenic Disorders*. Oxford: Oxford University Press; 2012. ISBN 9780199738670.

148. Hendricks TM, Bhatti MT, Hodge DO, et al. Incidence, epidemiology and transformation of ocular myasthenia gravis: a population-based study. Am J Ophthalmol. 2019;205:99–105. doi:10.1016/j.ajo.2019.04.017.

149. Kaminski HJ. *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003. ISBN: 1-58829-058-1.

150. Koopman WJ, Wiebe S, Colton-Hudson A, et al. Prediction of aspiration in myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2004;29(2):256–260. doi: 10.1002/mus.10538.

151. Lavrnić D. Kliničko-epidemiološka studija miastenije gravis [doktorska disertacija]. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 1995.

152. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol*. 2009;8:475–490. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70063-8.

153. Nikolić A. Odnos antitela protiv acetilholinskog receptora i hiperplazije timusa kod bolesnika sa generalizovanom miastenijom gravis [magistarska teza]. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2009.

154. Beekman R, Kuks JBM, Oosterhuis HJGH. Myasthenia gravis: diagnosis and follow-up of 100 consecutive patients. *J Neurol*. 1997;244(2):112-118. doi: 10.1007/s004150050059.

155. Osserman KE. Myasthenia gravis. New York, NY: Grune and Stratton; 1958.

156. Osserman KE, Genkins G. Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience in over 1200 patients. *Mount Sinai J Med*. 1971;38:497–537.

157. Jeretzki A 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology*. 2000;55:16–23. doi:10.1212/WNL.55.1.16.

158. Singman EL, Matta NS, Silbert DI. Use of the Cogan lid twitch to identify myasthenia gravis. *J Neuroophthalmol*. 2011;31:239–240. doi: 10.1097/WNO.0b013e3182224b92.

159. Colavito J, Cooper J, Ciuffreda KJ. Non-ptotic ocular myasthenia gravis: a common presentation of an uncommon disease. *Optometry*. 2005;76(7):363–375. doi: 10.1016/j.optm.2005.05.004.

160. Pike-Lee T, Hill J, Li J, et al. Comitant ocular deviation in myasthenia gravis. *J Neuroophthalmol*. 2021;41(4):e619–e621. doi: 10.1097/WNO.0000000000001056.

161. Barnett C, Herbelin L, Dimachkie MM, et al. Measuring clinical treatment response in myasthenia gravis. *Neurol Clin*. 2018;36(2):339-353. doi:10.1016/j.ncl.2018.01.006.

162. Liu WW, Chen A. Diagnosing myasthenia gravis with an ice pack. *N Engl J Med*. 2016;375(19):e39. doi:10.1056/NEJMicm1509523.

163. Kubis KC, Danesh-Meyer HV, Savino PJ, et al. The ice test versus the rest test in myasthenia gravis. *Ophthalmology*. 2000;107(11):1995–1998. doi: 10.1016/s0161-6420(00)00458-9.

164. Odel JG, Winterkorn JM, Behrens MM. The sleep test for myasthenia gravis: a safe alternative to tensilon. *J Clin Neuroophthalmol*. 1991;11(4):288–292.

165. Kostić V. *Neurologija: za studente medicine*. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2020. ISBN: 978-86-7117-483-1.

166. Benatar M. A systematic review of diagnostic studies in myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord*. 2006;16(7):459-467. doi:10.1016/j.nmd.2006.05.006.

167. Peeler CE, De Lott LB, Nagia L, et al. Clinical utility of acetylcholine receptor antibody testing in ocular myasthenia gravis. *JAMA Neurol*. 2015;72(10):1170–1174. doi:10.1001/jamaneurol.2015.1444.

168. Bau V, Hanisch F, Hain B, et al. Ocular involvement in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2006;223(1):81-83. doi: 10.1055/s-2005-858629.

169. Bacchi S, Kramer P, Chalk C. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in double-seronegative myasthenia gravis: a systematic review. *Can J Neurol Sci*. 2018;45(1):62-67. doi: 10.1017/cjn.2017.253.

170. Wilf-Yarkoni A, Alkalay Y, Brenner T, et al. High κ free light chain is a potential biomarker for double seronegative and ocular myasthenia gravis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(5):e831. doi:10.1212/NXI.0000000000000831.

171. Costa J, Evangelista T, Conceicao I, et al. Repetitive nerve stimulation in myasthenia gravis — relative sensitivity of different muscles. *Clin Neurophysiol*. 2004;115(12):2776–2782. doi: 10.1016/j.clinph.2004.05.024.

172. Meriggioli MN, Sanders DB. Myasthenia gravis: diagnosis. *Semin Neurol*. 2004;24(1):31–39. doi:10.1055/s-2004-829594.

173. Giannoccaro MP, Di Stasi V, Zanesini C, et al. Sensitivity and specificity of single-fibre EMG in the diagnosis of ocular myasthenia varies according to clinical presentation. *J Neurol*. 2020;267(3):739–745. doi: 10.1007/s00415-019-09631-3.

174. Sanders DB, Arimura K, Cui L, et al. Guidelines for single fiber EMG. *Clin Neurophysiol*. 2019;130:1417–1439. doi: 10.1016/j.clinph.2019.04.005.

175. Valko Y, Rosengren SM, Jung HH, et al. Ocular vestibular evoked myogenic potentials as a test for myasthenia gravis. *Neurology*. 2016;86:660–668. doi: 10.1212/WNL.0000000000002383.

176. Priola AM, Priola SM. Imaging of thymus in myasthenia gravis: from thymic hyperplasia to thymic tumor. *Clin Radiol*. 2014;69(5):e230–e245. doi:10.1016/j.crad.2014.01.005.

177. Kerty E, Elsais A, Argov Z, et al. EFNS/ENS Guidelines for the treatment of ocular myasthenia. *Eur J Neurol*. 2014;21:687–693. doi:10.1111/ene.12359.

178. Kupersmith MJ, Ying G. Ocular motor dysfunction and ptosis in ocular myasthenia gravis: effects of treatment. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(10):1330–1334. doi: 10.1136/bjo.2004.063404.

179. Kupersmith MJ. Ocular myasthenia gravis: treatment successes and failures in patients with long-term follow-up. *J Neurol*. 2009;256(8):1314–1320. doi: 10.1007/s00415-009-5120-8.

180. Farrugia ME, Goodfellow JA. A practical approach to managing patients with myasthenia gravis—opinions and a review of the literature. *Front Neurol*. 2020;11:604. doi:10.3389/fneur.2020.00604.

181. Alhaidar MK, Abumurad S, Soliven B, et al. Current treatment of myasthenia gravis. *J Clin Med*. 2022;11(6):1597. doi:10.3390/jcm11061597.

182. Hehir MK 2nd, Li Y. Diagnosis and management of myasthenia gravis. *Continuum (Minneap Minn)*. 2022;28(6):1615–1642. doi:10.1212/CON.0000000000001161.

183. Apostolski S. Liječenje miastenije gravis. In: Bilić E, editor. *Smjernice za liječenje neuromuskularnih bolesti – 1. dio*. Zagreb: Medicinska naklada; 2021:107-114.

184. Heckmann JM, Nel M. A unique subphenotype of myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci*. 2018;1412(1):14–20. doi: 10.1111/nyas.13471.

185. Cornblath WT. Treatment of ocular myasthenia gravis. *Asia Pac J Ophthalmol*. 2018;7(4):257–259. doi: 10.22608/APO.2018301.

186. Sharma B, Pasnoor M, Dimachkie MM, et al. Treatment refractory ocular symptoms in myasthenia gravis: clinical and therapeutic profile (P6.445). *Neurology*. 2018;90(15 Suppl). doi: 10.1212/WNL.90.15_supplement.P6.445

187. Tandan R, Hehir MK II, Waheed W, et al. Rituximab treatment of myasthenia gravis: a systematic review. *Muscle Nerve*. 2017;56:185–196. doi: 10.1002/mus.25597.

188. Li F, Li Z, Chen Y, et al. Thymectomy in ocular myasthenia gravis before generalization results in a higher remission rate. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2020;57:478–487. doi:10.1093/ejcts/ezz275.

189. Zhu K, Li J, Huang X, et al. Thymectomy is a beneficial therapy for patients with non-thymomatous ocular myasthenia gravis: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*. 2017;38:1753–1760. doi: 10.1007/s10072-017-3058-7.

190. Shimizu Y, Suzuki S, Nagasao T, et al. Surgical treatment for medically refractory myasthenic blepharoptosis. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:1859–1867. doi: 10.2147/OPTH.S69883.

191. Narayanaswami P, Sanders DB, Wolfe G, et al. International consensus guidance for management of myasthenia gravis: 2020 update. *Neurology*. 2021;96:114–122. doi:10.1212/WNL.0000000000011124.

192. Farmakidis C, Pasnoor M, Dimachkie MM, et al. Treatment of myasthenia gravis. *Neurol Clin*. 2018;36(2):311-337. doi: 10.1016/j.ncl.2018.01.011.

193. Gupta A, Goyal V, Srivastava AK, et al. Remission and relapse of myasthenia gravis on long-term azathioprine: an ambispective study. *Muscle Nerve*. 2016;54(3):405–412. doi:10.1002/mus.25052.

194. Barnett C, Tabasinejad R, Bril V. Current pharmacotherapeutic options for myasthenia gravis. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(18):2295-2303. doi:10.1080/14656566.2019.1682548.

195. Morren J, Li Y. Maintenance immunosuppression in myasthenia gravis, an update. *J Neurol Sci*. 2020;410:116648. doi:10.1016/j.jns.2019.116648.

196. Lascano AM, Lalive PH. Update in immunosuppressive therapy of myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2021;20(1):102712. doi:10.1016/j.autrev.2020.102712.

197. Rodolico C, Nicocia G, Damato V, et al. Benefit and danger from immunotherapy in myasthenia gravis. *Neurol Sci*. 2021;42(4):1367–1375. doi:10.1007/s10072-021-05077-6.

198. Schneider-Gold C, Hagenacker T, Melzer N, et al. Understanding the burden of refractory myasthenia gravis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2019;12:1756286419832242. doi:10.1177/1756286419832242.

199. Wiendl H, Abicht A, Chan A, et al. Guideline for the management of myasthenic syndromes. *Ther Adv Neurol Disord*. 2023;16:17562864231213240. doi:10.1177/17562864231213240.

200. Gamez J, Salvadó M, Carmona F, et al. Intravenous immunoglobulin to prevent myasthenic crisis after thymectomy and other procedures can be omitted in patients with well-controlled myasthenia gravis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2019;12:1756286419864497. doi:10.1177/1756286419864497.

201. DeHart-McCoyle M, Patel S, Du X. New and emerging treatments for myasthenia gravis. *BMJ Med*. 2023;2(1):e000241. doi:10.1136/bmjmed-2022-000241.

202. Gerischer L, Doksani P, Hoffmann S, et al. New and emerging biological therapies for myasthenia gravis: a focussed review for clinical decision-making. *BioDrugs*. 2025;39(2):185-213. doi:10.1007/s40259-024-00701-1.

203. Frampton JE. Inebilizumab: first approval. Drugs. 2020;80:1259–1264. doi:10.1007/s40265-020-01370-4.

204. Howard JF, Utsugisawa K, Benatar M, et al. Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalized myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Lancet Neurol*. 2017;16:976–986. doi:10.1016/S1474-4422(17)30369-1.

205. Muppidi S, Utsugisawa K, Benatar M, et al. Long-term safety and efficacy of eculizumab in generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2019;60:14–24. doi:10.1002/mus.26447.

206. Howard JF, Bril V, Vu T, et al. Safety, efficacy, and tolerability of efgartigimod in patients with generalized myasthenia gravis (ADAPT): a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2021;20:526–536. doi:10.1016/S1474-4422(21)00159-9.

207. Heo YA. Efgartigimod alfa in generalized myasthenia gravis: a profile of its use. CNS Drugs. 2023;37(5):467–473. doi: 10.1007/s40263-023-01000-z.

208. Li J, Wu X, Chu T, et al. The efficacy and safety of FcRn inhibitors in patients with myasthenia gravis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2024;271(5):2298–2308. doi:10.1007/s00415-024-12247-x.

209. Wolfe GI, Herbelin L, Nations SP, et al. Myasthenia gravis activities of daily living profile. *Neurology*. 1999;52(7):1487–1489. doi:10.1212/WNL.52.7.1487.

210. Muppidi S, Silvestri NJ, Tan R, et al. Utilization of MG-ADL in myasthenia gravis clinical research and care. *Muscle Nerve*. 2022;65(6):630–639. doi:10.1002/mus.27476.

211. Uzawa A, Ozawa Y, Yasuda M, et al. Minimal symptom expression achievement over time in generalized myasthenia gravis. *Acta Neurol Belg*. 2023;123(3):979–982. doi:10.1007/s13760-022-02162-1.

212. Barohn RJ, McIntire D, Herbelin L, et al. Reliability testing of the quantitative myasthenia gravis score. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;841:769-772. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11015.x.

213. Ruzhansky K, Li Y, Wolfe GI, et al. Standardization of myasthenia gravis outcome measures in clinical practice: a report of the MGFA task force. *Muscle Nerve*. 2025;72(1):56–65. doi:10.1002/mus.28417.

214. Nagia L, Lemos J, Abusamra K, et al. Prognosis of ocular myasthenia gravis: retrospective multicenter analysis. *Ophthalmology*. 2015;122(7):1517–1521. doi:10.1016/j.ophtha.2015.03.010.

215. Galassi G, Mazzoli M, Ariatti A, et al. Antibody profile may predict outcome in ocular myasthenia gravis. *Acta Neurol Belg*. 2018;118(3):435-443. doi:10.1007/s13760-018-0943-7.

216. Li F, Hotter B, Swierzy M, et al. Generalization after ocular onset in myasthenia gravis: a case series in Germany. *J Neurol*. 2018;265(12):2773–2782. doi:10.1007/s00415-018-9056-8.

217. Sabre L, Punga T, Punga AR. Circulating miRNAs as potential biomarkers in myasthenia gravis: tools for personalized medicine. *Front Immunol*. 2020;11:213. doi:10.3389/fimmu.2020.00213.

218. Wang L, Zhang Y, He M. Clinical predictors for the prognosis of myasthenia gravis. *BMC Neurol*. 2017;17:77. doi:10.1186/s12883-017-0857-7.

219. Hong YH, Kwon SB, Kim BJ, et al. Prognosis of ocular myasthenia in Korea: a retrospective multicenter analysis of 202 patients. *J Neurol Sci*. 2008;273:10–14. doi:10.1016/j.jns.2008.05.023.

220. Frykman H, Kumar P, Oger J. Immunopathology of autoimmune myasthenia gravis: implications for improved testing algorithms and treatment strategies. *Front Neurol*. 2020;11:596621. doi:10.3389/fneur.2020.596621.

221. Cai GM, Gao Z, Yue YX, et al. Association between CTLA-4 gene polymorphism and myasthenia gravis in a Chinese cohort. *J Clin Neurosci*. 2019;69:31-37. doi:10.1016/j.jocn.2019.08.079.

222. Team RC. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2022.

223. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007;81(3):559–575. doi:10.1086/519795.

224. Jacobson CM, Sas G. genpwr: Power calculations under genetic model misspecification. 2021.

225. McGrogan A, Sneddon S, de Vries SC. The incidence of myasthenia gravis: a systematic literature review. *Neuroepidemiology*. 2010;34:171–183. doi: 10.1159/000279334.

226. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2003;2:119-125. doi: 10.1016/s1568-9972(03)00006-5.

227. Mazzoli M, Ariatti A, Valzania F, et al. Factors affecting outcome in ocular myasthenia gravis. *Int J Neurosci*. 2018;128(1):15–24. doi:10.1080/00207454.2017.1344237.

228. Nicolì V, Tabano SM, Colapietro P, et al. Preferential X chromosome inactivation as a mechanism to explain female preponderance in myasthenia gravis. *Genes (Basel)*. 2022;13(4):696. doi:10.3390/genes13040696.

229. Lavrnić D. Klinički aspekti stečene autoimune miastenije gravis. In: Apostolski S, Lavrnić D, Đukić P, editors. *Myasthenia gravis*. Beograd: Vizartis; 1998. p. 55–75.

230. Delpy L, Douin-Echinard V, Garidou L, et al. Estrogen enhances susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis by promoting type 1-polarized immune responses. *J Immunol*. 2005;175(8):5050-5057. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5050.

231. Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:797–804. doi: 10.1038/nri916.

232. Berrih-Aknin S, Frenkian-Cuvelier M, Eymard B. Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2014;48-49:143-148. doi: 10.1016/j.jaut.2014.01.003.

233. Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: a comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*. 2014;52:90-100. doi: 10.1016/j.jaut.2013.12.011.

234. Valencia K, Wutz A. Recent insights into the regulation of X-chromosome inactivation. *Adv Genom Genet*. 2015;5:227–238. doi: 10.2147/AGG.S60399.

235. Gribnau J, Barakat TS. X-chromosome inactivation and its implications for human disease. *bioRxiv*. 2017;076950. doi: 10.1101/076950.

236. Ortona E, Pierdominici M, Maselli A, et al. Sex-based differences in autoimmune diseases. *Ann Ist Super Sanita*. 2016;52:205–212. doi: 10.4415/ANN_16_02_12.

237. Youness A, Miquel C-H, Guéry J-C. Escape from X chromosome inactivation and the female predominance in autoimmune diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22:1114. doi:10.3390/ijms22031114.

238. Miozzo M, Selmi C, Gentilin B, et al. Preferential X chromosome loss but random inactivation characterize primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2007;46:456–462. doi: 10.1002/hep.21696.

239. Bateman K, Schinkel M, Little F, et al. Incidence of seropositive myasthenia gravis in Cape Town and South Africa. *S Afr Med J*. 2007;97(10):959-962.

240. Zhang X, Yang M, Xu J, et al. Clinical and serological study of myasthenia gravis in Hu-Bei Province, China. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78:386–390. doi: 10.1136/jnnp.2006.100545.

241. Chiu HC, Vincent A, Newsom-Davis J, et al. Population differences in disease expression and acetylcholine receptor antibody titres between Chinese and Caucasians. *Neurology*. 1987;37:1854-1857. doi:10.1212/WNL.37.12.1854.

242. Kawaguchi N, Kuwabara S, Nemoto Y, et al. Treatment and outcome of myasthenia gravis: retrospective multi-center analysis of 470 Japanese patients, 1999–2000. *J Neurol Sci*. 2004;224:43–47. doi: 10.1016/j.jns.2003.09.016.

243. Vaphiades MS, Bhatti MT, Lesser RL. Ocular myasthenia gravis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012;23(6):537–542. doi:10.1097/ICU.0b013e328358b94a.

244. Wilson L, Davis H. The role of thymoma and thymic hyperplasia as prognostic risk factors for secondary generalisation in adults with ocular myasthenia gravis: a systematic narrative review. *Br Ir Orthopt J*. 2023;19(1):108–119. doi:10.22599/bioj.315.

245. Supawongwattana M, Vanikieti K, Jindahra P, et al. Significance of acetylcholine receptor antibody titers in acetylcholine receptor antibody-positive ocular myasthenia gravis: generalization and presence of thyroid autoimmune antibodies and thymoma. *Clin Ophthalmol*. 2023;17:649–656. doi:10.2147/OPTH.S402181.

246. Welland CM, Brandes JC, Schmidt D, et al. Functional properties of CD4+CD28– T cells in the ageing immune system. *Mech Ageing Dev*. 1998;102:131–147. doi: 10.1016/s0047-6374(97)00161-9.

247. Wong SH, Petrie A, Plant GT. Ocular myasthenia gravis: toward a risk of generalization score and sample size calculation for a randomized controlled trial of disease modification. *J Neuroophthalmol*. 2016;36:252–258. doi:10.1097/WNO.0000000000000350.

248. Kamarajah SK, Sadalage G, Palmer J, et al. Ocular presentation of myasthenia gravis: a natural history cohort. *Muscle Nerve*. 2018;57:622–627. doi: 10.1002/mus.25971.

249. Díaz-Maroto I, García-García J, Sánchez-Ayaso PA, et al. Ocular myasthenia gravis and risk factors for developing a secondary generalisation: description of a Spanish series. *Neurologia (Engl Ed)*. 2020; S0213-4853(20)30300-5. doi:10.1016/j.nrl.2020.09.004.

250. Kupersmith MJ, Latkany R, Homel P. Development of generalized disease at 2 years in patients with ocular myasthenia gravis. *Arch Neurol*. 2003;60(2):243–248. doi:10.1001/archneur.60.2.243.

251. Huang X, Li Y, Feng H, et al. Clinical characteristics of juvenile myasthenia gravis in southern China. *Front Neurol*. 2018;9:77. doi:10.3389/fneur.2018.00077.

252. Teo KY, Tow SL, Haaland B, et al. Low conversion rate of ocular to generalized myasthenia gravis in Singapore. *Muscle Nerve*. 2018;57(5):756–760. doi:10.1002/mus.25983.

253. Ding J, Zhao S, Ren K, et al. Prediction of generalization of ocular myasthenia gravis under immunosuppressive therapy in Northwest China. *BMC Neurol*. 2020;20:238. doi:10.1186/s12883-020-01805-1.

254. Sommer N, Sigg B, Melms A, et al. Ocular myasthenia gravis: response to long-term immunosuppressive treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997;62(2):156–162. doi:10.1136/jnnp.62.2.156.

255. Feng X, Huan X, Zhao C, et al. Adult ocular myasthenia gravis conversion: a single-center retrospective analysis in China. *Eur Neurol*. 2020;83(2):182–188. doi:10.1159/000507853.

256. Kisabay A, et al. Risk for generalization in ocular onset myasthenia gravis: Experience from a neuro-ophthalmology clinic. *Acta Neurol Belg*. 2022;122(2):337–344. doi:10.1007/s13760-020-01582-1.

257. Kim KH, Kim SW, Shin HY. Initial repetitive nerve stimulation test predicts conversion of ocular myasthenia gravis to generalized myasthenia gravis. *J Clin Neurol*. 2021;17:265–272. doi:10.3988/jcn.2021.17.2.265.

258. Tomschik M, Renaud E, Jäger F, et al. The diagnostic and prognostic utility of repetitive nerve stimulation in patients with myasthenia gravis. *Sci Rep*. 2023;13:2985. doi:10.1038/s41598-023-30154-5.

259. Katzberg HD, Bril V. A comparison of electrodiagnostic tests in ocular myasthenia gravis. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2005;6(3):109–113. doi:10.1097/01.cnd.0000155026.66153.f0.

260. Padua L, Stalberg E, LoMonaco M, et al. SFEMG in ocular myasthenia gravis diagnosis. *Clin Neurophysiol*. 2000;111(7):1203–1207. doi:10.1016/s1388-2457(00)00307-2.

261. Benatar M, Kaminski HJ. Evidence report: the medical treatment of ocular myasthenia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2007;68(24):2144-2149. doi:10.1212/01.wnl.0000263481.14289.90.

262. Mee J, Paine M, Byrne E, et al. Immunotherapy of ocular myasthenia gravis reduces conversion to generalized myasthenia gravis. *J Neuroophthalmol*. 2003;23(4):251–255. doi:10.1097/00041327-200312000-00002.

263. Monsul NT, Patwa HS, Knorr AM, et al. The effect of prednisone on the progression from ocular to generalized myasthenia gravis. *J Neurol Sci*. 2004;217(2):131–133. doi:10.1016/j.jns.2003.08.017.

264. Menon D, Alharbi M, Katzberg HD, et al. Effect of immunosuppression in risk of developing generalized symptoms in ocular myasthenia gravis: a retrospective cohort study. *Neurology*. 2024;103(4):e209722. doi:10.1212/WNL.0000000000209722.

265. Nacu A, Andersen JB, Lisnic V, et al. Complicating autoimmune diseases in myasthenia gravis: a review. *Autoimmunity*. 2015;48:362–368. doi:10.3109/08916934.2015.1030614.

266. Szobor A. Myasthenia gravis: familial occurrence. A study of 1100 myasthenia gravis patients. *Acta Med Hung*. 1989;46(1):13–21.

267. Provenzano C, Arancio O, Evoli A, et al. Familial autoimmune myasthenia gravis with different pathogenic antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51:1228–1230. doi: 10.1136/jnnp.51.9.1228.

268. Guo RJ, Gao T, Ruan Z, et al. Risk factors for generalization in patients with ocular myasthenia gravis: a multicenter retrospective cohort study. *Neurol Ther*. 2022;11(1):73–86. doi:10.1007/s40120-021-00292-x.

269. Li F, Zhang H, Tao Y, et al. Prediction of the generalization of myasthenia gravis with purely ocular symptoms at onset: a multivariable model development and validation. *Ther Adv Neurol Disord*. 2022;15:17562864221104508. doi:10.1177/17562864221104508.

270. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*. 2018;48(2):202–213. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007.

271. Strobel P, Moritz R, Leite MI, et al. The ageing and myasthenic thymus: a morphometric study validating a standard procedure in the histological workup of thymic specimens. *J Neuroimmunol*. 2008;201-202:64–73. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.06.017.

272. Zdrojewicz Z, Pachura E, Pachura P. The thymus: a forgotten, but very important organ. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25(2):369–375. doi:10.17219/acem/58802.

273. Verhagen J, Genolet R, Britton GJ, et al. CTLA-4 controls the thymic development of both conventional and regulatory T cells through modulation of the TCR repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E221–E230. doi:10.1073/pnas.1208573110.

274. Schaffert H, Pelz A, Saxena A, et al. IL-17-producing CD4(+) T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol*. 2015;45(5):1339–1347. doi:10.1002/eji.201445064.

275. Cao Y, Amezquita RA, Kleinstein SH, et al. Autoreactive T cells from patients with myasthenia gravis are characterized by elevated IL-17, IFN-γ, and GM-CSF and diminished IL-10 production. *J Immunol*. 2016;196(5):2075-2084. doi:10.4049/jimmunol.1501339.

276. Salam N, Rane S, Das R, et al. T cell ageing: effects of age on development, survival & function. *Indian J Med Res*. 2013;138(5):595–608.

277. Li F, Yuan W, Wu X. Association of CTLA-4 polymorphisms with increased risks of myasthenia gravis. *Ann Hum Genet*. 2018;82(6):358–369. doi:10.1111/ahg.12262.

278. Fernandez-Mestre M, Sanchez K, Balbas O, et al. Influence of CTLA-4 gene polymorphism in autoimmune and infectious diseases. Hum Immunol. 2009;70(7):532-535. doi:10.1016/j.humimm.2009.03.016.

279. Dugger SA, Platt A, Goldstein DB. Drug development in the era of precision medicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(3):183-196. doi:10.1038/nrd.2017.226.

280. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, et al. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(49):19396-19401. doi:10.1073/pnas.0806855105.

281. Gerold KD, Zheng P, Rainbow DB, et al. The soluble CTLA-4 splice variant protects from type 1 diabetes and potentiates regulatory T-cell function. *Diabetes*. 2011;60(7):1955-1963. doi:10.2337/db11-0130.

282. Derakhshani A, Asadzadeh Z, Safarpour H, et al. Regulation of CTLA-4 and PD-L1 expression in relapsing-remitting multiple sclerosis patients after treatment with fingolimod, IFN-beta-1alpha, glatiramer acetate, and dimethyl fumarate drugs. *J Pers Med*. 2021;11(8):721. doi:10.3390/jpm11080721.

283. Qi YY, Zhao XY, Liu XR, et al. Lupus susceptibility region containing CTLA4 rs17268364 functionally reduces CTLA4 expression by binding EWSR1 and correlates IFN-alpha signature. *Arthritis Res Ther*. 2021;23(1):279. doi:10.1186/s13075-021-02664-y.

284. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, et al. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol*. 2000;165(11):6606–6611. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6606.

8 Spisak skraćenica

Ach	acetilholin
AChE	acetilholin esteraza
AIC	eng. Akaike Information Criterion, informacioni kriterijum Akaike
CI	eng. confidence interval, interval poverenja
CMAP	eng. compound muscle action potential, amplituda zbirnog akcionog potencijala
CT	eng. Computed Tomography, kompjuterizovana tomografija
CTLA-4	engl. Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen-4, antigen 4 koji je udružen sa citotoksičnim T-limfocitima
df	eng. degrees of freedom, stepeni slobode
EOM	ekstraokularni mišići
EPSP	ekscitatorni postsinaptički potencijal
GWAS	eng. genome-wide association studies, studije asocijacije na nivou genoma
HLA	humani leukocitni antigen
IgG	imunoglobulin G
IvIg	imunoglobulini u intravenskoj infuziji
LD	eng. linkage disequlibrium, neravnoteža vezanosti gena
LRP4	eng. low-density lipoprotein receptor-related protein 4, protein 4 srodan receptoru lipoproteina niske gustine
MG-ADL	eng. MG–Activities of Daily Living, MG skala dnevne onesposobljenosti
MGC	eng. MG Composite, MG kompozitni skor
MGFA	eng. Myasthenia Gravis Foundation of America, američka fondacija za mijasteniju gravis
MG-QOL15	eng. MG–Quality of Life–15, MG skala za procenu kvaliteta života
MHC	eng. major histocompatibility complex, glavni histopatibilni kompleks
MiRNK	mikro RNK
MSE	eng. minimal symptom expression, minimalna manifestacija bolesti
MuSK	eng. muscle specific receptor tyrosine kinase,mišićno specifična tirozin kinaza
nAChR	nikotinski acetilholinski receptor
NMS	nervno-mišićna spojnica
OR	eng. odds ratio, odnos šansi
OSAMG	okularna forma stečene autoimune mijastenije gravis
QMG	eng. Quantitative MG, kvantitativni MG skor
qPCR	eng. Quantitative Polymerase Chain Reaction, kvantitativna lančana reakcija polimeraza
RIA	eng. radioimmunoassay, radioimunoesej
ROC	eng. Receiver Operating Characteristic
RoVEMP	repetitivni okularni vestibularni miogeni evocirani potencijali
SAMG	Stečena autoimuna mijastenija gravis
SE	eng. standard error, standardna greška
SFEMG	eng. single-fiber electromyography, elektromiografijom pojedinačnog mišićnog vlakna
SNPs/SNVs	engl. Single Nucleotide Polymorphisms/Variants, polimorfizmi/varijante pojedinačnog nukleotida
TCR	T ćelijski receptor
TIP	Terapijska izmena plazme
TNT	test nervno-mišićne transmisije
UKCS	Univerzitetski klinički centar Srbije
VATS	eng. Video Assited Thoracoscopic Surgery, video-asistirana torakoskopska hirurgija

9 Biografija autora

Ivana Đorđević diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2011. godine. Od 2012. do 2014. godine stručno se usavršavala u Klinici za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu u Beogradu. U periodu od 2013. do 2018. godine bila je zaposlena u Specijalističkoj ordinaciji za neurologiju „Apostolski“.

Specijalističke akademske studije iz neurologije završila je 2018. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, nakon što je odbranila završni rad pod nazivom „Transkranijalna parenhimska sonografija bazalnih ganglija u proceni kliničkog toka juvenilne miokloničke epilepsije“ pod mentorstvom prof. dr Nebojše Jovića. Iste godine upisala je doktorske akademske studije iz neurologije. Specijalistički ispit iz neurologije položila je 2019. godine sa odličnom ocenom.

Od 2018. do 2022. godine radila je u Specijalnoj bolnici za cerebrovaskularne bolesti „Sveti Sava“ u Beogradu. Nakon toga, od 2022. do 2025. godine bila je zaposlena u organizaciji za klinička istraživanja IQVIA, na poziciji savetnika za medicinska pitanja iz oblasti neurologije.

Od novembra 2025. godine zaposlena je u kompaniji Thermo Fisher Scientific na poziciji medicinskog direktora u okviru neurološkog tima.

Autor je i koautor više naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima iz oblasti neurologije, sa posebnim fokusom na neuromišićne bolesti i epilepsiju.

Прилог 1

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Ивана Ђорђевић

Број индекса 5012/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Анализа генетичких фактора ризика и показатељи тока и исхода 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, 5. 11. 2026.

Ивана Ђорђевић

Прилог 2

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ивана Ђорђевић

Број индекса: 5012/2018

Студијски програм: Неурологија

Наслов рада: Анализа генетичких фактора ризика и показатељи тока и исхода стечене аутоимуне мијастеније гравис

Ментор: проф. др Ивана Баста

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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, 5.11.2026.

Ивана Ђорђевић

Прилог 3

Изјава о коришћењу

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

Анализа генетичких фактора ризика и показатељи тока и исхода 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, 5. 11. 2026.

Ивана Ђорђевић

1. **Ауторство**. Дозвољавате 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**. Дозвољавате 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**. Дозвољавате 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**. Дозвољавате 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**. Дозвољавате 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.** Дозвољавате 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.