

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marko M. Andabaka

**MOLEKULARNO - GENETIČKA ANALIZA  
AKVAPORINA 4 I KORELACIJA SA  
KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA  
OBOLELIH OD NEUROMIJELITIS OPTIKA  
SPEKTRA BOLESTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Marko M. Andabaka

**MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF  
AQUAPORIN 4 AND CORRELATION WITH  
CLINICAL CHARACTERISTICS OF  
PATIENTS WITH NEUROMYELITIS OPTICA  
SPECTRUM DISORDER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentor:

Prof. dr Jelena Drulović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komentor:

Prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Članovi Komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof. dr Tatjana Pekmezović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. Prof. dr Šarlota Mesaroš, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. Prof. dr Borut Peterlin, redovni profesor, Univerzitet u Ljubljani, Medicinski fakultet.

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## *Izjava zahvalnosti*

*Najveću zahvalnost želim da izrazim Prof. dr Jeleni Drulović, mom mentoru, koja me je svojim beskrajnim strpljenjem, ljubaznim osmehom i iskrenim savetima uvela u svet neurologije pružajući mi bezuslovnu podršku u mojim prvim stručnim i naučnim koracima. Zahvaljujem se na izuzetnoj prilici, koja za mene predstavlja najveću čast i privilegiju, da i dalje učim od Vas.*

*Posebnu zahvalnost dugujem Prof. dr Ivani Novaković koja mi je nesebično otvorila vrata neuronauka i svojim dostojanstvom, mudrošću uz spremnost da uvek pomogne, sasluša i posavetuje, osvetlila put ka neurogenetici koja je bila i ostala moja najveća fascinacija.*

*Veliku zahvalnost dugujem Prof. dr Tatjani Pekmezović koja mi je pomogla da shvatim suštinu naučne misli i važnost principijalnosti i strpljenja u svim životnim i profesionalnim iskusejima.*

*Najlepše se zahvaljujem Prof. dr Šarlotti Mesaroš na tome što je svojom neiscrpnom energijom i besprekornom profesionalizmu u radu, kao i u edukaciji mladih kolega, pokazala koliko je važno biti deo tima. Zahvaljujem se na tome što je činila stub na koji sam se uvek mogao čvrsto osloniti u svim prilikama.*

*Zahvaljujem se Prof. dr Borutu Peterlinu na dugogodišnjoj uzbudljivoj i plodnoj saradnji na polju neurogenetike.*

*Zahvaljujem se beskrajno dragim prijateljima i kolegama sa Odeljenja za imunski posredovane bolesti centralnog nervnog sistema Klinike za neurologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije – Ass. dr Oliveri Tamaš, Ass. dr Nikoli Veselinoviću, Ass. dr Maji Stefanović Budmikić, dr Vanji Jovičević, dr Jovani Ivanović i dr Nikoli Momčiloviću na svim dragocenim trenucima provedenim zajedno u druženju, radu, iskrenom razumevanju i međusobnoj pomoći pri savladavanju svih životnih i profesionalnih teškoća.*

*Zahvaljujem se posebno dragim prijateljima i kolegama iz Laboratorije za molekularnu i genetičku dijagnozu neuroloških bolesti Klinike za neurologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije – dr Mileni Janković, dr Ani Marjanović i dr Mariji Branković na prijatnom vremenu provedenom u radu, smehu, srdačnim i neposrednim razgovorima i nemerljivo velikoj pomoći.*

*Zahvaljujem se i mojim vrlo cenjenim kolegama sa Instituta za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Doc. dr Gorici Marić i Ass. dr Aleksi Jovanoviću na bezuslovnoj pomoći, podršci i saradnji.*

*Zahvaljujem se dragim kolegama iz Kliničko bolničkog centra Rebro u Republici Hrvatskoj – Prof. dr Mariu Habeku, dr Luki Crnošiji, dr Anamari Junaković, dr Terezi Gabelić i dr Magdaleni Krbot Skorić na širokoj i plodonosnoj saradnji.*

*Zahvaljujem se dragim kolegama iz Univerzitetskog kliničkog centra Crne Gore – dr Ljiljani Radulović i dr Milovanu Roganoviću na uspešnoj saradnji.*

*Najlepše se zahvaljujem svim ispitanicima koji su prihvatili da učestvuju u ovoj studiji i bez kojih izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća.*

*Na kraju, iznimnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na ljubavi, razumevanju, podršci i borbi za bolje sutra, kao i na rečima utehe u najtežim trenucima.*

*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima Milanu i Katarini.*

# MOLEKULARNO - GENETIČKA ANALIZA AKVAPORINA 4 I KORELACIJA SA KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA OBOLELIH OD NEUROMIJELITIS OPTIKA SPEKTRA BOLESTI

## Sažetak

**Uvod:** U osnovi neuromijelitis optika spektra bolesti (NMOSB) nalaze se kompleksni multifaktorijalni mehanizmi interakcije genetičkih činilaca i faktora spoljašnje sredine.

**Ciljevi:** Analiza gena za akvaporin 4 (*AQP4*) kod obolelih od NMOSB i multiple skleroze (MS), analiza čitavog egzoma obolelih od NMOSB, kao i korelacija genetičkih markera sa kliničkim karakteristikama osoba obolelih od NMOSB. Procena kvaliteta života obolelih od NMOSB i MS.

**Ispitanici i metode:** Istraživanje je obuhvatilo uzorke DNK ukupno 64 pacijenata sa NMOSB, 40 pacijenata sa MS, kao i 100 uzoraka zdravih osoba. Nakon amplifikacije kodirajućih regiona gena *AQP4* učinjeno je njihovo sekvenciranje metodom po Sangeru. Dobijene varijante su korelisane sa kliničkim karakteristikama obolelih od NMOSB. Analiza celog egzoma (engl. *Whole Exome Sequencing*, WES) sprovedena je na *Illumina HiSeq-2000* platformi pomoću komercijalnih kitova, za svih 64 pacijenata sa NMOSB. Analiziran je odabrani panel gena u kojima su izdvojene varijante od potencijalnog značaja u NMOSB, kao i opterećenje ovim genima u NMOSB. Za procenu kvaliteta života obavljena je studija preseka sa ukupno 180 ispitanika (80 NMOSB, 100 MS) primenom odgovarajućih upitnika.

**Rezultati:** U kodirajućim regionima gena *AQP4* samo za varijantu rs35248760 pokazana je statistički značajna povezanost sa mijelitisom kod osoba sa NMOSB. Učinjenom analizom opterećenja retkim varijantama u okviru WES, nisu detektovane patogene varijante ili geni rizika za razvoj NMOSB.

**Zaključci:** Osim varijante rs35248760 u kodirajućim regionima gena *AQP4* nisu detektovane druge varijante od značaja. NMOSB predstavlja bolest sa kompleksnom genetičkom osnovom. Kvalitet života osoba sa NMOSB i MS značajno je narušen postojanjem autonomne disfunkcije.

**Ključne reči:** neuromijelitis optika spektar bolesti, multipla skleroza, kliničke karakteristike, gen za akvaporin 4, genetička osnova, kvalitet života, disautonomija, neuroimunologija, neurogenetika.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Neuronauke

UDK broj:

MOLECULAR - GENETIC ANALYSIS OF AQUAPORIN 4 AND CORRELATION  
WITH CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH NEUROMYELITIS  
OPTICA SPECTRUM DISORDERS

Abstract

**Introduction:** In Neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) is based on complex multifactorial mechanisms of interaction between genetic factors and environmental factors.

**Objectives:** Analysis of the gene for aquaporin-4 (*AQP4*) in patients with NMOSD and Multiple Sclerosis (MS), whole exome analysis of NMOSD patients and correlation of genetic markers with clinical characteristics of NMOSD patients. Assessment of the quality of life patients with NMOSD and MS.

**Patients and methods:** This study included DNA samples from a total of 64 patients with NMOSD, 40 patients from NMOSD, as well as 100 samples from healthy individuals. After amplification of the coding regions of *AQP4* gene, they were sequenced by the Sanger's method. The obtained variants were correlated with clinical characteristics of patients with NMOSD. For all 64 patients with NMOSD whole exome sequencing (WES) analysis was performed on the Illumina HiSeq-2000 platform using commercial kits. A selected panel of genes was analyzed in which variants of potential significance in NMOSB were identified, as well as the burden of these genes in NMOSB. To assess the quality of life, a cross-sectional study was conducted with a total of 180 patients (80 NMOSD, 100 MS) using appropriate questionnaires.

**Results:** In the coding regions of *AQP4* gene, only the rs35248760 variant showed a statistically significant association with myelitis in individuals with NMOSD. By analyzing the burden of rare variants within WES, no pathogenic variants or risk genes for the development of NMOSD were detected.

**Conclusions:** Besides the variant rs35248760, no other significant variants were detected in the coding regions of the *AQP4* gene. NMOSD is a disease with a complex genetic basis. The quality of life of people with NMOSD and MS is significantly impaired by the presence of autonomic dysfunction.

**Key words:** Neuromyelitis optica spectrum disorder, Multiple sclerosis, clinical characteristics, aquaporin 4 gene, genetic basis, quality of life, dysautonomia, neuroimmunology, neurogenetics.

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Neuroscience

UDK Number:

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Definicija i istorijat neuromijelitis optika spektra bolesti.....	1
1.2. Epidemiologija neuromijelitis optika spektra bolesti.....	3
1.2.1. Prevalencija neuromijelitis optika spektra bolesti.....	3
1.2.2. Incidencija neuromijelitis optika spektra bolesti.....	4
1.2.3. Demografske karakteristike obolelih od neuromijelitis optika spektra bolesti...5	
1.2.4. Etiologija neuromijelitis optika spektra bolesti.....	6
1.2.5. Faktori rizika za nastanak neuromijelitis optika spektra bolesti.....	8
1.3. Genetička osnova neuromijelitis optika spektra bolesti.....	8
1.3.1. Genetička osnova sporadičnih formi neuromijelitis optika spektra bolesti.....	8
1.3.1.1. Region glavnog kompleksa histokompatibilnosti.....	9
1.3.1.2. Gen za akvaporin-4.....	10
1.3.1.3. Drugi geni van HLA lokusa i neuromijelitis optika spektra bolesti.....	11
1.3.1.4. Studije genoma u neuromijelitis optika spektru bolesti.....	12
1.3.1.5. Mitohondrijalni genom i neuromijelitis optika spektra bolesti.....	13
1.3.2. Genetička osnova familijarne forme neuromijelitis optika spektra bolesti.....	13
1.4. Struktura i funkcija akvaporina 4 u centralnom nervnom sistemu.....	14
1.5. Patogeneza i patofiziologija neuromijelitis optika spektra bolesti.....	15
1.5.1. Antitela prema akvaporin 4 antigenima.....	15
1.5.2. Imunopatogeneza neuromijelitis optika spektra bolesti.....	15
1.5.3. Uloga T limfocita u patogenezi neuromijelitis optika spektra bolesti.....	17
1.5.4. Patogeneza seronegativne forme neuromijelitis optika spektra bolesti.....	17
1.6. Patologija neuromijelitis optika spektra bolesti.....	18
1.7. Kliničke i parakliničke karakteristike neuromijelitis optika spektra bolesti.....	18
1.7.1. Optički neuritis.....	19
1.7.2. Mijelitis.....	19
1.7.3. Sindrom moždanog stabla.....	20
1.7.4. Diencefalički i cerebralni sindrom.....	21

1.7.5. Bol i bolni sindrom.....	22
1.7.6. Poremećaji funkcije autonomnog nervnog sistema.....	23
1.7.7. Laboratorijske analize.....	23
1.7.7.1. Određivanje antitela prema akvaporin 4 antigenima.....	23
1.7.7.2. Određivanje antitela prema mijelin oligodendrocitnom glikoproteinu.....	24
1.7.7.3. Citobiohemijske karakteristike likvora.....	25
1.7.7.4. Izoelektrično fokusiranje likvora i seruma.....	25
1.8. Dijagnoza i diferencijalna dijagnoza neuromijelitis optika spektra bolesti.....	25
1.8.1. Važeći dijagnostički kriterijumi.....	26
1.8.2. Diferencijalno dijagnostička razmatranja.....	27
1.9. Autoimunski komorbiditeti u neuromijelitis optika spektru bolesti.....	28
1.10. Lečenje neuromijelitis optika spektra bolesti.....	29
1.10.1. Terapija relapsa bolesti.....	29
1.10.2. Terapija za prevenciju pojave relapsa bolesti.....	30
1.10.2.1. Klasični imunosupresivni lekovi.....	30
1.10.2.2. Monoklonska antitela.....	31
1.11. Prognoza i ishod neuromijelitis optika spektra bolesti.....	34
1.12. Kvalitet života obolelih od neuromijelitis optika spektra bolesti.....	34
2. CILJEVI.....	35
3. MATERIJAL I METODE.....	36
3.1. Eksperimentalni deo istraživanja.....	36
3.1.1. Materijal.....	36
3.1.2. Metode eksperimentalnog istraživanja.....	36
3.1.2.1. Izolacija genomske dezoksiribonukleinske kiseline.....	36
3.1.2.2. Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane DNK.....	37
3.1.2.3. Sekvenciranje odabranih regiona gena <i>AQP4</i> .....	37
3.1.2.3.1. Lančana reakcija polimeraze.....	38
3.1.2.3.2. Provera PCR produkata.....	40
3.1.2.3.3. Prečišćavanje produkata PCR reakcije.....	40
3.1.2.3.4. Sekvenciranje gena <i>AQP4</i> .....	41

3.1.2.3.5. Prečišćavanje produkata sekvenciranja.....	42
3.1.2.3.6. Kapilarna elektroforeza i analiza produkata sekvenciranja.....	42
3.1.2.4. Sekvenciranje nove generacije.....	43
3.1.2.4.1. Sekvenciranje čitavog egzoma pacijenata sa NMOSB.....	43
3.1.2.5. Analiza rezultata WES.....	44
3.2. Klinički deo istraživanja.....	44
3.2.1. Tip studije.....	44
3.2.2. Selekcija ispitanika.....	44
3.2.3. Metode kliničkog istraživanja.....	45
3.2.3.1. Upitnik za procenu kvaliteta života.....	45
3.2.3.2. Upitnik za procenu disfunkcije autonomnog nervnog sistema.....	45
3.2.3.3. Upitnik za procenu stepena depresivnosti.....	46
3.3. Statističke analize.....	46
3.4. Ocena etičnosti istraživanja.....	47
4. REZULTATI.....	48
4.1. Rezultati eksperimentalnog istraživanja.....	48
4.1.1. Rezultati sekvenciranja kodirajućih regiona gena <i>AQP4</i> .....	49
4.1.2. Rezultati sekvenciranja čitavog egzoma.....	53
4.2. Rezultati kliničkog istraživanja.....	57
5. DISKUSIJA.....	63
6. ZAKLJUČCI.....	78
7. LITERATURA.....	80

## 1. UVOD

### 1.1. Definicija i istorijat neuromijelitis optika spektra bolesti

Neuromijelitis optika (NMO, Devikova bolest) terminološki označava imunski posredovani poremećaj centralnog nervnog sistema (CNS), koji predominantno zahvata optičke nerve i kičmenu moždinu (KM), u okviru čega je savremena definicija obuhvatila i kliničke manifestacije koje se pored longitudinalnog ekstenzivnog transverzalnog mijelitisa (LETM) i optičkog neuritisa (ON), mogu ispoljiti i simptomima i znacima zahvaćenosti diencefalona, moždanog stabla i aree postreme, što je predstavljeno jedinstvenim kliničkim entitetom pod nazivom neuromijelitis optika spektra bolesti (NMOSB) [1, 2].

Međutim, etimološki posmatrano, koncept razumevanja ove bolesti kroz istoriju bio je vezan za njene različite nazive koji su je pratili tokom određene epohe u neurologiji i medicinskoj nauci uopšte [3, 4].

Početak XIX veka francuski oftalmolog nemačkog porekla Frederic Jules Sichel (1802-1868) je 1837 godine prvi put upotrebio naziv „*amaurose spinale*” odnosno spinalna amauroza kojoj je posvetio šesto poglavlje u svom tekstu pod nazivom „*Traité de l'ophthalmie, la cataracte et l'amaurose*” [5]. Naime, on je opisivanjem slučaja četrnaestogodišnje pacijentkinje koju je pregledao 1832 godine zbog pojave oštećenja vida na oba oka i bolom u leđima sa grčenjem elstremiteta, skrenuo pažnju da amauroza koegzistencijalno može biti povezana sa prisustvom oboljenja kičmene moždine i sugerisao da svakog pacijenta sa razvojem slepila treba pregledati i neurološki [4, 5]. Godinu dana kasnije, 1838 godine francuski oftalmolog Charles Joseph Frédéric Carron du Villards (1801-1860) je u svom tekstu pod nazivom „*Guide pratique pour l'etude et le traitement des maladies des yeux*” takođe istakao slučajeve koji su se klinički manifestovali postojanjem amauroze i oboljenjem kičmene moždine i predložio flebotomiju sa ispuštanjem značajnih količina krvi kao terapiju sa mogućim pozitivnim efektom [4, 6]. Joseph Pierre Eléonor Pétrequin (1809-1876) hirurg iz ugledne bolnice *Hôtel-Dieu* u Parizu je 1841 godine izneo zapažanja nakon *post mortem* analize devetnaestogodišnjeg pacijenta, koji je preminuo usled komplikacija spinalne amauroze, kada je na autopsiji zapazio da su mozak, moždano stablo i optički nervi makroskopski intaktni a da je u nivou 10. kičmenog živca bila prisutna braonkasto – sivkasta promena praćena razmekšanjem kičmene moždine što je smatrao posledicom mijelitisa. Takođe, on je verovao da u osnovi ove bolesti kod pacijenata postoji abnormalni sastav krvi odnosno diskrazija [4, 7]. Karl Gustav Himly (1772-1837) nemački hirurg i oftalmolog u tekstu objavljenom posthumno 1843 godine navodi da je mogući uzrok amauroze iritacija kičmene moždine [8], pozivajući se na zapažanje koje ranije izneo Carron du Villards da se ponekad amauroza gubi sa povlačenjem zapaljenja kičmene moždine [4, 6]. Sa druge strane, britanski oftalmolog Edward Octavius Hocken (1820-1845) je u svojim radovima iz 1841. i 1842 godine [9-12], između ostalog, opisao slučaj pedijatrijskog pacijenta koji je razvio febrilnost sa bolom u zadnjem predelu vrata i spasticitetom u sva četiri ekstremiteta, nakon čega se ubrzo razvilo slepilo na oba oka u ukupnom trajanju od nedelju dana sa povlačenjem pomenutih simptoma u narednom periodu. Naime u pokušaju da objasni ovo retko stanje u čijoj osnovi se nalazilo oštećenje koje zahvata i KM i vidni sistem, naveo je da verovatno procesi u vratnom delu kičme, uključujući i one koji bi eventualno zahvatali simpatikus ili određene lokalne membrane, mogli dovesti do oštećenja vida te je predložio upotrebu naziva „*spinal amaurosis*” odnosno spinalna amauroza [13].

Važno je istaći, da bez obzira na to što je u drugoj polovini XVIII veka francuski patolog i botaničar François Boissier de Sauvages de Lacroix's (1706–1776) u svom delu „*Nosologia*

*methodica*'' iz 1763 godine upotrebio naziv „*amaurose rachialgique*'' ali bez jasnog isticanja bilo kakvih karakteristika koje bi ukazale na povezanost oštećenja KM i pojave samog slepila [4], kao i činjenice da je britanski hirurg Joseph Warner (1717–1801) verovatno među prvima opisao slučaj pacijenta sa teškim oštećenjem vida na oba oka i paraplegijom 1773 godine [14], termin „spinalna amauroza" koji je inicijalno upotrebio Frederic Sichel postao je široko prihvaćen u Evropi tokom čitavog XIX veka, a posebno u njegovoj prvoj polovini, označavajući pre svega retko stanje koje se manifestuje istovremenim zahvatanjem optičkih nerava i KM [4].

Međutim, u drugoj polovini XIX veka sve više lekara i istraživača su ovaj termin počeli da upotrebljavaju i u kontekstu postojanja amauroze u sklopu oboljenja *tabes dorsalis* [4] kao na primer Édouard Meyer (1838–1902) koji je u svom predavanju na „*Ecole pratique*'' Univerziteta u Parizu 1863 godine, o čemu je kasnije i pisao, izneo stav da je spinalna amauroza najčešće posledica *tabes dorsalis*-a [15]. Upravo ovakav tok događaja neminovno je vodio ka tome da „spinalna amauroza" gotovo postane sinonim za amaurozu u sklopu bolesti *tabes dorsalis* [4].

Na samom kraju XIX veka francuski neurolog Eugène Devic (1858–1930) je na skupu pod nazivom „*Congrès Français de Médecine*'' 1894 godine u Lionu održao predavanje tokom kojeg je prikazao seriju slučajeva od 17 pacijenata sa akutnim mijelitisom i ON sugerišući novi klinički entitet za koji je predložio naziv „*neuro-myélite optique*" odnosno „neuromijelitis optika" [16]. Nakon toga, iste godine Fernand Gault (1873-1936) objavio je doktorsku tezu čiji mentor je upravo bio Eugène Devic pod nazivom „*De la neuromyélite optique aiguë*'' odnosno „akutni neuromijelitis optika'' čiji su rezultati, između ostalog, obuhvatili nalaz autopsije pacijentkinje koje je pratio i lečio Eugène Devic i koji su jasno ukazivali na postojanje oštećenja KM i optičkih nerava [3, 17]. Iako je termin „neuromijelitis" odnosno „neuromyelitis" definisan kao zapaljenje KM mnogo ranije u francuskom rečniku „*Dictionnaire de l'Académie Française*'' 1836 godine [4] i u rečniku engleskog govornog područja „*Dictionary of Medical Science*'' iz 1848 godine [3] postoji mogućnost da su Eugène Devic i Fernand Gault konkretan entitet „*neuro-myélite optique*" izveli po analogiji naziva „*neuro-cérébrite*'' koji je uveo August Pierret (1845-1920) definišući određene forme encefalitisa [3, 4, 17]. Svakako, značaj rada kojim se bavio Eugène Devic ogleda se i u činjenici da je turski neurolog Peppo Acchioté (1870-1916) predložio da neuromijelitis optika dobije eponim „Devikova bolest" što je i učinjeno na sednici „*Société de Neurologie de Paris*'' 04 jula 1907 godine čime je ozvaničeno postojanje ovog novog entiteta [3].

Međutim, upravo početkom XX veka kako je postojala sve veća zainteresovanost brojnih lekara i istraživača za NMO odnosno Devikovu bolest, rastao je i broj onih koji su smatrali da je NMO forma multiple skleroze (MS), što je razmišljanje koje je suštinski obeležilo ovaj vek [3]. Među njima bio je i poznati britanski neurolog Russell Brain (1895-1966) koji je u svom preglednom radu iz 1930 godine tvrdio da NMO spada u MS i da se klinički razlikuje samo u stepenu akutnog početka i težini ispoljavanja te da se generalno radi o jednoj bolesti [18]. Svakako, u drugoj polovini XX veka dominiraju istraživanja koja su se bavila kliničkom prezentacijom NMO u cilju definisanja manje ili više karakterističnih manifestacija bolesti [3]. Najveći iskorak u tom smislu načinjen je 1999 godine kada su američki neurolog Dean M. Wingerchuk i saradnici predložili prve kriterijume za postavljanje dijagnoze NMO, a na osnovu rezultata opsežne studije koju su sprovedli na uglednoj klinici Mayo u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), kada je zaključeno da su kliničke, neuroradiološke i laboratorijske odnosno molekularne karakteristike NMO bitno različite od onih koji se sreću u „tipičnoj MS", te su u okviru načinjene distinkcije posebno istakli potrebu za ranim postavljanjem dijagnoze i mogućnost pojave relapsnog toka NMO sa lošijom prognozom u odnosu na MS, zatim postojanje visokog stepena autoimunskih komorbiditeta kao i mogući širi spektar neurološkog ispoljavanja NMO [19].

Revolucionalnim otkrićem na samom pragu XXI veka kada su Vanda A. Lennon i saradnici 2004 godine sa klinike Mayo u SAD izolovali autoantitela koja su bila specifično usmerena prema vodenom kanalu po imenu akvaporin-4 (engl. *aquaporin-4*, AQP4) i pokazali da se radi o imunoglobulinima klase G (IgG) čije postojanje u serumu predstavlja molekularni biomarker

Devikove bolesti (AQP4-IgG, NMO-IgG) koji razlikuje ovo oboljenje od MS [20], započela je savremena era u okviru koje je NMO konačno i jasno izdvojen kao potpuno samostalan entitet, pre svega, u odnosu na MS [21]. Naime, otkriće AQP4-IgG omogućilo je dalja istraživanja kako kliničkih tako i neuroradioloških i laboratorijskih karakteristika obolelih od NMO, kao i onih za koje se smatralo da imaju MS, što je dovelo do jasnog definisanja fenotipova NMO na osnovu čega su Dean M. Wingerchuk i saradnici 2006 godine predložili nove, revidirane kriterijume za postavljanje dijagnoze NMO naglašavajući mogućnost afekcije i ostalih delova CNS van optikospinalne osovine, kao i postojanje specifičnog serumskog biomarkera za NMO [21]. Druga dekada XXI veka, prateći savremene tokove, obeležena je formiranjem Internacionalnog panela za dijagnozu NMO koji je na osnovu činjenica prikupljenih detaljnim pregledom literature i analizom podataka vezanih za demografske i kliničke karakteristike, potom, neuroradiološku prezentaciju i laboratorijske parametre obolelih od NMO, uspostavila savremene i aktuelno važeće dijagnostičke kriterijume 2015 godine koji su uključili sve etimološki relevantne kliničke manifestacije i nozološki ih predstavili jedinstvenim nazivom neuromijelitis optika spektra bolesti (NMOSB) [2].

## **1.2. Epidemiologija neuromijelitis optika spektra bolesti**

Studije koje su se bavile procenom prevalencije i incidencije NMOSB ukazuju na to da je u pitanju suštinski retko oboljenje, koje predominantno zahvata osobe ženskog pola, uz različitu distribuciju širom sveta sa najvišim stepenom zastupljenosti u azijskoj i afričkoj populaciji u odnosu na etničku pripadnost, sugerišući određenu genetičku determinisanost, kao i mogući uticaj pojedinih faktora rizika spoljne sredine na stopu javljanja bolesti u određenim geografskim područjima [22].

### **1.2.1. Prevalencija neuromijelitis optika spektra bolesti**

Imajući u vidu varijabilnu zastupljenost NMOSB u odnosu na različite populacije i geografsku pripadnost, prevalencija ove bolesti visoka je u Aziji obuhvatajući zemlje Dalekog istoka odnosno Istočnu Aziju, tako da je u Japanu prevalencija procenjena na 3,42/100 000 stanovnika [23] prema istraživanju koje se rukovodilo dijagnostičkim kriterijumima za NMO iz 2006 godine [21]. Sa druge strane, uzimajući u obzir NMOSB pacijente kojima je dijagnoza postavljena prema kriterijumima iz 2015 godine [2], prevalencija ove bolesti u Japanu procenjena je na 4,1/100 000 stanovnika za period do 2016 godine [24] da bi analizom iz 2021 godine bilo pokazano da je tokom pet godina došlo do porasta prevalencije NMOSB u ovoj zemlji na 6,6/100 000 stanovnika [25]. Takođe, prevalencija NMOSB u Koreji procenjena je na 3,56/100 000 stanovnika 2017 godine [26]. Zatim, među kineskom populacijom u jugoistočnoj Aziji odnosno Maleziji, prevalencija je iznosila 3,31/100 000 stanovnika [27], dok je na Tajlandu procenjeno da je prevalencija ove bolesti 3,08/100 000 [28]. U oblasti južne Azije odnosno u Indiji, prevalencija NMOSB iznosi 2,6/100 000 stanovnika [29]. U jugozapadnoj Aziji, odnosno u Ujedinjenim Arapskim Emiratima prevalencija NMOSB iznosila je 1,76/100 000 stanovnika [30]. Prevalencija NMOSB regiona zapadne Azije, procenjena je u Iranu na 0,86/100 000 stanovnika u 2016 godini [31], da bi analizom čiji rezultati su objavljeni 2019 godine uočen porast prevalencije NMOSB na 1,31/100 000 stanovnika koristeći se dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine [2] u obe navedene studije [32]. Kada je u pitanju prevalencija pedijatrijskih slučajeva NMOSB u Aziji, postoje podaci da prevalencija, na primer u Iranu, čini 0,16/100 000 [31], dok je u Japanu ona niža i iznosi 0,06/100 000 dece [33] a na Tajvanu je procenjeno da je prevalencija pedijatrijskih formi NMOSB viša i da iznosi do 0,34/100 000 [34].

Studije koje su se bavile određivanjem stepena prevalencije NMOSB u afričkoj populaciji su malobrojne i upućuju na to da je ona viša u odnosu na kavkazoide [35]. Naime, pokazano je da je prevalencija NMOSB u 2011 godini bila izuzetno visoka među populacijom afričkog porekla u SAD 13/100 000 kao i na ostrvu Martinik (*Martinique*) gde je iznosila 10/100 000 stanovnika [36]. Takođe, prevalencija NMOSB među stanovništvom afričkog porekla u Australiji i Novom Zelandu iznosi 1,84/100 000 [37], dok u Velikoj Britaniji ona iznosi 1,8/100 000 [38]. Interesantno je napomenuti da se prevalencija NMOSB određivana u regionu afričkog kontinenta kreće od 0,004/100 000 stanovnika u Etipiji, na istoku Afrike, pa do 0,17 obolelih na 100 000 stanovnika u zapadnoj Africi, odnosno Nigeriji [39]. Na severu Afrike, odnosno u Sudanu, prevalencija NMOSB iznosi 0,074/100 000, a na severoistoku Afrike, u Egiptu, prevalencija NMOSB čini 0,020/100 000 stanovnika, dok u Južnoafričkoj Republici prevalencija ove bolesti procenjena je na 0,052/100 000 [39].

Prevalencija NMOSB koja se odnosi na Australiju, uključujući i Novi Zeland, 2013 godine iznosila je 0,7/100 000 [40], dok je prevalencija ove bolesti među većinskim stanovništvom evropskog porekla procenjena na 0,55 obolelih od NMOSB na 100 000 stanovnika [37]. Takođe, prema novijim podacima, koji su obuhvatili pacijente kojima je dijagnoza NMOSB postavljena prema kriterijumima iz 2015 godine [2], ukupna prevalencija ove bolesti u Australiji iznosila je 0,29/100 000 stanovnika [41].

Kada je u pitanju oblast Severne Amerike, odnosno u Meksiku, prevalencija NMOSB iznosila je 1,09/100 000 stanovnika [42] dok je ukupna prevalencija ove bolesti u SAD procenjena kao visoka čineći 3,9/100 000 stanovnika [36]. Ovo se isto odnosilo i na oblast Južne Amerike, odnosno na Brazil, gde je prevalencija iznosila 3,09/100 000 [41], Venecuelu sa 2,11/100 000 stanovnika [43] i Čile sa prevalencijom NMOSB od 0,95/100 000 stanovnika [44].

Među dominantnom, kavkaskom populacijom na evropskom kontinentu, prevalencija NMOSB je niža u odnosu na pripadnike drugih etničkih grupa, prema podacima sprovedenih populacionih studija [22, 35]. U oblasti zapadne Evrope odnosno u Velikoj Britaniji, prevalencija NMOSB je nešto viša i 2010 godine iznosila je 1,96/100 000 za kavkasku populaciju [45], da bi 2018 godine prevalencija NMOSB za ovu populaciju bila procenjena na 1,4/100 000 stanovnika [46]. Takođe, u centralnoistočnoj Evropi, odnosno u Mađarskoj, prevalencija NMOSB iznosi 1,91/100 000 stanovnika [47], dok u centralnoj Evropi (Austrija) ona iznosi 0,7 obolelih na 100 000 stanovnika [48]. U oblasti severne Evrope, prevalencija NMOSB na primer u Danskoj, procenjena je na 0,56/100 000 stanovnika uzimajući u obzir dijagnostičke kriterijume za ovu bolest iz 2006 godine [21], odnosno 1,09/100 000 stanovnika prema dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine [2] za datu populaciju [49], dok je u Švedskoj ona iznosila 1,04 obolelih od NMOS na 100 000 stanovnika u 2013 godini [50]. Sa druge strane, u južnoj Evropi, odnosno Španiji, prevalencija NMOSB čija procena je obuhvatila osobe kojima je dijagnoza bolesti postavljena prema kriterijumima iz 2006 godine [21] iznosila je 0,58/100 000, dok je prema dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine [2] ona bila 0,89/100 000 stanovnika u 2016 godini [51]. Za prevalenciju NMOSB u okviru pedijatrijske populacije u Evropi procenjeno je da ona, na primer u Velikoj Britaniji, iznosi 1,4/100 000 za 2018 godinu [46], dok je u Španiji za 2016 godinu procenjena na 0,22/100 000 osoba [51].

Kada je u pitanju Republika Srbija, prevalencija NMOSB u regionu Centralne Srbije uključujući i grad Beograd iznosi 1,03/100 000 stanovnika [52].

### **1.2.2. Incidencija neuromijelitis optika spektra bolesti**

Incidencija NMOSB razlikuje se u odnosu na etničko poreklo i geografsku pripadnost prateći uglavnom stepen prevalencije ovog oboljenja u ispitivanim populacijama [22, 35]. Posmatrajući region Azije, incidencija NMOSB u Japanu u periodu između 1980-1984 godine iznosila je 0,06/100 000, dok je u periodu između 2015-2019 godine ona činila 0,52/100 000

stanovnika [25] a u Koreji incidencija 2016. odnosno 2017 godine, bila je 0,65/100 000 osoba-godina odnosno 0,41/100 000 osoba-godina [26]. Takođe, postoje podaci da je godišnja incidencija NMOSB u Južnoj Koreji 0,57/100 000 stanovnika [41]. U Maleziji incidencija ovog oboljenja predstavlja 0,39/100 000 osoba-godina [53], dok je za Ujedinjene Arapske Emirate ona procenjena na 0,17/100 000 za posmatrani period između 2010-2016 godine [30], a godišnja incidencija u ovoj zemlji je niska i iznosi 0,05/100 000 stanovnika [40].

Incidencija NMOSB vezana za populaciju afričkog porekla u Martiniku (*Martinique*) iznosi 0,73/100 000 za period između 2003-2011 godine [36], a u oblasti Karipskog basena do 0,4/100 000 stanovnika [54].

Kada je u pitanju Australija može se reći da je godišnja incidencija NMOSB niska i procenjeno je da iznosi 0,037/100 000 stanovnika-godina za period 2009-2012 godine [37].

U Severnoj Americi, odnosno SAD, godišnja incidencija NMOSB činila je 0,07/100 000 za period od 2003-2011 godine [36], dok u Meksiku ona iznosi 0,71/100 000 [42].

U Evropi incidencija NMOSB među kavkaskom populacijom procenjena je kao visoka u Slovačkoj gde iznosi 0,88/100 000 godišnje [41]. U Velikoj Britaniji incidencija NMOSB procenjena u odnosu na dijagnostičke kriterijume za NMOSB iz 2015 godine [2] iznosi 0,25/100 000 osoba-godina [46]. Incidencija NMOSB u Mađarskoj procenjena je na 0,13/100 000 za period od 2006-2015 godine [47]. U Danskoj incidencija NMOSB procenjena je na 0,02/100 000 uzimajući u obzir dijagnostičke kriterijume za ovu bolest iz 2006 godine [21], odnosno 0,07/100 000 stanovnika-godina prema dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine [2] za period od 2007-2013 godine [49], dok je u Švedskoj ona iznosila 0,03/100 000 za period između 1987-2006 godine i 0,07/100 000 u periodu od 2007-2013 godine [50]. Sa druge strane, u južoevropskom regionu, odnosno u Španiji, incidencija NMOSB iznosila je 0,06/100 000 prema dijagnostičkim kriterijumima za ovu bolest iz 2015 godine [2], za period od 2006-2015 godine [51]. Niska incidencija NMOSB u odnosu na evropske zemlje sa predominantno kavkaskom populacijom zabeležena je i u Austriji gde je iznosila 0,05/100 000 za period između 2008-2011 godine [48], prema kriterijumima za ovu bolest iz 2006 godine [21].

Globalno posmatrano, incidencija NMOSB u pedijatrijskoj populaciji je takođe varijabilna, pa je tako na primer, za region Tajvana ona iznosila 0,11/100 000 za period od 2011-2015 godine [34], dok je u Koreji incidencija ove forme bolesti procenjena na 0,09/100 000 [55]. Potom, incidencija pedijatrijske forme NMOSB u Ujedinjenim Arapskim Emiratima iznosi 0,06 (0,059)/100 000 [30]. U Islandu incidencija NMOSB u pedijatrijskoj populaciji predstavlja 0,06/100 000 u okviru perioda između 1990. i 2009 godine [56], a u Danskoj je incidencija činila 0,03/100 000 za period od 2008 do 2018 godine [57] kao i u južnoj oblasti Evrope odnosno Španiji, gde je takođe procenjena na 0,03/100 000 u periodu od 2006-2016 godine [51].

Međutim, kada su u pitanju podaci vezani za prevalenciju i incidenciju NMOSB, važno je napomenuti da vrednosti ovih epidemioloških parametara variraju u odnosu na rezultate različitih istraživanja, što dobrim delom može biti posledica dizajna samih studija, metodološkog pristupa kao i promene dijagnostičkih kriterijuma, što za posledicu ima otežanu komparabilnost i analizu ovako dobijenih podataka koji bi eventualno preciznije ukazali na rasprostranjenost i dinamiku javljanja NMOSB u svetu [22, 35, 41]. Sa druge strane, načinjeni su određeni naponi u pokušaju da se analiziraju i prikažu rezultati vezani za sveukupnu incidenciju i prevalenciju NMOSB na nivou svetske populacije, kada je uzimajući u obzir dijagnostičke kriterijume iz 2015 godine [2], procenjeno da objedinjena prevalencija za ovu bolest iznosi 1,51/100 000 osoba, dok ukupna godišnja incidencija čini 0,27/100 000 osoba [41].

### **1.2.3. Demografske karakteristike obolelih od neuromijelitis optika spektra bolesti**

Na osnovu podataka dobijenih sprovedenim epidemiološkim studijama, globalno je utvrđeno da NMOSB češće zahvata osobe ženskog pola, u okviru čega je procenjena prevalencija

od 2,82/100 000, dok je za populaciju muškog pola prevalencija ove bolesti niža, i iznosi 0,58/100 000 prema dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine [2]. Ovakav stepen prevalencije je takođe praćen i trendom incidencije NMOSB, koja je procenjena kao viša u populaciji osoba ženskog pola i iznosi 0,35/100 000 u odnosu na populaciju koju čine osobe muškog pola sa godišnjom incidencijom NMOSB od 0,04/100 000 [41]. Kada govorimo o međusobnom odnosu obolelih osoba muškog i ženskog pola, izuzetno velika razlika primećena je u Aziji odnosno u Japanu, dakle na zapadu kontinenta gde pomenuti odnos iznosi 12:1 na štetu osoba ženskog pola [24] dok je u Ujedinjenim Arapskim Emiratima taj odnos 4,75:1 na štetu ženskog pola [30]. U predelu afričkog kontinenta, udeo žena koje su obolele od NMOSB iznosi 82% i znatno je viši od 18% udela obolelih od ove bolesti među muškom populacijom [39]. U Australiji je takođe zabaležen visok udeo ženskih osoba obolelih od NMOSB čineći 96% od ukupno obolelih od ove bolesti među većinskim stanovništvom evropskog porekla [37]. U SAD postoji upadljiva predominacija osoba ženskog pola od 83-90% obolelih od NMOSB u zavisnosti i od etničke pripadnosti [36], dok je u regionu Južne Amerike odnos polova 4:1 na štetu osoba ženskog pola kada je u pitanju oboljevanje od NMOSB [43]. U oblasti Evrope nešto upadljivija razlika u odnosu polova zahvaćenih NMOSB od 7:1 na štetu osoba ženskog pola primećena je u Velikoj Britaniji i Austriji [46, 48], dok je u Danskoj taj odnos 4,6:1 [49], a na jugu Evrope odnosno, u Španiji, ta razlika manja i iznosi 3,1:1 takođe na štetu osoba ženskog pola [51]. Kada je u pitanju Republika Srbija pokazano je da osobe ženskog pola češće oboljevaju od NMOSB i da taj udeo iznosi 85,1% od ukupnog broja analiziranih pacijenata [58].

NMOSB može nastati u različitom životnom dobu [22], mada studije ukazuju da se bolest uglavnom javlja u opsegu uzrasta između 29,2 [59], do 45,7 godina [48]. Svakako, postoje procene u kojima se navodi da globalno srednji uzrast kada NMOSB najčešće počinje iznosi ~40 godina za oba pola [35]. Takođe, poznato je da se bolest može javiti i u pedijatrijskoj populaciji, odnosno na uzrastu ispod 18 godina u okviru čega je zabeležena pojava NMOSB i na uzrastu od 5 godina [46, 56, 57, 60] što je manje uobičajeno kao i pojava bolesti sa kasnim početkom ( $\geq 60$  godina života) čiji se udeo incidencije kreće od 20% do 28% [22, 47, 51]. Posmatrano u odnosu na pojedine regione, određena istraživanja sugerišu da je srednji uzrast ispoljavanja NMOSB niži među populacijom afričkog (28-33 godine) i azijskog (35-40 godina) porekla u odnosu na srednji uzrast ispoljavanja ove bolesti od 44 godine, koliko iznosi među pripadnicima kavkaske populacije [61, 62]. Međutim, na istoku Azije, odnosno u Japanu, srednji uzrast javljanja NMOSB iznosi 45,2 godine [24]. U Istočnoj Africi srednji uzrast za pojavu NMOSB iznosi 30 godina, dok u predelu Južne Afrike srednji uzrast u kojoj se ispoljava bolest je niži i iznosi 29 godina [39]. Takođe, niži srednji uzrast u kome je došlo do pojave NMOSB primećen je u oblasti Južne Amerike, odnosno u Venecueli, gde je iznosio 34 godine [43], dok je sa druge strane, u SAD odnosno u Severnoj Americi, medijana javljanja ovog oboljenja 35-37 godina [36]. Slične vrednosti zabeležene su i u severnim predelima Evrope, odnosno u Danskoj, gde medijana javljanja NMOSB iznosi 35,5 godina [49], dok je u južnoj Evropi, odnosno Španiji, procenjena nešto viša medijana koja iznosi 42 godine [51]. Medijana javljanja NMOSB u Republici Srbiji iznosi 40 godina [58].

#### **1.2.4. Etiologija neuromijelitis optika spektra bolesti**

Sve veći broj studija koje su se bavile analizom epidemioloških karakteristika NMOSB ukazao je da ova bolest ima varijabilnu etničku zastupljenost što snažno sugerise uticaj određenih naslednih faktora na nastanak NMOSB kod ljudi [22, 35]. Tome u prilog svakako idu zapažanja da je pojava NMOSB veća među pripadnicima određene etničke grupe, bez obzira na to što žive u različitim geografskim područjima, pa samim tim i nisu pod uticajem manje ili više identičnih faktora spoljne sredine [22, 35-37, 41], kao i činjenica, istaknuta u stidijama genetičke epidemiologije, da postoji javljanje ove bolesti u okviru istih porodica [63], uz izdvajanje retkih

slučajeva zahvaćenosti monozigotnih blizanaca, što je od posebne važnosti za analizu doprinosa naslednih uzročnih elemenata za NMOSB [64].

Sa druge strane, uticaj ekspozicije određenim faktorima spoljne sredine na pojavu NMOSB podržavaju podaci populacionih studija koji ukazuju da je bolest prisutna u svim delovima sveta [22, 35, 41], kao i da je u pojedinim geografskim područjima zabeležen porast prevalencije u vremenu između dve tačke procene, odnosno analize zastupljenosti NMOSB [25, 31, 32]. Međutim, nije poznato koji faktori spoljne sredine presudno, odnosno značajno, doprinose pojavi i razvoju NMOSB te je u tom smislu, na primer, ispitivana povezanost gradijenta geografske širine i pojave NMOSB, kada je pokazano postojanje obrnute diskretne korelacije sa porastom prevalencije ove bolesti u nižim gradijentima geografske širine [40]. Mada, postoje i studije koje nisu ustanovile sa sigurnošću postojanje ovakve povezanosti [22]. Takođe, ispitivan je i uticaj stepena ekspozicije sunčevoj svetlosti tokom godine i nivoa vitamina D, odnosno njegovih aktivnih oblika u serumu, kao potencijalnih etioloških faktora za NMOSB kada su dobijeni varijabilni rezultati od kojih neki ukazuju na moguću etiopatogenetsku ulogu ovih faktora, ali na osnovu kojih još uvek nije moguće izvesti jasan, konstitutivan zaključak, pre svega, na individualom nivou [65-67].

Posebna pažnja posvećena je istraživanjima koja se odnose na kompoziciju crevne flore odnosno intestinalnog mikrobioma i pojave NMOSB [68]. Naime, određene studije pokazale su da se sastav intestinalnog mikrobioma obolelih od NMOSB razlikuje u odnosu na potpuno zdrave individue, kao i osobe koje namaju ovo oboljenje [68]. Dakle, zaključeno je da u intestinalnom mikrobiomu obolelih od NMOSB postoji povećan broj bakterija iz roda: *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Butyricimonas*, *Veillonella*, *Alistipes* i *Rothia*, dok je nešto manja zastupljenost bakterija iz roda: *Clostridium* (izuzev bakterije *Clostridium perfringens*), *Oxalobacter*, *Burkholderia* i *Parabacteroides* u odnosu na zdrave osobe [69-71]. Pretpostavljeni etiopatogenetski mehanizam vezan je za moguću unakrsnu imunsku reakciju između pojedinih sekvenci bakterije *Clostridium perfringens* i proteina AQP4, po tipu mehanizma molekularne mimikrije, što dalje vodi ka proliferaciji AQP4 imunodominantnih odnosno reaktivnih T ćelija [69, 70]. Takođe, istraživanja intestinalnog mikrobioma obolelih od NMOSB u azijskoj populaciji pokazala su da se bakterije iz roda *Streptococcus* mogu povezati sa ovim oboljenjem, mada njihova uloga u patogenezi nije u potpunosti razjašnjena [72]. Postoje podaci koji naglašavaju da je fekalna koncentracija masnih kiselina kratkih lanaca (engl. *short - chain fatty acids*, SCFA) smanjena u intestinumu osoba obolelih od NMOSB, usled postojeće disbioze odnosno poremećaja unutar cervnog mikrobioma, što potencijalno može uticati na protektivne imunske mehanizme čija disfunkcija doprinosi nastanku autoimunskih reakcija u organizmu [72, 73].

Sa druge strane, nevezano za rezidentnu odnosno saprofitnu floru, proučavan je i uticaj infekcija patogenim mikroorganizmima u etiologiji NMOSB [74]. Tako na primer, infekcije izazvane bakterijama kao što su: *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* i *Mycoplasma pneumoniae*, pominju se kao mogući okidači autoimunskog procesa neposredno nakon akutnih ili tokom hroničnih formi infekcija, i uglavnom se povezuju sa njihovim uticajem na oslobađanje određenih inflamatornih medijatora, zatim sa mehanizmima molekularne mimikrije uz reaktivaciju imunskih ćelija, što za posledicu može imati pojavu ili pogoršanje već postojećeg NMOSB [74-78]. Svakako se i infekcije brojnim virusima pominju kao mogući etiološki činioci NMOSB, od kojih se posebno izdvajaju: hepatitis B virus (HBV), *Epstein – Barr* virus (EBV), *Varicella zoster* virus (VZV) i virus humane imunodeficijencije (HIV) koji mogu, u svojoj akutnoj ili hroničnoj fazi uticati, za sada još uvek nedovoljno razjašnjenim mehanizmima, na pojedine aspekte imunskog sistema narušavajući pravilnu funkciju imunske tolerancije [74, 78]. Razmatran je i uticaj SARS-CoV-2 (engl. *severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2*) virusa, kao i uticaj vakcinacije protiv COVID -19 infekcije na pojavu NMOSB, ali njihov etiološki značaj nije u potpunosti utvrđen i uglavnom se povezuje sa mogućim pokretanjem autoimunskih procesa koji mogu potencijalno dovesti do razvoja NMOSB kod predisponiranih osoba [79, 80].

Uzimajući u obzir sve navedeno, može se reći da etiologija NMOSB još uvek nije do kraja razjašnjena, kao i da u osnovi ove bolesti svakako leže vrlo kompleksni i nedovoljno poznati

mehanizmi interakcije genetičkih činilaca sa jedne strane, i faktora spoljne sredine sa druge strane, što je definisano osnovnim konceptom multifaktorskih oboljenja kod ljudi [22, 81].

### **1.2.5. Faktori rizika za nastanak neuromijelitis optika spektra bolesti**

Pored istraživanja vezanih za etiologiju NMOSB, učinjeni su naporu u pokušaju da se izdvoje i mogući faktori rizika, koji svakako nisu u potpunosti razjašnjeni kada je u pitanju pojava ove retke bolesti [82]. Uzimajući u obzir podatke populacionih epidemioloških studija, izveden je zaključak da osobe koje su pripadnici istočnoazijske i afričke populacije, kao i osobe ženskog pola, imaju veći rizik oboljevanja od NMOSB kada su u pitanju etničko poreklo i pol kao nezavisni faktori [22, 35, 41, 82]. Takođe, smatra se da osobe koje boluju od pojedinih autoimunskih bolesti kao što su na primer: autoimunski tireoiditis, sistemski lupus eritematosus (SLE) ili sindrom Sjogren dele određene patogenetske mehanizme i osnovu potencijalno povećanog rizika za razvoj NMOSB [83].

Sa druge strane, ispitivani su i pojedini faktori spoljne sredine među kojima su izdvojeni: manjak unosa gvožđa (Fe), vitamina C i vitamina B12 putem ishrane tokom adolescencije, kao i nedostatak fizičke aktivnosti i manja ekspozicija sunčevoj svetlosti takođe tokom adolescencije, za koje je zaključeno da predstavljaju faktore rizika za razvoj NMOSB [84]. U tom smislu, posebna pažnja posvećena je i ispitivanju uticaja pušenja cigareta (uključujući i pasivnu izloženost dimu cigareta) i zloupotrebe alkohola za razvoj NMOSB, kada je sugerisano da oni predstavljaju faktore rizika za pojavu ove bolesti [84, 85], mada postoje i studije koje nisu sa sigurnošću pokazale povezanost pušenja cigareta i pojave NMOSB, kao što je to slučaj sa rizikom za razvoj MS [86, 87]. Teški psihički i emocionalni stresovi, kao što su smrt bliskog člana porodice, gubitak posla i druge finansijske poteškoće, kao i postojanje depresije, takođe su naglašeni kao potencijalni faktori rizika za nastanak NMOSB [88].

Interesantno je napomenuti da su pretpostavljeni i određeni protektivni faktori kao što su dojenje i izloženost vršnjačkoj grupi u najranijem uzrastu, odnosno ponašanje koje potencira prokuženost ubikvitarnim mikroorganizmima u ranom detinjstvu, smanjuju rizik od pojave NMOSB [86].

### **1.3. Genetička osnova neuromijelitis optika spektra bolesti**

Kao što je prethodno pomenuto, NMOSB po svemu sudeći, predstavlja multifaktorsko oboljenje sa kompleksnom naslednom osnovom i nedovoljno razjašnjenim mehanizmima koji se odnose na genetičku arhitekturu kod obolelih, kao i na uticaj međusobne interakcije pojedinih genetičkih činilaca na pojavu kako sporadičnih tako i familijarnih formi NMOSB [22, 81, 89, 90]. Prema podacima sprovedenih epidemioloških studija, može se zaključiti da NMOSB u najvećem broju slučajeva predstavlja sporadičnu bolest [22, 35, 41]. Tako, na primer, postoji procena da je sporadična pojava ove bolesti prisutna kod 97 % obolelih, dok je pojava NMOSB kod članova unutar iste porodice zabaležena svega u oko 3 % slučajeva [91].

#### **1.3.1. Genetička osnova sporadičnih formi neuromijelitis optika spektra bolesti**

Analiza nasledne osnove NMOSB ogleda se, sa jedne strane, u pokušajima utvrđivanja genetičkih činilaca i njihovog udela u etiopatogenezi i razvoju NMOSB, dok sa druge strane, postoje naporu da se razumeju nasledni faktori podložnosti odnosno genetički markeri predispozicije za pojavu ove bolesti kod ljudi [89, 92]. U tom smislu važno je napomenuti da su primenjivani različiti metodološki pristupi istraživanja nasledne osnove NMOSB [89].

### 1.3.1.1. Region glavnog kompleksa histokompatibilnosti

Istraživanja genetičke osnove NMOSB ukazala su na značaj glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) koji se kod ljudi još naziva i kompleks humanog leukocitnog antigena (engl. *Human Leukocyte Antigen*, HLA) kada je u pitanju ova imunski posredovana bolest CNS [93, 94]. Naime, MHC region obuhvata sekvencu dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) u dužini od približno 4 megabaze (Mb), koja predstavlja lokus specifičan po izuzetno velikoj gustini gena, kao i vrlo kompleksnom aranžmanu gena na poziciji 6p21.3 u humanom genomu [95]. U okviru MHC regiona definisano je 283 lokusa od kojih je identifikovano 144 strukturnih gena raspoređenih u vidu klastera [96]. Smatra se da je MHC jedan od najkompleksnijih regiona u humanom genomu, jer se pored velike gustine gena, karakteriše izrazito visokim nivoom polimorfizama i strukturnih varijacija, zatim duplikacijama i ponavljajućim sekvencama, pseudogenima, retrotranspozonskim i transpozonskim elementima, uz postojanje haplotipova dugog dometa [96-98]. Sa stanovišta genetičke arhitekture, MHC region na kratkom kraku hromozoma 6, idući od telomere ka centromeri podeljen je u pet segmenata: proširena klasa I, klasa I, klasa III, klasa II i proširena klasa II [98]. Proširena klasa I obuhvata subsegment od gena za subjedinicu B receptora gamaaminobuterne kiseline (*GABBR1*) do gena za protein cinkovih prstiju 57 (*ZFP57*), zatim, klasa I obuhvata predeo od HLA-F do gena sa peptidima MHC I povezane sekvence B (*MICB*), dok je klasa III smeštena u središnjem delu MHC lokusa i obuhvata subsegment od pseudogena 9 peptidilprolil izomeraze A (*PPIAP9*) do gena za protein 2 koji je sličan butirofilinu (*BTNL2*) [98]. Potom, idući ka centromeri, klasa II zauzima subsegment od HLA-DRA do HLA-DPA3 i na kraju, proširena klasa II obuhvata predeo od gena za kolagen tip XI-alfa 2 (*COL11A2*) do gena za član C1 familije kinezina (*KIFCI*) [98]. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je čitav MHC lokus ograničen genom *GABBR1* na telomernom kraju i genom *KIFCI* na poziciji centromere [96]. Tako je, pored 144 protein kodirajućih gena, identifikovano i 53 lokusa za ne-kodirajuće ribonukleinske kiseline (RNK), pet lokusa koji kodiraju za male RNK nukleolusa (snoRNK), kao i 81 pseudogen [96]. Klasa MHC I podeljena je u tri strukturna bloka: alfa, beta i kapa blok, dok klasa MHC II obuhvata strukturne blokove delta i epsilon [96, 99]. Kompleksnost MHC regiona ogleda se i u njegovom funkcionalnom aspektu, posebno u kontekstu pomenute strukturne organizacije [90, 96, 98, 99]. Pokazano je da većina gena HLA regiona kodira za regulatorne molekule vezane za funkciju imunskog sistema, što se pre svega, odnosi na ekspresiju različitih molekula na površini ćelija igrajući pri tome važnu ulogu u prezentaciji i distinkciji sopstvenih struktura od stranih antigena imunski kompetentnim ćelijama [96, 100, 101]. Peptidi kodirani genima koji pripadaju MHC klasi I ekspimiraju se na površini svih ćelija sa jedrom noseći sopstvene antigene koje prepoznaju citotoksične CD8+ T ćelije u procesu imunske tolerancije, dok se produkti gena MHC klase II ekspimiraju na površini posebnih antigen prezentujućih ćelija (APC) kao što su dendritske ćelije, makrofagi i B limfociti koje obrađuju i prezentuju strane antigene CD4+ T ćelijama u procesu njihove koordinacije i regulacije efektorskih mehanizama imunskog sistema [101]. Sa druge strane, produkti gena MHC klase III nisu uključeni u proces prezentacije sopstvenih ili stranih peptida imunski kompetentnim ćelijama već je pokazano da kodiraju za subjedinice sistema komplementa, prostaglandine, faktore nekroze tumora (TNF), dok se funkcija ostalih genskih produkata ovog segmenta vezuje i za različite regulatorne uloge imunskog sistema kao što su: diferencijacija T ćelija, maturacija leukocita i procesi inflamacije [102, 103]. S obzirom na to da se MHC region sastoji od velikog broja gusto raspoređenih i blisko vezanih gena i genskih klastera, te da je izuzetno važan za kompleksnu regulaciju i brojne funkcije imunskog sistema, on predstavlja imunogenetički centar u humanom genomu čija se aktivnost i dinamika povezuju i sa jako velikim brojem oboljenja od kojih su u prvom redu autoimunske bolesti, zatim, reakcije odbacivanja transplantata, infektivna stanja i neoplastični procesi [98, 104-106]. Imunogenetičke studije su

pokazale povezanost određenih varijanti MHC lokusa sa razvojem neuroloških i psihijatrijskih bolesti kao što su: Parkinsonova bolest (PB), Alchajmerova demencija, amiotrofična lateralna skleroza (ALS), shizofrenija, mijastenija gravis (MG), autoimunski encefalitis, MS kao i NMOSB [81, 107].

Kada je u pitanju NMOSB izdvojene su pojedine varijante HLA gena koje se smatraju značajnim za razvoj ove bolesti u određenim populacijama, odnosno u okviru različite etničke pripadnosti [89, 94]. Tako je, na primer, u populaciji stanovnika Francuske kavkaskog porekla pokazano da su oboleli od NMOSB češće nosioci HLA-DRB1\*01 i HLA-DRB1\*03 alela kada je u pitanju HLA klasa II gena, dok nije uočena asocijacija sa lokusima HLA klase I u NMOSB [108]. U španskoj populaciji HLA-DRB1\*03 alel je takođe bio učestaliji kod obolelih od NMOSB u odnosu na osobe sa MS, kao i na zdrave kontrole [109]. U Danskoj sa većinskim stanovništvom kavkaskog porekla, HLA-DQB1\*0402 alel bio je značajno učestaliji kod obolelih od NMOSB, dok povezanost sa alelima HLA klase I nije određivana u ovoj studiji [110]. Među obolelima od NMOSB u Švajcarskoj i Austriji HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*03 i HLA-DQB1\*02 aleli bili su učestaliji u odnosu na zdrave osobe [111]. Takođe, u Holandiji je pokazano da su HLA-DRB1\*03 i aleli HLA klase I kao što su: HLA-A\*01 i HLA-B\*08 povezani sa pojavom NMOSB u odnosu na zdrave osobe u obuhvaćenoj kavkaskoj populaciji [112].

Takođe, kada je u pitanju srpska populacija, među obolelim osobama od NMOSB najfrekventniji haplotipovi bili su: HLA-A\*01, B\*08, DRB1\*03 i HLA-A\*01, B\*08, C\*07, DRB1\*03, DQB1\*02 [113].

Sa druge strane, postoje studije koje su se bavile HLA genotipizacijom obolelih od NMOSB u azijskoj populaciji i koje su pokazale da su, na primer u Japanu, kod obolelih bili najzastupljeniji HLA-DRB1\*16:02 i HLA-DPB1\*05:01 aleli [114], potom je identifikovan i HLA-DQA1\*05:03 alel koji, do tada, nije bio povezivan sa NMOSB u japanskoj populaciji [115]. Takođe, u japanskoj populaciji pacijenata izdvojeni su HLA-DRB1\*08:01 i HLA-DRB1\*08:02 aleli povezani sa NMOSB ali je izdvojen i jedan protektivni HLA-DRB1\*09:01 alel [92, 116]. Za kinesku populaciju podaci govore da su HLA-DPB1\*05:01 i HLA-DRB1\*16:02 aleli takođe dovedeni u vezu sa podložnošću za razvoj NMOSB, dok je HLA-DRB1\*09:01 alel okarakterisan kao protektivan za ovu bolest [117]. I u Indiji je među obolelima od NMOSB pokazano da su HLA-DRB1\*03 i HLA-DRB1\*10 aleli povezani sa pojavom NMOSB [118].

Među populacijom u zemljama Latinske Amerike kod obolelih od NMOSB najzastupljeniji je HLA-DRB1\*03 alel [93, 119, 120].

Meta analizom rezultata trinaest studija koje su se bavile asocijacijom HLA-DRB1\*03:01 alela sa NMOSB ukazano je na to da pacijenti koji boluju od NMOSB imaju 2.46 puta veću verovatnoću da u svom genomu sadrže ovaj alel u odnosu na kontrolnu grupu [94].

#### **1.3.1.2. Gen za akvaporin-4**

Kao što je već pomenuto, autoantitela prema AQP4 u CNS imaju važnu ulogu u etiopatogenezi NMOSB kao imunski posredovane bolesti i predstavljaju dijagnostički molekularni biomarker ove bolesti [20, 21]. Humani gen koji kodira za AQP4 vodeni kanal identifikovan je i opisan sredinom devedesetih godina XX veka, kada je i njegovim mapiranjem lokalizacije u genomu utvrđeno da se nalazi na poziciji 18q11.2-q12.1 [121, 122]. Strukturnom karakterizacijom pokazano je da se humani gen za AQP4 sastoji od ukupno 5 kodirajućih regiona, odnosno egzona (engl. *exone*) koji se smatraju konzerviranim sekvencama između kojih se nalaze četiri nekodirajuća regiona, odnosno introna, kao i da je prisutan u jednoj kopiji u haploidnom genomu čoveka [122]. Ukupna dužina kodirajuće sekvence humanog gena za AQP4 iznosi 1081 baznih parova (bp), odnosno veličina egzona 0 iznosi 250 bp, egzon 1 ima dužinu od 363 bp, egzon 2 ima 147 bp, egzon 3 se sastoji od 63 bp a dužina egzona 4 iznosi 258 bp dok je procenjeno da veličina umetnutih nekodirajućih sekvenci odnosno introna između egzona 0 i 1 iznosi 2.7 kilobaza (kb),

dužina sekvence između egzona 1 i 2 iznosi 0.8 kb, dužina introna između egzona 2 i 3 iznosi 278 bp, dok veličina intronske sekvence između egzona 3 i 4 iznosi 5.2 kb [122]. Kada je u pitanju ekspresija gena za AQP4 izolovane su dve forme komplementarne DNK (cDNK) u odnosu na dva mesta inicijacije transkripcije, okarakterisana kao M1 koja odgovara polipeptidu od 323 aminokiseline ukupne mase 31 kilodalton (kDa), i M23 koja odgovara drugom mestu inicijacije transkripcije, odnosno polipeptidu od 301 aminokiseline mase 34 kDa, predstavljajući dve funkcionalne subjedinice polipeptida odnosno, dva produkta ekspresije ovog gena [121-123]. Naime, zahvaljujući karakteristikama sekvence, pre svega, egzona 0 gen *AQP4* ispoljava specifičan vid transkripcionog diverziteta što ga izdvaja u odnosu na druge gene koji kodiraju za transmembranske vodene kanale - akvaporine [122]. Alternativnom transkripcijom i posttranskripcionom obradom primarnog prepisa humanog gena *AQP4* nastaju dve forme ovog transmembranskog proteina, vodenog kanala – akvaporina 4 označene kao M1 i M23, ali je nedavno pokazano da alternativnom translacijom mogu nastati još dve izoforme polipeptida označene kao M1x i M23x koje se karakterišu postojanjem C-terminalnog produžetka od 29 aminokiselina [124, 125].

### 1.3.1.3. Drugi geni van HLA lokusa i neuromijelitis optika spektar bolesti

Analiza genetičke osnove NMOSB ukazala je da, pored gena *AQP4*, postoji i određen broj drugih gena koji takođe ne pripadaju HLA regionu, a koji se mogu dovesti u vezu sa nastankom i razvojem NMOSB [126]. Tako na primer, opisano je da polimorfizmi u humanom genu koji kodira za interleukin-17 (*IL-17*) mogu biti povezani sa pojavom NMOSB pa je tako genotip TT rs763780 gena *IL-17* opisan kao značajan u kineskoj populaciji obolelih dovodeći do supstitucije aminokiseline histidin u arginin (His-u-Arg) u primarnoj strukturi polipeptidnog lanca IL-17, što može imati uticaja i na funkciju ovog signalnog molekula [127, 128]. Takođe, postoje studije koje su analizirale ekspresiju gena *OX40* čiji produkt CD134 molekul pripada porodici receptora za faktor nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF) i predstavlja marker aktivacije T limfocita u NMOSB, kada je pokazano da je ekspresija ovog gena smanjena u leukocitima periferne krvi kod obolelih od NMOSB u odnosu na zdravu kontrolnu grupu ali nije primećena značajna razlika kada je u pitanju nivo solubilnog molekula u krvi obolelih u odnosu na kontrolnu grupu [129, 130]. Novija studija koja se bavila procenom nivoa ekspresije gena *OX40* u serumu obolelih od MS i NMOSB, ukazala je na to da kod obolelih od MS postoje značajno povišene vrednosti solubilnog OX40 faktora u krvi u odnosu na zdravu kontrolnu grupu, kao i na pacijente obolele od NMOSB kod kojih ta korelacija nije uočena [131]. Sa druge strane, u studiji koja je obuhvatila animalne modele, ali i post mortem uzorke humanog tkiva mozga obolelih osoba, pokazano je da u aktivnim NMOSB lezijama postoji povećan broj aktiviranih CD4+ T ćelija, odnosno T limfocita sa povećanom ekspresijom OX40 markera ćelijske aktivacije [132]. Analiza gena za transkripcioni faktor II-I (*GTF2I*) na poziciji 7q11.23 obuhvatajući i *GTF2IRD1* ponavljajuće domene ovog lokusa čijom ekspresijom se obezbeđuje veliki broj multifunkcionalnih fosfoproteina koji su, između ostalog, važni za regulaciju T i B ćelijske aktivacije pokazala je da *GTF2IRD1-GTF2I* polimorfizmi kao što su T alel rs117026326 i CC genotip rs73366469 utiču na povećan rizik oboljevanja od NMOSB u kineskoj populaciji [133, 134]. U studiji u kojoj je vršeno sekvenciranje egzona 4 gena *CD33* (engl. *Cluster of Differentiation*, CD) u kohorti pacijenata obolelih od NMOSB opisana je mutacija u genu *CD33* čija ekspresija se smatra važnom za imunsku regulaciju i koja je bila prisutna kod oko 15% ispitanika, te je zaključeno da se radi o potencijalnom rizičnom lokusu za razvoj NMOSB [135]. Takođe, opisana je korelacija gena za estrogen receptor  $\alpha$  (*ER $\alpha$* ) koji se nalazi na poziciji 6q25.1, odnosno određenih polimorfizama ovog gena, kao što je XbaI sa povećanim rizikom za nastanak NMOSB posebno u osoba ženskog pola sa Xx genotipom [136].

#### 1.3.1.4. Studije genoma u neuromijelitis optika spektru bolesti

Kao što je poznato, prva automatizovana metoda kojom je omogućeno precizno određivanje primarne strukture molekula DNK, odnosno molekularna disekcija je sekvenciranje DNK metodom po Sanger-u iz 1977 godine koja se zasniva na analizi kraćih nukleotidnih sekvenci pa se, samim tim, i danas koristi za preciznu analizu pojedinačnih gena ili delova gena od posebnog interesa [137]. Međutim, konceptualno posmatrano, izuzetno važan doprinos razumevanju genetičke osnove mnogih bolesti u humanoj patologiji upravo su ostvarile tehnološki napredne metode za analizu naslednog materijala kao što je sekvenciranje nove generacije (engl. *Next Generation Of Sequencing*, NGS) koja sadrži različite metodološke pristupe omogućavajući sekvenciranje celog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS), sekvenciranje celog egzoma (engl. *Whole Exome Sequencing*, WES) kao i brojne strategije analize odabranih setova, odnosno panela gena, što je od posebne važnosti u kliničkoj genetici [138, 139]. U osnovi NGS metodologije druge generacije, koja je uvela revoluciju u biomedicinskim naukama, nalazi se postupak generisanja miliona kratkih DNK sekvenci, nakon čega se vrši njihovo masivno paralelno sekvenciranje a dobijeni podaci se obrađuju i analiziraju uz pomoć kompleksnih bioinformatičkih alata [140]. Savremeni tehnološki progres omogućio je dalje kreiranje treće i četvrte generacije sekvenciranja DNK što, u ovom momentu, predstavlja krajnju instancu u težnji da se uspostave što precizniji i moćniji načini analize nasledne osnove čoveka uz konstantno razvijanje novih bioinformatičkih pristupa u obradi tako velike količine dobijenih podataka a sve u cilju povećanja utilizacije ovih metoda u humanoj genetici, genomici i kliničkoj praksi uopšte [139, 141, 142].

Kada je u pitanju primena NGS metodologije u NMOSB, obavljani su rezultati meta analize WGS od ukupno 86 obolelih i 460 kontrolnih uzoraka čime je izdvojen genetički marker (rs28383224) koji je bio povezan sa NMOSB bez obzira na serostatus ovih pacijenata, kao i signal unutar HLA lokusa odnosno C4 alela kod seropozitivnih NMOSB pacijenata [143]. Takođe, jedna od prvih studija sa ciljem detektovanja potencijalnih retnih uzročnih varijanti primenom WES metodologije objavljena je 2015 godine i obuhvatala je malu kohortu obolelih od NMOSB u Finskoj, kada su detektovane određene retke varijante kod dva pacijenta u ukupno četiri gena (*C3ORF20*, *C5ORF47*, *PDZD2*, *ZNF606*) od kojih je posebno istaknuto da gen *PDZD2* kodira za protein koji igra ulogu u celularnoj signalizaciji [144]. Studija u kojoj je sproveden WES kod obolelih od NMOSB u azijskoj populaciji koja je obuhvatila kohortu od 228 NMOSB seropozitivnih pacijenata i 1400 kontrolnih ispitanika, izdvojila je HLA lokus odnosno, pokazala je postojanje udruženosti HLA-DQB1\*05:02 alela kao i HLA-DQB1\*05:02-DRB1\*15:01 haplotipa sa mogućom pojavom NMOSB [145]. Takođe, nedavno je objavljena studija u kojoj je, između ostalog, sprovedena WES analiza kod ukupno 40 obolelih osoba od NMOSB, kada je identifikovano 346 varijanti u ukupno 338 gena, od kojih su većinom bile heterozigotne *missense* varijante, a izvršena je i kategorizacija u tri grupe visoko međusobno povezanih gena sa mutacijama za koje se pokazalo da su od značaja za pojavu NMOSB, odnoseći se većinom na funkcije imunskog sistema kao što su: obrada antigena, razni signalni putevi kao i određene varijante u genu za kalijumove kanale [113].

Sa druge strane, studija asocijacije u čitavom genomu (engl. *Genome Wide Association Studies*, GWAS) sprovedena u Japanu obuhvatila je kohortu od 211 obolelih osoba od NMOSB kao i 1919 kontrolnih uzoraka i pokazala da postoji značajna udruženost SNP rs1964995 sa pojavom NMOSB, dok je varijanta rs1516512 bila udružena sa stepenom onesposobljenosti kod obolelih od NMOSB nezavisno od serostatusa ispitivanih pacijenata [92]. Sekundarna analiza GWAS studije koja je obuhvatila 132 pacijenta sa AQP4-IgG kao i 83 pacijenta sa seronegativnom formom NMOSB i 1244 kontrolnih uzoraka, izdvojila je postojanje pet gena za koje je ustanovljeno da predstavljaju rizične gene za pojavu NMOSB (*CFB*, *EHMT2*, *HLA-DQA1*, *MSH5*, *SLC44A4*) koji su udruženi sa funkcijom sistema komplementa, obradom antigena i regulacijom imunске funkcije [146].

### 1.3.1.5. Mitohondrijalni genom i neuromijelitis optika spektra bolesti

Mitohondrijalna DNK (mtDNK) predstavlja dvolančani cirkularni molekul veličine približno 16.6 kilobaza (kb), smešten u mitohondrijama, sa ukupno 37 gena za koje je karakteristično to da nemaju intronske sekvence i poseduju jedan regulatorni region [147, 148]. Od ukupnog broja mitohondrijskih gena, njih 13 predstavljaju strukturne gene koji kodiraju za polipeptide uključene, pre svega, u enzimske procese oksidativne fosforilacije igrajući ključnu ulogu u energetskom metabolizmu te je njihova funkcija, na primer, proučavana u patogenezi mnogih neuroloških bolesti [149, 150].

Uloga mitohondrijalnog genoma ispitivana je i u NMOSB. Pa tako, u revijskom radu objavljenom 2008 godine, pregledom prethodno dostupne literature i sekvenciranjem mtDNK od ukupno 32 osobe obbolele od NMOSB, nisu detektovani polimorfizmi koji bi se jasno mogli dovesti u vezu sa pojavom ove bolesti [151]. Međutim, treba istaći da postoje pojedinačni prikazi slučajeva NMOSB povezanih sa mutacijama u mitohondrijalnom genomu pa je tako jedan od prvih objavljen 2004 godine, kada je kod pacijentkinje detektovana primarna homoplazmična mutacija na poziciji 3460 mtDNK, dok je ista mutacija u heteroplazmičnom obliku potvrđena kod majke, babe po majci i tri ujaka koji su bili bez neuroloških tegoba [152]. Takođe, kod druge pacijentkinje sa NMOSB opisane su dve sekundarne homoplazmične mutacije na pozicijama 3460 i 4917 u mtDNK čiji značaj nije do kraja razjašnjen [153].

Interesantno je pomenuti da je u cerebrosposinalnoj tečnosti odnosno likvoru (CSF) obolelih od NMOSB utvrđeno postojanje povišenih vrednosti ekstracelularne mtDNK verovatno usled oštećenja astrocita posredovanog AQP4, kao i da prisustvo oslobođene mtDNK pokreće specifične kaskade imunskog odgovora i aktivacije određenih inflamatornih ćelija odnosno monocita [154, 155].

### 1.3.2. Genetička osnova familijarne forme neuromijelitis optika spektra bolesti

NMOSB suštinski predstavlja multifaktorski uslovljeno oboljenje koje se, pre svega, ispoljava sporadično u opštoj populaciji, mada je opisana pojava NMOSB kod članova unutar iste porodice, što je od izuzetnog značaja za pokušaj razumevanja genetičkih činilaca koji bi se mogli nalaziti u njegovoj osnovi [90, 91]. Familijarna forma NMOSB čini 0.8% do 6.3% od ukupnog broja slučajeva NMOSB i predstavlja retku manifestaciju ove bolesti [63, 90, 91]. Multicentrična studija kojom je obuhvaćen veliki broj ispitanika, pokazala je da se familijarna forma NMOSB sreće u približno 3% slučajeva [91]. Malobrojne studije koje su se bavile analizom genetičke osnove familijarne forme NMOSB ukazale su na značaj određenih alelnih varijanti unutar HLA lokusa od kojih se posebno ističu HLA-DRB1\*03 i HLA-A\*01 aleli, koji su inače opisani i u sporadičnim formama bolesti [63, 90, 91, 94, 156]. Istraživanjem kojim je obuhvaćeno 40 porodica sa ukupno 83 slučajeva familijarne forme NMOSB pokazano je da se u najvećem broju slučajeva radilo o porodicama azijskog, a potom kavkaskog porekla, da su osobe ženskog pola bile zastupljenije među obolelim članovima odnosno da su činile 86.7% obolelih, da su u 52.5% bili aficirani članovi prvog stepena srodstva braća-sestre a nešto ređe roditelji-deca sa oko 32.5%, kao i da su u 92.5% slučajeva bila aficirana dva člana u porodici, dok je u 7.5% bilo tri aficirana člana po porodici uz činjenicu da tip nasleđivanja u NMOSB nije definisan, što ukazuje na postojanje kompleksnih oblika nasleđivanja kada je u pitanju ova bolest [90]. Takođe, pokazano je da se NMOSB javlja ranije kod aficiranog potomstva u odnosu na vreme pojave bolesti kod njihovih roditelja kada su u pitanju familijarne forme NMOSB, što predstavlja fenomen anticipacije i još jednom ističe značajan upliv genetičkih faktora u ispoljavanju bolesti dok je, sa druge strane, pokazano da nema bitnih razlika u kliničkoj prezentaciji familijarnih u odnosu na sporadične forme NMOSB [63, 90, 91, 156].

#### 1.4. Struktura i funkcija akvaporina 4 u centralnom nervnom sistemu

Akvaporini predstavljaju familiju ubikvitarnih transmembranskih proteina čija funkcija se ogleda u transportu malih nepolarnih molekula i pojedinih jona kroz ćelijske membrane sa dominantnom ulogom kanala koji regulišu transport molekula vode kroz ćelijske membrane po čemu su i dobili naziv [157-162]. Do sada je opisano i definisano postojanje ukupno 13 strukturalno i funkcionalno uglavnom sličnih humanih proteina podeljenih u tri subfamilije: klasični akvaporini, akvagliceroporini i superakvaporini, čija distribucija se razlikuje u odnosu na različita tkiva u organizmu [163, 164].

Generalno, akvaporini su monomeri sastavljeni od šest transmembranskih petlji (1-6) nazvanih alfa petlje ( $\alpha$ -heliksi) kao i dve polupetlje (B, E) od ukupno pet spojnice (A-E) sa dva konstantna motiva sastavljena od tri aminokiseline (aspargin, prolin i alanin) koji su fiksirani u lipidnom dvosloju ćelijske membrane, dok šest transmembranskih alfa petlji postavljeno je tako da okružuje, odnosno ograničava, jednu vodenu poru sa N i C terminalnim domenima pozicioniranim na citosolnoj strani [162, 163, 165]. Polupetlje, odnosno spojnice B i E, sa po jednim konstantnim aminokiselinskim (aspargin-prolin-alanin) motivom neposredno organizuju unutrašnji kanal transmembranske vodene pore koji se karakteriše hidrofobnim aminokiselinskim reziduumima, kao i postojanjem konstrikcije lokalizovane sa ekstracelularne strane ovog kanala koju čine aromatične rezidue i rezidue arginina, što je od posebne važnosti jer one svojim biofizičkim karakteristikama sprečavaju prolaz protona [163]. Dakle, svaki monomer sadrži jednu vodenu poru, i pokazano je da četiri ovakva AQP monomera međusobno formiraju tetramerne, odnosno homotetramerne proteinske komplekse na ćelijskoj membrani [162, 163]. Pomenuta molekularna struktura akvaporina, sa funkcionalnog aspekta, obezbeđuje da kroz tako uzak vodeni kanal suštinski mogu proći pojedinačni molekuli vode jedan za drugim, po specifičnom obrascu, zahvaljujući elektrostatičkim karakteristikama aminokiselinskih rezidua unutar same vodene pore [163, 166].

Međutim, važno je istaći da AQP4, pored ove opšte strukture i organizacije monomera, pokazuje i određene specifične karakteristike koje odgovaraju kompleksnim molekularnim aranžmanima višeg reda, u smislu da je organizacija AQP4 proteina u vidu formiranja heterotetramera koji nastaju kao posledica translacije različitih subjedinica AQP4 proteina [122, 162, 167-169]. Dakle, analizom ekspresije gena *AQP4* koji je inicijalno nazvan gen za humani vodeni kanal neosetljiv na živu (engl. *Human Mercurial Insensitive Water Channel*, hMIWC) pokazano je da nakon primarne obrade transkripta nastaje više različitih polipeptidnih produkata, ali da su glavne dve izoforme: M1 izoforma dužine 323 aminokiseline, i M23 izoforma koju gradi 301 aminokiselina [121, 122]. Sa strukturalnog aspekta AQP4 takođe, važno je istaći, da su dalja istraživanja devedesetih godina XX veka ukazala na to da je morfološki ekvivalent AQP4 proteina predstavljen ortogonalnim nizovima intramembranskih čestica (engl. *Orthogonal Arrays of Intramembranous Particles*, OAPs) čije su subjedinice upravo tetrameri AQP4 proteina, kao i da se svaki OAPs sastoji od vrlo varijabilnog broja AQP4 tetramera na ćelijskoj membrani [162, 170].

Humani AQP4 vodeni kanal pripada subfamiliji klasičnih akvaporina i predominantno je zastupljen u CNS, a u manjoj meri i u drugim tkivima kao što su, na primer, renalni tubuli, gastrointestinalni epitel, jetra i pluća [162, 171-175]. Kada je u pitanju CNS, pokazano je da glijalne ćelije, u prvom redu astrociti, imaju najviši stepen ekspresije AQP4 takođe organizovanih u vidu OAPs i to najviše u predelu ćelijske membrane stopalastih produžetaka astrocita koja dolazi u blizak kontakt sa bazalnom membranom (BM) endotelnih ćelija kapilara, u okviru vrlo važne histološke strukture pod nazivom krvno – moždana barijera (KMB), u čijoj morfološkoj osnovi je gliovaskularni kompleks i koja funkcionalno predstavlja semipermeabilnu, visoko selektivnu i aktivnu biološku membranu obezbeđujući homeostazu unutar CNS [162, 176-178]. Svoju bazičnu ulogu u regulaciji protoka molekula vode kroz ćelijske membrane AQP4 kanali, između ostalog, ostvaruju i kao vrlo važna funkcionalna jedinica glimfatičkog sistema gde presudno učestvuju u

procesima vezanim za protok intersticijalne tečnosti preko astrocita u perivaskularnim prostorima unutar tkiva mozga čiji tok je polarizovan od periarterijskog ka perivenskom prostoru čime se obezbeđuje adekvatna drenaža tečnosti ali i klirens svih solubilnih produkata metabolizma nervnog tkiva [179-181]. Kompleksnost AQP4 kanala ogleda se i u postojanju složenih mehanizama koji su uključeni kako u kratkoročne tako i dugoročne oblike regulacije aktivnosti i ekspresije AQP4 što se direktno reperkutuje na stepen njihove funkcije u različitim fiziološkim ali i patološkim stanjima [164, 181-183].

Dakle, važno je istaći da pored brojnih i vrlo značajnih fizioloških uloga AQP4 proteina vezanih za njihovu specifičnu ekspresiju na astrocitima u CNS, veliki značaj AQP4 kanala ogleda se u njihovoj ulozi u raznim patološkim stanjima u CNS i neurološkim bolestima kao što su: NMOSB, cerebrovaskularna oboljenja, edem mozga, hidrocefalus, migrena, Parkinsonova bolest i demencije [20, 181, 184-189].

### **1.5. Patogeneza i patofiziologija neuromijelitis optika spektra bolesti**

Mehanizmi koji se nalaze u osnovi patogeneze NMOSB nisu do kraja razjašnjeni, dok dosadašnja saznanja ukazuju na to da je NMOSB imunski posredovana bolest CNS u kojoj su autoantitela usmerena prema AQP4 antigenima, te se smatra da NMOSB suštinski predstavlja kanalopatiju udruženu sa oštećenjem astrocita u kojoj su procesi demijelinizacije i neurodegeneracije okarakterisani kao sekundarni fenomeni [20, 190-192].

#### **1.5.1. Antitela prema akvaporin 4 antigenima**

Glavni imunopatogenetski supstrat NMOSB su autoantitela usmerena prema specifičnom autoantigenu odnosno AQP4 kanalima na ćelijskoj membrani astrocita [20, 192]. Antitela na AQP4 predstavljaju IgG klasu odnosno IgG1 izotip antitela koju produkuju dominantno interleukinom 6 (IL-6) aktivirani B limfociti, odnosno plazmablasti, u perifernom limfnom tkivu i cirkulaciji čime se ističe značaj poremećene imunske tolerancije i humornog imenskog odgovora u NMOSB [190, 193-196]. Takođe, istraživanja su ukazala na to da se produkcija AQP4-IgG dešava ekstratekalno, tim pre što su cirkulišuća AQP4-IgG prisutna u perifernoj krvi obolelih od NMOSB u mnogo većem procentu u odnosu na njihovo prisustvo u CST, kao i da je nivo serumskog IL-6 veći u odnosu na nivo IL-6 u CST [197-200].

#### **1.5.2. Imunopatogeneza neuromijelitis optika spektra bolesti**

Nakon produkcije od strane plazma ćelija, odnosno aktiviranih B limfocita, cirkulišuća AQP4-IgG u sledećem koraku prolaze KMB i dospevaju u CNS što se smatra jednim od ključnih inicijalnih događaja u patogenezi NMOSB čiji mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni [79, 190, 201, 202]. Naime, permeabilnost KMB u NMOSB može biti narušena na više različitih načina, pa je tako pokazano da IL-6 svojim direktnim dejstvom na endotelne ćelije kao komponente KMB, dovodi do povećane permeabilnosti ove strukture što omogućava prodor AQP4-IgG u intratekalni prostor, dok sa druge strane, postoje podaci i da određene sistemske infekcije mogu izazvati povećanu tranzientnu permeabilnost KMB, što bi stvorilo mogućnost za ulazak AQP4-IgG u CNS [76, 190, 203, 204]. Takođe, smatra se da cirkulišuća AQP4-IgG mogu dospeti unutar CNS na mestima gde je KMB, odnosno njena normalna morfologija specifična što se, pre svega, odnosi na postojanje fenestrovanih kapilara i drugih karakteristika koje utiču na njenu intaktnost, ali i na mestima gde KMB može biti nedovoljno razvijena kao što je prelaminarni deo optičkog nerva i korenovi spinalnih nerava [205-207]. Isto tako, ne bi trebalo zanemariti potencijalni direktni uticaj

cirkulišućih AQP4-IgG na KMB u inicijaciji patogenetskih mehanizama u NMOSB [203, 208, 209].

Specifičnost AQP4-IgG ogleda se u njihovom prepoznavanju epitopa AQP4 proteina, što rezultira vezivanjem ovih antitela za AQP4 na spoljašnjoj membrani astrocita, posebno stopalastih produžetaka ovih glijalnih ćelija čime otpočinje čitav niz patogenetskih događaja na celularnom i molekularnom nivou [20, 190, 192]. AQP4-IgG prepoznaju domene obe izoforme, odnosno M1 i M23 izoforme AQP4, mada je pokazano da imaju mnogo veći afinitet prema M23 izoformi AQP4, pre svega zbog njene jedinstvene molekularne organizacije u vidu OAPs što nije slučaj kada je u pitanju organizacija izoforme M1 [210]. Naime, kao rezultat vezivanja AQP4-IgG za epitope AQP4 kanala dolazi do ispoljavanja različitih manifestacija kao što su redukcija ekspresije AQP4 proteina i internalizacije posebno M1 izoformi, potom disfunkcije transporta molekula vode kroz ćelijsku membranu astrocita, kao i pojave vrlo važnih imunopatogenetskih reakcija u vidu komplemenata zavisne citotoksičnosti i antitelima indukovane ćelijske citotoksičnosti [211-215].

Jedna od glavnih imunoloških karakteristika u patogenezi NMOSB svakako je aktivacija sistema komplemenata klasičnim putem, koja je inicirana AQP4-IgG/AQP4 antigen reakcijom i posledičnim vezivanjem komponente komplemenata 1q (C1q) za AQP4-IgG što dalje vodi do vrlo kompleksnih kaskadnih reakcija aktivacije brojnih komponenti komplemenata, čiji krajnji rezultat je oštećenje ćelijske membrane astrocita formiranjem kompleksa membranskog napada (engl. *Membrane Attack Complex*, MAC), odnosno kompleksa terminalnog komplemenata koji oštećuje plazma membranu astrocita dovodeći do lize ćelije [212, 213, 216-218]. Pokazano je da C1q ima poseban afinitet prema AQP4-IgG koja se nalaze u klasterima nastalim njihovim vezivanjem za AQP4 u okviru OAPs struktura, što još jednom ističe značaj ovakve molekularne organizacije AQP4 kanala na astrocitima u patogenezi NMOSB [219]. Takođe, u okviru kaskadne reakcije aktiviranog sistema komplemenata dolazi i do aktivacije komponenti komplemenata 3a i 5a (C3a i C5a) koje, sa svoje strane, dovode do povećane permeabilnosti KMB i hemotakse imunski kompetentnih ćelija u CNS [209, 213].

Značaj antitelima indukovane ćelijske citotoksičnosti ogleda se u činjenici da ćelije primarnog imunskog odgovora kao što su ćelije "prirodne ubice" (engl. *Natural Killer Cells*, NK), nakon što iz periferne cirkulacije hemotaksom prođu hematoencefalnu barijeru i dospeju do CNS, imaju sposobnost da prepoznaju i vežu se za određene domene AQP4-IgG/AQP4 kompleksa koji se nalazi na spoljašnjoj membrani astrocita što rezultuje oslobađanjem perforirajućih citotoksičnih faktora od strane NK ćelija koji dovode do oštećenja i smrti astrocita [209, 211, 220]. I druge imunski kompetentne ćelije kao što su: neutrofil, eozinofil, bazofil i mastociti takođe privučene hemotaksičnim faktorima u CNS, mogu reagovati sa domenima AQP4-IgG vezanih za AQP4 kanale kada svoj citotoksični efekat ispoljavaju degranulacijom i oslobađanjem brojnih medijatora zapaljenja, enzima i slobodnih kiseoničnih radikala, što rezultira oštećenjem i smrću astrocita [209, 211, 220-222].

Određene studije ističu moguću značaj mikroglije, odnosno interakcije između astrocita i mikroglijalnih ćelija koje, između ostalog, ekspimiraju i C3a receptore (C3aR) na svojoj površini i bivaju aktivirane C3a frakcijom komplemenata C3 koji je sintetisan i oslobođen od strane astrocita nakon njihove reaktivnosti indukovane vezivanjem AQP4-IgG za AQP4 antigen, čime otpočinju brojni procesi koji su verovatno vezani za dodatne imunopatogenetske mehanizme u razvoju i održavanju neuroinflamacije u NMOSB [223-226].

Takođe, pokazano je da, pored toga što imaju ključnu ulogu u produkciji AQP4-IgG, određeni subsetovi aktiviranih B limfocita mogu da luče i brojne citokine doprinoseći razvoju patogeneze NMOSB, što predstavlja dodatnu proinflamatornu aktivnost ovih ćelija, mada pojedini subsetovi B limfocita mogu ispoljavati i antiinflamatorne efekte modulišući tako imunopatogenetske mehanizme u NMOSB [193, 214, 227].

### 1.5.3. Uloga T limfocita u patogenezi neuromijelitis optika spektra bolesti

U okviru patogeneze NMOSB razmatrana je i uloga T limfocita za koje je pokazano da verovatno učestvuju u bidirekcionoj kostimulaciji sa B limfocitima, tim pre što postoje studije koje ukazuju da se T limfociti, u okolnostima poremećene imunske tolerancije, nakon antigen specifične aktivacije, mogu diferencirati u pravcu određenih subtipova kakve su T "pomoćne" ćelije (engl. *T helper*, Th) utičući citokinima na aktivaciju B limfocita, što rezultira produkcijom specifičnih autoantitela, dok sa druge strane, B limfociti mogu imati antigen prezentujuće i druge stimulatívne uloge, čime postoji mogućnost indukcije T ćelijskog imenskog odgovora, što se posebno odnosi na Th17 profil ćelija [228-232]. Takođe, određene studije sugerišu da T limfociti zajedno sa AQP4-IgG bitno doprinose nastanku inflamatornog odgovora i lezija u CNS obolelih od NMOSB, odnosno da je prisustvo ovih ćelija verovatno neophodno da bi AQP4-IgG ostvarila svoj patogeni potencijal u nervnom parenhimu, kao i da su T limfociti direktno ili indirektno uključeni u mnoge aspekte patogeneze NMOSB, mada njihova konačna uloga nije do kraja razjašnjena [214, 229, 232, 233].

Imajući sve navedeno u vidu, važno je istaći da komplement zavisni mehanizmi citotoksičnosti, kao i antitelima indukovana ćelijska citotoksičnost, predstavljaju dominantne imunopatogenetske mehanizme u NMOSB, koji zajedno sa drugim celularnim i molekularnim akterima primarno dovode do oštećenja i smrti astrocita, dok direktnim i indirektnim mehanizmima oštećuju i druge okolne ćelije u nervnom parenhimu, kao što su oligodendrociti i neuroni, što rezultira razvojem demijelinizacije, neurodegeneracije i smrti nervnih ćelija u zoni pojave i održavanja ekstenzivne neuroinflamacije, kako u beloj tako i sivoj masi CNS, čime su podržani patofiziološki efekti kliničkog ispoljavanja simptoma i znakova u NMOSB [190, 193, 214, 221, 229, 234-236].

### 1.5.4. Patogeneza seronegativne forme neuromijelitis optika spektra bolesti

Svakako treba napomenuti da još uvek nisu do kraja razjašnjeni svi aspekti patogeneze i patofiziologije NMOSB, što se posebno odnosi na seronegativnu formu bolesti kojoj pripada približno oko 20% obolelih od NSMOB kojima je dijagnoza postavljena prema dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine [2, 190, 214, 237]. Upravo, da je potencijalno objašnjenje za razvoj seronegativne forme NMOSB, mogućnost da postoji neko drugo autoantitelo je činjenica da od ovog ukupnog broja seronegativnih slučajeva obolelih čija klinička slika ukazuje na NMOSB, njih oko 30% ima serumska autoantitela klase IgG prema mijelin oligodendrocitnom glikoproteinu (MOG At) [237-239]. MOG predstavlja glikoprotein čiji je polipeptidni lanac sastavljen od 218 aminokiselina ukupne molekulske mase 26-28 kDa koji je eksprimiran na površini oligodendrocita sa još uvek nedovoljno definisanim svim funkcijama, mada je verovatno da ima ulogu i adhezionog molekula u mijelinskom omotaču, kao i da je prisutan unutar CNS dok nije detektovan u perifernom nervnom sistemu (PNS), čime je istaknuta i njegova imunodominantna, odnosno targetna uloga u patogenetskom procesu demijelinizacije unutar CNS [238, 240-242]. Patogenetski mehanizmi koji dovode do MOG At indukovane demijelinizacije nisu do kraja razjašnjeni i prevashodno su ispitivani na animalnim modelima, kao i na manjem broju bioptata i patoloških uzoraka humanog porekla, kada je sugerisano da se verovatno razlikuju u odnosu na patogenezu AQP4 seropozitivnog NMOSB, tim pre što je pokazano da se u MOG At indukovanoj demijelinizaciji generalno radi o oligodendrocitopatiji bez izražene astrocitopatije, u čijoj imunopatogenetskoj osnovi se nalazi međusobni odnos antigen specifičnih reaktivnih Th ćelija i MOG At odnosno, aktiviranih B limfocita [239, 243-248].

Kada je u pitanju dvostruko seronegativna forma (DN-NMOSB) pretpostavljeni mehanizmi koji bi se mogli nalaziti u patogenetskoj osnovi odnose se na mogućnost postojanja još uvek nedefinisano autoantitela usmerenog prema specifičnom targetu, zatim vrsta i način primene

laboratorijskih testova različitog stepena senzitivnosti i specifičnosti u kliničkoj praksi što može voditi lažno negativnim rezultatima AQP4-IgG i MOG At nalaza, mada postoje i studije koje navode da se procesi imunopatogeneze dvostruko seronagivne forme NMOSB koji nisu u potpunosti razjašnjeni, prezentuju relativnom očuvanošću astrocita kao i različitim profilnim karakteristikama citokina u odnosu na AQP4-IgG seropozitivnu formu NMOSB i MOG At pozitivnih formi bolesti, čime se sugerije moguće postojanje različitog imunopatogenetskog mehanizma u njihovoj osnovi [190, 199, 249-253].

### **1.6. Patologija neuromijelitis optika spektra bolesti**

Patološka analiza sprovedena na autopsijskim nalazima obolelih od NMOSB ukazala je na postojanje ekstenzivne demijelinizacije, nekroze kako bele tako i sive mase CNS, uz mestimičnu pojavu edema, kao i kavitacije i razmekšanja u nervnom tkivu, što ukazuje na destruktivnu prirodu lezija u ovoj bolesti [254]. Patoanatomska distribucija lezija u NMOSB dominantno se odnosi na kičmenu moždinu i optičke nerve, uključujući optičku hijazmu, na kojima obično ima karakter longitudinalno ekstenzivnih lezija, ali može zahvatiti moždano stablo, posebno predeo aree postreme, kao i pojedine regione velikog mozga obuhvatajući i periventrikularnu lokalizaciju [255-258].

Kada su u pitanju patohistološke karakteristike lezija NMOSB pokazano je da klasični nalaz ukazuje na gubitak astrocita i AQP4, gubitak oligodendrocita uz ekstenzivnu demijelinizaciju, oštećenje neurona i nekrozu koja zahvata belu i sivu masu CNS, infiltraciju makrofagima u zoni inflamacije nervnog tkiva u akutnim plakovima, dok postoje i lezije koje se karakterišu prisustvom reaktivnih astrocita i mikroglije, bez jasnih znakova demijelinizacije uz infiltraciju granulocitima i relativno pošteđenim neuronima [254, 256, 259-261]. Takođe, patohistološkom analizom na autopsijskom materijalu pokazano je da pored gubitka astrocita i oligodendrocita, uz infiltraciju granulocitima i prisutnim T ćelijama u lediranom nervnom tkivu, postoje i centrovaskularni depoziti komponenti komplementa i imunoglobulina organizovanih u vidu rozeta, uz česte znake vaskularne fibroze predstavljajući nalaz karakterističan za NMOSB [254, 260].

### **1.7. Kliničke i parakliničke karakteristike neuromijelitis optika spektra bolesti**

Otkriće specifičnog molekularnog biomarkera, odnosno AQP4-IgG, omogućilo je dalje usmeravanje kliničkih, neuroradioloških, laboratorijskih i patogenetskih istraživanja NMO što je dovelo do formiranja Internacionalnog panela za dijagnostičke kriterijume NMOSB koji je, između ostalog, predložio upotrebu jedinstvenog, krovnog termina NMOSB čime je pored kardinalnih kliničkih manifestacija zahvaćenosti optičkih nerava i KM, definisana mogućnost afekcije i drugih delova CNS van pomenute optikospinalne osovine, kao što su: moždano stablo, diencefalon i veliki mozak, čineći tako deo spektra relevantnih kliničkih karakteristika ove bolesti [2, 20, 192].

U odnosu na klinički tok NMOSB se može podeliti na relapsni odnosno rekurentni i monofazni oblik bolesti, dok postojanje progresivnih formi NMOSB, za sada, nije sa sigurnošću utvrđeno i ne smatra se tipičnim za ovu bolest [2, 199, 234, 262]. Relaps NMOSB se definiše kao akutno ili subakutno nastalo neurološko pogoršanje, ili pogoršanje prethodno postojećeg neurološkog deficita prilikom objektivnog neurološkog pregleda, čiji simptomi/znaci traju najmanje 24h u odsustvu povišene telesne temperature, dok period između dva relapsa ne može biti kraći od 4 nedelje da bi se oni smatrali odvojenim kliničkim događajima [2, 234]. U zavisnosti od različitih studija, procenjeno je da se relapsna forma NMOSB javlja između 73% i 89.1% slučajeva i verovatno je povezana sa postojanjem serumskih AQP4-IgG, te je istaknuta i moguća prediktivna povezanost titra AQP4-IgG u odnosu na rizik za pojavu relapsa [199, 234, 263, 264]. U studiji koja se, između ostalog, bavila analizom kliničkih i parakliničkih karakteristika pacijenata obolelih od

NMOSB u srpskoj kohorti, kojima je dijagnoza bolesti postavljena prema važećim kriterijumima iz 2015 godine, pokazano je da 82.4% slučajeva ima relapsni oblik bolesti kao i da je u najvećem broju slučajeva u pitanju monofokalni početak bolesti iznosivši 68.9% od ukupnog broja obolelih, dok su AQP4-IgG bila detektovana u serumu kod 89.2% pacijenta [2, 58].

Prema tome, može se reći da su kliničko - radiološke manifestacije i karakteristike NMOSB generalno posledica zahvaćenosti onih delova, odnosno struktura CNS, u kojima su visoko ekspimirani AQP4 epitopi vodenih kanala, uzimajući u obzir značaj AQP4-IgG i predominaciju seropozitivnih slučajeva bolesti [265].

### **1.7.1. Optički neuritis**

Zahvaćenost optičkih nerava u vidu ON kao i KM u vidu mijelitisa, predstavljaju najvažnije oblike kliničkog ispoljavanja NMOSB, što je sadržano i u inicijalnom nazivu ovog entiteta, odnosno NMO [3, 4, 266].

Pokazano je da se ON javlja u 58.1% slučajeva kao prva manifestacija NMOSB, kada može biti unilateralan, što je češće, ili bilateralan (simultano ili konsekutivno) što je prisutno u oko 21.5% slučajeva [199]. Takođe, postoji istraživanje koje je ukazalo na to da se ON kao prva manifestacija bolesti obično javlja u nešto mlađoj životnoj dobi odnosno u 37.1 godini u odnosu na druge manifestacije NMOSB kao što je, na primer kod mijelitisa koji se prezentovao kao prva manifestacija bolesti u 45.7 godina [62]. U srpskoj kohorti pacijenata obolelih od NMOSB pokazano je da se ON kao prva manifestacija bolesti sreće kod 44.6% slučajeva, dok je ON bio prisutan u 54% kao jedina klinička manifestacija u formi monofazne bolesti [58].

Klinički, ON se može manifestovati različitim simptomima i znacima koji umnogome zavise od lokalizacije i stepena zapaljenskog procesa, pa tako može biti prisutan bol lokalizovan u predelu oka ili retrobulbarno, različitog intenziteta i kvaliteta sa mogućom propagacijom i u predeo glave, koji se obično potencira prilikom pomeranja očnih jabučica, zatim, ON se može manifestovati različitim stepenom poremećaja oštine vida i oštećenjem kolornog vida, kao i pojavom različitih ispada u vidnom polju uključujući i altitudinalne ispade [199, 234, 267]. Važno je napomenuti da ovo oštećenje oštine vida koje nastaje kao posledica monofaznog, ili češće rekurentnog ON u NMOSB, može biti izrazitog stepena čak do amauroze [2, 19, 58].

Upotreba magnetne rezonancije (MR) zahteva posebne sekvence definisane za pregled orbita čime se omogućava adekvatna vizualizacija optičkih nerava, čija primena je pokazala da ON u NMOSB tipično zahvata više od 1/2 dužine optičkih nerava, u vidu longitudinalnog ekstenzivnog optičkog neuritisa (LEON), pokazujući afinitet pretežno za posteriorne segmente optičkih nerava, hijazmu i optički trakt u vidu hiperintenziteta signala u T2 sekvenci, kao i postkontrastno prebojavanje u T1 sekvenci aktivnih i akutnih lezija tokom MR pregleda, kao i eventualne pojave edema zahvaćenog optičkog živca [234, 268]. Takođe, MR pregled orbita može ukazati na atrofiju optičkih nerava u kasnijoj fazi bolesti kao posledica ON u NMOSB [268, 269].

Primena optičke konherentne tomografije (OKT) i vizualnih evociranih potencijala (VEP) nije savetovana u rutinskoj upotrebi, odnosno nije podržana dijagnostičkim kriterijumima za NMOSB, ali može imati značaja u specifičnim slučajevima kada je potrebno objektivizovati subkliničke oblike i sekvele ranijeg ON koje nisu verifikovane klinički i pregledom MR, kao i u pedijatrijskoj populaciji obolelih [2, 270-272].

### **1.7.2. Mijelitis**

Zapaljenje KM, odnosno mijelitis, je prepoznatljiva klinička karakteristika NMOSB za koju je pokazano da se, kao prva manifestacija bolesti, javlja u 24.8% slučajeva, dok se simultana pojava ON i mijelitisa sreće kod 12.8% inicijalno obolelih [199, 234].

Kliničke manifestacije mijelitisa u NMOSB i težina njihovog ispoljavanja takođe zavise od lokalizacije i stepena zahvaćenosti KM zapaljenjem, što može rezultirati pojavom motornih i senzitivnih simptoma i znakova, poremećajem funkcije sfinktera, kao i disfunkcijom autonomnog nervnog sistema (ANS) [2, 234]. Isto tako, pokazano je da se motorne manifestacije mijelitisa javljaju u čak 69% obolelih od NMOSB, kao i da je pareza težeg stepena češće prisutna kod AQP4-IgG seropozitivnih pacijenata, dok se kliničke karakteristike izolovane senzitivne forme mijelitisa javljaju kod 29.9% slučajeva i to češće u okviru AQP4-IgG seronegativne grupe pacijenata [199]. Takođe, u srpskoj kohorti pacijenata kojima je dijagnoza NMOSB postavljena prema kriterijumima iz 2015 godine, pokazano je da se mijelitis javlja kao prva manifestacija bolesti u 55.4% od ukupnog broja slučajeva, dok je u relapsnoj formi bolesti mijelitis bio prisutan u 58% slučajeva [2, 58]. Važno je napomenuti da, kada je u pitanju pojava mijelitisa lokalizovanog u predelu torakalnog regiona ali i nižih cervikalnih segmenta KM, može doći do ispoljavanja motornih manifestacija u vidu respiratorne insuficijencije različitog stepena i evolucije kod obolelih od NMOSB [199, 234, 273].

Tipična kliničko-radiološka prezentacija mijelitisa u okviru NMOSB svakako je pojava longitudinalnog ekstenzivnog transverzalnog mijelitisa (LETM) koji podrazumeva ekstenzivno zapaljenje KM zahvatajući tri ili više vertebralna segmenta mijelona u kontinuitetu, uz transverzalni mijelitis (TM), odnosno zahvatanje više od 1/2 poprečnog preseka KM, što se karakteriše postojanjem hiperintenziteta signala na T2 sekvenci kao i postkontrastnim pojačanjem intenziteta signala na T1 sekvenci kod akutnih ili aktivnih promena na MR pregledu KM [2, 19, 234, 274]. Isto tako, pokazano je da je mijelitis na MR pregledu KM najčešće lokalizovan u cervikalnom, potom u torakalnom regionu, dakle u 40% odnosno 20% slučajeva, dok je simultana zahvaćenost i cervikalnog i torakalnog regiona zastupljena u 33% pacijenata kao i da su u najvećem broju slučajeva u pitanju longitudinalne lezije KM kojima pripada 90.6% nalaza na MR, dok su lezije kraće od dva vertebralna segmenta bile prisutne kod 9.4% [58]. Važno je napomenuti da dužina lezije KM mora biti razmatrana u kontekstu vremenske distance koja obuhvata pojavu relevantnih kliničkih simptoma i znakova, njihovog trajanja i efekta primenjene terapije odnosno u kontekstu nastanka, evolucije ili rezolucije lezije u momentu MR pregleda KM [234]. Takođe, promene na KM u NMOSB tipično pokazuju afinitet prema sivoj masi odnosno centralnim aspektima KM [2, 234]. U okviru tako ekstenzivnog akutnog oblika mijelitisa, u određenom broju slučajeva, može se uočiti pojava ograničenog otoka i distenzije KM u predelu lezije prilikom MR pregleda, kao i hipointenzitet signala u centralnim delovima lezije na T1 sekvenci [2]. Kada su u pitanju kasne manifestacije mijelitisa u NMOSB, na MR pregledu KM može se uočiti izvesna dinamika konfluentnih lezija na T2 sekvenci u vidu delimične fragmentacije intenziteta signala, dok se hronične promene uglavnom vezuju za pojavu atrofije KM različitog stepena i ekstenzivnosti, obično na mestu prethodne inflamacije mada i distalno u odnosu na leziju [2, 19].

### **1.7.3. Sindrom moždanog stabla**

Mogućnost zahvatanja različitih regiona moždanog stabla prepoznata je u kliničkim i radiološkim karakteristikama NMOSB, dok je važnost pojedinih manifestacija posebno istaknuta i u okviru kriterijuma za postavljanje dijagnoze ove bolesti [2, 199, 234]. Pokazano je da se afekcija moždanog stabla u NMOSB javlja od 26.3% do 31.4% pacijenata tokom trajanja bolesti, dok su novija istraživanja koja su obuhvatila pacijente kod kojih je dijagnoza NMOSB postavljena prema dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine, ukazala da se sindrom moždanog stabla javlja u 25.7% slučajeva, upravo kao prva manifestacija bolesti [2, 58, 199, 275].

Generalno, zahvaćenost moždanog stabla u NMOSB može se ispoljiti brojnim simptomima i znacima koji obuhvataju poremećaje pokreta očnih jabučica, slabost mimične muskulature, senzitivne poremećaje u predelu lica i glave, oštećenje čula sluha i ukusa, vrtoglavice, mučninu sa povraćanjem, štućanje, kašalj, disfagiju, dizartriju i ataksiju [275-277].

Kao tipična kliničko - radiološka manifestacija NMOSB istaknuta je prolongirana pojava mučnine, upornog povraćanja i štucaanja što je označeno kao "area postrema" sindrom (APS), koji je uvršten i u aktuelno važeće dijagnostičke kriterijume za NMOSB iz 2015 godine [2, 234, 278]. Naime, smatra se da tegobe APS nastaju kao posledica zahvaćenosti posteriornih aspekata produžene moždine u kojoj se nalazi emetički centar, kao i posebna grupa hemosenzitivnih neurona koji su odgovorni za štucaanje, dok sa druge strane, postoji fiziološki permeabilnija KMB i bogatstvo AQP4 proteinima u ovoj regiji, što se smatra važnim u procesu imunski posredovanog oštećenja CNS kod osoba obolelih od NMOSB [190, 201, 265, 279-282]. Pokazano je da se APS javlja kao izolovana klinička manifestacija AQP4-IgG seropozitivne forme NMOSB od 7.1% do 10.3% slučajeva na početku bolesti kao i u čak 73% tokom trajanja bolesti [278]. Takođe, u srpskoj kohorti obolelih od NMOSB inicijalna manifestacija u vidu APS zabeležena je u 16.2% od ukupnog broja slučajeva od kojih je 10.8% AQP4-IgG seronegativnih pacijenata [58]. Neuroradiološki APS se karakteriše pojavom hiperintenzne lezije na T2 sekvenci MR, ili postoji T1 postkontrastno pojačanje intenziteta signala akutnih lezija u jasno posteriornom aspektu produžene moždine, nekada se mogu uočiti bilateralne lezije, ređe se sreću ekstenzivne cervikalne lezije koje se nastavljaju u region produžene moždine i aree postreme [2, 269, 278, 283, 284]. S obzirom na to da APS predstavlja jednu od ključnih kliničkih karakteristika za postavljanje dijagnoze NMOSB, važno je istaći da postoji izvesna kliničko radiološka disocijacija kada je u pitanju APS, odnosno da se tipične kliničke manifestacije ovog sindroma mogu javiti bez jasnog nalaza na pregledu endokranijuma MR, zbog čega su 2018 godine predloženi dijagnostički kriterijumi za APS koji ističu važnost kliničke evaluacije i neophodnost trajanja tipičnih simptoma nastalih akutno ili subakutno, pojedinačno ili u kombinaciji, kontinuirano ili epizodično (mučnina, povraćanje, štucaanje) najmanje 48h u slučaju odsustva lezija u regiji aree postreme na MR, dok se dijagnoza APS može postaviti kada tipični simptomi traju i kraće od 48h ako imaju jasan neuroradiološki korelat, svakako u oba slučaja je potrebno isključivanje alternativnih uzroka kao i utvrđivanje AQP4-IgG seropozitivnosti [2, 278].

Kada je u pitanju prezentacija ostalih lezija moždanog stabla na MR, tipično se sreću promene u vidu hiperintenziteta signala na T2 sekvenci, kao i postkontrastnog pojačanja intenziteta signala u T1 sekvenci postkontrastno kod aktivnih i akutnih lezija, periependimalno oko IV moždane komore, zatim u ponsu, ređe cerebelarnim pedunkulima, nekada se ove lezije mogu javiti bilateralno i smatra se da su lezije moždanog stabla češće prisutne u seropozitivnim slučajevima NMOSB [2, 269, 285].

#### **1.7.4. Diencefalički i cerebralni sindrom**

Znaci zahvaćenosti supratentorijalnih struktura kao što su diencefalon i veliki mozak, takođe mogu pripadati kliničkoj i radiološkoj prezentaciji NMOSB, pa je tako pokazano da se diencefalički sindrom sreće kod 3.4% obolelih, mada postoje studije koje ističu da se akutni diencefalički sindrom kao prva manifestacija NMOSB javlja u 9.5% slučajeva, dok cerebralni sindrom može biti prisutan na početku bolesti u 4.1% pacijenata, kao i na činjenicu da supratentorijalne lezije na MR vrlo često mogu biti asimptomatske [2, 58, 286, 287].

Diencefalički sindrom u NMOSB može se javiti u vidu simptomatske narkolepsije, zatim kao poremećaj funkcije hipotalamo-hipofizne osovine sa hormonskom disregulacijom, uključujući i sindrom neadekvatne sekrecije antidiuretskog hormona (engl. *Syndrome of Inappropriate Secretion of Antidiuretic Hormone*, SIADH), poremećaj autonomnih funkcija (posebno kod zahvatanja hipotalamusa), poremećaj apetita (anoreksija ili hiperfagija) i presinkopalna stanja [234, 276, 277].

Cerebralni sindrom se u NMOSB može ispoljiti u vidu posteriornog reverzibilnog encefalopatskog sindroma (engl. *Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome*, PRES), zatim je moguća pojava glavobolje, konfuznog stanja, kognitivnih poremećaja, afazije, apraksije,

psihijatrijske simptomatologije, malaksalosti, poremećaja stanja svesti i epileptičkih napada [234, 276, 277, 288, 289].

Pored toga što nalaz na MR mozga može biti potpuno uredan u NMOSB, neuroradiološke karakteristike, kada postoji zahvaćenost diencefalona i velikog mozga u NMOSB, karakterišu se mogućom pojavom lezija u predelu talamusa, hipotalamusa, periependimalno oko lateralnih i III moždane komore, zatim lezija korpusa kalozuma i u periakveduktalnoj sivoj masi, subkortikalnih lezija bele mase koje su najčešće nespecifične u obliku malih punktiformnih ( $\leq 3$ mm) promena, ali mogu biti u vidu ekstenzivnih lezija bele mase koje su često prisutne bilateralno, nepravilnog oblika [2, 234, 255, 269]. Relativno specifičnim za NMOSB smatra se supratentorijalna prezentacija longitudinalnih lezija u vidu ekstenzivnog zahvatanja korpusa kalozuma, što je nekada praćeno pojavom edema kada na sagitalnim snimcima MR promene mogu podsećati na izgled "mermera" [234, 290]. Takođe, promene na MR mozga u NMOSB mogu biti u vidu unilateralnih ili bilateralnih trakastih T2 hiperintenzivnih lezija koje odgovaraju projekciji kortikospinalnih puteva sa mogućom ekstenzijom put kaudalno u cerebralne pedunkule i pons [2, 291]. Važno je istaći da promene na MR mozga u NMOSB mogu biti potpuno asimptomatske i obično se otkrivaju tokom dijagnostičke evaluacije osoba sa simptomima ON i/ili mijelitisa, pa je tako pokazano da se tipične promene za NMOSB na MR mozga sreću kod 8% osoba kojima je bolest počela simptomima i znacima akutnog ON, odnosno kod 15% onih sa pojavom mijelitisa [286].

### 1.7.5. Bol i bolni sindrom

Pojava bola prepoznata je kao važna klinička karakteristika NMOSB uzimajući u obzir činjenicu da je bol prisutan kod velikog broja pacijenata tokom trajanja bolesti [292, 293]. Naime, procenjeno je da se bol javlja kod ukupno 75.3% obolelih od AQP4-IgG seropozitivne forme NMOSB, i to dominantno kao dugotrajan odnosno kontinuirani hronični bol u 61.6% slučajeva [293]. Takođe, u istoj kohorti pacijenata, pokazano je da intenzitet bola varira i da najveći broj pacijenata, odnosno njih 55.2% doživljava umeren do težak stepen bola tokom trajanja bolesti [293]. Kada je u pitanju kvalitet bola u NMOSB, u istoj ovoj studiji, zaključeno je da se u 90.4% opisuje tipičan osećaj bola, ali i da su ostali vidovi subjektivnog ispoljavanja neprijatnih senzacija bili prisutni u značajnom procentu, pa je tako na primer, osećaj probadanja bio prisutan u 68.8%, a osećaj žarenja u 66.4% pacijenata [293].

Važno je istaći da se različiti vidovi bola mogu javiti u okviru kliničke prezentacije kako AQP4-IgG seropozitivne tako i seronegativne forme bolesti, od kojih se posebno izdvaja neuropatski bol, zatim bol udružen sa spasticitetom odnosno bolni tonički spazmi, neuropatski svrab kao i izmene senzitivnog modaliteta u vidu alodinije ili hiperalgezije [292-297]. Neuropatski bol se javlja kod značajnog broja obolelih od NMOSB, i pokazano je da je u 72.8% lokalizovan u nogama, znatno ređe u rukama i trupu, odnosno 48.8% i 34.4 % pacijenata [292, 293]. Sa druge strane, u odnosu na region tela, neuropatski bol je u ispitivanoj kohorti bio najintenzivniji u predelu trupa, dok je bol udružen sa spasticitetom bio najzastupljeniji obuhvatajući 68.8% od ukupnog broja obolelih [293]. Bolni tonički spazmi prijavljeni su u 22.61% do 26.4% obolelih od NMOSB, sa predominantnom lokalizacijom u nogama [293, 296].

Patogenetski mehanizmi koji leže u osnovi pojave bola u NMOSB nisu do kraja razjašnjeni uključujući i potencijalnu ulogu centralnih mehanizama regulacije bola, ali je pokazano da određene lezije u KM mogu biti povezane sa pojedinim modalitetima kakav je neuropatski svrab, dok rekurentni mijelitisi, posebno u gornjim torakalnim partijama, mogu biti povezani sa generalno češćom pojavom hroničnog bola kod pacijenata sa NMOSB [293, 295, 297].

Svakako, klinički značaj pojave bola u NMOSB je izuzetno veliki, obzirom na činjenicu da različite karakteristike bola kao što su trajanje, intenzitet i lokalizacija doprinose razvoju komorbiditeta, u prvom redu depresije, i imaju vrlo veliki uticaj na sveukupni kvalitet života obolelih od NMOSB [292, 293].

### **1.7.6. Poremećaji funkcije autonomnog nervnog sistema**

Zahvaćenost pojedinih komponenti ANS karakteriše se pojavom različitog stepena disautonomije koja je primećena u okviru kliničkog ispoljavanja NMOSB [298-300]. Pokazano je da se disautonomija kod obolelih od NMOSB karakteriše disfunkcijom parasimpatičke komponente ANS u 50% obolelih, poremećaj funkcije simpatikusa zabeležen je u 50% slučajeva, a ortostatska hipotenzija bila je prisutna kod 30% pacijenata [298]. Takođe, utvrđeno je da se poremećaj funkcije ANS kvantitativno i kvalitativno razlikuje od one koja se sreće kod pacijenata sa MS, pre svega u pogledu kardiovaskularne autonomne disfunkcije, koja se ređe javlja kod osoba sa NMOSB ali je težeg stepena u odnosu na obolele od MS, uključujući istovremenu pojavu ortostatske hipotenzije i disfunkcije parasimpatičke komponente ANS [298]. Posebno je razmatrana i sudomotorna disfunkcija ispitivanjem kvantitativnog sudomotornog aksonalnog refleksa kada je pokazano da se disautonomija sreće kod više od polovine obolelih od NMOSB, od kojih 29.2% ima umeren do težak stepen poremećaja sudomotorne regulacije [301].

Važno je istaći da je ukazano na moguću povezanost određenih domena disautonomije u odnosu na različite kliničke i parakliničke karakteristike pacijenata obolelih od NMOSB [300]. Između ostalog, pokazano je da je mijelitis cervikalnog regiona KM udružen sa lošijim skorom kardiovagalnog indeksa, dok zahvaćenost mozga i kičmene moždine u NMOSB doprinosi lošijem ukupnom skorom autonomne disfunkcije, dok su pacijenti muškog pola imali lošije skorove sudomotornog indeksa [300].

Disfunkcija ANS ima bitnu ulogu kada je u pitanju klinička prezentacija NMOSB jer može dovesti do ispoljavanja dramatičnih poremećaja vitalnih parametara, odnosno moguće životne ugroženosti pacijenata, dok sa druge strane, disautonomija ima značajan uticaj i na ukupan kvalitet života obolelih osoba [300, 302-304].

### **1.7.7. Laboratorijske analize**

Izuzetno važnu grupu testova u procesu dijagnostičke i diferencijalno dijagnostičke eksploracije pacijenata kod kojih postoji sumnja na imunski posredovano oštećenje CNS čine laboratorijske analize seruma i CST, u kojima se, pored rutinskih biohemijskih analiza krvi i urina kao i specifičnih imunoloških i mikrobioloških analiza, posebno ističu klinički relevantni odnosno jasno definisani molekularni biomarkeri pojedinih bolesti [234, 237, 305]. Kada je u pitanju NMOSB molekularni biomarkeri u serumu kao što su AQP4-IgG i MOG At imaju apsolutni klinički značaj, dok suštinski analiza likvora nije neophodna za postavljanje dijagnoze bolesti, ali se njeno sprovođenje sugeriše u cilju neophodnosti diferencijalno dijagnostičkog razmatranja [234].

#### **1.7.7.1. Određivanje antitela prema akvaporin 4 antigenima**

Antitela IgG klase prema AQP4 antigenima analiziraju se prevashodno iz seruma pacijenata te je, do danas, razvijeno više različitih pristupa za detekciju i analizu AQP4-IgG od kojih su, u manjoj ili većoj meri, u kliničkoj upotrebi šest različitih metodoloških testova: enzimski imunosorbentni test (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), indirektna imunofluorescencija (IIF), fluorescentna imunoprecipitacija (engl. *Fluorescence Immunoprecipitation Assay*, FIPA), radioimunoprecipitacioni esej (engl. *Radioimmunoprecipitation Assay*, RIPA) i metode ćelijskog eseja (engl. *Cell Based Assay*, CBA) koje se mogu bazirati na tehnici IIF ili protočnoj citometriji (engl. *Flow – Cytometry Activated Cells Sorting*, FACS) [237, 306].

Jedan od prvih testova koji je bio široko prihvaćen u kliničkoj praksi za detekciju AQP4-IgG je ELISA test, čija upotreba zbog praktičnosti i dostupnosti ove metode suštinski nije u potpunosti napuštena ni do danas [237, 307]. U odnosu na različite modifikacije ELISA testa, a u zavisnosti i od literature, pokazano je da je stepen senzitivnosti metode varijabilan, i da se kreće od 66% do 83.3%, dok je prosečna senzitivnost pojedinih testova iznosila 64% [306, 308-314]. Sa druge strane, specifičnost ELISA testa, u odnosu na različite metodološke pristupe, iznosila je 96.6% do 100% [306, 314]. Između ostalog, ograničenja same metode, kao i velika varijabilnost senzitivnosti i specifičnosti svakako su razmatrani i u kontekstu javljanja lažno pozitivnih rezultata, kada je procenjeno da se primenom ELISA testa ona javlja u 0.5% do 1.3% [2, 306, 315, 316].

Primena IIF za detekciju serumskih AQP4-IgG na supstratu tkiva animalnog mozga korišćenjem fluorescentno obeleženih antihumanih antitela i upotrebom fluorescentnog mikroskopa predstavlja subjektivnu metodu kojom je postignuta varijabilna senzitivnost od 40% do 78%, dok specifičnost iznosi između 97.1% i 100% [306, 312, 317, 318].

Metode FIPA i RIPA suštinski se vrlo retko koriste u kliničkoj praksi zbog zahtevnih laboratorijskih protokola i upotrebe radioaktivnosti kada je u pitanju RIPA, uz nisku senzitivnost obe metode, koja za FIPA iznosi 48.7%, dok RIPA dostiže senzitivnost oko 56.8% [306, 317].

Najvažniju grupu testova za detekciju serumskih AQP4-IgG danas svakako predstavljaju metode CBA, koje u osnovi koriste humane AQP4 transfektovane ćelije koje mogu biti fiksirane na biočipu, kada se koristi tehnika IIF što predstavlja subjektivnu metodu, ili korišćenjem FACS metodologije koja je vrlo precizna i objektivna u određivanju titra antitela u serumu, ali je protokolarno zahtevnija metoda [2, 306, 312, 319-323]. Svakako senzitivnost CBA, u zavisnosti od literature, iznosi 96.7% dok je specifičnost i do 100% [306, 318, 322].

Zbog svega navedenog, sugerise se, da za detekciju serumskih AQP4-IgG u procesu dijagnostičke evaluacije osoba kod kojih postoji sumnja na NMOSB, primena metodologije CBA ima apsolutnu prednost u kliničkoj primeni [2, 234, 322]. Takođe, postoje preporuke koje navode da bi bilo idealno sve seropozitivne slučajeve NMOSB retestirati primenom različite metodologije u odnosu na inicijalnu, kako bi se potvrdio pozitivan rezultat, ili u slučaju da takve metode nisu dostupne, ponoviti analizu iz jednog vremenski odvojenog uzorka seruma imajući u vidu ozbiljnost i dugoročni značaj postavljanja dijagnoze NMOSB [234]. U skladu sa tim, preporuke ističu da bi retestiranje u cilju praćenja serostatusa, trebalo obaviti i kod svih prethodno seronegativnih pacijenata kod kojih klinička slika ukazuje na mogućnost da se radi o NMOSB, uz posebnu napomenu da bi testiranje trebalo raditi u periodu kada nije primenjivana specifična imunomodulatorna ili imunosupresivna terapija, kao i u momentu relapsa bolesti kada bi dinamika titra AQP4-IgG povećala mogućnost detekcije AQP4-IgG primenom odgovarajućih i preporučenih metodoloških pristupa, kakvi su, na primer, testovi CBA [234, 324].

#### **1.7.7.2. Određivanje antitela prema mijelin oligodendrocitnom glikoproteinu**

Testiranje u cilju detekcije MOG At u serumu preporučuje se kod svih pacijenata kod kojih klinička slika i paraklinički nalazi ukazuju na postojanje imunski posredovanog oboljenja CNS uključujući pacijenate kod kojih prethodnim i adekvatnim testiranjem nisu detektovana AQP4-IgG [234, 325].

Zahvaljujući visokoj senzitivnosti od 74.6% do 89.1% i specifičnosti od 93.3% do 100%, kao i postignutim visokim stepenom interlaboratorijske podudarnosti rezultata, primena testova CBA (upotrebom IIF ili FACS tehnologije) preporučuje se kao jedina validna metoda za detekciju MOG At u serumu u kliničkoj praksi [325-328].

### **1.7.7.3. Citobiohemijske karakteristike likvora**

Citobiohemijski pregled likvora predstavlja skup analiza kojima se, između ostalog, određuje nivo glikoze, proteina (uključujući indeks albumina), kao i prisustvo celularnih elemenata u jedinici zapremine CST, čineći rutinsku analizu tokom kliničke eksploracije neuroloških bolesti, uključujući i imunski posredovane bolesti CNS [234, 329-331].

Retrospektivnom studijom koja je obuhvatila rezultate citobiohemijskih analiza preko 200 uzoraka likvora pacijenata obolelih od AQP-IgG seropozitivne forme NMOSB, kojima je dijagnoza bolesti postavljena prema kriterijumima iz 2006 godine, pokazano je postojanje uglavnom umerene pleocitoze, dok je izražena pleocitoza (leukociti > 100/mikrolitar) bila prisutna kod 6.2% uzoraka većinom dobijenih od pacijenata tokom relapsa bolesti [332]. Od ovog ukupnog broja belih krvnih zrnaca, gotovo u 100% slučajeva su bili prisutni limfociti, dok su monociti činili oko 40%, neutrofilu su detektovani u likvoru kod 44.4% uzoraka (čineći do 80% od ukupnog broja leukocita) [332]. Takođe, pleocitoza je češće bila zastupljena kod pacijenata tokom relapsa bolesti, i to više kod onih sa kliničkom prezentacijom mijelitisa u odnosu na ON [332]. Kada je u pitanju proteinorahija, ovom studijom, pokazano je da se ona javljala kod više od polovine ispitivanih uzoraka likvora, i da je kod 58.8% bila prisutna u opsegu od 0.5 do 1g/l, dok je izražena hiperproteinorahija od preko 1.5g/l bila detektovana kod 13.8% uzoraka [332]. Takođe, proteinorahija je bila znatno izraženija tokom relapsa bolesti, kao i tokom pojave mijelitisa ili simultane pojave ON i mijelitisa [332].

Analiza celularnih elemenata i proteinorahije u okviru diferencijalno dijagnostičke eksploracije može biti od pomoći u distinkciji NMSOB od MS [2, 234, 332].

### **1.7.7.4. Izoelektrično fokusiranje likvora i seruma**

Pozitivan nalaz oligoklonalnih traka (OGT) u likvoru, uz paralelno negativan nalaz u serumu, odraz je intratekalne imunske aktivacije i sreće se u brojnim imunski posredovanim i infektivnim bolestima nervnog sistema, a u prvom redu, čini važan biomarker temporalne diseminacije u dijagnozi MS [333-335].

Različite studije koje su uglavnom obuhvatile pacijente kavkaskog porekla obolele od NMOSB, ukazale su na to da se pozitivan nalaz OGT u ovoj bolesti obično sreće prilikom ataka odnosno relapsa, kod manjeg broja pacijenata odnosno 15-35%, a da se oligoklonalni intratekalni odgovor gubi kod većine pacijenata tokom remisije bolesti [199, 234, 332].

Dakle, pozitivan nalaz OGT u likvoru, kao odraz centralne humoralne aktivacije, može se sresti kod manjeg broja obolelih od NMOSB, ali treba imati na umu da je takav nalaz uglavnom tranzijentnog karaktera, odnosno da se ne smatra tipičnim za NMOSB [2, 234].

## **1.8. Dijagnoza i diferencijalna dijagnoza neuromijelitis optika spektra bolesti**

Dijagnoza NMOSB postavlja se prema aktuelno važećim dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine kojima su obuhvaćene sve relevantne kliničke i parakliničke karakteristike ove bolesti, čime je, između ostalog, obezbeđen uniforman terminološki pristup ovom entitetu, i postavljen osnov za dalja precizna istraživanja i jasniju naučnu komunikaciju [2]. Takođe, primena ovih dijagnostičkih kriterijuma za NMOSB imala je za cilj da obezbedi što brže i sigurnije postavljanje dijagnoze, kako kod AQP4-IgG seropozitivnih slučajeva, tako i kod pacijenata kod kojih nisu detektovana AQP4-IgG ili je njihov serostatus kao takav nedostupan/nepoznat, definišući jasne i dijagnostički neophodne kliničke i neuroradiološke karakteristike bolesti [2]. Aktuelno važećim kriterijumima za postavljanje dijagnoze NMOSB naznačena je važnost integracije kliničkih, neuroradioloških i laboratorijskih nalaza, obzirom na to da su istaknute tipične, ali da ne postoje

patognomonične kliničke manifestacije bolesti, naglašavajući preporuke za dopunskim neuroradiološkim i laboratorijskim dijagnostički važnim karakteristikama, postojanje autoimunskih komorbiditeta kao i neophodnost isključivanja alternativnih dijagnoza, odnosno diferencijalno dijagnostičkog razmatranja [2].

### 1.8.1. Važeći dijagnostički kriterijumi

Aktuelno važeći kriterijumi iz 2015 godine za postavljanje dijagnoze NMOSB prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Dijagnostički kriterijumi za neuromijelitis optika spektar bolesti

Dijagnostički kriterijumi za NMOSB sa AQP4-IgG
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Najmanje jedna ključna klinična karakteristika</li> <li>2. Pozitivan test na AQP4-IgG korišćenjem najbolje dostupne metode (preporučuje se CBA)</li> <li>3. Isključivanje alternativnih dijagnoza</li> </ol>
Dijagnostički kriterijumi za NMOSB bez AQP4-IgG ili sa nepoznatim AQP4-IgG statusom
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Najmanje dve ključne karakteristike u okviru jednog ili ponavljanih kliničkih ataka uz ispunjavanje svih sledećih kriterijuma: <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Najmanje jedna ključna klinička karakteristika mora biti ON, akutni mijelitis – LETM ili APS</li> <li>b) Diseminacija u prostoru (dve ili više različitih ključnih karakteristika)</li> <li>c) Ispunjavanje dopunskih nalaza na MR (kako je navedeno)</li> </ol> </li> <li>2. Negativni testovi na AQP4-IgG korišćenjem najbolje dostupne metode ili je testiranje nedostupno</li> <li>3. Isključivanje alternativnih dijagnoza</li> </ol>
Ključne kliničke karakteristike
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ON</li> <li>2. Akutni mijelitis</li> <li>3. APS: neobjašnjene epizode štućanja ili epizode mućnine i povraćanja</li> <li>4. Akutni sindrom moždanog stabla</li> <li>5. Simptomatska narkolepsija ili akutni diencefalićki sindrom sa diencefalićnim lezijama tipićnim za NMOSB na MR</li> <li>6. Simptomatski cerebralni sindrom sa lezijama mozga na MR tipićnim za NMOSB</li> </ol>
Dodatni MR kriterijumi/zahtevi za NMOSB bez AQP4-IgG ili nepoznatim AQP4-IgG serostatusom

1. Akutni ON: nalaz MR mozga (a) ukazuje na normalan nalaz ili na postojanje samo nespecifičnih lezija bele mase ili (b) T2 hiperintenzna lezija na MR optičkih nerava ili postkontrastno prebojavanje na T1 sekvenci MR u dužini većoj od ½ dužine optičkog nerva ili zahvaćenost optičke hijazme.
2. Akutni mijelitis: potrebno je prisustvo odgovarajuće intramedularne lezije koja kontinuirano zahvata 3 ili više segmenata KM (LETM) ili prisustvo fokalne atrofije KM u dužini od 3 ili više segmenata KM kod pacijenata sa istorijom akutnog mijelitisa u datoj regiji
3. Sindrom aree postreme: potrebna je zahvaćenost dorzalnog aspekta produžene moždine odnosno lezije aree postreme
4. Akutni sindrom moždanog stabla: potrebno je prisustvo periependimalnih lezija u moždanom stablu

Skraćenice: APS – area postrema sindrom; AQP4-IgG – antitela na akvaporin 4; CBA – ćelijski esej (engl. *Cell Based Assay*), IgG – imunoglobulin G; KM – kičmena moždina; LETM – longitudinalni ekstenzivni transverzalni mijelitis; MR - magnetna rezonancija; NMOSB – neuromijelitis optika spektar bolesti; ON – optički neuritis; Adaptirano prema Wingerchuk i sar. 2015 [2].

Kada je u pitanju postavljanje dijagnoze pedijatrijske forme NMOSB, kriterijumi se ne razlikuju od aktuelno važećih dijagnostičkih kriterijuma iz 2015 godine za adultnu populaciju [2].

### 1.8.2. Diferencijalno dijagnostička razmatranja

Nozološki doprinos dijagnostičkih kriterijuma iz 2015 godine koji su jasno definisali kliničke i parakliničke karakteristike NMOSB, ogleđa se, između ostalog, u činjenici da su omogućena dalja istraživanja i drugih autoantitelima posredovanih bolesti CNS, pa su tako 2023 godine objavljene preporuke za postavljanje dijagnoze bolesti udružene sa MOG At (engl. *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody Associated Disease*, MOGAD) [2, 234, 325]. Naime, Internacionalni MOGAD panel je na osnovu podataka dobijenih pregledom literature ustanovio da MOGAD najverovatnije predstavlja patogenetski, klinički, neuroradiološki i svakako laboratorijski poseban entitet u okviru demijelinizacionih bolesti CNS, predlažući jasne kriterijume za postavljanje dijagnoze ove bolesti u objedinjenim kliničkim i parakliničkim zahtevima, od kojih je pozitivan nalaz MOG At u serumu dokazan primenom jasno definisane CBA metodologije neophodan dijagnostički parametar [325]. Takođe, tokom 2023 godine, grupa eksperata objavila je revidirane preporuke vezane za dijagnozu i diferencijalnu dijagnozu NMOSB kada su, uvažavajući činjenicu da postoje određena preklapanja posebno u kliničkim karakteristikama između osoba obolelih od NMOSB i onih sa pozitivnim MOG At u serumu, istakli da je MOGAD najvažnija diferencijalna dijagnoza u odnosu na NMOSB i da bi je, kao takvu, trebalo smatrati posebnim kliničkim entitetom [234].

Svakako da i mnoge druge bolesti nervnog sistema, pre svega imunski posredovana oboljenja CNS uključujući, u prvom redu, MS ali i neurološke forme sistemskih autoimunskih bolesti, zatim, infektivne, vaskularne, metaboličke i genetički uzrokovane bolesti CNS, neoplastične i druge bolesti i stanja sa afekcijom nervnog sistema predstavljaju važne diferencijalno dijagnostičke entitete koje treba razmotriti i čije isključivanje je neophodno za postavljanje definitivne dijagnoze NMOSB [2, 234].

## 1.9. Autoimunski komorbiditeti u neuromijelitis optika spektru bolesti

Na osnovu dosadašnjih saznanja, može se reći da NMOSB predstavlja bolest sa čestom pojavom različitih komorbiditeta od kojih su, kako je pokazano, od posebne patogenetske ali i terapijske važnosti, pre svega autoimunski komorbiditeti [336, 337]. Takođe, postoje pokušaji sistematizacije autoimunskih bolesti kao komorbiditeta u smislu njihove podele koja obuhvata sistemske autoimunske komorbiditete, zatim, organ specifične neurološke i somatske autoimunske komorbiditete u NMOSB, uz izdvajanje posebne grupe koja se odnosi na stanja sa koincidentalnim prisustvom određenih autoantitela bez očigledne i klinički potvrđene komorbidne autoimunske bolesti [337].

Pa je tako pokazano da veliki broj sistemskih autoimunskih (reumatoloških) bolesti mogu biti komorbiditeti u NMOSB, ali da su svakako najčešće Sjogren sindrom (SS) i sistemski eritemski lupus (SLE) [337]. Dakle, pregledom literature došlo se do podatka da su SS i SLE daleko učestaliji kod osoba ženskog pola obolelih od NMOSB, odnosno da je udeo žena iznosio 87.9% za komorbiditet u vidu SS, kao i 94.7% za SLE, kao i da se SS kod većine pacijenata tačnije njih 57.3% javio nakon kliničke prezentacije NMOSB, dok je, sa druge strane, kod 73.7% obolelih došlo do pojave SLE pre klinički manifestnog ispoljavanja NMOSB [337].

Od organ specifičnih neuroloških autoimunskih komorbiditeta u NMOSB, opisano je postojanje mijastenije gravis (MG), autoimnskog encefalitisa i perifernih neuropatija, ali je svakako MG izdvojena kao najčešći komorbiditet iz ove grupe koincidentalnih bolesti [337]. Takođe, MG je bila najzastupljeniji komorbiditet u ženskoj populaciji obolelih od NMOSB čineći 93.7%, dok su se kliničke manifestacije NMOSB javljale obično godinama nakon dijagnoze MG kod većine pacijenata odnosno kod njih 81.2% [337].

Ne-neurološki odnosno somatski organ specifični autoimunski komorbiditeti u NMOSB čine brojne bolesti i suštinski, mogu se prezentovati zahvatanjem bilo kojeg organskog sistema u telu, dok je pokazano da je najčešća bolest iz ove grupe autoimunskih komorbiditeta u NMOSB svakako autoimunski tireoiditis [337].

Bez obzira na to što je najveći broj bolesti iz grupe autoimunskih komorbiditeta u NMOSB posredovan autoantitelima, postoje situacije u kojima je kod pacijenata obolelih od NMOSB detektovano postojanje određenih autoantitela u serumu bez kliničkih manifestacija tipičnih za neko autoimunsko oboljenje, i to u značajnom procentu koji se kreće od 38% do 75% [337, 338]. U tom smislu, najčešće su detektovana serumska antinuklearna antitela (ANA) i antitela prema SS antigenu A (Anti-SSA) [337, 339].

Imajući sve navedeno u vidu, razmatran je i potencijalni uticaj izolovanog postojanja određenih autoantitela na ispoljavanje kliničkih manifestacija i prognozu NMOSB, kada je sugerisano da se ON češće javlja kod udruženog postojanja MG, dok je TM češće zastupljen kao klinička manifestacija NMOSB u komorbiditetima kakvi su SS i SLE [337].

Svakako, još uvek je nerazjašnjen etiopatogenetski značaj ovih koincidentalnih autoantitela ali i autoimunskih komorbiditeta u NMOSB, u okviru čega se navodi mogući značaj genetičkih faktora kakav je HLA lokus, koji se smatra imunogenetičkim centrom, uz sadejstvo određenih faktora spoljne sredine sa druge strane, čime je istaknuta mogućnost da NMOSB može pripadati složenom multisistemskom autoimunskom sindromu [98, 337, 340]. Zbog svega navedenog, prisustvo autoimunskih komorbiditeta se smatra podržavajućim karakteristikama kada je u pitanju proces dijagnostičke elaboracije NMOSB [2].

Opterećenje komorbiditetima u NMOSB predstavlja vrlo važan domen sa mogućim značajnim uticajem na sam tok osnovne bolesti, ishod lečenja, kao i kvalitet života obolelih, dok sa druge strane, ne treba zanemariti i njihov ukupan socijalno ekonomski značaj [337, 341].

## 1.10. Lečenje neuromijelitis optika spektra bolesti

Farmakološki terapijski pristupi NMOSB baziraju se na dosadašnjim saznanjima vezanim za etiologiju, patogenezu, patofiziologiju, prirodan tok i druge kliničke karakteristike bolesti kada su, uzimajući u obzir značajne razlike koje postoje kako interindividualno tako i u odnosu na samu bolest i socijalno ekonomske faktore, istaknuta dva osnovna cilja: rano primenjena efikasna terapija relapsa bolesti i dugoročna prevencija pojave novih relapsa bolesti [234, 342, 343].

Sa druge strane, primena simptomatske i nefarmakološke terapije predstavlja dopunski vid tretmana NMOSB u cilju redukcije negativnih uticaja i posledica same bolesti, pre svega, na funkcionalnost i kvalitet života obolelih osoba [344].

Glavni preduslov započinjanja terapije svakako je rano postavljanje definitivne i sigurne dijagnoze NMOSB što je, između ostalog, omogućeno implementacijom aktuelno važećih dijagnostičkih kriterijuma iz 2015 godine, dok izbor i vrsta terapije zahtevaju i sagledavanje individualnih karakteristika svakog pacijenta ponaosob, zatim kliničkih i parakliničkih karakteristika uključujući osnovnu bolest i komorbiditete, uz uvažavanje svih specifičnosti kao što su: uzrast, generativni period, planiranje porodice, trudnoća i stil života obolelih osoba [2, 342].

### 1.10.1. Terapija relapsa bolesti

Najveći broj pacijenata sa NMOSB ima relapsnu formu bolesti u okviru koje se mogu javiti vrlo teški relapsi, čak i na samom početku bolesti, sa velikim stepenom neurološkog deficita a ponekad mogu i životno ugroziti pacijenta [199, 234, 345]. Stoga je važno na vreme prepoznati sve neurološke simptome i znake relapsa u NMOSB, te započeti lečenje relapsa i potencijalnih somatskih komplikacija što je moguće ranije [234, 342]. Akutna terapija relapsa ima za cilj da utiče na smanjenje produbljivanja postojećeg kao i bolji oporavak neurološkog deficita [345-347]. Prateći poslednje preporuke, terapija relapsa kako kod AQP4-IgG seropozitivnih tako i kod dvostruko seronegativnih pacijenata sa NMOSB, predstavlja primenu kortikosteroida (glukokortikoida) i/ili afereze krvi [342].

Glukokortikoidi se, u terapiji relapsa NMOSB, koriste u visokim dozama tokom kraćeg perioda pa se tako najčešće intravenski daje metilprednizolon u dozi od 1000mg/dan u trajanju od 3 - 5 dana uz suportivnu terapiju [342]. Nakon toga potrebno je nastaviti terapiju oralnim glukokortikoidima u dozi od 2-30 mg/dan sa postepenim opadajućim dozama tokom 2-3 nedelje do doze od 10-15mg/dan glukokortikoida [342].

Takođe, preporuke ističu da bi, u daljim koracima, trebalo razmotriti primenu nižih doza glukokortikoida oralnim putem u trajanju od 3-6 meseci u odnosu na serostatus obolelih od NMOSB, aktivnost bolesti i planiranog vremena za postizanje punog efekta nakon uvođenja hronične terapije za prevenciju relapsa u NMOSB [342].

Međutim, ako već u prvim danima od pojave relapsa izostane pozitivan efekat intravenske primene kortikosteroidne terapije ili je taj efekat nezadovoljavajućeg stepena, potrebno je primeniti tehnike afereze krvi, koje mogu biti u vidu terapijskih izmena plazme (TIP) ili imunoadsorpcije (IA) za koje je pokazano da ranom primenom mogu uticati na znatno bolji terapijski ishod relapsa kod osoba sa NMOSB [342, 345, 348, 349]. U okviru takvih terapijskih protokola, obično se primenjuje TIP ili IIA dnevno ili svakog drugog dana ukupno 5-10 ciklusa [342]. Sa druge strane, kod relapsa u NMOSB koji za posledicu imaju nastanak neurološkog deficita teškog stepena moguće je primeniti kombinaciju afereze i visokih doza kortikosteroidne terapije primenjene intravenski [342, 349].

Primenu tehnika afereze kao inicijalne terapije relapsa u NMOSB trebalo bi razmotriti kod pacijenata sa poznatom istorijom NMOSB koji nisu imali povoljan terapijski odgovor na intravensku primenu visokih doza kortikosteroida, i/ili su ispoljili posebno dobar terapijski odgovor

na primenu afereze tokom prethodnih relapsa bolesti, ili kod onih pacijenata sa relapsom u vidu teškog oblika mijelitisa [342].

Rano započinjanje terapije relapsa u okviru NMOSB predstavlja imperativ, jer je nedvosmisleno pokazano da što je vreme koje protekne od momenta pojave relapsa do primene odgovarajuće terapije kraće, to su izgledi za bolji oporavak nastalog neurološkog deficita veći [345, 347, 348, 350].

### **1.10.2. Terapija za prevenciju pojave relapsa bolesti**

Kada su u pitanju poslednje preporuke koje se odnose na primenu dugoročne terapije u cilju prevencije relapsa bolesti, stav je da bi takav vid lečenja trebalo započeti odmah po postavljanju dijagnoze NMOSB [342]. Ovakav pristup svakako je opravdan i činjenicom da, za sada, ne postoje klinički ili paraklinički parametri u NMOSB kojima bi se, sa sigurnošću, mogli da predvide javljanje, broj i težina samih relapsa, bez obzira na to što su identifikovani mogući faktori rizika za pojavu relapsa [199, 234, 351]. Takođe, važna činjenica je da onesposobljenost u NMOSB predstavlja direktnu posledicu neurološkog deficita nastalog usled relapsa bolesti, posebno akumulacije takvog deficita usled ponavljanih relapsa, imajući u vidu da većina obolelih osoba upravo ima relapsnu formu NMOSB, dok je, sa druge strane, na raspolaganju sve veći broj lekova koji svoje terapijsko dejstvo ostvaruju delujući na različite etiopatogenetske aspekte bolesti, što se posebno odnosi na AQP4-IgG seropozitivnu formu NMOSB [2, 58, 199, 234, 342, 343, 352].

Lekovi koji se koriste u hroničnoj terapiji sa ciljem prevencije relapsa u NMOSB obuhvataju konvencionalne, odnosno klasične imunosupresivne lekove, kao i specifične oblike terapije u čijoj osnovi se nalazi monoklonsko antitelo [342].

#### **1.10.2.1. Klasični imunosupresivni lekovi**

Lekovi koji ostvaruju nespecifičnu imunosupresiju kao što su: oralni glukokortikoidi, azatioprin i mikofenolat mofetil, zadržali su svoju primenu u terapiji kako AQP4-IgG seropozitivnih, tako i seronegativnih formi NMOSB [342]. Svakako, radi se o lekovima koji se koriste dugi niz godina u terapiji adultnih i pedijatrijskih formi NMOSB, pokazujući određeni stepen efikasnosti u redukciji broja relapsa uz jasno profilisanje mogućih neželjenih dejstava, posebno tokom dugotrajne upotrebe [342, 353, 354].

Oralni glukokortikoidi se, prema preporukama, u hroničnoj terapiji za prevenciju relapsa NMOSB trebalo da koriste kao adjuvantna terapija, posebno kod osoba sa autoimunskim bolestima kao komorbiditetima, mada je istaknuto da u određenim sredinama u svetu, gde nisu dostupni drugi lekovi za lečenje NMOSB, glukokortikoidi i dalje koriste kao monoterapija [342]. Preporučena doza oralnih glukokortikoida za dugotrajnu primenu trebalo bi da bude manja od 7.5 mg/dan [342]. Svoj imunosupresivni efekat ostvaruju brzo, ali treba imati na umu da su česta neželjena dejstva limfopenija i hepatotoksičnost, a da se tokom dugotrajne primene mogu javiti komplikacije terapije kao što su: dijabetes melitus, hipertenzija, osteoporoza, gojaznost, kušingoidan izgled, katarakta i adrenalna insuficijencija [342, 354].

Azatioprin je lek koji se, pored terapije MS, već duže vremena koristi i za terapiju NMOSB u aktuelno preporučenim dozama od 2.5 - 3 mg/kg/dan [342, 355]. Međutim, vrlo je važno istaći da azatioprin svoj puni terapijski efekat ostvaruje za 6-12 meseci od momenta uvođenja, te se preporučuje njegovo preklapanje tokom prvih šest meseci sa oralnim glukokortikoidima, koji odmah ostvaruju svoj imunosupresivni efekat, čime se obezbeđuje terapijski kontinuitet [342, 356]. Česta neželjena dejstva azatioprina odnose se na pojavu limfocitopenije uz moguću pojavu i pancitopenije, hepatotoksičnosti, gastrointestinalnih smetnji, dok dugotrajna primena leka nosi

određene rizike za onkogenezu, posebno u vidu pojave maligniteta kože i imunoproliferativnih bolesti [342, 353, 355, 357].

Mikofenolat mofetil ima sličnu efikasnost, profil neželjenih dejstava i rizike tokom hronične terapije NMOSB kao azatioprin [342, 357]. Preporučene terapijske doze iznose od 1000 do 2000 mg/dan [342]. Međutim, vreme potrebno za postizanje punog terapijskog efekta je kraće u odnosu na azatioprin, i iznosi 6-12 nedelja, kada se takođe preporučuje preklapanje sa oralnim glukokortikoidima tokom prvih tri meseca od započinjanja lečenja [342, 358].

Uzimajući u obzir karakteristike ovih lekova kao klasičnih imunosupresiva, poslednje preporuke sugerišu da se oralni glukokortikoidi ne treba da koriste kao monoterapija u prevenciji relapsa NMOSB, osim u slučajevima kada nisu dostupne druge terapijske mogućnosti [342]. Takođe, pored tipičnih i čestih neželjenih dejstava ovih lekova njihova upotreba povećava i sklonost ka respiratornim, urinarnim i oportunističkim infekcijama [342].

### **1.10.2.2. Monoklonska antitela**

Kada je u pitanju biološka terapija, Rituksimab je jedno od prvih monoklonskih antitela koje je primenjeno u lečenju adultne i pedijatrijske forme NMOSB, i do sada jedino monoklonsko antitelo koje je, pored AQP4-IgG seropozitivnog NMOSB, pokazalo efikasnost i u seronegativnoj formi bolesti [342, 359]. Rituksimab je monoklonsko antitelo usmereno prema proteinima diferencijacije klastera - CD20, koji su eksprimirani na površini posebnog seta B limfocita, što za rezultat ima depleciju ovih ćelija unutar 4 nedelje od primene [342, 359]. Pun terapijski efekat Rituksimaba postiže se za 8-12 nedelja zbog čega se savetuje inicijalno uvođenje oralnih glukokortikoida u prvih nekoliko meseci od započinjanja lečenja kako bi se obezbedio terapijski kontinuitet [342]. Do sada je sprovedeno više studija koje su pokazale da se primenom Rituksimaba postiže smanjenje stope relapsa u NMOSB preko 80%, što ga čini efikasnim vidom terapije [342]. Međutim, kod određenog broja pacijenata obolelih od NMOSB koji su lečeni primenom Rituksimaba, a posebno kod onih kod kojih nije postignut očekivan stepen deplecije B limfocita i/ili nije ostvarena povoljna kontrola relapsa tokom lečenja, mogu se detektovati serumska antitela usmerena prema samom leku [342, 360]. U studiji koja je obuhvatila manju kohortu pacijenata sa NMOSB lečenih niskim dozama Rituksimaba pokazano je postojanje antitela prema Rituksimabu u serumu kod 36.9% ispitanika [361]. Kada su u pitanju neželjena dejstva tokom primene Rituksimaba, najčešće se opisuje postojanje mučnine, glavobolje i egzantema u vidu infuzionih reakcija [342, 357].

Sledeći lek koji ostvaruje depleciju B ćelija je Inebilizumab, odnosno humanizovano monoklonsko antitelo prema CD19 subpopulaciji B limfocita i plazma ćelijama [342]. Lek je odobren 2020 godine u USA, i 2022 godine u Evropi kao monoterapija, u lečenju AQP4-IgG seropozitivnog NMOSB [342, 362]. Smatra se da Inebilizumab svoj puni efekat ostvaruje unutar 6-8 nedelja od započinjanja terapije [342]. Tokom primene Inebilizumaba takođe su detektovana serumska antitela usmerena prema ovom leku u 14.7% lečenih, ali nije pokazan njihov značajan uticaj na terapijski efekat [363]. Najčešća neželjena dejstva Inebilizumaba vezana su za pojavu artralgijske i bola u leđima, glavobolje, infuzionih reakcija [342, 362].

Eculizumab je humanizovano monoklonsko antitelo usmereno prema C5 frakciji komplementa, blokirajući terminalnu reakciju sistema komplementa, čime ostvaruje svoj efekat u kompletno zavisnoj patogenezi NMOSB [234, 342]. Lek je odobren za lečenje AQP4-IgG seropozitivnog NMOSB tokom 2019 godine u USA, dok je u Evropi odobren iste godine za relapsne forme bolesti, nakon analize rezultata randomizovane placebo kontrolisane pilot studije [364-367]. Eculizumab svoj efekat ostvaruje vrlo brzo nakon primene i pokazao se efikasnim u kontroli pojave relapsa u NMOSB [365]. Serumska antitela prema Eculizumabu su detektovana tokom primene leka ali se smatra da ne utiču na njegovu terapijsku aktivnost [342]. Jedno od

najčešćih neželjenih dejstava Eculizumaba je glavobolja dok se ređe javljaju bol u leđima, dijareja i mučnina [357].

Još jedan od terapijskih agenasa koji svoje dejstvo ostvaruje inhibicijom C5 frakcije komplementa u tretmanu NMOSB je monoklonsko antitelo ravulizumab, koje ima dug poluzivot i vrši gotovo potpunu inhibiciju reakcije sistema komplementa vrlo brzo nakon administracije prve doze leka [342]. Dakle, prvi rezultati placebom kontrolisane randomizovane studije ukazuju na to da ravulizumab predstavlja potentan i efikasan lek kada je u pitanju kontrola pojave relapsa u NMOSB, odnosno da je tokom godinu dana praćenja efikasnosti leka postignuta potpuna kontrola bolesti, odnosno da nisu zabeleženi relapsi u grupi pacijenata tretiranih ravulizumabom [342, 368]. Svakako, ekstenzija ove studije je u toku, ali postoji konsenzus da ravulizumab i eculizumab verovatno predstavljaju terapijske opcije sličnih profila u okviru iste klase lekova za lečenje NMOSB [342]. Ravulizumab je nedavno odobren u Evropi za lečenje pacijenata sa AQP4-IgG seropozitivnim NMOSB [342].

Satralizumab je monoklonsko antitelo koje je specifično usmereno na IL-6 receptor (IL-6-R) blokirajući tako dejstvo IL-6 koji je, između ostalog, važan induktor aktivacije B limfocita u patogenezi NMOSB [198, 234, 342]. Satralizumab je tokom 2020 godine u USA, i 2021 godine u Evropi, odobren za terapiju AQP4-IgG seropozitivnih formi NMOSB kod odraslih pacijenata i adolescenata uzrasta 12 i više godina, a na osnovu rezultata dve stožerne studije koje su se bavile procenom efikasnosti i bezbednosti satralizumaba kao terapije prve linije, ili kao adjuvantne terapije [342, 369, 370]. Smatra se da satralizumab ostvaruje svoj puni terapijski efekat nakon 8-12 nedelja, dok je tokom perioda praćenja od preko 4 godine pokazano da više od 70% pacijenata lečenih ovim lekom u studiji nije imalo relapse NMOSB [371]. Takođe, između 41% i 71% pacijenata lečenih satralizumabom detektovana su serumska antitela prema ovom leku za koje nije pokazano da utiču na njegovu efikasnost [342].

Tocilizumab predstavlja takođe humanizovano monoklonsko antitelo na IL-6-R [342]. Studije koje su ispitivale efikasnost tocilizumaba u prevenciji relapsa u NMOSB uglavnom su obuhvatale pacijente prethodno lečene klasičnim imunosupresivnim lekovima ili rituksimabom, kada je svakako pokazana efikasnost ovog leka [342]. Još uvek nedostaju podaci o efikasnosti i neželjenim dejstvima tocilizumaba kao prve terapijske linije u NMOSB [342].

Uvođenje biološke terapije u cilju prevencije i kontrole relapsa u NMOSB upotrebom monoklonskih antitela predstavlja izuzetno važan korak u borbi protiv onesposobljenosti i teškog neurološkog deficita kao kliničkih karakteristika ove bolesti, zbog čega je potrebno poznavanje adekvatnih indikacija, terapijskih doza, čestih neželjenih dejstava i komplikacija lečenja monoklonskim antitelima, uključujući potrebu za adekvatnim kliničkim i parakliničkim monitoringom shodno važećim preporukama [342, 343].

Preporuke za doziranje bioloških lekova u prevenciji relapsa u NMOSB, i moguće komplikacije tokom njihove primene prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. Doze bioloških lekova u NSMOB, rizici i komplikacije terapije

<b>Lek</b>	<b>Doza i način primene</b>	<b>Mogući rizici i komplikacije terapije</b>
Rituksimab	Inicijalna doza 1000 mg intravenski 1. i 14. dana lečenja. Potom 500-1000mg na 6 meseci.	Infuziono zavisne pseudoalergijske reakcije, leukopenija, neutropenija, hipogamaglobulinemija. Sklonost ka respiratornim, urinarnim i oportunističkim infekcijama. Moguća reaktivacija B hepatitisa.
Inebilizumab	Inicijalna doza 300mg intravenski 1. i 14. dana lečenja. Potom 300mg na 6 meseci.	Infuziono zavisne pseudoalergijske reakcije, leukopenija, neutropenija, odložena neutropenija, hipogamaglobulinemija. Sklonost ka respiratornim, urinarnim i oportunističkim infekcijama. Moguća pojava progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML).

Ekulizumab	Inicijalna doza 900mg/nedeljno intravenski tokom 3 nedelje, potom 1200mg/nedeljno u 4. nedelji, potom 1200mg na dve nedelje.	Infuziono zavisne reakcije, leukopenija, anemija. Sklonost ka infekcijama inkapsuliranim bakterijama (uključujući meningokokne infekcije) i sklonost ka gljivičnim infekcijama.
Ravulizumab	Inicijalna doza obično iznosi 2400-3000mg intravenski 1. i 15. dana, potom 3000-3600mg na 8 nedelja	Infuziono zavisne reakcije, leukopenija, anemija. Sklonost ka infekcijama inkapsuliranim bakterijama (uključujući meningokokne infekcije) i sklonost ka gljivičnim infekcijama.
Satralizumab	Inicijalna doza 120mg/nedeljno supkutano u 0, 2. i 4 nedelji, potom 120mg na 4 nedelje	Neutropenija, trombocitopenija, hiperlipidemija (porast holesterola i triglicerida), abnormalnosti u hepatogramu. Sklonost uglavnom ka blagim do umereno teškim infekcijama (nisu zabeležene oportunističke infekcije)
Tocilizumab	6-8mg/kg intravenski na 4-6 nedelja (moguća i supkutana primena)	Neutropenija, trombocitopenija, hiperlipidemija (porast holesterola i triglicerida), abnormalnosti u hepatogramu, infuzione i alergijske reakcije. Moguća pojava divertikulitisa i intestinalne perforacije. Sklonost ka infekcijama respiratornog i urinarnog trakta.

Adaptirano prema Kümpfel i sar. 2024 [342]

Isto tako, primena intravenskih imunoglobulina (IVIG) u dozi od 1g/kg na 4 nedelje pokazala je određene pozitivne efekte u kontoli relapsa u NMOSB, kada je primenjena kod dece i osoba u slučaju postojanja kontraindikacija za primenu ostale terapije [342]. U zavisnosti od modaliteta lečenja, pokazano je da IVIG u kombinaciji sa drugim lekovima, kao što je na primer azatiprin, ima takođe pozitivan efekat u prevenciji relapsa u NMOSB [372]. Primena drugih lekova i vidova lečenja kao što je metotreksat takođe mogu imati mesta u terapiji prevencije relapsa, posebno kod osoba sa reumatološkim komorbiditetima i kontraindikacijama za primenom bioloških lekova, kao i mogućnost sprovođenja intermitentne afereze (TIP), najčešće u kombinaciji sa klasičnim imunosupresivnim lekovima u cilju postizanja kontrole bolesti u odsustvu drugih terapijskih opcija [342, 373, 374].

Imajući sve navedeno u vidu, aktuelno izdate preporuke koje se odnose na hroničnu primenu terapije kod dvostruko seronegativnog NMOSB sugerišu da se, ka prva terapijska linija nakon prvog teškog ili ponovljenog relapsa, mogu da koriste neki od klasičnih imunosupresivnih lekova, ili rituksimab i da, ukoliko izostane povoljan terapijski efekat, ove lekove treba kombinovati sa primenom rituksimaba [342]. Ukoliko kombinacija nekog od klasičnih imunosupresivnih lekova sa rituksimabom takođe ne postigne zadovoljavajući efekat u kontroli relapsa NMOSB, prema dosadašnjim saznanjima, trebalo bi pokušati lečenje tocilizumabom ili nekim dostupnim eksperimentalnim vidom lečenja [342].

Posebni naponi okrenuti su principima vezanim za značaj planiranja porodice, trudnoće i dojenja kod osoba ženskog pola obolelih od NMOSB i primene terapije za prevenciju relapsa bolesti [342]. Važno je istaći da bi osobe ženskog pola u generativnom periodu koje su obolele od NMOSB trebalo da planiraju trudnoću u konsultaciji sa neurologom u fazama remisije bolesti, kao i da je generalni stav eksperata da hronična primena lekova u kontroli relapsa bolesti ne bi trebalo da se prekida ili odlaže [342, 375, 376]. Naime, lekovi za koje je pokazan jasan teratogeni efekat kao što su mikofenolat mofetil i metotreksat ne treba da se koriste, ukoliko je to moguće, kod ove subpopulacije pacijenata a svakako ne u periodu trudnoće i dojenja [342, 376]. Zatim, lekovi kao što su azatioprin ili monoklonska antitela, na osnovu savremenih stavova, mogli bi da se primenjuju u trudnoći sa ciljem kontrole pojave relapsa u NMOSB, ali odluka lekara i obolele osobe o njihovoj

primeni mora prethodno da obuhvati analizu svih relevantnih kliničkih i parakliničkih karakteristika bolesti svake pacijentkinje ponaosob, kao i profil dostupnih lekova uz adekvatan monitoring tokom trudnoće od strane neurologa i ginekologa [342, 376]. Ukoliko se sa primenom terapija za prevenciju relapsa u NMOSB prestane tokom trudnoće, preporuke ističu da bi terapiju trebalo nastaviti što pre nakon porođaja u cilju kontrole bolesti [342].

### **1.11. Prognoza i ishod neuromijelitis optika spektra bolesti**

Prognoza NMOSB kao i preživljavanje obolelih od NMOSB predstavljaju važne pokazatelje toka bolesti kojima se, još jednom, ističe neophodnost ranog postavljanja pouzdane dijagnoze, potom ranog započinjanja adekvatne terapije kako relapsa, tako i dugoročnog lečenja u cilju prevencije pojave relapsa u okviru NMOSB, odnosno pojave neurološkog deficita koji tipično za ovu bolest, vodi do razvoja onesposobljenosti i potencijalno do životno ugrožavajućih komplikacija [2, 58, 62, 199, 234, 342, 345]. Najčešći način kojim se meri i prati stepen neurološke onesposobljenosti u NMOSB svakako je primena proširene skale stepena onesposobljenosti (engl. *Expanded Disability Status Scale*, EDSS) na isti način kao kod obolelih od MS [342, 377].

Tako je, na primer, u studiji koja je obuhvatila kohortu srpskih pacijenata kojima je dijagnoza NMOSB postavljena prema aktuelno važećim dijagnostičkim kriterijumima iz 2015 godine, pokazano da tokom perioda praćenja (opseg 0.5-34.5 godina) njih 58.5% dostiglo EDSS 4.0, dok je EDSS 7.0 dostiglo 43.2% obolelih čija medijana praćenja je iznosila 6.5 godina, odnosno 22 godine [2, 58]. Takođe, tokom ovog perioda praćenja preminulo je 9.5% pacijenata obolelih od NMOSB, od čega je kod više od polovine njih uzrok smrti bila respiratorna insuficijencija u okviru NMOSB [58]. Prema tome, u ovoj studiji, procenjeno je da verovatnoća preživljavanja u NMOSB nakon pet godina iznosi 98.6%, dok nakon 20 godina trajanja bolesti ona iznosi 63%, kao i da su rani prognostički faktori dužeg preživljavanja u NMOSB, između ostalog, mlađi uzrast na početku bolesti, kraće vreme od pojave simptoma bolesti i započinjanja lečenja, simptomi APS na početku bolesti [58].

### **1.12. Kvalitet života obolelih od neuromijelitis optika spektra bolesti**

Koncept kvaliteta života obolelih od NMOSB predstavlja multidimenzioni sistem, odnosno pristup kojim pokušava da se sagleda opterećenje čitavog spektra simptoma i znakova, koji su međusobno povezani i nalaze se u bidirekcionoj vezi sa bolešću pa tako, mogu imati vrlo važan uticaj na sve sfere funkcionisanja obolelih osoba [293, 378-380].

Analiza različitih domena koji mogu uticati na kvalitet života osoba obolelih od NMOSB postiže se brojnim alatima i baterijama testova i upitnika kojima se procenjuje stepen opterećenja koji postojanje bolesti može imati na psihičke, somatske, psihosocijalne i ekonomske aspekte života sa jedne strane, kao i doživljaj obolele osobe u odnosu na takav uticaj bolesti sa druge strane [379-384].

Rezultati nedavno objavljene studije su ukazali da kvalitet života povezan sa zdravljem može biti značajno narušen posle samo jednog relapsa u NMOSB čime je, takođe, istaknuta važnost rane primene adekvatne terapije u prevenciji nastanka relapsa u ovoj bolesti [385].

## 2. CILJEVI

Ciljevi ove doktorske disertacije su sledeći:

1. Analiza gena *AQP4* kod obolelih od NMOSB i MS
2. Analiza čitavog egzoma obolelih od NMOSB
3. Korelacija genetičkih markera sa kliničkim karakteristikama osoba obolelih od NMOSB
4. Procena kvaliteta života i autonomnih poremećaja kod obolelih od NMOSB i MS.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalni deo istraživanja

##### 3.1.1. Materijal

Eksperimentalni deo ovog istraživanja obuhvatio je 64 uzoraka DNK pacijenata obolelih od NMOSB, zatim, 40 uzoraka DNK pacijenata obolelih od MS, kao i 100 uzoraka DNK zdravih ispitanika, koji su činili kontrolnu grupu. Istraživanjem su obuhvaćeni uzorci DNK pacijenata kojima je dijagnoza NMOSB ili MS postavljena prema aktuelno važećim dijagnostičkim kriterijumima Wingerchuk i sar. 2015 godine za NMOSB [2], odnosno, prema aktuelno važećim dijagnostičkim kriterijumima za MS iz 2017 godine [335]. Uzorci DNK pacijenata obolelih od NMOSB i MS kolektovani su u Klinici za neurologiju UKCS, u Klinici za neurologiju Kliničkog centra Vojvodine, kao i u Klinici za neurologiju Kliničko bolničkog centra Rebro u Zagrebu, Republika Hrvatska u periodu od maja 2018 do januara 2020 godine. Uzorci DNK zdravih ispitanika kolektovani su u Klinici za neurologiju UKCS.

Sekvenciranje gena za AQP4, obavljeno je u Laboratoriji za molekularnu i genetičku dijagnostiku neuroloških bolesti u Klinici za neurologiju UKCS, i obuhvatilo je uzorke DNK 64 pacijenata sa NMOSB, 40 uzoraka DNK pacijenata obolelih od MS, kao i uzorke DNK 100 zdravih osoba. Za istih 64 uzoraka DNK pacijenata obolelih od NMOSB, analiza čitavog egzoma obavljena je u Institutu za genomsku medicinu Univerzitetskog kliničkog centra u Ljubljani, Republika Slovenija u okviru interuniverzitetske saradnje.

##### 3.1.2. Metode eksperimentalnog istraživanja

Pacijentima, koji su bili uključeni u ovo istraživanje, venepunkcijom je uzorkovano 10ml periferne krvi u komercijalno dostupnim epruvetama gde je kao antikoagulans korišćen natrijum citrat (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, Na-citrat) ili etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA). Uzorci krvi, do izolacije DNK, bili su skladišteni na temperaturi od -20 stepeni po Celzijus-u (°C).

##### 3.1.2.1. Izolacija genomske dezoksiribonukleinske kiseline

Izolacija genomske DNK, svih ispitivanih uzoraka, vršena je na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, metodom izolovanja po Miller-u [386]. Dvodnevni protokol primenjene metode izolovanja DNK iz limfocita uzoraka periferne krvi obuhvata više koraka koji su prikazani u Tabeli 3 [386].

Tabela 3. Protokol metode izolovanja DNK

1. DAN	Korak 1 – uzorak od 10ml periferne krvi (iz epruvete sa Na-citratom ili EDTA) sjediniti sa istom količinom pufera za lizu <sup>a</sup> . Inkubirati na 4°C tokom 15-20 minuta.
	Korak 2 – nakon inkubacije, smešu centrifugirati tokom 15 minuta (2000 obrtaja/minut). Odliti supernatant. Izvršiti resuspenziju taloga dodavanjem 10 ml fiziološkog pufera.
	Korak 3 – ponoviti postupak iz drugog koraka 2-3 puta dok se makroskopski ne uoči pojava belog taloga nakon centrifugiranja.

	Korak 4 – odbaciti supernatant nakon poslednjeg centrifugiranja iz prethodnog koraka. Belom talogu dodati 3 ml pufera A <sup>b</sup> , potom 50 mikrolitara (µl) 10% enzima proteinaze K, dodati i 200 µl 10% natrijum-dodecilsulfata. Uzorak se vorteksuje i inkubira tokom 12-18h na 37°C.
2. DAN	Korak 5 – narednog dana, nakon inkubacije, dodati 1 ml natrijum hlorida (NaCl, rastvor 6 mola (6 M)), promućkati svaki uzorak po 15 sekundi, potom centrifugirati tokom 15 minuta (3000 obrtaja/minut).
	Korak 6 – supernatant dobijen centrifugiranjem tokom prethodnog koraka pažljivo (bez zahvatanja taloga) prebaciti u novu čistu epruvetu. Centrifugirati tokom 15 minuta (4000 obrtaja/min).
	Korak 7 – supernatant dobijen centrifugiranjem tokom prethodnog koraka pažljivo prebaciti u novu čistu epruvetu. Dodati istu količinu izopropanola. Lagano izvrtati epruvetu sve dok se u smeši golim okom ne primeti pojava beličastog filameta ili bele oblačaste kolekcije.
	Korak 8 – Beličasti filament/oblačastu kolekciju pokupiti staklenim štapićem i potopiti u 70% etil alkoholu tokom 30 sekundi. Ostaviti uzorak da se osuši na sobnoj temperaturi tokom 30-40 minuta.
	Korak 9 – Nakon sušenja uzorak rastvoriti u 300 µl redestilovane vode. Uzorak čuvati na -20°C.

Legenda: a – Pufer za lizu: 0.32 M Saharoza + 10 milimola (mM) hidroksimetil aminometan hidrohlorid hlorovodonične kiseline (TRIS HCL) + oktil fenol etoksilat 1% (TRITON) + 5 mM magnezijum-hlorida (MgCl<sub>2</sub>); b – Pufer A: 10 mM TRIS HCL – 400 ml NaCl + 2mM EDTA; Modifikovano prema Miller-u [386].

### 3.1.2.2. Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane DNK

Nakon izolacije genomske DNK, a pre sprovođenja bilo kojih metoda molekularno genetičkih analiza, pristupilo se merenju koncentracije i proveru kvaliteta izolovane DNK.

Koncentracija izolovane DNK određivana je za svaki uzorak posebno, tako što je prethodno pripremljeno po 50 µl razblaženja uzorka DNK u dejonizovanoj vodi (5 µl DNK izolata i 45 µl dejonizovane vode; odnos 1:10). Potom je celokupna količina razblaženog izolata DNK, odnosno 50 µl, prebačena u plastičnu kivetu (*Uvette, Eppendorf, Savezna Republika Nemačka*). Prethodno je na spektrofotometru (*BioPhotometer, Eppendorf, Savezna Republika Nemačka*) podešena apsorbanca dejonizovane vode kao slepe probe (50 µl). Zatim je, za svaki uzorak, izmerena koncentracija navedenog razblaženja na spektrofotometru sa prikazanim odnosom apsorbanca.

### 3.1.2.3. Sekvenciranje odabranih regiona gena *AQP4*

Proces sekvenciranja odabranih regiona gena *AQP4* od istraživačkog interesa (egzoni: 1, 2, 3, 4 i 5) obuhvatio je njihovu amplifikaciju, potom proveru kvaliteta i specifičnosti amplifikata, zatim proces sekvenciranja i obrade produkata sekvenciranja kao i njihovu analizu putem kapilarne elektroforeze i softversku obradu dobijenih podataka.

### 3.1.2.3.1. Lančana reakcija polimeraze

Za amplifikaciju odabranih regiona gena *AQP4* od istraživačkog interesa (egzoni: 1, 2 (deo 2a i deo 2b), 3, 4, 5) korišćena je lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Generalno, PCR ciklus se sastoji od 3 osnovna koraka koji se, u *in vitro* uslovima, sukcesivno ponavljaju više puta:

1. Dentaturacija DNK: Primenom visoke temperature smeše dolazi do raskidanja vodoničnih veza između dva antiparalelna polinukleotidna lanca DNK, odnosno postiže se termalna denaturacija DNK molekula čime se dobijaju jednolančani DNK molekuli.
2. Hibridizacija prajmera: predstavlja vezivanje specifičnih prajmera, odnosno oligonukleotidnih sekvenci dužine 14-40 bp, za komplementarne jednolančane sekvence prethodno denaturisane DNK. Prajmeri se specifično dizajniraju i imaju za cilj da ograniče sekvencu od interesa i omoguće njoj komplementarnu sintezu DNK fragmenata u sledećem koraku.
3. Elongacija: Poslednji korak PCR ciklusa predstavlja polimerizaciju novih lanaca DNK pomoću termostabilnog enzima *Taq* polimeraze čija poziciona aktivnost je određena prajmerima. Naime, novosintetisane DNK sekvence su komplementarne matičnom DNK lancu i određene su pozicijom prajmera.

U Tabeli 4. prikazane su sekvence prajmera korišćenih u PCR reakciji za amplifikaciju regiona od interesa gena *AQP4*, kao i dužine PCR produkata. Prajmeri za ovu PCR reakciju su dizajnirani pomoću Primer 3 softvera (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

Tabela 4. Sekvence prajmera i dužina PCR produkata

Egzon	Oznaka prajmera <sup>a</sup>	Sekvenca prajmera	Dužina produkta
1	F	5'CCACCCCTAACACTCCAAA3'	232bp
	R	5'TGCCTAAGAAGGCACAAACA3'	
2a	F	5'CCTGGGTGTAGTGGCTTCTG3'	357bp
	R	5'AGACTTGGCGATGCTGATCT3'	
2b	F	5'TTGCTTTGGACTCAGCATTG3'	269bp
	R	5'TGCAAGAAGCTTGGAGTCCT3'	
3	F	5'TCATCGAAAATACTCTTGCTTCA3'	281bp
	R	5'CAGGCCAGCTAGAGTGAGGA3'	
4	F	5'TGACAGCAAATTGCAATGAA3'	222bp
	R	5'GAGCCCCACAGGTAATTGTC3'	
5	F	5'GCTGCTCAATGGAATAGCTT3'	399bp
	R	5'TGGAAGGAAATCTGAGGACAG3'	

Legenda: a – F: ushodni prajmer (engl. *Forward*), R: nishodni prajmer (engl. *Reverse*); bp – bazni par.

Za PCR amplifikaciju egzona 1, 3 i 4 gena *AQP4* korišćen je Protokol A za izradu PCR smeše, dok je smeša za PCR amplifikaciju egzona 2a, 2b i 5 gena *AQP4* pravljen prema Protokolu

B. Komponente PCR smeše prema Protokolu A i B, kao i finalne koncentracije svakog pojedinačnog sastojka prikazani su u Tabeli 5.

Tabela 5. Sastav PCR smeše i koncentracija sastojaka u PCR smeši

Komponente reakcione smeše	Finalna koncentracija	
	Protokol A	Protokol B
PCR buffer <sup>a</sup>	1x Pufer A	1x Pufer B
10 mM dezoksiribonukleotida (dNTPs, <i>Thermo Scientific</i> , SAD)	0.2 mM svakog nukleotida	
Ushodni prajmer	0.4 pmol/μl	0.4 pmol/μl
Nishodni prajmer	0.4 pmol/μl	0.4 pmol/μl
Taq polimeraza <sup>b</sup>	0.4 U	0.5 U
DNK	20 ng	20 ng
Dejonizovana voda	po potrebi	po potrebi
Ukupna zapremina	10 μl	10 μl

Legenda: a - PCR Buffer A: 10x *Dream Taq* pufer (KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, tačan odnos komponenti nije dostupan u deklaraciji proizvođača: *Thermo Scientific*, SAD); Buffer B: 5x *MyTaq* pufer (5 mM dNTPs, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, stabilizatori i pojačivači; *Meridian Bioscience*, SAD).

b - *DreamTaq* polimeraza: (20 mM Tris-HCL (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20 i 50% (v/v) glycerol; *Thermo Scientific*, SAD),

*MyTaq* polimeraza (sastav polimeraze nije dostupan u deklaraciji proizvođača, *Meridian Bioscience*, SAD). DNK – dezoksiribonukleinska kiselina; dNTP – dezoksiribonukleotid trifosfat (engl. *deoxyribonucleotide-triphosphate*); PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*); SAD – Sjedinjene Američke Države;

Nakon izrade PCR smeše pristupilo se izvođenju PCR reakcija u tubicama od 0.2 ml u aparatima *Verity® Thermal Cycler* (*Aplied Biosystems*, SAD), prema programu koji je prikazan u Tabeli 6. Nakon završenog procesa PCR reakcije uzorci su skladišteni u frižideru na temperaturi od +4°C.

Tabela 6. PCR program za amplifikaciju ciljanih egzona gena *AQP4*

Inicijalna denaturacija	94 °C/5 min	1 ciklus
Denaturacija	94 °C/30 s	10 ciklusa
Hibridizacija	60 °C/30 s	
Elongacija	72 °C/45 s	
Denaturacija	94 °C/30 s	20 ciklusa
Hibridizacija	60 °C <sup>a</sup> /30 s <sup>b</sup>	
Elongacija	72 °C/60 s	
Denaturacija	94 °C/30 s	10 ciklusa
Hibridizacija	50 °C <sup>a</sup> /30 s	

Elongacija	72 °C/45 s	
Finalna elongacija	72 °C/10 min	1 ciklus

Legenda: a – ''Touch down'' program za sve egzone gena *AQP4* iznosio je 60°C - 50°C; b – Temperatura hibridizacije se snižava za 0.5°C u svakom narednom ciklusu (*touchdown PCR*);

### 3.1.2.3.2. Provera PCR produkata

Nakon završene PCR reakcije pristupilo se proveriti kvaliteta i specifičnosti dobijenih PCR produkata metodom gel elektroforeze na 2% agaroznom gelu, čiji postupak izrade kao i protokol gel elektroforeze su prikazani u Tabeli 7. Za proces gel elektroforeze korišćen je sistem *HE 33 Mini Submarine* (*GE Healthcare*, Kraljevina Švedska).

Tabela 7. Postupak izrade 2% agaroznog gela i protokol za gel elektroforezu

Koraci	POSTUPAK ZA IZRADU AGAROZNOG GELA
1.	Odmeriti 2 grama agaroze <sup>a</sup> i dodati 100 ml 1xTBE <sup>b</sup> pufera. Lagano pomešati. Rastvor zagrevati do ključanja. Potom ohladiti na 40°C.
2.	Dodati 5 µl Midori Green boje <sup>c</sup> i lagano pomešati dok se boja ne sjedini.
3.	Gel naliti u kadicu za elektroforezu i ostaviti da polimeriše na sobnoj temperaturi (25-30 minuta).
	PROTOKOL ZA GEL ELEKTROFOREZU
4.	4 µl PCR produkta pomešati sa markerom <sup>d</sup> i puferom <sup>e</sup> za nalivanje uzoraka (odnos 5:1) i naneti u bunarić gela. Tako za svaki ispitivani uzorak posebno.
5.	Gel elektroforezu izvesti u 0.5x TBE sistema za elektroforezu pri konstantnom naponu struje (90V). Otpor treba da iznosi 90 miliampera (mA). Trajanje procedure: 15 minuta.

Legenda: a – Upotrebljena je agarozna proizvođača *Serva* (Savezna Republika Nemačka); b – 1xTBE: 45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8.0; c – Upotrebljena je *Midori Green* boja proizvođača *Nippon Genetics*, (Savezna Republika Nemačka); d – Marker: *GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder*, 50-1000 bp, *Fermentas*, (Savezna Republika Nemačka); e – pufer: 0,25% bromfenolplavo (w/v), 30% glicerol (v/v);

Nakon završene gel elektroforeze za vizualizaciju produkata PCR amplifikacije na 2% agaroznom gelu, upotrebljen je UV transiluminator E-BOX VX5 (*Vilber Lourmat*, Francuska), na UV svetlu od 240 nm. Pored toga što je svaki ispitivani gel bio prikazan na ekranu aparata tokom transiluminacije, vršeno je i njegovo fotografisanje integrisanom kamerom zatvorenog transiluminatora. Analiza kvaliteta i dužine fragmenata nakon PCR amplifikacije vršena je u odnosu na marker (*GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder*, 50-1000 bp, *Fermentas*, Savezna Republika Nemačka) kao i u odnosu na očekivane dužine i broj traka PCR amplifikata na 2% agaroznom gelu koji su međusobno poređeni.

### 3.1.2.3.3. Prečišćavanje produkata PCR reakcije

Nakon provere specifičnosti amplifikata egzona gena *AQP4* procesom gel elektroforeze na 2% agaroznom gelu i procene njihovog kvaliteta, pristupilo se prečišćavanju produkata PCR reakcije. U ovom postupku upotrebljen je enzim egzonnukleaza I (engl. *Exonuclease I*, Exo I), (proizvođač: *Thermo Scientific*, SAD) kojom se uklanja višak prajmera nakon PCR amplifikacije,

kao enzim termosenzitivna alkalna fosfataza (engl. *Thermosensitive alkaline phosphatase*, FastAP), (proizvođač: *Thermo Scientific*, SAD) kojim se vrši defosforilacija nukleotida. Način obrade uzoraka i program prečišćavanja PCR produkata prikazani su u Tabeli 8. Uzorci su nakon reakcije prečišćavanja produkata skladišteni na +4°C do sprovođenja sekvenciranja.

Tabela 8. Priprema i prečišćavanje produkata PCR reakcije

Priprema reakcione smeše	U 5 µl svakog PCR produkta dodato je po 1.5 µl smeše enzima Exo I i FastAp, (odnos 1:2)
Program enzimske reakcije <sup>a</sup>	Enzimska reakcija prečišćavanja: Zagrevanje smeše na 37°C tokom 15 minuta
	Reakcija deaktivacije enzima: Zagrevanje smeše na 80 °C tokom 15 minuta

Legenda: a – Reakcija je sprovedena u aparatu *Verity® Thermal Cyclers (Applied Biosystems, SAD)*.

### 3.1.2.3.4. Sekvenciranje gena *AQP4*

Za potrebe sekvenciranja egzona 1, 2, 3, 4 i 5 gena *AQP4* korišćena je metoda sekvenciranja po Sanger-u, kao metoda koja omogućava tačno i precizno utvrđivanje primarne strukture DNK, odnosno određivanje redosleda nukleotida u polinukleotidnom lancu [137]. Princip sekvenciranja metodom po Sanger-u bazira se na primeni fluorescentno obeleženih dideoksiribonukleotid trifosfata (ddNTP), koji na svom 3' kraju umesto hidroksilne (OH) grupe sadrže jon vodonika, te ugradnjom ovakvih nukleotida na 5' kraju prethodnog dNTP prestaje sinteza polinukleotidnog lanca, koju vrši DNK polimeraza komplementarno matičnom DNK lancu iz ispitivanog uzorka, jer nedostaje OH grupa na 3' kraju ddNTP kojom bi se omogućilo formiranje diestarske veze sa narednim nukleotidom i omogućila dalja elongacija replikacije [137]. Kako se u reakcionoj smeši nalazi dovoljna količina dNTP i ddNTP, tako DNK polimeraza neselektivno ugrađuje ove nukleotide u rastući lanac komplementarno ispitivanoj DNK matrici što, na kraju reakcije, rezultira pojavom mase fragmenata različite dužine u odnosu na matični DNK lanac (u zavisnosti od toga u kojem momentu je došlo do terminacije elnogacije ugradnjom ddNTP-a za svaki fragment komplementaran DNK matičnom lancu).

Sastav reakcione smeše za proces sekvenciranja regiona od interesa *AQP4* gena, kao i program sekvenciranja prikazani su u Tabeli 9. Reakcija je izvršena u aparatu *Verity® Thermal Cyclers (proizvođač: AppliedBiosystems, SAD)*. Nakon završene reakcije sekvenciranja produkti su skladišteni na +4°C.

Tabela 9. Sastav reakcione smeše i program sekvenciranja regiona gena *AQP4*

SASTAV REAKCIONE SMEŠE	
Komponente <sup>a</sup>	Količina
BigDye <sup>TM</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100	0.5 µl
BigDye <sup>TM</sup> Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	1.5 µl
Prajmer (10 pmola/µl)	0.4 µl
PCR produkt	x
Dejonizovana voda	do 10 µl <sup>b</sup>
PROGRAM SEKVENCIRANJA	

Inicijalna denaturacija: zagrevanje smeše na 96 °C tokom 60 sekundi
Ciklus amplifikacije: 1) Denaturacija: zagrevanje smeše na 96°C tokom 10 sekundi 2) Hibridizacija: zagrevanje smeše na 50°C tokom 5 sekundi 3) Elongacija: zagrevanje smeše na 60°C tokom 4 minuta
Ukupan broj ciklusa amplifikacije: 25

Legenda: a – Za izradu reakcione smeše korišćene su komponente komercijalnog kita: *BigDye™ Terminator Ready Reaction*, (proizvođač: *Applied Biosystems*, SAD). b – ukupna količina smeše po ispitivanom uzorku iznosila je 10 µl; x - Količina PCR produkta koja se dodaje je 3-10 ng za PCR produkte od 200-500 bp i 10-40 ng za PCR produkte od 500-1000 bp;

### 3.1.2.3.5. Prečišćavanje produkata sekvenciranja

Prečišćavanje dobijenih produkata obavljeno je nakon završenog procesa sekvenciranja korišćenjem metode precipitacije fragmenata kojom se, pre svega, odstranjuju nevezani ddNTP a sami fragmenti se denaturišu u jednonlačane DNK sekvence, čime se obezbeđuje mogućnost analize redosleda nukleotida putem primene kapilarne elektroforeze. Proces precipitacije, odnosno prečišćavanja produkata reakcije sekvenciranja, sastojao se od 6 koraka koji su prikazani u Tabeli 10. Nakon završenog procesa precipitacije uzorci su čuvani na +4°C.

Tabela 10. Proces prečišćavanja produkata reakcije sekvenciranja

1. Korak	Svakom uzorku (produkt reakcije sekvenciranja u ukupnoj zapemini od 10 µl) dodato je 10 µl dejonizovane vode, potom, 50 µl 99% etil alkohola kao i 2 µl natrijum-acetata (3M). Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta.
2. Korak	Smeša je centrifugirana na 13 000 obrtaja/min tokom 15 minuta. Supernatant je odstranjen.
3. Korak	U uzorke je dodato po 70 µl 70% etil alkohola. Potom je smeša centrifugirana na 13 000/min tokom 10 minuta. Supernatant je odstranjen.
4. Korak	Precipitat je zagrevan na 90°C tokom 2 minuta (proces sušenja produkata sekvenciranja)
5. Korak	Precipitatu svakog ispitivanog uzorka dodato je po 15 µl dejonizovanog Formadida <sup>a</sup> Uzorci su vorteksovani u trajanju 2-4 sekunde.
6. Korak	Smeša je zagrejana na 95°C tokom 2 minuta (izvršen je proces termalne denaturacije fragmenata DNK).

Legenda: a - HiDi™ Formamide (proizvođač: *AppliedBiosystems*, SAD).

### 3.1.2.3.6. Kapilarna elektroforeza i analiza produkata sekvenciranja

Daljim postupkom, nakon reakcije sekvenciranja i prečišćavanja produkata reakcije sekvenciranja precipitacijom, primenjena je analiza dobijenih fragmenata putem kapilarne elektroforeze na aparatu *ABI3500 Genetic Analyzer* (proizvođač: *AppliedBiosystems*, SAD) sa kapilarnom od 50 cm. Svi fragmenti ispitivanih uzoraka su analizirani kapilarnom elektroforezom po principu molekularne disekcije, uz pomoć automatskog sistema sastavljenog od lasera koji pobuđuje fluorescenciju svakog pojedinačnog ddNTP/fragmenta tokom njegovog prolaska kroz polimerom ispunjen kapilar elektroforeze, gde se su fragmenti razdvajaju po dužini, i fluorescentne kamere koja beleži njihov redosled, tip i intenzitet za nukleotid specifične fluorescencije, čime se,

finalnom softverskom obradom, stiče uvid u redosled nukleotida kompletne ispitivane sekvence, odnosno ispitivanog matričnog lanca DNK [387].

Elektroforeza je vršena na 19,5 kV i 60 °C, injekciono vreme je bilo 2 s, a injekciona voltaža 1 kV. Za elektroforezu je korišćen polimer POP7 (proizvođač: *AppliedBiosystems*, SAD). Monitoring ovog procesa i prikupljanje dobijenih podataka učinjeno je primenom *Data Collection* softvera (proizvođač: *AppliedBiosystems*, SAD).

Podaci dobijeni sekvenciranjem regiona Podaci dobijeni sekvenciranjem regiona od interesa gena *AQP4* obrađeni su pomoću softvera za analizu sekvenciranja v.4.10.1 (engl. *Sequencing Analysis v.4.10.1*; Proizvođač: *AppliedBiosystems*, SAD). Potom su sekvence upoređivane sa referentnim sekvencama (engl. *Wild Type*, WT) koje su preuzete iz odgovarajuće baze podataka (*Ensemble*; <http://www.ensembl.org/index.html>) [388]. Finalna analiza rezultata dobijenih poređenjem ispitivanih sekvenci sa referentnim sekvencama učinjena je pomoću *Sequencher 4.10.1 Demo* softvera (Proizvođač: *Gene Codes Corporation*, SAD).

#### 3.1.2.4. Sekvenciranje nove generacije

Za analizu uzoraka DNK naše kohorte osoba obolelih od NMOSB primenjen je WES. Ovaj vid NGS metodologije obuhvatao je prethodnu obradu uzoraka i formiranje biblioteke DNK, potom sekvenciranje i obradu tako dobijenih podataka.

##### 3.1.2.4.1. Sekvenciranje čitavog egzoma pacijenata sa NMOSB

Analiza čitavog egzoma podrazumevala je primenu WES metodologije na Illumina HiSeq-2000 platformi (prosečna dubina 30x) za ukupno 64 uzoraka osoba obolelih od NMOSB, korišćenjem standardnih protokola i uputstva proizvođača za izradu i proveru kvaliteta DNK biblioteke pomoću komercijalno dostupnih kitova (*Agilent All-Exon*, proizvođač: *Agilent Technologies*, SAD; *Illumina Nextera-Exome capture*, proizvođač: *Illumina*, SAD). Podaci dobijeni sekvenciranjem upoređeni su sa referentnim humanim genomom 38 (hg38) pomoću Burrows-Wheeler Aligner (BWA) alata i obrađeni u skladu sa najboljom praksom analize genoma, odnosno primenom alata za analizu genoma toolkit78 [389]. Kontrola kvaliteta dobijenih varijanti uključivala je: filtriranje varijanti na osnovu postignute dubine čitanja sekvenci, kvaliteta rezultata dobijenih primenom *toolkit 78*, kao i frekvencije retkih varijanti (engl. *Minor Allele Frequency*, MAF) u odnosu na bazu gnomAD (engl. *Genome Aggregation Database*, gnomAD). Analiziran je panel od ukupno 26 gena (sa 32 varijante) koji su izdvojeni u studiji Tabansky i sar. 2022, za koje je pokazana određena asocijacija sa NMOSB, od kojih je za njih 14 sprovedena i analiza opterećenosti (engl. *burden*). Ovom analizom obuhvaćeni su sledeći geni: *CCR4*, *NOTCH1*, *SPINK5*, *GUSB*, *IL6ST*, *FNI*, *C1S*, *C3*, *C7*, *C8B*, *C9*, *SNX4*, *PDS5A* i *BIN2* u sledećim regionima genoma: chr1:56929207-56966140, chr2:215360865-215436068, chr3:32951644-32956347, chr3:125446650-125520202, chr4:39822863-39977956, chr5:39284141-39364495, chr5:40909497-40984643, chr5:55935097-55994963, chr5:148063980-148137381, chr7:65960686-65982213, chr9:136494433-136546048, chr12:7060718-7071031, chr12:51281038-51324668 i chr19:6677704-6720650 [113].

Varijante koje su bile lokalizovane van kodirajućih regiona odabranih gena, kao i one čija je učestalost u gnomAD bila viša od 0.05, kao i sinonimne varijante isključene su iz dalje statističke analize.

### 3.1.2.5. Analiza rezultata WES

Efekat varijanti dobijenih WES analizom uzoraka DNK osoba sa NMOSB procenjivan je i u odnosu na njihov uticaj na funkciju proteina, što je postignuto korišćenjem posebnog kombinovanog algoritma za predikciju patogenosti (engl. *Combined Annotation-Dependent Depletion*, CADD) [390], kao i REVEL (engl. *Rare Exome Variant Ensemble Learner*) skorom [391]. Retke varijante za koje je predviđeno da dovode do menjanja funkcije proteina izdvojene su i grupisane za svaki gen od interesa, odnosno za svaki gen iz odabranog panela gena ispitivanih uzoraka DNK osoba sa NMOSB, nakon čega je izvršeno poređenje sa kontrolnim uzorcima. Opterećenje retkim varijantama izračunato je za NMOSB kohortu ispitanika. Takođe, opterećenje retkim varijantama izračunato je za svaki odabrani gen ponaosob, nakon korekcije stepena netačnog nalaza (engl. *False Discovery Rate*, FDR) uz značajnost veću od 0.05.

## 3.2. Klinički deo istraživanja

### 3.2.1. Tip studije

Ovo istraživanje sprovedeno je po tipu opservacione studije odnosno studije preseka.

### 3.2.2. Selekcija ispitanika

Selekcija ispitanika za sprovođenje ovog istraživanja vršena je u odnosu na sledeće uključujuće i isključujuće kriterijume:

1. Uključujući kriterijumi:
  - Osobe starije od 18 godina
  - Punoletne osobe sposobne da razumeju kontekst svog učešća u istraživanju i daju dobrovoljni pristanak pisanim putem za učešće u studiji, kao i za obradu, analizu i objavljivanje dobijenih podataka
  - Osobe kojima je dijagnoza bolesti (NMOSB/MS) postavljena prema aktuelno važećim dijagnostičkim kriterijumima [2, 335].
2. Isključujući kriterijumi:
  - Osobe mlađe od 18 godina
  - Osobe koje nisu u mogućnosti da razumeju kontekst učešća i/ili da donesu odluku o dobrovoljnom pristanku za učešće u istraživanju
  - Osobe koje ne ispunjavaju aktuelno važeće dijagnostičke kriterijume za NMOSB ili MS [2, 335]
  - Osobe sa teškim kardiovaskularnim i/ili pulmološkim bolestima, kao i osobe koje koriste lekove sa mogućim uticajem na funkciju ANS.

Dakle, u ovu studiju uključeni su pacijenti stariji od 18 godina kojima je dijagnoza bolesti (NMOSB ili MS) postavljena prema važećim dijagnostičkim kriterijumima [2, 335].

Ukupan broj ispitanika iznosio je 180 pacijenata (80 ispitanika obolelih od NMOSB i 100 ispitanika obolelih od MS) u periodu od februara 2021 godine do januara 2022 godine iz tri referentna neurološka centra: u Republici Srbiji (Klinika za neurologiju UKCS, Beograd), Republici Hrvatskoj (Klinika za neurologiju KBC Rebro, Zagreb) i Republici Crna Gora (Klinika za

neurologiju Kliničkog centra Crne Gore (KCCG), Podgorica). U Klinici za neurologiju UKCS obuhvaćeno je 72 ispitanika obolelih od NMOSB kao i 100 ispitanika obolelih od MS. U Klinici za neurologiju KBC Rebro obuhvaćeno je ukupno 7 pacijenata obolelih od NMOSB, dok je u Klinici za neurologiju KCCG ovim istraživanjem obuhvaćen jedan pacijent oboleo od NMOSB.

Informacije o demografskim i kliničkim karakteristikama ispitanika obezbeđene su tokom pregleda neurologa u ambulantnim ili hospitalnim uslovima, i preuzete su iz elektronskih zdravstvenih kartona/istorije bolesti i čine sastavni deo medicinske dokumentacije.

### **3.2.3. Metode kliničkog istraživanja**

Procena kvaliteta života, disfunkcije ANS i stepena depresivnosti kod osoba obolelih od NMOSB i MS izvršena je primenom seta od 3 odgovarajuća upitnika u papirnoj formi, koje su pacijenti direktno popunjavali.

#### **3.2.3.1. Upitnik za procenu kvaliteta života**

U ovom istraživanju, za procenu kvaliteta života osoba obolelih od NMOSB i MS, korišćen je upitnik - Kvalitet života u multiploj sklerozi 54 (engl. *Multiple Sclerosis Quality of Life-54*, MSQoL-54) koji je preveden i prilagođen sociološkom i kulturološkom aspektu ispitanika, odnosno, validiran je 2007 godine [392, 393]. Primenjeni MSQoL-54 upitnik predstavlja multidimenzionalni sistem povezan sa zdravljem čiju osnovu čini 36 pitanja koja predstavljaju generički instrument i odnose se na opšta pitanja o percepciji ispitanika (bilo koje populacije/kategorije) u odnosu na različite domene svog zdravlja (opšti utisak o sopstvenom zdravlju, osećaj zamora, socijalno funkcionisanje, emocionalno stanje, ograničenost funkcionisanja zbog emocionalnog stanja, fizičko funkcionisanje, ograničenost usled fizičkih poteškoća, osećaj bola) [393, 394]. Takođe ovaj upitnik, po domenima, dodatno sadrži još 18 pitanja usko povezanih sa aspektima koji se odnose na MS [393]. Dakle, MSQoL-54 se sastoji od ukupno 54 pitanja kategorisanih u 12 domena (sa po više pitanja), kao i dva pojedinačna pitanja, sa opsegom minimalnih i maksimalnih skorova čijim ponderisanjem ukupnih skorova se mogu dobiti dva osnovna kompozitna sistema:

- Kompozitni skor fizičkog zdravlja (engl. *Physical Health Composites*, PHC) i
- Kompozitni skor mentalnog zdravlja (engl. *Mental Health Composites*, MHC), [393].

Rezultati skale su linearno transformisani, odnosno opseg mogućeg skora iznosi od 0-100 pri čemu ostvareni viši skor znači bolji kvalitet života obolelih osoba [393].

#### **3.2.3.2. Upitnik za procenu disfunkcije autonomnog nervnog sistema**

Instrument koji je korišćen u ovom istraživanju za procenu disfunkcije ANS kod osoba obolelih od NMOSB i MS jeste Kompozitni skor autonomnih simptoma-31 (engl. *Composite Autonomic Symptom Score-31*, COMPASS-31) koji je preveden i prilagođen sociološkom i kulturološkom aspektu ispitanika, odnosno validiran od strane Drulović i sar. 2017 godine [395, 396]. Naime, COMPASS-31 predstavlja upitnik za kvantitativnu procenu disautonomije i sastoji se od ukupno 31 pitanja, koja se odnose na 6 domena funkcije/disfunkcije ANS [396]. Domeni i broj pitanja po domenu, ukupan skor odgovora, kao i skor nakon ponderisanja inicijalno dobijenih vrednosti odgovora u cilju poboljšanja unutrašnje konzistentnosti između svih domena prikazan je u Tabeli 11.

Tabela 11. Domeni COMPASS-31, broj pitanja po domenu i skorovanje odgovora

Domeni		Broj pitanja (po domenu)	Inicijalni skor	Konačni skor <sup>a</sup>
Ortostatska intolerancija		4	10	40
Vazomotorna funkcija		3	6	5
Sekretomotorna funkcija		4	7	15
Gastrointestinalna funkcija		12	28	25
Funkcija mokraćne bešike		3	9	10
Pupilomotorna funkcija		5	15	5
UKUPNO:	6	31	75	100

Legenda: a – Nakon dodavanja ponder faktora na inicijalni skor statistički je postignut prilagođeni opseg kompozitnog skora 0-100 (viši konačni skor označava teži stepen disfunkcije autonomnog nervnog sistema). Modifikovano prema Sletten i sar. 2012. [396]

### 3.2.3.3. Upitnik za procenu stepena depresivnosti

Za procenu stepena depresivnosti, odnosno ispitivanja osećanja i stavova u odnosu na prisustvo bolesti (NMOSB ili MS), u ovoj studiji korišćena je skala za procenu depresivnosti koju su dizajnirali A. Beck i R. Beck 1972 godine [397]. Bekova skala depresivnosti (engl. *Beck's Depression Inventory*, BDI) prevedena je i prilagođena sociološkim i kulturološkim aspektima ispitanika. Ova skala sastoji se od ukupno 13 kategorija sa po 4 ponuđene tvrdnje (označene numerički 0-4), koje se odnose na svaku ispitivanu kategoriju [397]. Ukupan skor dobija se sabiranjem svih skorova pojedinačnih kategorija pri čemu viši ukupni skor, predstavlja teži oblik, odnosno veći stepen depresivnosti. Gradacija stepena depresivnosti prema ukupnom skoru prikazana je u Tabeli 12.

Tabela 12. Procena stepena depresivnosti prema ukupnom skoru

Opseg konačnog skora	Stepen procenjene depresivnosti
0-4	Depresivnost ne postoji <sup>a</sup>
5-7	Blagi stepen
8-15	Umeren stepen
≥16	Težak stepen

Legenda: a – Moguće minimalni stepen depresivnosti. Modifikovano prema Beck i Beck, 1972. [397]

### 3.3. Statističke analize

Za analizu i poređenje demografskih i kliničkih karakteristika između kohorte pacijenata sa NMOSB i kohorte obolelih od MS, korišćen je Hi kvadrat test (za kategorijalne varijable), t-test (za kontinuirane varijable sa normalnom distribucijom), Man-Whitney U test (za varijable koje nisu normalno distribuirane).

Za procenu razlike u frekvenciji alela među ispitivanim grupama (NMOSB i MS) korišćen je Hi kvadrat test, dok je za ispitivanje korelacije genetičkih markera i kliničkih varijabli pacijenata obolelih od NMOSB upotrebljen Spirmanov koeficijent korelacije.

Analiza opterećenja retkim varijantama u okviru WES, vršena je korišćenjem generalizovanog linearnog modela (GLM) i R softvera (<http://www.r-project.org>) u paketu komparativne mikrobne genomike (engl. *Comparative Microbial Genomics, CMG package*).

Za analizu povezanosti autonomne disfunkcije i kvaliteta života sproveden je test Spirman-ove korelacije.

Unakrsni odnos (engl. *Odds Ratio, OR*) sa intervalima poverenja od 95% (engl. *Confidence Interval, CI*) ispitivani su logističkom regresionom analizom.

Analiza uticaja različitih varijabli na PHC i MHC skorove kod pacijenata obolelih od NMOSB i MS učinjena je pomoću univarijabilne regresione analize. Potom, svi statistički značajni parametri dobijeni primenom univarijabilne regresione analize su zajedno analizirani u prilagođenom multivarijantnom modelu.

Kao mera efekta veličine određen je Cohen-ov  $F^2$  za multiplu regresiju čija vrednost 0.02 je smatrana za mali efekat veličine, dok su vrednosti od 0.15 i 0.35 predstavljale umeren odnosno veliki efekat veličine [398].

Sve analize sprovedene su uz pomoć Statističkog paketa za socijalne nauke (engl. *Statistical Package for Social Sciences, SPSS*), verzija 17.0. Nivo statističke značajnosti iznosio je  $p < 0.05$ .

### **3.4. Ocena etičnosti istraživanja**

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu odlukom broj 1322/XII-11 od 03.12.2020 godine.

Svi ispitanici uključeni u ovo istraživanje su prethodno detaljno informisani usmenim i pismenim putem o nazivu, ciljevima i osnovnoj metodologiji ovog istraživanja, uključujući značaj, kontekst i sve relacije njihovog učešća u ovoj studiji, dokumentom pod nazivom Informacije za pacijente. Potencijalnim ispitanicima obezbeđeno je dovoljno vremena da se upoznaju sa sadržajem dokumenta Informacije za pacijente, i omogućeno im je da postave sva pitanja u vezi sa predloženim učešćem u ovom istraživanju.

Istraživanje je takođe odobreno od strane Etičkog odbora Klinike za neurologiju KBC Rebro i Etičkog odbora Klinike za neurologiju KCCG.

Pre započinjanja bilo kojeg procesa vezanog za eksperimentalni ili klinički deo ovog istraživanja, svi ispitanici su prethodno dobrovoljno dali saglasnost, odnosno potpisali obrazac Pisane saglasnosti pacijenta za učešće u ovoj studiji, što je podrazumevalo i saglasnost za korišćenje ličnih podataka tokom prikupljanja demografskih, kliničkih i parakliničkih parametara relevantnih za ovu studiju, obradu i objavljivanje rezultata istraživanja u naučne i stručne svrhe.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati eksperimentalnog istraživanja

Eksperimentalni deo studije obuhvatio je analizu uzoraka DNK ukupno 64 pacijenata obolelih od NMOSB i 40 pacijenata sa MS, kao i 100 uzoraka DNK zdravih osoba (kontrolna grupa). Za sve ove uzorke urađeno je sekvenciranje svih 5 egzona gena *AQP4*, dok je za istih 64 pacijenata sa NMOSB učinjena i WES analiza. Demografske i kliničke karakteristike ovih pacijenata prikazane su u Tabeli 13.

Tabela 13. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata uključenih u eksperimentalni deo istraživanja

Variable	NMOSB n=64	MS n=40	p
Pol, n (%)			
Muškarci	8 (12.5)	10 (24.4)	0.101
Žene	56 (87.5)	30 (73.2)	
Starost (godine)	52.5 ± 13.6	49.0 ± 10.9	0.143
Starost na početku bolesti (godine)	39.4 ± 13.9	31.2 ± 9.7	<b>0.001</b>
Trajanje bolesti (godine)	8.4 ± 8.6	12.8 ± 8.9	<b>0.014</b>
Broj relapsa u prethodnoj godini, n (%)			
Nula	27 (42.2)	24 (58.8)	<b>0.037</b>
Jedan	29 (45.3)	9 (22.0)	
Dva	4 (6.3)	1 (2.4)	
Tri	1 (1.6)	2 (4.9)	
Četiri	2 (3.1)	0 (0.0)	
EDSS, mediana (opseg)	3.0 (1.0-9.0)	2.5 (0.0-7.5)	0.118
Mijelitis, n (%)			
Da	46 (71.9)		
Ne	18 (28.1)		
Optički neuritis, n (%)			
Da	44 (68.8)		
Ne	20 (31.3)		
Mijelitis i optički neuritis, n (%)			
Da	25 (39.1)		
Ne	39 (60.9)		

Tok bolesti, n (%)			
Monofazni	13 (20.3)		
Relapsni	51 (79.7)		
MR nalaz, n (%)			
Da	39 (60.9)		
Ne	20 (31.3)		
LETM, n (%)			
Da	20 (31.3)		
Ne	40 (62.5)		

Legenda: EDSS - Expanded Disability Status Scale; LETM – Longitudinalni ekstenzivni transverzalni mijelitis; MR – Magnetna rezonanca; MS – Multipla skleroza; NMOSB – Neuromijelitis optika spektra bolesti;

#### 4.1.1. Rezultati sekvenciranja kodirajućih regiona gena *AQP4*

Učinjenim sekvenciranjem metodom po Sanger-u gena *AQP4* kod ispitivanih uzoraka u egzonu 1 nisu otkrivene varijante od značaja, dok je detektovana jedna varijanta od značaja u nekodirajućem regionu odnosno u intronu 3 gena *AQP4*. Lokalizacija svih izdvojenih varijanti, genotip i uticaj na primarnu strukturu polipeptida prikazani su u Tabeli 14. Detektovane varijante gena *AQP4* u kohorti obolelih od NMOSB, MS, kao i kontrolnoj grupi prikazane su u Tabeli 15.

Tabela 14. Varijante od značaja u genu *AQP4*

Region gena <i>AQP4</i>	HGVS	Genotip	Promena aminokiselina <sup>a</sup>	SNP
Egzon 1 <sup>b</sup>	/	/	/	/
Egzon 2a	NM_001650.7:c.201G>A	GA	Pro-67-Pro	rs35248760
	NM_001650.7:c.112G>C	GC	Val-38-Leu	rs778208236
Egzon 2b	NM_001650.7:c.366G>A	GA	Gln-122-Gln	rs72557968
Egzon 3	NM_001650.7:c.492G>A	GA	Leu-164-Leu	rs1839318
Intron 3	NM_001650.7:c.613-10T>A	TA	NA	NA
Egzon 5	NM_001650.7:c.955G>A	GA	Val319Ile	rs200498749
	NM_001650.7:c.832A>G	AG	Met278Val	rs2144949828

Legenda: <sup>a</sup> – promena u primarnoj strukturi polipeptidnog lanca. <sup>b</sup> – nisu pronađene varijante od značaja. *AQP4* – akvaporin 4; Gln – glutamin, HGVS – Društvo za varijacije humanog genoma (engl. *Human Genome Variation Society*); Ile – izoleucin; Leu – leucin; Met – metionin; NA – nije primenjivo (engl. *Not Applicable*); Pro – prolin; SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*); Val – valin;

Tabela 15. Detektovane varijante u genu *AQP4* u grupi obolelih od NMOSB i MS, kao i u kontrolnoj grupi ispitanika

SNP	GENOTIP	NMOSB	MS	Kontrolna grupa
		n = 64 N (%)	n = 40 N (%)	n = 100 N (%)
rs35248760	GG	49 (76.56)	29 (72.50)	81 (81.00)
	GA	15 (23.43)	11 (27.50)	17 (17.00)
	AA	0 (0)	0 (0)	2 (2.00)
rs778208236	GG	64 (100)	40 (100)	99 (99.00)
	GC	0 (0)	0 (0)	1 (1.00)
	CC	0 (0)	0 (0)	0 (0.00)
rs72557968	GG	63 (98.43)	39 (97.50)	98 (98.00)
	GA	1 (1.56)	1 (2.50)	2 (2.00)
	AA	0 (0)	0 (0)	0 (0.00)
rs1839318	GG	63 (98.43)	39 (97.50)	98 (98.00)
	GA	1 (1.56)	1 (2.50)	2 (2.00)
	AA	0 (0)	0 (0)	0 (0.00)
NA	TT	64 (100)	39 (97.50)	100 (100.00)
	TA	0 (0)	1 (2.50)	0 (0.00)
	AA	0 (0)	0 (0)	0 (0.00)
rs200498749	GG	63 (98.43)	39 (97.50)	100 (100.00)
	GA	1 (1.56)	1 (2.50)	0 (0.00)
	AA	0 (0)	0 (0)	0 (0.00)
rs2144949828	AA	64 (100)	40 (100)	99 (99.00)
	AG	0 (0)	0 (0)	1 (1.00)
	GG	0 (0)	0 (0)	0 (0.00)

Legenda: AQP4 – Akvaporin 4; MS – multipla skleroza; NMOSB – neuromijelitis optika spekta bolesti; SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*);

Takođe, učinjeno je poređenje učestalosti dobijenih varijanti u genu *AQP4* između kohorte obolelih od NMOSB i kontrolne grupe ispitanika, potom, komparacija varijanti od značaja u genu *AQP4* izdvojenih u kohorti obolelih od MS sa kontrolnom grupom, kao i varijanti u genu *AQP4* između NMOSB i MS kohorte pacijenata. Komparacija selektovanih varijanti gena *AQP4* izvršena je i između kohorte obolelih od NMOSB, MS i kontrolne grupe ispitanika. Nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u odnosu na varijante detektovane u genu *AQP4* (Tabela 16 i Tabela 17).

Tabela 16. Komparacija učestalosti heterozigota za varijante gena *AQP4* između NMOSB kohorte i kontrolne grupe, između MS kohorte i kontrolne grupe, između NMOSB i MS kohorte.

Varijanta Genotip	NMOSB	K	p	MS	K	p	NMOSB	MS	p
rs35248760 GA	15/64 (23.4%)	17/100 (17%)	0.310	11/40 (27.5%)	17/100 (17%)	0.161	15/64 (23.4%)	11/40 (27.5%)	0.642
rs778208236 GC	0/64 (0%)	1/100 (1%)	0.422	0/40 (0%)	1/100 (1%)	0.526	0/64 (0%)	0/40 (0%)	/
rs72557968 GA	1/64 (1.6%)	2/100 (2%)	0.838	1/40 (2.5%)	2/100 (2%)	0.854	1/64 (1.6%)	1/40 (2.5%)	0.735
rs1839318 GA	1/64 (1.6%)	2/100 (2%)	0.838	1/40 (2.5%)	2/100 (2%)	0.854	1/64 (1.6%)	1/40 (2.5%)	0.735
c.613-10 T>A	0/64 (0%)	0/100 (0%)	/	1/40 (2.5%)	0/100 (0%)	0.113	0/64 (0%)	1/40 (2.5%)	0.204
rs200498749 GA	1/64 (1.6%)	0/100 (0%)	0.210	1/40 (2.5%)	0/100 (0%)	0.113	1/64 (1.6%)	1/40 (2.5%)	0.735
rs2144949828 AG	0/64 (0%)	1/100 (1%)	0.422	0/40 (0%)	1/100 (1%)	0.526	0/64 (0%)	0/40 (0%)	/

Legenda: AQP4 – Akvaporin 4; K – kontrolna grupa; MS – Multipla skleroza; NMOSB – Neuromijelitis optika spektar bolesti;

Tabela 17. Komparacija učestalosti heterozigota za varijante gena *AQP4* između NMOSB kohorte, MS kohorte i kontrolne grupe.

Varijanta Genotip	NMOSB	MS	K	p
rs35248760 GA	15/64 (23.4%)	11/40 (27.5%)	17/100 (17%)	0.332
rs778208236 GC	0/64 (0%)	0/40 (0%)	1/100 (1%)	0.593
rs72557968 GA	1/64 (1.6%)	1/40 (2.5%)	2/100 (2%)	0.945
rs1839318 GA	1/64 (1.6%)	1/40 (2.5%)	2/100 (2%)	0.945
c.613-10	0/64	1/40	0/100	0.127

T>A	(0%)	(2.5%)	(0%)	
rs200498749	1/64	1/40	0/100	0.339
GA	(1.6%)	(2.5%)	(0%)	
rs2144949828	0/64	0/40	1/100	0.593
AG	(0%)	(0%)	(1%)	

Legenda: K – Kontrolna grupa; MS – Multipla skleroza; NMOSB – Neuromijelitis optika spektra bolesti;

Ispitivanje korelacije između dobijenih varijanti u genu *AQP4* i kliničkih karakteristika osoba obolelih od NMOSB, pokazalo je da je rs35248760 varijanta povezana sa pojavom mijelitisa kod ovih osoba (Spearman 0.299,  $p = 0.016$ ), kako je prikazano u Tabeli 18.

Tabela 18. Korelacija *AQP4* genotipova i kliničkih karakteristika osoba obolelih od NMOSB

		rs35248760 GT	rs778208236 GC	rs72557968 GA	rs1839318 GA	c.613-10 T>A	rs200498749 GA	rs2144949828 AG
Tok bolesti	1. Monofazni	-.179	/	.064	.064	/	.064	/
	2. Relapsni	.157	/	.618	.618	/	.618	/
Promene na MR mozga	1. DA	-.063	/	.183	.183	/	.183	/
	2. NE	.637	/	.165	.165	/	.165	/
Sindrom aree postreme	1. DA	-.207	/	.061	.061	/	.061	/
	2. NE	.101	/	.635	.635	/	.635	/
Sindrom moždanog stabla	1. DA	-.228	/	.079	.079	/	.079	/
	2. NE	.070	/	.536	.536	/	.536	/
Mijelitis	1. DA	<b>-.299</b>	/	-.073	-.073	/	-.073	/
	2. NE	.016	/	.566	.566	/	.566	/
Optički neuritis	1. DA	.184	/	-.085	-.085	/	.187	/
	2. NE	.145	/	.505	.505	/	.139	/
AQP4 antitela	1. Pozitivna	-.024	/	-.037	-.037	/	-.037	/
	2. Negativna	.853	/	.774	.774	/	.774	/

Legenda: AQP4 – Akvaporin 4; MR – Magnetna rezonanca;

#### 4.1.2. Rezultati sekvenciranja čitavog egzoma

Tokom WES analize replikovano je 5 varijanti od ukupno 10 varijanti od značaja u 6 gena kandidata u studiji iz 2022 godine, koju su sproveli Tabansky i sar. [113]. Ovi rezultati prikazani su u Tabeli 19.

Tabela 19. Varijante u genima izdvojene WES u kohorti obolelih od NMOSB

Gen	Hr	Pozicija	Ref	Alt	TV	REVEL	CADD	gAF	Het CMG	Nalaz
<i>NOTCH1</i>	9	139391815	C	T	missense	0.169	24.5	0.0004	14	Replikovana
<i>NOTCH1</i>	9	139403482	G	A	missense	0.325	24.6		20	Replikovana
<i>SPINK5</i>	5	147498598	G	T	missense	0.197	24	0	2	Nije replikovana
<i>GUSB</i>	7	65439334	A	T	missense	0.914	25.6	0	1	Replikovana
<i>IL6ST</i>	5	55259272	T	C	missense	0.153	22.5	0.0002	0	Nije replikovana
<i>IL6ST</i>	5	55243391	C	T	missense	0.201	33	0	0	Nije replikovana
<i>FN1</i>	2	216240047	G	A	missense	0.287	24.6	0.0002	4	Replikovana
<i>FN1</i>	2	216272884	A	G	missense	0.252	26.5		0	Nije replikovana
<i>FN1</i>	2	216264005	G	A	missense	0.448	34	0.0002	3	Replikovana
<i>CCR4</i>	3	32995947	T	C	missense	0.374	25.8		na	Nije replikovana

Legenda: Alt – Alternativni alel; CADD – (engl. *Combined Annotation-Dependent Depletion*); CCR4 – C-C hemokinski receptor tip4; CMG – (engl. *Centers for Mendelian Genomics*); FN1 – Fibronektin-1 protein; gAF – Frekvencija alela u bazi gnomAD (engl. *Genome Aggregation Database*); GUSB – Glukuronidaza beta; Hr – Hromozom; IL6ST – Familija signalnog transdjusera interleukina 6; NOTCH1- Neurogenski lokus notch homolog protein 1; Ref – Referentni alel; REVEL – (engl. *Rare Exome Variant Ensemble Learner*); SPINK5 – Inhibitor kazal serinske peptidaze tip 5; TV – Tip varijante; WES – Sekvenciranje čitavog egzoma;

Analizom je obuhvaćeno i 6 gena koji kodiraju za proteine uključene u sistem komplementa (Tabela 20), od kojih su dve varijante replikovane u genu *C1S*. Pored toga, analizirana su i 3 gena u kojima su prethodno kod probanada nađene *de novo* varijante u studiji Tabansky i sar. [113]. Od 3 analizirane varijante, u našoj studiji, replikovana je jedna varijanta u genu *sorting nexin 4* (Tabela 21).

Tabela 20. Varijante u genima sistema komplementa

Gen	Hr	Pozicija	Ref	Alt	TV	REVEL	CADD	gAF	Het CMG	Nalaz
<i>C1S</i>	12	7169873	A	G	missense	0.038	22.4	0.0006	3	Replikovana
<i>C1S</i>	12	7174371	C	T	missense	0.151	24.6	0	1	Replikovana
<i>C3</i>	19	6709721	T	C	missense	0.181	25.6	/	0	Nije replikovana
<i>C7</i>	5	40931185	T	G	missense	0.554	26.6	0	1	Nije replikovana
<i>C8B</i>	1	57420448	G	C	missense	0.868	27.4	/	0	Nije replikovana
<i>C9</i>	5	39341348	C	T	missense	0.579	34	0.0002	0	Nije replikovana
<i>C4A</i>	6	Bez detektovanih varijanti	/	/	/	/	/	/	/	Bez detektovanih varijanti

Legenda: Alt – Alternativni alel; C – Komplement; CADD – (engl. *Combined Annotation-Dependent Depletion*); CMG – (engl. *Centers for Mendelian Genomics*); gAF – Frekvencija alela u bazi gnomAD (engl. *Genome Aggregation Database*); Hr – Hromozom; Ref – Referentni alel; REVEL – (engl. *Rare Exome Variant Ensemble Learner*); TV – Tip varijante;

Tabela 21. *De novo* varijante detektovane u studiji Tabansky i sar. [113] u kohorti obolelih od NMOSB (WES)

Gen	Hromozom	Pozicija	Ref	Alt	Tip varijanti	CADD	gAF	Het CMG	Nalaz
<i>SNX4</i>	3	NM_003794:exon13:c. C1251A:p.D417E	G	T	Missense	21	0	1	Replikovana

<i>PDS5A</i>	4	NM_001100399:exon25:c. C2935T;p.R979C	G	A	Missense	34	0	0	Nije replikovana
<i>BIN2</i>	12	NM_001290008:exon10:c. G1549A;p.E517K	C	T	Missense	17.79	0.0003	0	Nije replikovana

Legenda: Alt – Alternativni alel; BIN2 – Integrator premošćavanja 2; CADD – (engl. *Combined Annotation-Dependent Depletion*); CMG – (engl. *Centers for Mendelian Genomics*); gAF – Frekvencija alela u bazi gnomAD (engl. *Genome Aggregation Database*); NMOSB – Neuromijelitis optika spektar bolesti; PDS5A – Faktor A udružen sa kohezinom; Ref – Referentni alel; SNX4 – Sorting neksin 4; WES – Sekvenciranje čitavog egzoma;

Takođe, od odabranih ukupno 7 varijanti u 6 gena MHC I lokusa, dve varijante su replikovane kako je prikazano u Tabeli 22.

Tabela 22. Varijante gena u MHC I lokusu

Gen	Hromozom	Pozicija	Ref	Alt	Tip varijanti	REVEL	CADD	gAF	Het CMG	Nalaz
<i>UBE2Q1</i>	1	154530746	C	T	missense	0,168	22,7	0,0002	0	Varijanta nije replikovana
<i>HUWE1</i>	X	53579831	C	T	missense	0,165	23,9	0	0	Varijanta nije replikovana
<i>UBE2H</i>	7	129479119	T	C	missense	0,168	22,7	0	2	Replikovana varijanta

<i>ASB8</i>	12	48547191	C	T	missense	0,338	29,1	0	0	Varijanta nije replikovana
<i>ZNRF1</i>	16	75140387	G	A	missense	0,303	34,00	0,00001649	1	Replikovana varijanta
<i>ZNRF1</i>	16	75033654	G	A	Missense	0,186	24,80	0	0	Varijanta nije replikovana
<i>TRIM37</i>	17	57079025	C	T	missense	0,296	27,6	0,00008247	0	Varijanta nije replikovana

Legenda: Alt – Alternativni alel; ASB8 – Ankrin ponavljajući i supresorski citokinski signalni (SOCS) box 8; CADD – (engl. *Combined Annotation-Dependent Depletion*); CMG – (engl. *Centers for Mendelian Genomics*); gAF – Frekvencija alela u bazi gnomAD (engl. *Genome Aggregation Database*); HUWE1 – E3 Ubikvitin protein ligaza; Ref – Referentni alel; REVEL – (engl. *Rare Exome Variant Ensemble Learner*); TRIM37 – Protein koji sadrži tripartit motiv 37; UBE2H – Ubikvitin konjugacioni enzim E2H; UBE2Q1 – Ubikvitin konjugacioni enzim E2Q1; ZNRF1 – Cink i prsten prst 1;

Tokom sprovedene WES analize od ukupno četiri izdvojena gena u MHC II lokusu u studiji Tabansky i sar. [113], detektovane su replikovane varijante u dva gena, prema našem istraživanju, kako je prikazano u Tabeli 23.

Tabela 23. Varijante gena u MHC II lokusu

Gen	Hromozom	Pozicija	Ref	Alt	Tip varijante	REVEL	CADD	gAF	Het CMG	Nalaz
<i>DCTN1</i>	2	74594504	G	C	missense	0,574	23,8	0	1	Varijanta nije replikovana
<i>CANX</i>	5	179146756	T	A	missense	0,517	26,6	0	1	Replikovana varijanta

<i>DCTN3</i>	9	34613808	C	T	missense	0,17	25,3	0,00001649	9	Replikovana varijanta
<i>OSBPL1A</i>	18	21897355	A	G	missense	0,247	23,6	0,00001652	0	Varijanta nije replikovana

Legenda: Alt – Alternativni alel; *CANX* – Calneksin; *CADD* – (engl. *Combined Annotation-Dependent Depletion*); *CMG* – (engl. *Centers for Mendelian Genomics*); gAF – Frekvencija alela u bazi gnomAD (engl. *Genome Aggregation Database*); *DCTN1* – Dinaktin subjedinica 1; *DCTN3* – Dinaktin subjedinica 3; *OSBPL1A* – Protein sličan oksisterol vezujućem proteinu 1A; Ref – Referentni alel; REVEL – (engl. *Rare Exome Variant Ensemble Learner*);

U preostala dva gena iz prethodno odabranog panela (gen za teški lanac klatrina – *CLTC* i gen za dopaminski D4 receptor – *DRD4*) čiji produkti su povezani sa procesima ligand – receptor interakcije, nisu replikovane varijante detektovane u studiji Tabanski i sar. [113].

Sprovedenom *burden* analizom u našoj kohorti pacijenata sa NMOSB potvrđeno je opterećenje za ukupno jednu varijantu u genu *GUSB* (Tabela 19), koja je izuzetno retka i sa visokom prediktivnom patogenošću ( $p=7.28E-7$ ).

#### 4.2. Rezultati kliničkog istraživanja

Klinički deo istraživanja odnosio se na procenu kvaliteta života pacijenata sa NMOSB i MS, kao i opterećenja simptomima disfunkcije ANS i njihovog uticaja na kvalitet života obolelih osoba od NMOSB i MS.

Kada su u pitanju demografski i klinički podaci, nije pokazano postojanje statističke značajnosti između ove dve grupe pacijenata (NMOSB i MS), osim u pogledu proporcije osoba sa pojavom jednog ili više relapsa u poslednjih 12 meseci u kohorti obolelih od NMOSB (61.3%  $p = 0.005$ ), što je prikazano u Tabeli 24.

Tabela 24. Demografski i klinički podaci ispitanika uključenih u kliničko istraživanje

Varijable		NMOSB n = 80	MS n = 100	p
Pol n (%)	Muškarci	14 (17.5)	26 (26.0)	0.173
	Žene	66 (82.5)	74 (74.0)	
Uzrast (srednja vrednost ± SD) godine		47.1 ± 11.8	44.0 ± 11.6	0.099
Trajanje bolesti (srednja vrednost ± SD) godine		6.8 ± 6.4	8.2 ± 5.5	0.128
EDSS mediana, (IQR)		3.0 (3.75)	2.5 (2.5)	0.159
Broj pacijenata sa relapsima tokom prethodnih 12 meseci n (%)		49 (61.3)	40 (40.0)	<b>0.005</b>

Legenda: EDSS – proširena skala onesposobljenosti (engl. *Expanded Disability Status Scale*); IQR – interkvartilni raspon (engl. *Interquartile range*); MS – multipla skleroza; NMOSB – neuromijelitis optika spektar bolesti; SD – standardna devijacija;

Prilikom poređenja skorova dobijenih primenom MSQoL-54 i BDI u ovoj studiji, između kohorte pacijenata sa NMOSB i onih koji boluju od MS, postignuta je statistička značajnost u okviru domena MHC skora, koji je bio viši u NMOSB kohorti u odnosu na MS kohortu, dok za ostale domene, kao i za domene BDI, nije postignuta statistički značajna razlika između ove dve grupe ispitanika, kako je prikazano u Tabeli 25.

Tabela 25. Skorovi MSQoL-54 i BDI upitnika kod pacijenata sa NMOSB i MS

	<b>NMOSB</b> (n=80)	<b>MS</b> (n=100)	<b>OR<sup>a</sup> (95% CI)</b>	<b>p</b>
Skala	Skor (Srednja vrednost ± SD)			
<b>Domeni MSQoL-54</b>				
- Fizičko zdravlje	56.0 ± 35.8	65.0 ± 30.9	1.00 (0.99–1.01)	0.283
- Ograničenost usled fizičkog stanja	44.8 ± 44.4	49.3 ± 43.8	1.00 (0.99–1.07)	0.840
- Ograničenost usled emocionalnog stanja	57.4 ± 46.5	54.7 ± 44.3	0.99 (0.99–1.03)	0.219
- Bol	66.3 ± 29.1	67.3 ± 28.5	0.99 (0.98–1.07)	0.427
- Emocionalno blagostanje	70.0 ± 18.9	65.4 ± 21.8	0.98 (0.96–0.99)	<b>0.021</b>
- Energičnost	57.9 ± 20.9	54.9 ± 22.3	0.99 (0.97–1.03)	0.114
- Percepcija sopstvenog zdravlja	54.5 ± 23.5	54.3 ± 22.4	0.99 (0.98–1.07)	0.258
- Socijalno funkcionisanje	67.6 ± 25.8	65.8 ± 25.1	0.99 (0.97–1.01)	0.128
- Kognitivno funkcionisanje	86.5 ± 18.9	74.6 ± 23.7	0.97 (0.95–0.98)	<b>0.001*</b>
- Zdravstveni distress	76.8 ± 25.4	67.7 ± 27.7	0.98 (0.97–0.99)	<b>0.004</b>
- Ukupni kvalitet života	47.3 ± 16.0	50.6 ± 13.4	1.02 (0.99–1.04)	0.178
- Seksualno funkcionisanje	52.9 ± 38.9	61.0 ± 31.0	1.00 (0.99–1.01)	0.861
- Promene u zdravstvenom stanju	44.2 ± 27.8	44.3 ± 22.7	1.00 (0.98–1.01)	0.969
- Zadovoljstvo seksualnim funkcionisanjem	48.4 ± 35.0	59.8 ± 33.7	1.01 (1.00–1.02)	0.035
- PHC	59.3 ± 24.1	60.5 ± 23.1	0.99 (0.98–1.01)	0.368
- MHC	66.2 ± 19.2	61.8 ± 20.7	0.98 (0.96–0.99)	<b>0.018</b>
<b>BDI</b>	8.3 ± 9.7	7.9 ± 7.6	1.02 (0.98–1.06)	0.433

Legenda: BDI – Bekova skala depresivnosti; MHC – Mentalni kompozitni skor; MS – Multipla skleroza; MSQoL-54 – Upitnik o kvalitetu života u multiploj sklerozi 54; NMOSB – Neuromijelitis optika spektar bolesti; OR – Odds ratio; SD - Standardna devijacija. \* <0.001;

U poređenju različitih domena disfunkcije ANS u COMPASS-31 kod obolelih od NMOSB i MS, pokazano je da su ortostatska tolerancija i poremećaji u domenu pupilomotorne funkcije bili

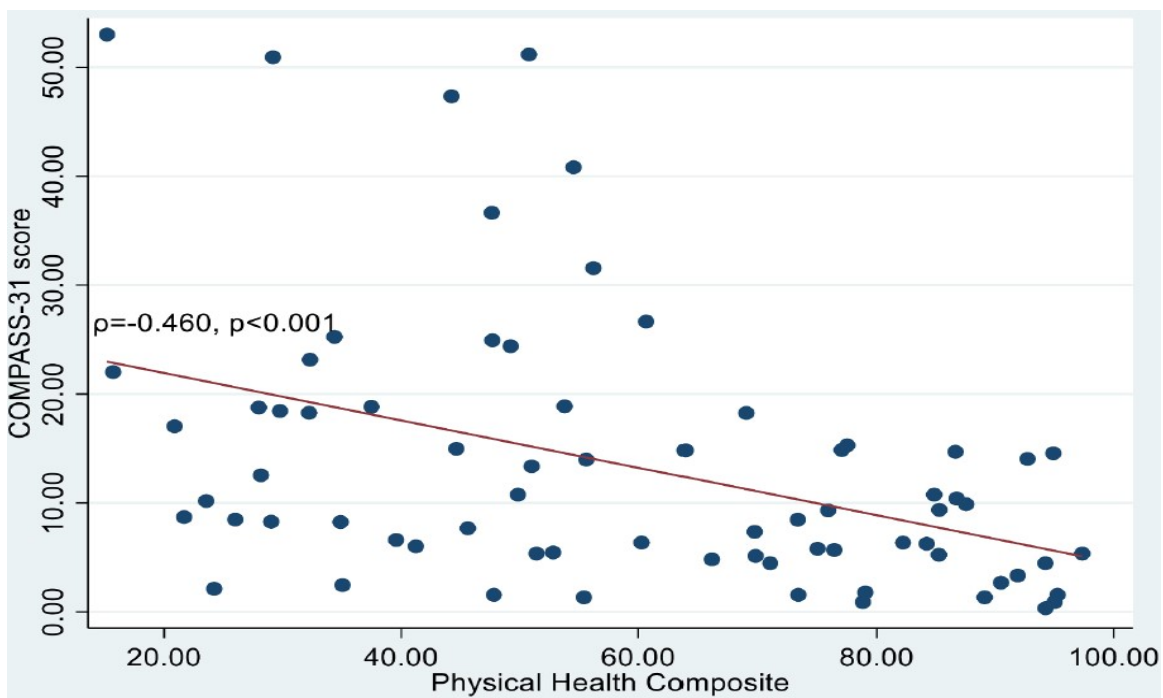
značajno zastupljeniji u grupi obolelih od MS u odnosu na pacijente sa NMOSB, kako je prikazano u Tabeli 26.

Tabela 26. Opterećenje simptomima disfunkcije ANS kod pacijenata sa NMOSB i MS

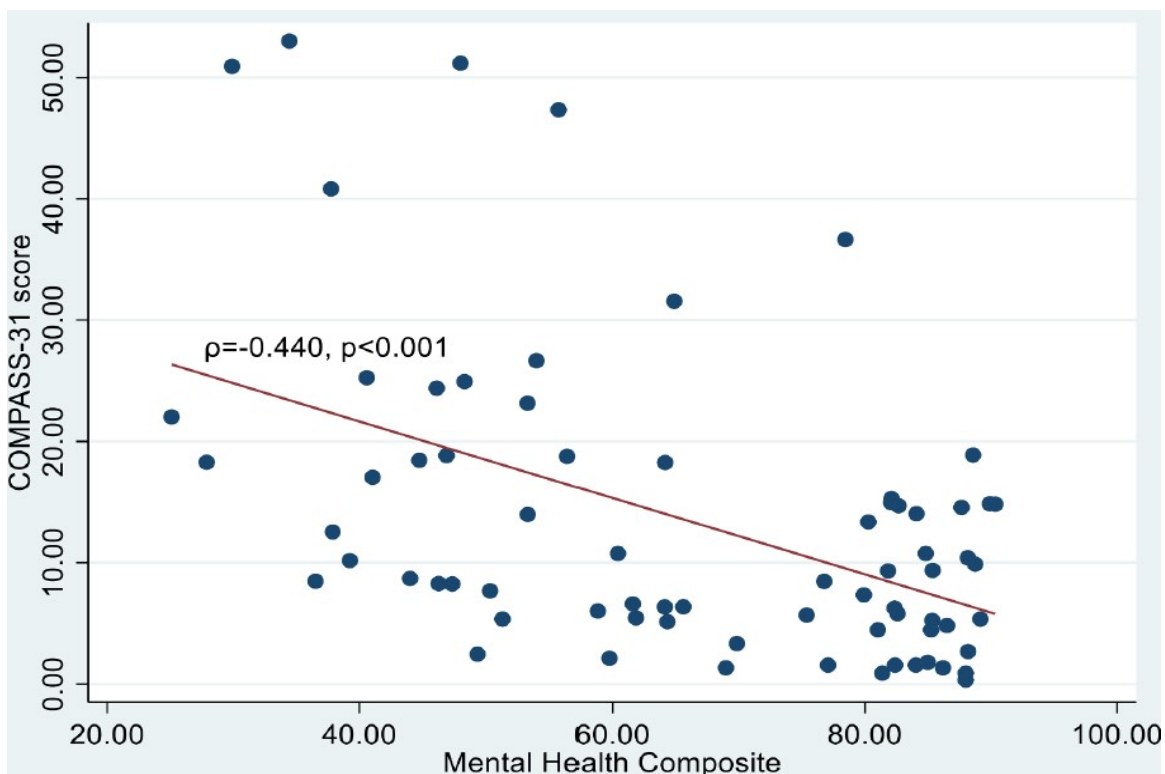
COMPASS-31	NMOSB	MS	p
Ortostatska intolerancija			
- Mediana (25. i 75. percentil)	0.0 (0.0, 0.0)	1.0 (0.0, 16.0)	<b>&lt;0.001</b>
- Pacijenti sa skorom > 0.0 (%)	15	41	<b>0.018</b>
Vazomotorni domen			
- Mediana (25. i 75. percentil)	1.0 (0.0, 0.0)	1.0 (0.0, 0.0)	0.562
- Pacijenti sa skorom > 0.0 (%)	20	18	0.420
Sekretomotorni domen			
- Mediana (25. i 75. percentil)	1.0 (0.0, 4.3)	1.0 (0.0, 4.3)	0.561
- Pacijenti sa skorom > 0.0 (%)	47	44	0.901
Gastrointestinalni domen			
- Mediana (25. i 75. percentil)	4.5 (2.7, 4.1)	4.9 (1.8, 6.9)	0.842
- Pacijenti sa skorom > 0.0 (%)	93	88	0.916
Funkcija mokraćne bežike			
- Mediana (25. i 75. percentil)	1.2 (0.0, 3.3)	2.2 (0.0, 3.3)	0.169
- Pacijenti sa skorom > 0.0 (%)	53	68	0.426
Pupilomotorni domen			
- Mediana (25. i 75. percentil)	0.7 (0.0, 1.3)	1.0 (0.7, 1.7)	<b>0.005</b>
- Pacijenti sa skorom > 0.0 (%)	63	84	0.056
Ukupni skor			
- Mediana (25. i 75. percentil)	9.4 (5.3, 18.3)	11.8 (6.6, 24.7)	0.060
- Pacijenti sa skorom > 0.0 (%)	100	97	0.312

Legenda: ANS – Autonomni nervni sistem; COMPASS-31 - Kompozitni skor autonomnih simptoma-31; MS – Multipla skleroza; NMOSB – Neuromijelitis optika spektra bolesti;

Utvrđena je statistički značajna inverzna korelacija između PHC i MHC skorova i totalnog COMPASS-31 skora kod pacijenata sa NMOSB (PHC = -0.420,  $p < 0.001$ ; MHC = -0.484,  $p < 0.001$ ), kako je prikazano na Grafikonu 1a i 1b.

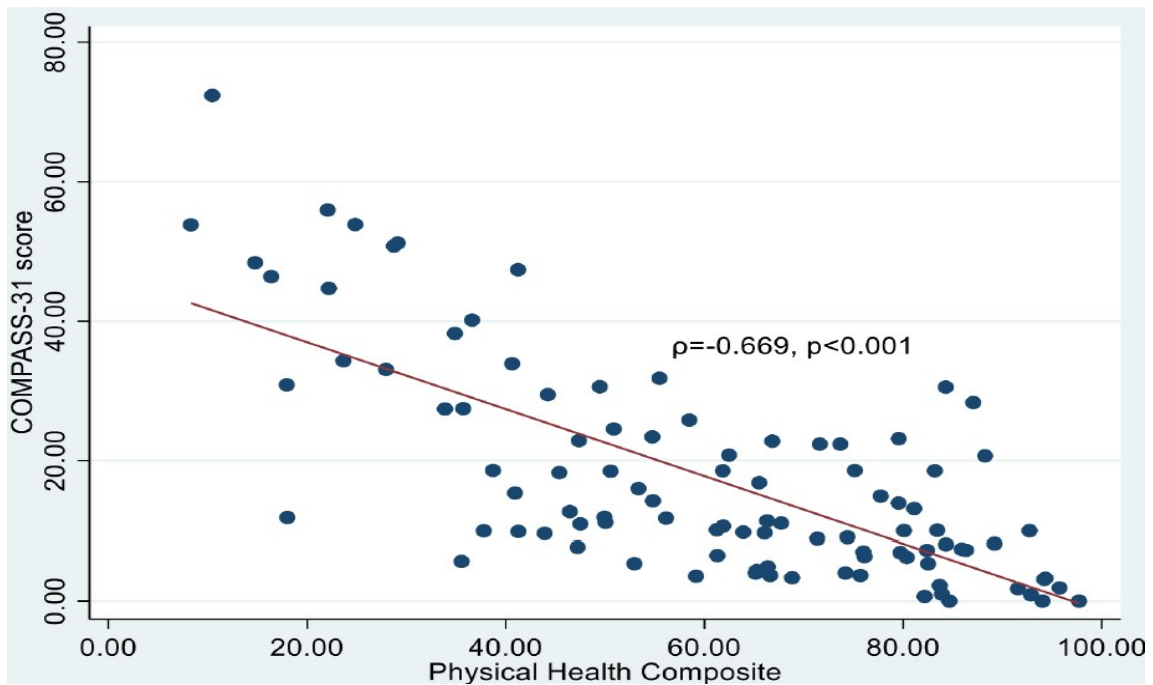


Grafikon 1a. Korelacija između PHC skora i COMPASS-31 kod pacijenata sa NMOSB

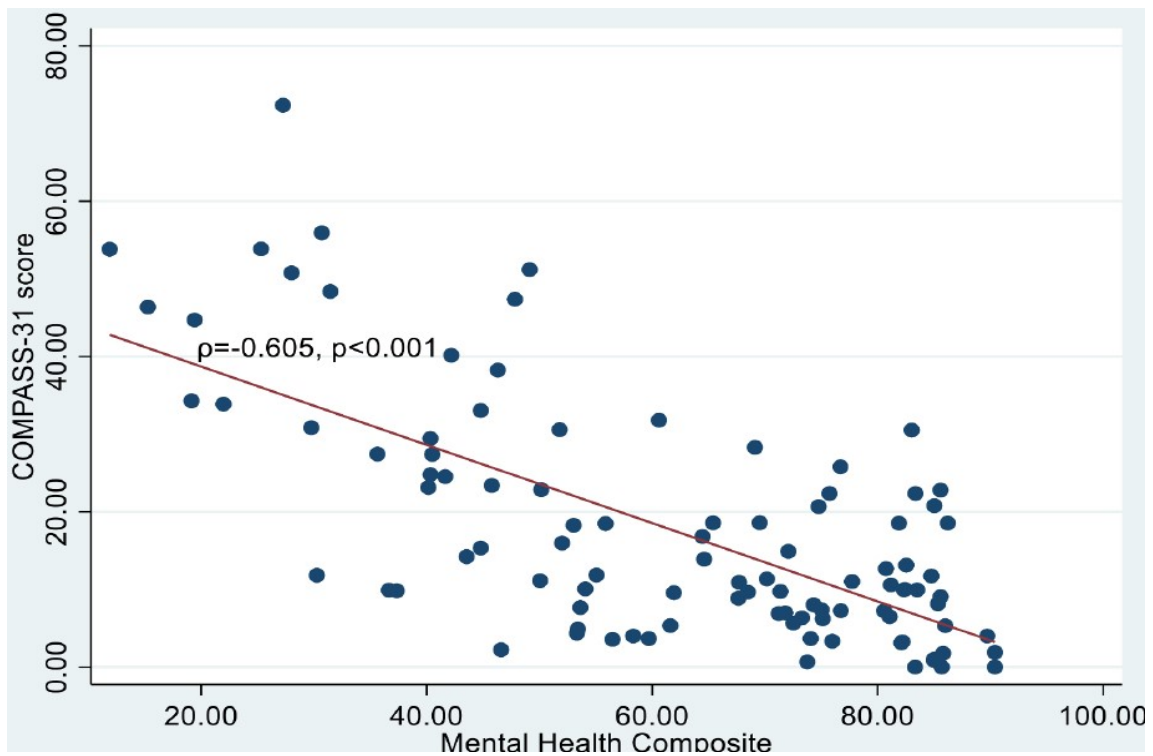


Grafikon 1b. Korelacija između MHC skora i COMPASS-31 kod pacijenata sa NMOSB

Takođe, utvrđena je statistički značajna inverzna korelacija između PHC i MHC skorova i totalnog COMPASS-31 skora kod pacijenata sa MS (PHC= -0.669,  $p < 0.001$ ; MHC= -0.605,  $p < 0.001$ ), kako je prikazano na Grafikonu 2a i 2b.



Grafikon 2a. Korelacija između PHC skora i COMPASS-31 kod osoba sa MS



Grafikon 2b. Korelacija između MHC skora i COMPASS-31 kod osoba sa MS

Primenom multivarijantne linearne regresione analize pokazano je postojanje nezavisnih prediktivnih faktora kvaliteta života osoba sa NMOSB i MS, kako je pokazano u Tabeli 27.

Tabela 27. Prediktivni faktori kvaliteta života mereni upotrebom MSQoL-54 upitnika kod osoba sa NMOSB i MS

	Kompozit fizičkog zdravlja			Kompozit mentalnog zdravlja		
	Beta koeficijent (95%CI)	p	C f <sup>2*</sup>	Beta koeficijent (95%CI)	p	C f <sup>2*</sup>
<b>NMOSB</b>						
EDSS	- 0.33 (- 5.69, - 1.61)	0.001	0.822	- 0.23 (- 3.53, - 0.41)	0.014	1.108
BDI	- 0.35 (- 1.29, - 0.41)	0.001 <sup>a</sup>	1.047	- 0.56 (- 1.43, - 0.73)	0.001 <sup>a</sup>	1.115
Ortostatska intolerancija	- 0.23 (- 1.27, - 0.23)	0.005	1.142	- 0.20 (- 1.05, - 0.20)	0.004	1.207
Uzrast	- 0.25 (- 0.79, - 0.14)	0.006	1.261	/	/	/
<b>MS</b>						
EDSS	- 4.21 (- 5.61, - 2.82)	0.001 <sup>a</sup>	1.049	/	/	/
BDI	- 1.06 (- 1.43, - 0.69)	0.001 <sup>a</sup>	1.418	- 1.72 (- 2.07, - 1.38)	0.001 <sup>a</sup>	0.932
Ortostatska intolerancija	- 1.07 (0.45, 1.69)	0.001	1.691	/	/	/
Totalni skor COMPASS-31	- 1.44 (- 1.55, - 0.74)	0.001 <sup>a</sup>	1.819	- 0.44 (- 0.61, - 0.27)	0.001 <sup>a</sup>	0.976

Legenda: <sup>a</sup> - < 0.001; \* - Cohen's f<sup>2</sup>; BDI – Bekova skala depresivnosti; CI – Interval poverenja; COMPASS-31 – Kompozitni skor autonomnih simptoma-31; EDSS - proširena skala onesposobljenosti (engl. *Expanded Disability Status Scale*); MS – Multipla skleroza; NMOSB – Neuromijelitis optika spekta bolesti;

## 5. DISKUSIJA

Studija u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila je značajan broj uzoraka DNK osoba obolelih od NMOSB, zatim obolelih od MS, kao i uzoraka zdravih ispitanika (NMOSB = 64, MS = 40, kontrolni uzorci = 100) u cilju molekularno – genetičke analize gena *AQP4* i potencijalne detekcije varijanti od značaja i njihove korelacije sa određenim kliničkim karakteristikama osoba obolelih od NMOSB. Takođe, uzorci pacijenata sa NMOSB analizirani su primenom WES tehnologije, u cilju istraživanja genetičke osnove NMOSB. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata prikazane su u Tabeli 13. Kada su u pitanju demografski podaci ispitanika, statistički značajna razlika između kohorte pacijenata sa NMOSB i MS uočena je u odnosu na starost na početku bolesti, koja je bila viša kod osoba sa NMOSB ( $p = 0.001$ ), zatim, u trajanju bolesti, koja je bila duža u kohorti pacijenata sa MS ( $p = 0.014$ ), kako je prikazano u Tabeli 13. Takođe, kada su u pitanju osnovne kliničke karakteristike između NMOSB i MS, statistički značajna razlika postignuta je broju relapsa u prethodnoj godini koja je bila viša u grupi pacijenata sa NMOSB ( $p = 0.037$ ), kako je prikazano u Tabeli 13.

Izvršeno je sekvenciranje svih pet egzona gena *AQP4* metodom po Sangeru [137], nakon čega je identifikovano ukupno sedam jednonukleotidnih varijanti (Tabela 14). Naime, u egzonu 1 gena *AQP4* nisu detektovane varijante od značaja u sve tri ispitivane grupe. Kod 15 bolesnika sa NMOSB, 11 bolesnika sa MS, kao i kod 19 kontrolnih ispitanika, detektovana je jednonukleotidna sinonimna varijanta u heterozigotnom obliku u egzonu 2a gena *AQP4*, (NM\_001650.7:c.201G>A, p.Pro67Pro). Varijanta je zabeležena u *gnomAD* kohorti u heterozigotnom obliku sa učestalošću od 0.0000119 [399]. S obzirom na to da je ova detektovana varijanta prisutna u heterozigotnom obliku i u opštoj populaciji, kao i u kontrolnoj grupi u okviru ovog istraživanja, te da se ne nalazi u evolutivno očuvanom regionu gena *AQP4* (phyloP100 zbir je -1.467) [400], kao i da je prema *in silico* predikcionom softveru *MaxEntScan* (koji omogućava predikciju značaja patogenosti sinonimnih varijanti), okarakterisana kao benigna [401], detektovanu varijantu svakako klasifikujemo kao benignu. Varijanta (p.Pro67Pro) je novootkrivena, odnosno nije prijavljena u dostupnim bazama genomskih varijanti kao što su *ClinVar* [402], i *LOVD* [403]. Pomenuta varijanta (p.Pro67Pro) nije prijavljena ni u dostupnoj literaturi, dok *CADD* (engl. *Combined Annotation Dependent Depletion*) zbir od 1.392 sugeriše da je ova varijanta benigna [404]. Takođe, kod jednog kontrolnog ispitanika detektovana je jednonukleotidna *missense* varijanta u heterozigotnom obliku u egzonu 2a gena *AQP4* (NM\_001650.7: c.112G>C, p.Val38Leu). Varijanta je zabeležena u *gnomAD* kohorti u heterozigotnom obliku sa učestalošću od 0.00000398 [399]. Isto tako, varijanta (p.Val38Leu) nalazi se u evolutivno očuvanom regionu gena *AQP4* (phyloP100 zbir je 7.899) [400]. Prema *in silico* predikcionim softverima (*MutationTaster* [405], *MetaLR*, *REVEL*) dobijena varijanta (p.Val38Leu) okarakterisana je uglavnom kao varijanta nejasnog značaja (engl. *Variant of Uncertain Significance*, VUS). Za ovu varijantu, *CADD* zbir iznosio je 2.88 što sugeriše da je varijanta benigna [404]. Većina opisanih *missense* varijanti u genu *AQP4* okarakterisano je kao VUS. Varijanta (p.Val38Leu) je novootkrivena, odnosno nije prijavljena ni u *ClinVar* [402], ni u *LOVD* [403] bazama genomskih varijanti, dok sa druge strane, nije izdvojena niti objavljena u dostupnoj literaturi. U egzonu 2b gena *AQP4* kod jednog bolesnika sa NMOSB, jednog bolesnika sa MS i dva kontrolna ispitanika, detektovana je heterozigotna jednonukleotidna sinonimna varijanta (NM\_001650.7:c.366G>A, p.Gln122Gln). Ova varijanta u egzonu 2b gena *AQP4* zabeležena je u *gnomAD* kohorti u heterozigotnom i homozigotnom obliku sa učestalošću od 0.0263 [399]. S obzirom na to da je varijanta (p.Gln122Gln) prisutna i kod kontrolnih subjekata u

globalnoj populaciji, kao i u kontrolnoj grupi u heterozigotnom obliku, te da se ne nalazi u evolutivno očuvanom regionu gena *AQP4* (phyloP100 zbir je 3.148) [400], te da je prema *in silico* predikcionom softveru *MaxEntScan* za predikciju značaja patogenosti sinonimnih varijanti [401] okarakterisana kao benigna, dobijenu varijantu (p.Gln122Gln) gena *AQP4* klasifikujemo kao benignu. Ova varijanta je novootkrivena, odnosno nije prijavljena ni u *ClinVar* [402], ni u *LOVD* [403] bazama genomskih varijanti, niti je izdvojena u dostupnoj literaturi. Takođe, CADD zbir iznosio je 5.736, koji svakako ukazuje na to da je varijanta (p.Gln122Gln) benigna [404]. U egzonu 3 gena *AQP4* kod jednog bolesnika sa NMOSB, kao i kod jednog pacijenta sa MS, i dva kontrolna ispitanika detektovana je heterozigotna jednonukleotidna sinonimna varijanta (NM\_001650.7:c.492G>A, p.Leu164Leu). Takođe, treba istaći da je ova varijanta detektovana i kod istih bolesnika kod kojih je detektovana i prethodno navedena c.366G>A (p.Gln122Gln) sinonimna varijanta. Ova pomenuta varijanta je zabeležena u *gnomAD* kohorti u heterozigotnom i homozigotnom obliku sa učestalošću od 0.0286 [399]. S obzirom na to da je varijanta c.366G>A (p.Gln122Gln) prisutna i kod kontrolnih subjekata u globalnoj populaciji, kao i u kontrolnoj grupi u okviru ovog straživanja i to u heterozigotnom obliku, kao i da se ne nalazi u evolutivno očuvanom regionu gena *AQP4* (phyloP100 zbir je 2.02) [400], dok je prema *in silico* predikcionom softveru *MaxEntScan* za predikciju značaja patogenosti sinonimnih varijanti [401], okarakterisana kao benigna, ovu varijantu u genu *AQP4* klasifikujemo kao benignu. Varijanta c.366G>A (p.Gln122Gln) je novootkrivena, odnosno nije prijavljena u bazama genomskih varijanti (*ClinVar* [402], *LOVD* [403]). Isto tako, ova varijanta nije opisana u dostupnoj literaturi, dok CADD zbir od 0.021 sugerise da je varijanta c.366G>A (p.Gln122Gln) benigna [404]. U egzonu 4 gena *AQP4* kod jednog bolesnika sa MS detektovana je heterozigotna jednonukleotidna intronska/nekodirajuća varijanta u intronu 3 (NM\_001650.7:c.613-10T>A). Prema dostupnoj literaturi, u ovom genu, do sada, nisu opisane varijante od značaja u nekodirajućem regionu. Varijanta c.613-10T>A nije zabeležena u *gnomAD* kohorti u homozigotnom i heterozigotnom obliku [399]. Takođe, nije detektovana ni iz uzoraka kontrolne grupe u ovom istraživanju, Tabela 15. Varijanta c.613-10T>A se ne nalazi u evolutivno očuvanom regionu gena *AQP4* (phyloP100 zbir je 2.351) [400]. Takođe, ova varijanta je novootkrivena, odnosno nije prijavljena ni u *ClinVar* [402], ni u *LOVD* [403] bazama genomskih varijanti, a odsustna je i iz dostupne literature. Prema *in silico* predikcionom softveru *MaxEntScan* varijanta c.613-10T>A okarakterisana je kao VUS [401]. Sa druge strane, CADD zbir je iznosio 1.791, što sugerise benigni efekat ove varijante [404]. Na osnovu svega navedenog, zbog oskudnosti informacija o datoj varijanti (c.613-10T>A) u nekodirajućem regionu gena *AQP4*, ovu varijantu, za sada, možemo klasifikovati kao varijantu nejasnog značaja. U egzonu 5 gena *AQP4* kod jednog bolesnika sa NMOSB i kod jedne osobe sa MS, detektovana je heterozigotna jednonukleotidna *missense* varijanta (NM\_001650.7:c.955G>A, p.Val319Ile). Dakle, ova varijanta je zabeležena u *gnomAD* kohorti u heterozigotnom obliku sa učestalošću od 0.000636 [399]. Varijanta c.955G>A, (p.Val319Ile) se nalazi u relativno očuvanom regionu gena (phyloP100 zbir je 5.343) [400]. Takođe, prema *in silico* predikcionim softverima *MutationTatster* [405] i *MetaLR* okarakterisana je kao VUS, a prema *REVEL* i *CADD* kao benigna (CADD zbir je 1.108) [404]. Isto tako, treba napomenuti da je ova detektovana varijanta prijavljena u *ClinVar* [402] bazi podataka (*ClinVarID*:252591) kao VUS. Sa druge strane, kod jednog kontrolnog ispitanika u ovom istraživanju detektovana je heterozigotna jednonukleotidna *missense* varijanta (NM\_001650.7:c.832A>G, p.Met278Val). Ova varijanta nije zabeležena u *gnomAD* kohorti u homozigotnom i heterozigotnom obliku [399]. Detektovana varijanta c.832A>G, (p.Met278Val) se ne nalazi u evolutivno očuvanom regionu gena *AQP4* (phyloP100 zbir je 0.683) [400], a prema *in silico* predikcionim softverima *MutationTatster* [405], *MetaLR*, *REVEL* i *CADD* (CADD zbir je 0.639) [404], okarakterisana je kao benigna. Varijanta c.832A>G, (p.Met278Val) je novootkrivena,

odnosno nije prijavljena u *ClinVar* [402], ni u *LOVD* [403] kao dostupnim bazama genomskih varijanti, a takođe nije opisana u dostupnoj literaturi u genu *AQP4*.

Kada je u pitanju postojanje potencijalne povezanosti dobijenih varijanti u genu *AQP4* sa pojavom NMOSB, u studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije, učinjeno je poređenje učestalosti heterozigota za ove varijante između kohorte obolelih od NMOSB i kontrolne grupe ispitanika, kada nije dostignuta statistički značajna razlika, kako je prikazano u Tabeli 16. Sa druge strane, u studiji koju su sproveli Matiello i sar. 2009 godine i koja je obuhvatila ukupno 191 (177 sporadičnih i 14 familijarnih slučajeva) pacijenata sa NMOSB, od kojih je najveći broj obolelih bio kavkaskog porekla, kao i 1363 zdravih ispitanika (kontrolna grupa), jedna od ukupno 8 jednonukleotidnih varijanti (22695167:TA) u genu *AQP4*, bila je statistički značajno povezana sa NMOSB fenotipom (MAF = 0.01, p = 0.026), dok su kod ukupno 3 pacijenta (od kojih su dva bila u srodstvu), izdvojene dve različite *missense* alelne mutacije (R19I, R19T) na poziciji 19 arginina, koje su okarakterisane kao specifične za NMOSB [406]. Studija u okviru ove doktorske disertacije u analiziranoj kohorti NMOSB pacijenata nije sadržala familijarne slučajeve bolesti. Imajući u vidu izuzetan značaj AQP4-IgG u patogenezi NMOSB, kao i u procesu postavljanja dijagnoze ove bolesti, Crane i sar. su 2011 godine ispitali, između ostalog, i uticaj tačkastih mutacija odnosno jednonukleotidnih *missense* varijanti u genu *AQP4* (posebno arginin 19 polimorfizama) na eventualnu produkciju AQP4-IgG, ili mogućeg uticaja na formiranje OAPs struktura, i tom prilikom nije uočen značaj ovih varijanti, kako u formiranju specifičnih supramolekularnih AQP4 struktura, tako i sposobnosti vezivanja AQP4-IgG za specifične epitope AQP4 proteina [2, 162, 170, 407]. Takođe, u studiji koju su sproveli Pisani i sar. 2014 godine i koja se bavila detekcijom *point* odnosno tačkastih mutacija u genu *AQP4*, sa ciljem procene njihovog uticaja na molekularnu organizaciju epitopa AQP4 proteina i formiranja OAPs struktura, ukazala je na značaj varijante sa aspartatom na poziciji 69 (Asp69) u kontroli prostorne ekstracelularne konformacije A petlje, u organizaciji epitopa AQP4 proteina, ne menjajući pritom sposobnost formiranja OAPs struktura, niti fiziološke funkcije AQP4 proteina kao vodenih kanala, što za posledicu može imati poseban afinitet patogenih poliklonalnih AQP4-IgG prema takvoj organizaciji epitopa [408]. Takođe, kada je u pitanju kavkaska populacija obolelih od NMOSB, analizom gena *AQP4* kod ukupno 18 pacijenata (od kojih je njih 12 bilo AQP4-IgG seropozitivno), izdvojene su određene varijante ovog gena, od kojih jedna u 5'UTR regionu (c.-39G>A), potom dve tihe mutacije u egzonu 2 (Pro67Pro i Gln122Gln), jedna varijanta u egzonu 3 (Leu164Leu) i jedna *missense* varijanta u egzonu 4 (Met224Thr), čiji značaj u NMOSB nije mogao biti jasno definisan usled malog broja ispitanika, iako su mutacije u egzonu 2 gena *AQP4* (Gln122Gln), kao i u egzonima 3 i 4 detektovane samo kod AQP4-IgG seropozitivnih pacijenata obolelih od NMOSB [409]. U studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije, takođe je u drugom egzonu gena *AQP4* detektovana pomenuta varijanta rs72557968 (Gln122Gln) kod jednog pacijenta u kohorti obolelih od NMOSB, ali i kod jednog pacijenta sa MS, kao i kod dva subjekta u kontrolnoj grupi (Tabela 14 i Tabela 15). Dakle, studija koju su sproveli Garcia-Miranda i sar. 2019 godine u okviru analize polimorfizama gena *AQP4*, obuhvatila je i 16 uzoraka osoba sa MS, kada izdvojene varijante u ovom genu nisu bile povezane sa pojavom MS, što je takođe u saglasnosti i sa rezultatima naše studije, kojom je obuhvaćeno ukupno 40 pacijenata sa MS kod kojih nisu detektovane rizične varijante za pojavu bolesti (Tabela 16), što je i očekivan nalaz s obzirom na činjenicu da su NMOSB i MS prepoznate kao posebni entiteti sa različitim etiopatogenetskim mehanizmima, koji dovode do razvoja ove dve bolesti [2, 335, 409]. Takođe, u našoj studiji nije uočena statistički značajna povezanost dobijenih polimorfizama u genu *AQP4* prilikom poređenja kohorte obolelih od NMOSB, MS i grupe zdravih ispitanika (Tabela 17). Sa druge strane, molekularno-genetičke analize gena *AQP4* u kineskoj, odnosno azijskoj populaciji, na uzorku od 122 osobe obolele od NMOSB (AQP4-IgG seropozitivni

slučajevi) detektovano je ukupno 14 novih SNP, među kojima nije bilo nesinonimnih mutacija, i čija frekvencija je bila niska u ispitivanoj kohorti, te nije uočena korelacija ovih varijanti sa razvojem susceptibilnosti prema NMOSB u poređenju sa kontrolnom grupom od 204 uzoraka zdravih ispitanika, mada je sugerisano da određeni polimorfizmi u nekodirajućim regionima gena za AQP4 kao što su A/T genotip u rs1058424 i C/T genotip u rs3763043 koji pripadaju 3'UTR, bi se mogli dovesti u vezu sa uticajem na regulatorne molekularne mehanizme, a samim tim i sa mogućim uticajem na pojavu NMOSB kod ovih pacijenata, te je ukazana potreba za daljim sprovođenjem funkcionalnih studija [410]. U studiji koja je objavljena 2016 godine i koja je takođe obuhvatila kinesku populaciju, ali sa manjom kohortom obolelih od NMOSB, sekvenciranjem gena *AQP4* izdvojeni su određeni česti, ali i dva ređa polimorfizma (rs61731038 i rs150587304) za datu populaciju, kada nije uočena korelacija sa NMSOB [411], što je u saglasnosti i sa rezultatima naše studije. Dakle, ova pomenuta studija Yang i sar. obuhvatila je ukupno 62 osobe sa NMOSB, 87 osoba sa MS, kao i kontrolnu grupu koju je činilo 109 zdravih ispitanika, upoređivanjem dobijenih varijanti u genu *AQP4* nije uočena povezanost detektovanih polimorfizama sa pojavom kako NMOSB tako i MS, primenom logističke regresione analize, sugerišući da ovi polimorfizmi u genu *AQP4* ne utiču na podložnost prema pojavi NMOSB i MS [411], što je takođe u saglasnosti sa rezultatima u istraživanju sprovedenom tokom izrade ove doktorske disertacije. Prema tome, u našoj studiji izvršena je komparacija varijanti *AQP4* gena od značaja izdvojenih u kohorti obolelih od MS sa kontrolnom grupom, kao i varijanti u *AQP4* genu između NMOSB i MS kohorte (Tabela 16). Sa druge strane, komparacija izdvojenih varijanti *AQP4* gena izvršena je i između kohorte obolelih od NMOSB, MS i kontrolne grupe ispitanika. Nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa u odnosu na varijante *AQP4* gena (Tabela 17). Isto tako, statistički značajna korelacija dobijenih polimorfizama u genu *AQP4* i pojave NMOSB (kao ni MS) nije uočena ni u studiji koja je obuhvatila korejsku populaciju od ukupno 178 pacijenata (99 osoba sa NMOSB i 79 osoba sa MS), kao i 237 zdravih osoba (kontrolna grupa) [412]. Svakako, kada je u pitanju poređenje rezultata dobijenih u studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije, treba uzeti u obzir određene razlike u odnosu na pomenute studije, pre svega, različitu etničku pripadnost pacijenata i zdravih ispitanika, odnosno kontrolne grupe u ovom istraživanju. Sa druge strane, studija koja je, između ostalih, obuhvatila i 18 pacijenata sa NMO/NMOSB, potom, 38 pacijenata obolelih od MS kao i 39 zdravih ispitanika, u kojoj je sekvenciranjem gena *AQP4* detektovana varijanta na poziciji -1003 bp (A-G) u promotoru ovog gena, čija frekvencija je bila značajno viša u grupi ispitanika sa AQP4-IgG seropozitivnom formom bolesti, u odnosu na one sa AQP4-IgG seronegativnom formom bolesti, kao i zdravim kontrolnim ispitanicima, što sugerise moguću povezanost ovog polimorfizma sa AQP4-IgG serostatusom [413]. Takođe, studija koja je obuhvatila obolele od NMOSB u japanskoj populaciji sekvenciranjem gena *AQP4* ukazala je da polimorfizam (rs2075575) u regionu promotora ovog gena, povećava rizik za pojavu AQP4-IgG seropozitivnog NMOSB u ispitivanoj populaciji [414]. Pomenuta varijanta (rs2075575) nije detektovana u ispitivanim grupama u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije, uz napomenu da u našoj studiji nije obuhvaćeno sekvenciranje nekodirajućih regiona u genu *AQP4*, kao i potrebe uvažavanja etičkih razlika kada je u pitanju ispitivana populacija pacijenata.

Naša studija je posebno ispitivala i povezanost određenih polimorfizama u genu *AQP4* sa najvažnijim kliničkim i parakliničkim karakteristikama pacijenata obolelih od NMOSB (Tabela 18). Kako je prikazano u Tabeli 18, izdvojena rs35248760 varijanta bila je povezana sa pojavom mijelitisa kod ovih osoba (Spearman 0.299,  $p = 0.016$ ), dok ostale kliničke i parakliničke karakteristike nisu bile statistički značajno asociirane sa varijantama od interesa u genu *AQP4* osoba obolelih od NMOSB. Do danas je objavljen mali broj rezultata studija koje su se direktno bavile korelacijom određenih polimorfizama gena *AQP4* kao genetičkih markera sa kliničkim i

parakliničkim karakteristikama osoba sa NMOSB. Pa je tako, na primer, u studiji kineskih autora, Qiu i sar. iz 2015 godine, obuhvaćeno ukupno 208 pacijenata sa AQP4-IgG seropozitivnom formom NMOSB, kao i 204 zdravih osoba u okviru kontrolne grupe, kada je pokazano da su polimorfizmi rs1058424 i rs3763043 u 3'-UTR gena *AQP4*, bili statistički značajno povezani sa pojavom transverzalnog mijelitisa kod osoba obolelih od NMOSB, dok su tri varijante u ovom genu (rs1058424, rs335929 u 3'-UTR, kao i rs151244 u regionu promotora) bile udružene sa optičkim neuritisom, dok su sa druge strane, polimorfizam rs6508459 u 3'-UTR i rs3763040 varijanta u intronskom regionu, bile udružene sa koegzistirajućim sistemskim autoimunskim bolestima [415]. Treba istaći da u studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije nije detektovana ni jedna od navedenih varijanti gena *AQP4* kod obolelih osoba sa NMOSB koju su izdvojili Qiu i sar. Takođe, u našoj studiji sekvenciranjem nije obuhvaćen region promotora kao ni UTR na 5' i 3' kraju DNK lanca u genu *AQP4* što se može smatrati relativnim nedostatkom ove studije. Takođe, u studiji koju su sprovedli Matsushita i sar. iz 2020 godine i koja je obuhvatila 211 pacijenata sa NMOSB pretežno azijskog porekla (Japan), kao i 1919 zdravih osoba (kontrolna grupa), u okviru primenjene GWAS analize izdvojeno je ukupno 46 SNP povezanih sa genom *AQP4*, od kojih je samo (rs162003) varijanta bila statistički značajno povezana sa merom stepena onesposobljenosti odnosno EDSS ( $p = 0.0056$ ), ali ova asocijacija nije potvrđena nakon primene statističkih alata za korekciju u okviru multiplog testiranja [92]. Naime, u ovoj studiji nije potvrđena povezanost određenih polimorfizama gena *AQP4* sa kliničkim i parakliničkim rezultatima, mada treba imati na umu postojeće razlike (etnička pripadnost), u odnosu na grupu ispitanika u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije. Imajući u vidu relativno mali broj pacijenata sa NMOSB uključenih u naše istraživanje sa jedne strane, kao i postojanje relativno slabe povezanosti mijelitisa i rs35248760 polimorfizma (Spearman 0.299) sa druge strane, svakako je neophodno ove rezultate potvrditi na većem broju ispitanika kavkaskog porekla i obuhvatiti neokodirajuće regione gena *AQP4*.

Takođe, u studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije obavljen je WES za svih 64 uzoraka DNK pacijenata sa NMOSB (iz Srbije i Hrvatske), čime je prethodno odabran set gena i varijanti izdvojenih u tim genima prema rezultatima studije Tabansky i sar. koja je, između ostalog, obuhvatila ukupno 36 pacijenata od kojih je 22 pacijenata sa NMOSB bilo poreklom iz Srbije [113]. U Tabeli 19 prikazani su geni odnosno varijante koje su replikovane prilikom WES u našoj NMOSB kohorti pacijenata. Naime, u genu *NOTCH1* izdvojene su dve replikovane varijante (identične varijantama u genu *NOTCH1* detektovane u istraživanju koje su sprovedli Tabansky i sar. [113]), ali za koje nema dovoljno dokaza da su povezane sa pojavom NMOSB u našoj kohorti pacijenata. Međutim, opisana je povezanost određenih, retkih varijanti, u genu *NOTCH1* sa različitim tipovima maligniteta u ljudi, ali i imunski posredovanim poremećajima [416-419]. Pa tako, na primer, pokazano je da su određene varijante u genu *NOTCH1* bile povezane i sa MS, posebno sa procesima vezanim za neuroinflamaciju i astrogliozu, koje mogu biti prominentne u ovoj bolesti [420]. Sa druge strane, u studiji Huang i sar. iz 2013 godine koja je obuhvatila 106 pacijenata sa NMO/NMOSB, zatim, 118 osoba sa MS kao, i 152 uzorka zdravih osoba, pokazano je da varijanta (rs422951) u genu *NOTCH4* može imati protektivan značaj kada je u pitanju MS u japanskoj populaciji ispitanika, što nije pokazano za kohortu pacijenata sa NMO/NMOSB [421]. Detektovana varijanta u genu *SPINK5* u kohorti NMOSB pacijenata u istraživanju koje su sprovedli Tabansky i sar nije replikovana [113] u našoj studiji. Do sada nisu opisane mutacije u genu *SPINK5* koje su povezane sa pojavom ili fenotipskim varijetetima NMOSB, dok su određene varijante u genu *SPINK5* pre svega, asociirane sa pojavom Nethertonovog sindroma, koji uključuje brojne abnormalnosti kože i imunskog sistema [422-424]. Kada je u pitanju gen *GUSB*, u našoj kohorti pacijenata sa NMOSB identifikovana je ista varijanta kao i u studiji Tabansky i sar. [113], te je važno napomenuti da smo sprovedenom *burden* analizom povećano opterećenje primetili u ovoj

varijanti gena *GUSB*, mada u dostupnoj literaturi nema podataka o povezanosti određenih varijanti u ovom genu sa pojavom MS ili NMOSB. Gen *GUSB* je, do sada, uglavnom povezan sa pojavom mukopolisaharidoze tip VII [425, 426]. Takođe, u studiji koju su sprovedli Tabansky i sar. u kohorti pacijenata sa NMOSB izdvojene su dve varijante u genu *IL6ST*, koje su bile nejasnog značaja [113], i koje nisu replikovane u našoj studiji primenom WES analize (Tabela 19). Do sada, u literaturi takođe nisu opisane jasno patogene varijante u genu *IL6ST* koje bi se mogle povezati sa NMOSB, posebno imajući u vidu značaj IL-6 u određenim patogenetskim mehanizmima u NMOSB [198]. Međutim, kada je u pitanju MS, pokazano je da gen *IL6ST*, verovatno u određenoj koregulaciji sa susednim genom ankirin ponavljajućeg domena 55 (*ANKRD55*), može imati uticaja na patogenetske procese u okviru razvoja MS [427]. Kada je u pitanju gen *FNI*, u istraživanju Tabansky i sar. identifikovano je ukupno tri varijante [113], od kojih su dve replikovane u istraživanju sprovedenom u okviru izrade ove doktorske disertacije, dok je jedna detektovana samo u kohorti pacijenata sa NMOSB u studiji Tabansky i sar. [113], (Tabela 19). Prema dostupnoj literaturi, do sada nije uočena povezanost varijanti u genu *FNI* sa pojavom NMOSB. Svakako, određene varijante u genu *FNI* mogu imati ulogu u patogenezi bolesti kakve su dijabetes melitus tip 1 ali i MS, što je, između ostalog, pokazano u studiji koja je ispitivala udruženost zajedničkih gena i molekularnih mehanizama koji dovode do razvoja ove dve imunski posredovane bolesti [428]. Isto tako, određena eksperimentalna istraživanja na animalnim modelima sa EAE ukazala su na to da regulacija ekspresije gena *FNI* može bitno uticati na stepen fibroze i disfunkcije mokraćne bešike [429]. Sa druge strane, poznato je da su varijante od značaja u genu *FNI* udružene sa različitim tipovima karcinoma, i da ekspresija ovog gena može igrati važnu ulogu u humanoj onkologiji [430-433]. Kada je u pitanju gen *CCR4* u našoj studiji nije replikovana varijanta koja je izdvojena kao jedina varijanta u ovom genu od strane Tabansky i sar. [113]. Uloga ovog, kao i ostalih, hemokinskih receptora ispitivana je u patogenezi NMOSB i MS kada je, na primer u studiji Shimizu i sar. koja je obuhvatila 30 pacijenata sa MS i 8 pacijenata sa NMO/NMOSB, pokazano da ekspresija *CCR4* na CD4+ i CD8+ T ćelijama predstavlja moguće indikatore aktivnosti ovih bolesti (NMOSB i MS), u različitom odnosu sa ostalim hemokinskim receptorima [434]. Isto tako, pokazano je da su *CCR4* molekuli ekspresirani dominantno na Th2 (CD4+) limfocitima osoba sa MS, posebno nakon primenjene terapije interferonom beta (INF-β) [435]. U ovim studijama svakako nije ispitivana eventualna uloga i značaj polimorfizama u genu *CCR4*.

Kao što je pomenuto, u imunopatogenezi AQP4-IgG seropozitivne forme NMOSB, presudnu ulogu u imunopatogenetskim procesima ima aktivacija sistema komplemента, koja nastaje usled formiranja antigen-antitelo kompleksa, što dalje vodi kompleksnom kaskadnom procesu koji za posledicu ima konačno oštećenje i smrt astrocita, što je udruženo i sa oštećenjem oligodendrocita odnosno pojavom demijelinizacije, ali i sa oštećenjem neuroaksonskih komponenti [209, 212, 213, 216, 217, 262]. U istraživanju koje su sprovedli Tabansky i sar. izdvojeno je ukupno 7 varijanti u 6 gena čija aktivnost je povezana upravo sa funkcijom sistema komplemента, od kojih smo replikovali obe varijante u genu *C1S*, dok preostalih 5 varijanti dobijenih analizom WES nisu detektovane u našoj NMOSB kohorti ispitanika (Tabela 20) [113]. Važno je istaći da je u istraživanju Hakobyan i sar. iz 2017 godine ispitivan nivo *C1S* proteina u plazmi kod ukupno 54 pacijenata sa NMOSB, zatim 40 pacijenata sa MS, kao i kod 69 zdravih osoba (kontrolna grupa), kada je pokazano da je nivo *C1S* proteina bio značajno viši kod osoba sa NMOSB u odnosu na one sa MS, kao i zdravih ispitanika sugeršući važnost sistema komplemента u NMOSB [436]. U genu *C4A* nisu detektovane varijante od značaja u studiji Tabansky i sar. [113], niti u našoj kohorti pacijenata sa NMOSB. Do sada nema mnogo objavljenih podataka kada je u pitanju značaj ove komponente kao izolovanog biomarkera u NMOSB, dok je pokazano da kod osoba sa AQP4-IgG seropozitivnom formom NMOSB, postoje nešto niže vrednosti C3, a posebno C4 komponente

komplementa u plazmi u odnosu na pacijente koji boluju od MS, MOGAD, kao i zdravih osoba što svakako sugerise veću potrošnju komponenti sistema komplementa usled imunopatoloških i patofizioloških procesa koji se mogu nalaziti u osnovi NMOSB [436, 437]. Međutim, u studiji Tatomir i sar. pokazano je da je nivo C4a proteina komplementa značajno povišen u plazmi pacijenata obolelih od aktivne forme RRMS, u odnosu na klinički stabilnu MS, kao i u odnosu na zdrave osobe, što može služiti i kao potencijalni molekularni biomarker bolesti [438]. Sa druge strane, rezultati studije Zelek i sar. iz 2020 godine kojom je obuhvaćena analiza seta, odnosno kombinacije od 6 komponenti sistema komplementa u likvoru (uključujući C3, C4, C5 i C9), kod ukupno 53 osobe sa definitivnom MS, zatim 17 osoba sa KIS, 11 osoba sa NMOSB kao i 35 zdravih ispitanika, pokazali su da ova kombinacija omogućava distinkciju NMOSB od MS, čime se više vrednosti određenih komponenti komplementa u CSF sreću kod obolelih od NMOSB, što je objašnjeno postojanjem eventualno izraženije disregulacije sistema komplementa kod ovih osoba [439]. Između ostalog, pokazano je da raznolikost humanih gena koji kodiraju za komponente sistema komplementa (posebno gena *C1* i *C4*), kao i njihova deficijencija, može uticati na pojavu poremećaja funkcije imunskog sistema, sa posledičnim porastom podločnosti ili razvojem brojnih autoimunskih oboljenja, ali i teških infekcija usled imunološke disregulacije [440]. Prema tome, nedavno je objavljen i prikaz slučaja pacijenta kod koga se pretpostavlja da se u osnovi koegzistencije multiplih autoimunskih poremećaja nalazi specifična kombinacija varijanti gena *C2* i *C8B*, koji potencijalno mogu uticati na pojavu multidimenzionalne imunske disregulacije [441].

U studiji koju su sproveli Tabansky i sar. u kohorti obolelih od NMOSB detektovane su *de novo* varijante u genima; *SNX4*, *PDS5A* i *BIN2* [113], dok je u našem istraživanju bila replikovana varijanta samo u genu *SNX4* (Tabela 21).

Takođe, kako je prethodno izneto, MHC lokus predstavlja imunogenetički centar sa vrlo kompleksnim aranžmanom velikog broja gena koji se, između ostalog, odlikuju izrazitim stepenom polimorfizma čiji je značaj prepoznat u mnogim bolestima, uključujući NMOSB i MS [94, 95, 98]. Kada je u pitanju MHC I klasa u ovoj studiji odabran je set od ukupno šest gena, gde su u genima *UBE2H* i *ZNRF1* pronađene identične varijante onima u studiji Tabansky i sar. [113], kako je prikazano u Tabeli 22. Međutim, u studiji koju su sproveli Tabansky i sar. otkrivena je još jedna retka varijanta nejasnog značaja u genu *ZNRF1* kod jednog pacijenta sa NMOSB, koja nije replikovana u našoj analizi primenom WES metodologije (Tabela 22). Do sada, u dostupnoj literaturi, nema podataka o povezanosti gena *UBE2H* sa pojavom NMOSB ili MS, već su određene varijante u ovom genu udružene sa mogućom pojavom neurorazvojnih i neurodegenerativnih bolesti [442-444]. Produkti gena *ZNRF1* su posebno mnogo eksprimirani unutar nervnog sistema, posebno tokom razvoja nerbnog sistema, kada imaju ubikvitin ligaznu aktivnost koja je, pre svega, važna za procese neuroplasticiteta [445]. Sa druge strane, produkti gena *ZNRF1* mogu imati potencijalnu ulogu u pojačanju proinflamatornog odgovora i/ili inhibiciji određenih antiinflamatornih citokina, odnosno mogu uticati na pojedine mehanizme imunske regulacije [446]. Takođe, do sada u dostupnoj literaturi nisu opisane varijante u genu *ZNRF1* koje bi se mogle dovesti u vezu sa pojavom ili kliničkim fenotipom NMOSB, kao i MS. U kohorti pacijenata sa NMOSB u istraživanju koje su sproveli Tabansky i sar. kod jednog pacijenta detektovana je retka varijanta u genu *HUWE1*, koja je okarakterisana kao varijanta nepoznatog značaja (Tabela 22), i koja nije replikovana u studiji u okviru ove doktorske disertacije [113]. Gen *HUWE1* utiče, pre svega, na procese aksonalnog razvoja, neuronalne migracije, te je potencijalno uključen u određene neurorazvojne poremećaje [447].

U Tabeli 23 prikazane su varijante u ukupno 4 gena izdvojenih u okviru MHC II u studiji koju su sproveli Tabansky i sar. [113], od kojih su identične varijante u našoj studiji identifikovane u genima *CANX* i *DCTN3*, od čega za varijantu u genu *DCTN3* nema pouzdanih pokazatelja

udruženosti sa NMOSB prema našem istraživanju. Do sada u dostupnoj literaturi nisu opisane druge varijante u genu *DCTN3* koje su asociirane sa pojavom NMOSB i MS. Takođe, kako je prikazano u Tabeli 23 u genima: *DCTN1* i *OSBPL1A* detektivane su retke varijante nejasnog značaja kada su u pitanju nalazi Tabansky i sar. [113], koje nisu replikovane u studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije. Sa druge strane, pokazano je da određeni polimorfizmi u genu *DCTN1* mogu biti udruženi sa različitim neurodegenerativnim bolestima, od kojih se posebno izdvaja amiotrofična lateralna skleroza (ALS) [448-451]. Drugi polimorfizmi pomenutih gena u okviru MHC II (Tabela 22), koji bi mogli biti udruženi sa pojavom NMOSB ili MS, prema dostupnoj literaturi, do sada nisu izdvojeni.

Takođe, u našoj studiji nisu replikovane varijante u genima *CLTC* i *DRD4* koje su prethodno izdvojene u analizi koju su sprovedi Tabansky i sar. [113]. Za sada, prema dostupnoj literaturi, nema objavljenih istraživanja o značaju i povezanosti gena *DRD4* sa NMOSB, kao ni sa MS.

Prema tome, ukupno 12 varijanti jeste potvrđeno i u našoj kohorti ispitanika sa NMOSB, u odnosu na studiju Tabansky i sar. [113]. S obzirom na to da je studija koju su sprovedi Tabansky i sar. obuhvatila pacijente bele rase uključujući i pacijente srpskog porekla pokušali smo da izdvojimo identične varijante i odredimo njihov značaj u NMOSB.

Imajući sve navedeno na umu, treba istaći da je neophodno sprovesti studije genoma na većem broju ispitanika, posebno kavkaskog porekla, kako bi se ustanovili potencijalni genetički markeri i kako bi se utvrdila njihova korelacija sa pojavom bolesti i/ili kliničkim karakteristikama kod osoba sa NMOSB. Od posebnog značaja svakako su istraživanja genetičke osnove koja obuhvataju familijarne slučajeve multifaktorskih bolesti kakva je i NMOSB. U studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije nije bilo familijarnih slučajeva u kohortama ispitanika (NMOSB, MS). Međutim, studija Xu i sar. iz 2018 godine koja se bavila ispitivanjem nektin familije gena primenom WES, i koja je pored ukupno 106 uzoraka pacijenata sa sporadičnom formom NMOSB uključila i familijarne oblike ove bolesti (porodica sa dva aficirana člana), kao i 212 uzoraka zdravih ispitanika izdvojila je jednu *missense* mutaciju (delecija) u genu nektinu sličan protein 2 (*NECL2*), (*rs770344177*, *c.1052\_1060delCCACCACCA*, *p. Thr351\_Thr353del*), za koju je pokazano da je verovatno povezana sa familijarnim oblicima NMOSB [452]. Takođe, u studiji koju su sprovedi Chang i sar. 2022 godine primenjen je WES kod 13 familijarnih slučajeva NMOSB dok su, između ostalog, podaci upoređeni sa onima iz studije Zhong i sar. iz 2021 godine koja je obuhvatila 228 slučajeva sporadičnih formi NMOSB kao i 1400 uzoraka zdravih ispitanika, kada je pokazano da je polimorfizam *rs2252257* u promotoru i pojačivaču gena ubikvitin specifična peptidaza 18 (*USP18*), bio povezan sa pojavom familiranog NMOSB, dok su polimorfizmi *rs361553*, *rs2252257* i *rs5746523* u genu *USP18* bili povezani sa sporadičnim formama bolesti [145, 453].

Ovom studijom u okviru izrade doktorske disertacije, između ostalog, obuhvaćen je značajan broj pacijenata obolelih od NMOSB, kao i osoba sa MS (NMOSB = 80, MS = 100) u cilju ispitivanja uticaja bolesti na kvalitet života ovih osoba. Takođe, procenjivan je i uticaj disautonomije koja postoji usled osnovne bolesti, na kvalitet života korišćenjem standardizovanih i validiranih upitnika (MSQoL-54, COMPASS-31), čiji domeni omogućavaju dalju stratifikaciju i analizu povezanosti specifičnih poremećaja funkcije ANS i kvaliteta života osoba obolelih od NMOSB i MS. Kao što je pokazano u Tabeli 24, nije bilo značajnih razlika u demografskim i kliničkim karakteristikama između ove dve grupe ispitanika, osim kada je u pitanju proporcija pacijenata koji su imali najmanje jedan relaps u prethodnoj godini. Ova proporcija je statistički bila

značajno viša kod osoba obolelih od NMOSB, u odnosu na osobe sa MS (61.3% osoba sa NMOSB u odnosu na 40.0% osoba sa MS).

Ispitivanjem povezanosti pojedinačnih skorova domena MSQoL-54 upitnika kod pacijenata sa NMOSB i MS, upotrebom logističke regresione analize (OR sa 95 CI) sa prilagođavanjem prema polu, uzrastu i trajanju bolesti, utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost domena u okviru kompozita mentalnog zdravlja (emocionalno blagostanje, kognitivno funkcionisanje i distres vezan za zdravstveno stanje) kod pacijenata sa NMOSB, u odnosu na ispitanike obolele od MS (Tabela 25). Ovakav nalaz svakako sugerise bolji ukupni kvalitet života obolelih od NMOSB u odnosu na osobe sa MS. Sa druge strane, skor u domenu zadovoljstva seksualnim funkcionisanjem bio je statistički značajno niži kod pacijenata obolelih od NMOSB u odnosu na ispitanike sa MS ( $p=0.035$ ). Kada je u pitanju kompozit fizičkog zdravlja u okviru MSQoL-54 upitnika, nije pokazana statistički značajna razlika između ove dve grupe ispitanika (NMOSB i MS), kako u totalnom odnosno ukupnom skor, tako ni u okviru pojedinačnih domena (Tabela 25). Do danas, suštinski nema mnogo objavljenih studija koje su ispitivale odnos kvaliteta života povezanog sa zdravljem između osoba obolelih od NMOSB i pacijenata sa MS, upotrebom specifičnog instrumenta kakav je MSQoL-54 upitnik. Pa je tako, na primer, relativno nedavno odnosno 2022 godine, objavljena studija preseka iz Argentine koja je obuhvatila 53 pacijenata sa NMOSB, zatim, 100 pacijenata obolelih od MS, kao i 90 zdravih ispitanika (kontrolna grupa), kod kojih je kvalitet života povezan sa zdravljem ispitivan pomoću kratke forme upitnika od 36 pitanja (engl. *36-Item Short Form Survey Instrument*, SF-36) koji se, kao što je ranije pomenuto, odnosi na percepciju ispitanika o opštim domenima zdravlja i koji je u potpunosti sadržan i u MSQoL-54 upitniku [393, 394], kada je između ostalog, pokazano da postoji statistički značajna razlika u ukupnom skor SF-36 upitnika pacijenata sa NMOSB i MS, u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika, dok sa druge strane, nije dostignuta statistička značajnost kada je u pitanju ukupni skor SF-36 upitnika između grupa obolelih osoba (NMOSB i MS) [454]. Takođe, u ovoj studiji koja je obuhvatila pacijente sa NMOSB i MS iz Argentine, pokazano je da postoji razlika u pojavi telesnog bola i opšteg zdravlja kod osoba sa NMOSB u odnosu na MS, ali nije dostignuta statistička značajnost [454]. U istraživanju sprovedenom u okviru ove doktorske disertacije takođe nije pokazana statistički značajna povezanost skorova u domenu bola između osoba sa NMOSB i MS ( $p=0.427$ , Tabela 25). Svakako, bol je jedan od simptoma čiji je uticaj na kvalitet života osoba sa NMOSB posebno prepoznat pa je tako, na primer, studija objavljena 2018 godine ispitala, između ostalog, uticaj bola koji se javlja u okviru kliničke prezentacije NMOSB, na kvalitet života kod ukupno 193 obolele osobe iz Amerike i Kanade, od kojih je njih 118 (61.1%) bilo pozitivno na AQP4-IgG [455]. Dakle, u ovoj studiji pokazano je da je telesni bol imao najveći uticaj na ukupan kvalitet života pacijenata obolelih od NMOSB, nezavisno od seropozitivnosti na AQP4-IgG, više u odnosu, na primer, od sfinkterijalne i seksualne disfunkcije, kao i smetnji sa vidom [455]. Takođe, u pomenutoj studiji je istaknuto da uticaj bola (najčešće je u pitanju bio bol u leđima) ima značajan negativan efekat na svakodnevne aktivnosti, kao i profesionalni angažman obolelih osoba, a samim tim i na ukupni kvalitet života, kao i da je bol jačeg intenziteta koji se obično javljao na samom početku bolesti, primećen u grupi AQP4-IgG seropozitivnih pacijenata [455]. Isto tako, velika multicentrična studija objavljena 2021 godine kojom je obuhvaćeno ukupno 166 AQP4-IgG seropozitivnih pacijenata iz 13 tercijarnih referentnih neuroloških centara ukazala je, između ostalog, da ukupno 75.3% ovih pacijenata pati od nekog oblika horničnog bola (65.9% obolelih od NMSOB u ovoj studiji imalo je neuripatski bol, 68.8% je imalo bol udružen sa spasticitetom i njih 26.4% je bilo zahvaćeno bolnim toničkim spazmima) [293]. Prema tome, ova multicentrična studija je upotrebom seta upitnika (upitnik za detekciju bola, kratki upitnik za bol, BDI i SF-36 upitnik) pokazala postojanje snažne korelacije težine, odnosno stepena bola, sa svim modalitetima

svakodnevnih aktivnosti, spavanja, raspoloženja, sposobnosti za rad, hodanja i uživanja u životu, gde je posebno istaknuta negativna korelacija neuropatskog bola u odnosu na nociceptivni tip bola kod ovih pacijenata kao, i da hronični bol ima snažan uticaj na depresivnost i svakodnevne aktivnosti, a samim tim i na kvalitet života obolelih [293]. Kada je u pitanju procena uticaja NMOSB na kvalitet života obolelih osoba u azijskoj populaciji, 2022 godine objavljena je studija koja je obuhvatila 210 pacijenata od kojih je njih 199 (94.8%) bilo AQP4-IgG seropozitivno, kada je upotrebom MSQoL-54 upitnika pokazano da uticaj bolesti na radni status, zatim, poremećaj vizualnog sistema, bol i poremećaj funkcije mokraćne bešike i creva imaju snažnu negativnu korelaciju sa kvalitetom života osoba obolelih od NMOSB, ali i da postoji određen stepen negativnog uticaja na ukupno fizičko, emocionalno i mentalno zdravlje ovih osoba [456]. Studija u okviru ove doktorske disertacije nije ispitivala radni status, kao ni uticaj bola na radni status obolelih od NMOSB i MS.

Kada je u pitanju fizička onesposobljenost kod obolelih od NMOSB, istraživanjem u ovoj doktorskoj disertaciji nije pokazana statistički značajna povezanost u odnosu na grupu obolelih od MS, kao što je prethodno pomenuto, mada su u NMOSB kohorti bili učestaliji relapsi koji su se javljali u prethodnoj godini u odnosu na kohortu ispitanika sa MS (Tabela 24). Fizička onesposobljenost svakako može bitno da utiče na kvalitet života osoba obolelih od NMOSB, što se posebno odnosi na tipične manifestacije bolesti, kakva je pojava ON, pa je tako u studiji objavljenoj 2017 godine, ispitivan uticaj sa vidom povezanog kvaliteta života osoba sa AQP4-IgG seropozitivnom formom NMOSB, zatim osoba sa MOG At udruženim poremećajima, kao i dvostruko seronegativnim NMOSB u odnosu na pacijente sa MS, primenom optičke koherentne tomografije (OKT) i specijalizovanog upitnika za procenu uticaja oštećenja vida, kada je pokazano da je kvalitet života vezan za poremećaje sa vidom bio značajno lošiji u grupi pacijenata obolelih od NMOSB u odnosu na MS, i to posebno kod onih sa rekurentnim bilateralnim ON, što je dominantno karakteristika NMOSB [457]. U radu koji je objavljen 2022 godine ispitivan je uticaj fizičke onesposobljenosti usled NMOSB (izražen EDSS-om) na kvalitet života koji je procenjivan standardizovanim upitnikom od 5 dimenzija za procenu kvaliteta života (engl. *Euro Quality of Life – 5 Dimension*, EQ-5D), kod ukupno 176 pacijenata obolelih od NMOSB, koji su učestvovali u dve multicentrične, randomizovane, internacionalne, duplo slepe, placebo kontrolisane studije sa satralizumabom (SAkuraSky, SAkuraStar) gde je, tom prilikom, pokazano da postoji jasna i konstantna korelacija između vrednosti EDSS-a i kvaliteta života koji se manifestuje smanjenjem EQ-5D skora sa svakim povećanjem EDSS-a, odnosno onesposobljenosti usled NMOSB [458]. Isto tako, u 2023 godini objavljeni su rezultati ispitivanja uticaja relapsa na kvalitet života kod ukupno 27 AQP4-IgG seropozitivnih pacijenata koji su učestvovali u placebo kontrolisanoj studiji sa primenom leka ekulizumab u terapiji NMOSB, gde je upotrebom SF-36 upitnika pokazano da i pojava jednog relapsa može dovesti do značajne neurološke onesposobljenosti izražene EDSS-om i može značajno negativno da utiče na kvalitet života obolelih osoba [385].

Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije, kako je prethodno pomenuto, ukazalo je na postojanje statistički značajne razlike u domenu kognitivnog funkcionisanja u okviru MHC između ispitanika sa NMOSB i onih sa MS (NMOSB  $86.5 \pm 18.9$  : MS  $74.6 \pm 23.7$ ;  $p < 0.01$ , Tabela 25), što implicira manju kognitivnu zahvaćenost osoba obolelih od NMOSB. Svakako, veći broj studija je nezavisno ukazao na značajnu zahvaćenost kognitivnog funkcionisanja u okviru NMOSB, kao važne kliničke karakteristike ove bolesti [459, 460]. Rezultati studije koja se bavila uticajem lošijeg kognitivnog funkcionisanja osoba sa NMOSB na kvalitet života, objavljeni su 2022 godine obuhvatajući 41 osobu obolelu od NMOSB iz 13 neuroloških centara u Španiji, ukazali su na to da kognitivni deficit kod ovih osoba ima negativan uticaj na njihov kvalitet života, što je procenjeno upotrebom različitih upitnika kao što su: Skala za procenu uticaja multiple skleroze (engl. *Multiple*

*Sclerosis Impact Scale*, MSIS-29v2), Skala zadovoljstva životom (engl. *Satisfaction with Life Scale*, SWLS), zatim, upitnik za skrining simptoma u MS (engl. *SymptoMScreen Questionnaire*, SyMS), skala za procenu stigme kod hroničnih bolesti od 8 domena (engl. *The Stigma Scale for Chronic Illness 8-item version*, SSCI-8), Skala za procenu uticaja bola (engl. *Pain Effects Scale*, PES) za ukupnu procenu kvaliteta života vezanog za zdravlje [382].

Takođe, pomenuta studija španskih autora iz 2022 godine obuhvatila je i brojne druge aspekte kao što su: težina simptoma, stigma, poremećaji raspoloženja, bol, zamor, poteškoće u radu, kao i stavove i odnos prema kvalitetu života, upotrebom širokog spektra različitih upitnika kod ukupno 71 pacijenta sa NMOSB, ukazavši na značajan uticaj ovih karakteristika na sveukupan kvalitet života vezanog za zdravlje kod obolelih osoba [380]. Dakle, ova studija je pokazala da suštinski nije bilo značajne razlike u ispitivanim domenima između AQP4-IgG seropozitivne i seronegativne grupe pacijenata sa NMOSB, dok je sa druge strane, posebno istaknuto postojanje korelacije svih pomenutih parametara ispoljavanja i uticaja NMOSB (poremećaji raspoloženja, zamor, bol) na fizičku i psihičku dimenziju merenu MSIS-29 upitnikom i to, nešto većeg stepena u psihičkom domenu kod obolelih osoba, čak i kod onih sa niskim stepenom fizičke onesposobljenosti merene EDSS-om [380]. Sa druge strane, u studiji Beekman i sar. iz 2019 godine ispitivan je uticaj NMOSB na kvalitet života upotrebom SF-36 upitnika, a rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim ispitivanjem osoba koje boluju od drugih imunski posredovanih bolesti (uključujući i MS), kada je pokazano da je ukupni uticaj NMOSB na fizički domen kvaliteta života sličan stepenu koji je postignut kod osoba sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE), dok je uticaj NMOSB na psihički domen bio sličan onome koji je dobijen, između ostalog, i za grupu obolelih od MS, dok je sa druge strane, istaknuta i pojava inverzne povezanosti koja se odnosila na diskrepancu u vidu očuvanih domena psihičkog/emocionalnog funkcionisanja u odnosu na značajnu narušenost domena fizičkog funkcionisanja usled bolesti i obrnuto, kod pojedinih učesnika u studiji [461].

Francuska studija autora Chanson i sar. iz 2011 godine takođe je ispitivala nemotorne fenomene vezane za NMOSB, kao što su zamor i poremećaji raspoloženja kod 40 pacijenata kojima je dijagnoza bolesti postavljena prema kriterijumima iz 2006 godine [21], na kvalitet života koji je procenjivan upotrebom modifikovanog MSQoL-54 upitnika sa dodatnih 5 stavki, čiji su rezultati upoređeni sa podacima 117 MS pacijenata dobijenim u studiji Gerbaud i sar. [462, 463]. U ovoj studiji pokazano je da nema statistički značajne razlike u domenima upitnika za procenu kvaliteta života, osim u skorovima domena kognitivnog funkcionisanja osoba sa NMOSB, koje je bilo bolje u odnosu na osobe sa MS, kao i postojanje znatno lošijeg skora svih domena vezanih za kvalitet života pacijenata sa NMOSB u odnosu na zdrave ispitanike [463], što je većim delom u saglasnosti sa rezultatima dobijenim istraživanjem u ovoj doktorskoj disertaciji, korišćenjem osnovnog MSQoL-54 upitnika kod pacijenata sa NMOSB (Tabela 25). Treba istaći da je ograničenje ovog istraživanja u okviru doktorske disertacije svakako nedostatak kontrolne grupe, koju bi činili zdravi ispitanici. Takođe, u studiji Chanson i sar. za procenu zamora kod svih 40 pacijenata sa NMOSB primenjen je modifikovani i prilagođeni upitnik, odnosno skala za procenu zamora (engl. *Fatigue Impact Scale*) sa ukupno 41 pitanjem koja su se odnosila na četiri subkategorije (kognitivna, fizička, psihološka i socijalna dimenzija zamora), a dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima 237 osoba obolelih od MS iz studije Debouverie i sar. [464], kada je ocenjeno da je uticaj NMOSB na psihološku sferu bio manje izražen u odnosu na grupu pacijenata sa MS [463]. Isto tako, u pomenutoj studiji francuskih autora iz 2011 godine, depresivnost je određivana posebnom skalom depresivnog raspoloženja (engl. *Depressive Mood Scale*) kod svih 40 pacijenata sa NMOSB, a ovi rezultati su upoređeni sa grupom od 77 pacijenata obolelih od MS, Radat i sar. [465], kada je pokazano da nije bilo značajnih razlika [463], što je takođe u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u studiji u okviru ove doktorske disertacije u kojoj je depresivnost procenjivana vrlo sličnom i

komparabilnom BDI skalom između grupe obolelih od NMOSB i pacijenata sa MS ( $p=0.433$ , Tabela 25). Barzegar i sar. su 2018 godine objavili rezultate komparativne studije koja se bavila procenom kvaliteta života kod osoba sa NMOSB i MS u iranskoj populaciji, i tom prilikom je obuhvaćeno ukupno 177 pacijenata (41 NMOSB, 136 MS) kod kojih je, takođe, ispitivan kvalitet života primenom SF-36 upitnika, dok je za procenu uticaja zamora korišćena modifikovana skala (engl. *Modified Fatigue Impact Scale*, MFIS) kao i BDI II skala za procenu depresivnosti kod ovih pacijenata, kada je utvrđeno da zamor predstavlja najvažniji faktor predikcije za varijabilnost u skorovima fizičkog i mentalnog funkcionisanja vezanim za procenu kvaliteta života, kao i da je kohorta pacijenata sa NMOSB imala niže skorove kako u somatskim, tako i u kognitivnim domenima BDI II u odnosu na obolele od MS [466]. Svakako, depresivnost može biti vrlo prominentan simptom u pacijenata sa NMOSB, koji bitno korelira sa kvalitetom života i aspektom socijalnog funkcionisanja ovih osoba, što potvrđuju i rezultati nedavno objavljene studije koja je obuhvatila ukupno 138 pacijenata obolelih od NMOSB, gde je za procenu kvaliteta života upotrebljen SF-36 upitnik, dok je za procenu depresivnosti korišćena BDI skala [384]. Ovom studijom Wang i sar. pokazano je da su: pol, uzrast, nivo edukacije, zaposlenost, stepen finansijskih primanja, simptomi i komorbiditeti bili značajno udruženi sa skorovima fizičkog funkcionisanja merenim SF-36 upitnikom, dok su zadovoljstvo socijalnim funkcionisanjem i depresivnost bili značajno povezani sa skorovima mentalnog funkcionisanja, odnosno da je depresivnost snažan medijator povezanosti socijalnog funkcionisanja i mentalnih aspekata kvaliteta života osoba sa NMOSB [384]. Sa druge strane, Mikula i sar. su ukazali da onesposobljenost usled MS utiče na fizičke sposobnosti, što posledično deluje i na pojavu nižeg stepena socijalnih aktivnosti i postignuća obolelih osoba, odnosno da je nedovoljna mogućnost socijalnih aktivnosti povezana sa lošijim skorovima fizičkih postignuća kod ovih osoba [467].

Deo kliničkog ispoljavanja kako NMOSB, tako i MS, jesu svakako simptomi i znaci zahvaćenosti funkcije ANS, kao posledice imunski posredovanih lezija na različitim nivoima anatomske organizacije ANS, čime bitno mogu uticati na sveukupno fizičko i mentalno stanje obolelih, uključujući i aspekte koji se odnose na kvalitet života ovih osoba [299, 300, 304, 468, 469]. Istraživanjem u okviru izrade ove doktorske disertacije posebno je ispitivan poremećaj funkcije ANS kod osoba obolelih od NMOSB i onih sa MS, kao i uticaj stepena disautonomije na kvalitet života obolelih osoba upotrebom COMPASS-31 upitnika. Kako je prikazano u Tabeli 26, medijana totalnog skora COMPASS-31 upitnika bila je viša kod ispitanika sa MS (medijana 11.8, 25. i 75. percentil 6.6-24.7) u odnosu na kohortu pacijenata obolelih od NMOSB (medijana 9.4, 25. i 75. percentil 5.3-18.3), međutim, nije dostignuta statistički značajna razlika ( $p= 0.060$ ). Dakle, ovakav nalaz može sugerisati da je ukupno opterećenje simptomima disfunkcije ANS veće kod osoba sa MS, u poređenju sa obolelima od NMOSB. Važno je istaći da je skor  $> 0.0$  primenom COMPASS-31 instrumenta ukazivao na moguće postojanje autonomne disfunkcije kod ovih ispitanika. Svakako treba imati na umu da je moguća i pojava simptoma koja nije direktno povezana sa disfunkcijom autonomnog nervnog sistema, odnosno da ovaj skor ne mora nužno da ukazuje na postojanje disautonomije, već da može biti  $> 0.0$  i kod zdravih osoba. Pa je tako u istraživanju u okviru izrade ove doktorske disertacije pokazano da je skor autonomnih funkcija meren COMPASS-31 skalom koji je bio  $> 0.0$ , detektovan kod 100% osoba obolelih od NMOSB, kao i kod 97% osoba sa MS. Medijana domena ortostatske intolerancije kao i ukupna proporcija pacijenata zahvaćenih ortostatskom intolerancijom bila je viša u kohorti obolelih od MS u odnosu na pacijente sa NMOSB (Tabela 26). Svakako fenomen ortostatske intolerancije, kao oblika kardijalne disautonomije, kod osoba sa MS prepoznat je i u ranijim istraživanjima, pa je tako u revijalnom radu Findling i sar. iz 2020 godine istaknuto da je kardijalna disautonomija čest fenomen u MS, kao i da može biti asimptomatska, ili da se može detektovati kako objektivnim

ispitivanjem, tako i posebno dizajniranim upitnicima za subjektivnu procenu od strane pacijenata kakav je, na primer COMPASS-31 upitnik [470]. Međutim, u pomenutom radu Findling i sar. posebno je naglašeno da većina studija, koje su bile obuhvaćene analizom, nisu posebno ispitivale izdvojene entitete u okviru kardijalne disautonomije kao što su: posturalni tahikardijalni sindrom, ortostatska intolerancija i ortostatska vrtoglavica, ističući nedostatak sveobuhvatnih i jasnih smernica za standardizovane protokole ispitivanja funkcije ANS kod osoba obolelih od MS, posebno u svakodnevnoj kliničkoj praksi [470]. Nedavno objavljeni rezultati studije italijanskih autora koja je obuhvatila 324 pacijenta obolelih od MS, kao i 190 zdravih osoba (kontrolna grupa), kod kojih je poremećaj funkcije ANS ispitivan pomoću COMPASS-31 upitnika ukazali su na to da su simptomi disautonomije vrlo česti kod osoba obolelih od MS, i to u gotovo svim ispitivanim domenima, uključujući i ortostatsku intoleranciju, te da se stepen opterećenosti ovim simptomima povećava sa trajanjem bolesti, kao i da je ovaj poremećaj posebno izražen u progresivnim formama MS [471]. U studiji objavljenoj 2020 godine koja je obuhvatila 20 pacijenata sa NMOSB, kao i 20 pacijenata obolelih od MS, ispitivana je disfunkcija ANS primenom COMPASS-31 upitnika, ali i objektivnom procenom stepena disautonomije, pokazali smo da je kod 50% pacijenata sa NMOSB skor ortostatske intolerancije meren COMPASS-31 upitnikom, bio  $> 0.0$ , dok je objektivnim ispitivanjem utvrđeno da postoji značajna kardijalna disautonomija (ortostatska hipotenzija je bila prisutna kod 30% osoba sa NMOSB), kao i da je ona izraženija kod osoba sa NMOSB u poređenju sa osobama obolelim od MS [298]. Sa druge strane, Adamec i sar. su 2013 godine objavili rezultate studije koja je ispitivala postojanje kardijalne disautonomije primenom objektivnih testova kod značajnog broja osoba obolelih od MS, kada je pokazano da je 63% pacijenata imalo patološku reakciju na ortostatsku provokaciju, sugerišući značajan udeo ovog poremećaja funkcije ANS kod osoba sa MS [472]. Studija u okviru ove doktorske disertacije nije obuhvatila primenu metoda za objektivno ispitivanje disfunkcije ANS, uključujući i kardijalnu disautonomiju što se, pored nedostatka zdravih ispitanika kao kontrolne grupe, može smatrati ograničenjem ove studije. U studiji objavljenoj 2023 godine u kojoj je ispitivano opterećenje simptomima autonomne disfunkcije i njihov uticaj na kvalitet života kod ukupno 63 pacijenata obolelih od NMOSB, u odnosu na zdrave kontrole primenom COMPASS-31 upitnika, ortostatska hipotenzija bila je prisutna kod značajnog broja ispitanika, odnosno kod njih 63.5% [304]. Ova razlika u stepenu pojave kardijalne disautonomije (50% i 63.5%), kod pacijenata obolelih od NMOSB upotrebom COMPASS-31 upitnika u ove dve studije (Crnosija i sar. 2020 i Yang i sar. 2023) može se objasniti, između ostalog, i eventualnim postojanjem različitog stepena i lokalizacije lezija u CNS, koje mogu usloviti pojavu ovakve simptomatologije kod pacijenata sa NMOSB. Tim pre što je pokazano da su lezije, posebno u moždanom stablu, povezane sa disfunkcijom ANS (na primer pojavom ortostatske intolerancije), kako je to istaknuto kod pacijenata koji boluju od MS [473].

Takođe, u studiji u okviru ove doktorske disertacije medijana domena vezanog za pupilomotornu aktivnost, odnosno funkciju, bila je jasno viša kod osoba sa MS u odnosu na kohortu ispitanika obolelih od NMOSB ( $p=0.005$ ). Takođe, proporcija osoba sa MS, koja je zahvaćena pupilomotornom disfunkcijom, bila je viša u odnosu na proporciju osoba sa NMOSB u ovom domenu disautonomije, ali nije dostignuta statistički značajna razlika (0.056), kako je prikazano u Tabeli 26. Sa druge strane, proporcija pacijenata zahvaćenih pupilomotornom disfunkcijom bila je veća kod osoba sa NMOSB u našoj prethodnoj studiji, koja je obuhvatila manji broj ispitanika (20 osoba sa NMOSB i 20 osoba sa MS) [298]. Jedno od potencijalnih objašnjenja za ovakve rezultate može ležati u činjenici da je u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije obuhvaćen značajno veći broj ispitanika (80 osoba sa NMOSB i 100 osoba sa MS), kao i da treba imati na umu mogućnost različitog stepena, lokalizacije i ekstenzivnosti lezija optičkih nerava, interindividualno kako kod obolelih od NMOSB, tako i kod obolelih od MS [2, 234, 335, 474, 475]. Takođe, od

posebne važnosti je nalaz koji ukazuje na jasnu razliku u stepenu težine autonomne disfunkcije vezane za pupilomotornu aktivnost između ove dve grupe pacijenata (NMOSB i MS), ispitivanu upotrebom COMPASS-31 upitnika, kako smo pokazali u prethodnoj [298], ali i u aktuelnoj studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije. Naime, kada je u pitanju multipla skleroza, pokazano je da osobe obbolele od ove bolesti generalno imaju prevagu uticaja simpatičkog sistema (usled redukcije parasimpatičkog tonusa), što uzrokuje pupilodilatatorni efekat i može rezultirati ispoljavanjem određenih adaptivnih vizualnih smetnji kod ovih osoba [476, 477]. Isto tako, brojnim istraživanjima pokazano je da su simptomi i znaci autonomne disfunkcije česti kod osoba sa MS, kao i da su pretpostavljeni mehanizmi koji dovode do disautonomije kod ovih osoba vezani, pre svega, za pojavu multiplih fokalnih lezija duž različitih struktura CNS koje su direktno ili indirektno povezane sa funkcionisanjem, ali i centralnom regulacijom funkcije ANS [469, 478, 479]. Sa druge strane, mnogo je manje studija vezanih za patofiziološke mehanizme disfunkcije ANS kod osoba sa NMOSB, ali se svakako može pretpostaviti da se, u osnovi ovih poremećaja, mogu nalaziti lezije (od kojih su neke ekstenzivne) unutar CNS, posebno u regiji talamusa, hipotalamusa, moždanog stabla i KM, što može rezultirati i oštećenjem autonomne funkcije, posebno u korelaciji sa stepenom afekcije odgovarajućih neuroanatomskih struktura ANS [300, 302]. Tome svakako u prilog može ići činjenica da, bez obzira na to što smo u prethodnoj studiji pokazali da je proporcija osoba sa disautonomijom niža kod obolelih od NMOSB, u odnosu na one sa MS, svakako je objektivnim ispitivanjem funkcije ANS istaknuto da je stepen afekcije, odnosno težina ispoljavanja posebno kardijalne autonomne disfunkcije, bila izraženija kod osoba sa NMOSB [298]. Svi ovi elementi bi se mogli svakako primeniti i na stepen ekstenzivnosti lezija i afekcije optičkih nerava u okviru kliničkog ispoljavanja NMOSB, što bi moglo objasniti i predominantu zastupljenost pupilomotorne disfunkcije kod ove grupe ispitanika.

U studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije nije bilo statistički značajne razlike u ostalim domenima autonomnog funkcionisanja između osoba sa NMOSB i osoba sa MS primenom COMPASS-31 upitnika (Tabela 26).

Međutim, u studiji u okviru izrade ove doktorske disertacije pokazano je postojanje statistički značajne obrnute korelacije između ukupnog skora COMPASS-31 i kompozitnih skorova MSQoL-54 upitnika, kako kod osoba sa NMOSB (PHC= -0.420,  $p < 0.001$ ; MHC= -0.484,  $p < 0.001$ , Grafikon 1a i 1b), tako i u kohorti osoba sa MS (PHC= -0.669,  $p < 0.001$ ; MHC= -0.605,  $p < 0.001$ , Grafikon 2a i 2b). Dakle ovi rezultati ukazuju da je opterećenje simptomima autonomne disfunkcije povezano sa ukupnim kvalitetom života kod obe grupe ispitanika (NMOSB i MS), ali da je ta korelacija bila jače izražena kada su u pitanju oboleli od MS. Kada je u pitanju MHC skor u okviru MSQoL-54 upitnika, uočena je statistički značajna razlika između kohorte NMOSB i MS ispitanika ( $p = 0.018$ ), što svakako sugerise bolji kvalitet života osoba obolelih od NMOSB, u ovom istraživanju kada je u pitanju MHC (Tabela 25). Sa druge strane, nije uočena statistički značajna razlika između ove dve grupe (NMOSB i MS) u odnosu na PHC skor dobijen primenom MSQoL-54 upitnika (Tabela 25).

Studija sprovedena u okviru izrade ove doktorske disertacije izdvojila je: EDSS, BDI, ortostatsku intoleranciju i starost kao nezavisne prediktivne faktore za PHC u okviru MSQoL-54 kod pacijenata sa NMOSB, dok je za MHC kompozit ovog upitnika nezavisni prediktivni faktori za NMOSB bili identični osim starosti (Tabela 27). Kada su bile u pitanju osobe sa MS, u ovoj studiji izdvojeni su sledeći pokazatelji: EDSS, BDI, ortostatska intolerancija kao i totalni skor postignut primenom COMPASS-31 upitnika koji su činili nezavisne prediktivne faktore za MHC u MSQoL-54, dok je za PHC u okviru MSQoL-54 upitnika uočeno da su BDI i totalni skor postignut primenom COMPASS-31 bili nezavisni prediktivni faktori za MS (Tabela 27). Prema tome, niža opterećenost simptomima disfunkcije ANS (posebno ortostatske intolerancije), zatim, niži EDSS i

BDI skor predstavljaju nezavisne prediktore boljeg kvaliteta života procenjivanog MSQoL-54 upitnikom, kako u kohorti osoba sa NMOSB, tako i u kohorti osoba sa MS u ovom istraživanju. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su u saglasnosti i sa rezultatima studije Yang i sar. objavljene 2023 godine, u kojoj je pokazano da je skor COMPASS-31 skale povezan sa svim domenima kvaliteta života osoba sa NMOSB, primenom generičkog upitnika SF-36 za procenu kvaliteta života [304]. Dakle, u pomenutom istraživanju Yang i sar. pacijenti oboleli od NMOSB imali su značajno viši stepen simptoma povezanih sa disautonomijom (sa izuzetkom gastrointestinalnih poremećaja) u odnosu na zdrave ispitanike (kontrolna grupa), kao i da su: EDSS, ukupan broj lezija na KM i zamor bili nezavisni faktori rizika za razvoj autonomne disfunkcije kod obolelih od NMOSB [304]. Za sada, nema drugih studija koje su neposredno ispitivale uticaj disfunkcije ANS kod pacijenata sa NMOSB, prema dostupnoj literaturi. Kada su u pitanju pacijenti sa MS, takođe je pokazano da opterećenje simptomima autonomne disfunkcije ima značajan uticaj na kvalitet života obolelih, pa tako na primer, u studiji Cortez i sar. koja je obuhvatila 100 osoba sa MS, i u kojoj je ispitivana disfunkcija ANS primenom COMPASS-31 upitnika, pokazano je da skor COMPASS-31 korelira sa skorovima oba kompozita MSQoL-54 upitnika (PHC i MHC) za procenu kvaliteta života obolelih osoba [480], što je u saglasnosti i sa rezultatima studije sprovedene u okviru izrade ove doktorske disertacije (Grafikon 2a i 2b).

Na osnovu svega navedenog, treba istaći da je disfunkcija ANS, koja nastaje najverovatnije kao posledica zahvaćenosti različitih neuroanatomskih struktura u CNS, često prisutna u okviru kliničkog ispoljavanja NMOSB ali i MS u različitom stepenu, što može bitno uticati na kvalitet života obolelih osoba, s toga je neophodno posvetiti posebnu pažnju razvoju uniformnih i sveobuhvatnih testova za subjektivnu i objektivnu procenu stepena disautonomije kod obolelih osoba, koji su klinički primenjivi, a u cilju prevencije, ranog otkrivanja i lečenja ove važne grupe poremećaja.

## 6. ZAKLJUČCI

Zaključci ove doktorske disertacije su sledeći:

1. Sekvenciranjem regiona od interesa gena *AQP4* kod 64 pacijenata sa NMOSB, 40 pacijenata sa MS i 100 zdravih individua izdvojeno je ukupno 7 varijanti, od kojih su tri varijante (rs35248760, rs778208236 i rs72557968) detektovane u drugom egzonu. Jedna varijanta (rs1839318) detektovana je u egzonu 3, dok je (c.613-10T>A) varijanta izdvojena u segmentu trećeg introna gena *AQP4*. Takođe, dve varijante (rs200498749 i rs2144949828) izdvojene su u egzonu 5. U prvom i četvrtom egzonu gena *AQP4* u našim kohortama ispitanika nisu detektovane varijante od potencijalnog značaja.
2. Od ukupno sedam detektovanih varijanti u genu *AQP4*, njih četiri okarakterisano je kao benigne varijante, dok su preostale 3 varijante izdvojene kao varijante nejasnog značaja. Kod jednog pacijenta sa MS, u intronskoj sekvecni gena *AQP4*, detektovana je varijanta nejasnog značaja (c.613-10T>A). Kod jedne osobe sa NMOSB i jednog obolelog od MS, u egzonu 5 gena *AQP4* detektovana je jedna varijanta nejasnog značaja (c.955G>A), dok je u egzonu 2 ovog gena kod jednog kontrolnog ispitanika detektovana varijanta (c.112G>C), koja je takođe okarakterisana kao varijanta nejasnog značaja.
3. U ovoj studiji nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa (NMOSB, MS, kontrolna kohorta) u odnosu na varijante detektovane u genu *AQP4*, na osnovu čega se može zaključiti da ne postoji povezanost dobijenih varijanti u kodirajućim regionima gena *AQP4* sa rizikom od pojave NMOSB, kao ni MS. Takođe, nije izdvojen ni jasno protektivni *AQP4* genotip kada su u pitanju NMOSB i MS u našoj studiji.
4. Ovom studijom pokazano je postojanje statistički značajne povezanosti varijante rs35248760 u genu *AQP4* sa pojavom mijelitisa u NMOSB. Nije uočena korelacija ostalih izdvojenih varijanti u genu *AQP4* sa kliničkim karakteristikama u našoj kohorti pacijenata sa NMOSB.
5. U ovoj studiji učinjenim ispitivanjem odabranog seta gena u okviru sprovedne WES analize u NMOSB kohorti, nisu izdvojene jasno uzročne varijante, niti specifičan protektivni genotip za NMOSB.
6. Sprovedenom analizom opterećenja (*burden* analiza) odabranih gena nije utvrđena jasna povezanost sa NMOSB u našoj kohorti pacijenata sa ovom bolešću.
7. U ovoj studiji utvrđeno je postojanje viših skorova u MHC domenu MSQoL-54 upitnika kod pacijenata sa NMOSB u odnosu na ispitanike sa MS. Za ostale domene MSQoL-54 upitnika, kao i za domene upitnika BDI, nije postignuta statistički značajna razlika skorova između ove dve grupe ispitanika (NMOSB, MS).
8. U ovoj studiji posebno je ispitivan uticaj poremećaja funkcije ANS na kvalitet života osoba sa NMOSB i MS. Sprovedenom analizom pokazano je da su ortostatska intolerancija i poremećaji u domenu pupilomotorne funkcije bili značajno zastupljeniji u kohorti obolelih od MS u odnosu na pacijente sa NMOSB, kao i da je stepen disautonomije povezan sa nižim skorovima kvaliteta života kod obe grupe ispitanika, sa nešto snažnijom korelacijom u kohorti pacijenata sa MS.

9. Analizom u okviru ove studije utvrđena je inverzna korelacija između PHC i MHC skorova MSQoL-54 upitnika i totalnog COMPASS-31 skora kod pacijenata sa NMOSB, kao i statistički značajna inverzna korelacija između PHC i MHC skorova MSQoL-54 upitnika i totalnog COMPASS-31 skora kod pacijenata sa MS .
  
10. Ovo istraživanje ukazalo je na to da niža opterećenost simptomima disfunkcije ANS, zatim, niži EDSS i skor BDI predstavljaju nezavisne prediktore boljeg kvaliteta života procenjivanog MSQoL-54 upitnikom, kako u kohorti osoba sa NMOSB, tako i u kohorti osoba sa MS.

## 7. LITERATURA

1. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Handb Clin Neurol.* 2014;122:581-99.
2. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology.* 2015;85(2):177-89.
3. Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation.* 2013;10:8.
4. Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. Part 2: 'Spinal amaurosis', or how it all began. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):280.
5. Sichel J. *Traité de l'ophthalmie, la cataracte et l'amaurose.* Paris: Germer Baillière; 1837.
6. Carron du Villards C. *Guide pratique pour l'etude et le traitement des maladies des yeux.* Paris: Société encyclographique des sciences médicales; 1838.
7. Pétrequin J. *Traité pratique de l'amaurose ou goutte-sereine.* Paris: Bailliere, Ch. Savy Jeune; 1841.
8. Himly K. *Die Krankheiten und Missbildungen des menschlichen Auges und deren Heilung.* Berlin: Hirschwald August; 1843.
9. Hocken E. Illustrations on the pathology and treatment of amaurosis. *Lancet.* 1841;36:38–42; 153–7; 223–5; 357–61; 470–4; 534–7; 713–6; 75–79; 916–9.
10. Hocken E. On the diagnosis, pathology, and treatment of amaurosis. *Lancet.* 1841;36:7-10.
11. Hocken E. Illustrations of the pathology, diagnosis, and treatment of ophthalmic affections. *Lancet.* 1841-42;37:349–52; 636–9.
12. Hocken E. Illustrations of the pathology, diagnosis, and treatment of ophthalmic affections. *Lancet.* 1842;38:81–4.
13. Jarius S, Wildemann B. 'Spinal amaurosis' (1841). On the early contribution of Edward Hocken to the concept of neuromyelitis optica. *J Neurol.* 2014;261(2):400-4.
14. Warner J. *A description of the human eye, and its adjacent parts; together with their principal diseases, and the methods proposed for relieving them.* . London: L. Davis; 1773.
15. Meyer È. *Traité pratique des maladies des yeux.* Paris: G. Masson; 1880.
16. Devic E. Myélite aiguë dorso-lombaire avec névrite optique. - Autopsie. Paris: Asselin et Houzeau, Louis Savy; 1895. 434–9 p.
17. Gault F. *De la neuromyéélite optique aiguë.* Paris: Paris, Lyon; 1894.
18. Brain W. Critical review: disseminated sclerosis. *QJM.* 1930;23:343–91.

19. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology*. 1999;53(5):1107-14.
20. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004;364(9451):2106-12.
21. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*. 2006;66(10):1485-9.
22. Papp V, Magyari M, Aktas O, Berger T, Broadley SA, Cabre P, et al. Worldwide Incidence and Prevalence of Neuromyelitis Optica: A Systematic Review. *Neurology*. 2021;96(2):59-77.
23. Miyamoto K, Fujihara K, Kira JI, Kuriyama N, Matsui M, Tamakoshi A, et al. Nationwide epidemiological study of neuromyelitis optica in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(6):667-8.
24. Houzen H, Kondo K, Niino M, Horiuchi K, Takahashi T, Nakashima I, et al. Prevalence and clinical features of neuromyelitis optica spectrum disorders in northern Japan. *Neurology*. 2017;89(19):1995-2001.
25. Houzen H, Kano T, Kondo K, Takahashi T, Niino M. Prevalence, incidence and clinical features of neuromyelitis optica spectrum disorders in northern Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022.
26. Lee HL, Kim JY, Seok JM, Hong YH, Lim NG, Shin HY, et al. Prevalence and Incidence of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder in Korea: Population Based Study. *J Korean Med Sci*. 2020;35(17):e115.
27. Hor JY, Lim TT, Chia YK, Ching YM, Cheah CF, Tan K, et al. Prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorder in the multi-ethnic Penang Island, Malaysia, and a review of worldwide prevalence. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;19:20-4.
28. Tisavipat N, Jitpratoom P, Siritho S, Prayoonwivat N, Apiwattanakul M, Boonyasiri A, et al. The epidemiology and burden of neuromyelitis optica spectrum disorder, multiple sclerosis, and MOG antibody-associated disease in a province in Thailand: A population-based study. *Mult Scler Relat Disord*. 2023;70:104511.
29. Pandit L, Kundapur R. Prevalence and patterns of demyelinating central nervous system disorders in urban Mangalore, South India. *Mult Scler*. 2014;20(12):1651-3.
30. Holroyd KB, Aziz F, Szolics M, Alsaadi T, Levy M, Schiess N. Prevalence and characteristics of transverse myelitis and neuromyelitis optica spectrum disorders in the United Arab Emirates: A multicenter, retrospective study. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2018;9(3):155-61.
31. Eskandarieh S, Nedjat S, Azimi AR, Moghadasi AN, Sahraian MA. Neuromyelitis optica spectrum disorders in Iran. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;18:209-12.
32. Rezaeimanesh N, Sahraian MA, Moghadasi AN, Eskandarieh S. Epidemiology of neuromyelitis optica spectrum disorder in Tehran, Iran: the prevalence, baseline characteristics, and clinical aspects. *Neurol Sci*. 2020;41(9):2647-8.

33. Yamaguchi Y, Torisu H, Kira R, Ishizaki Y, Sakai Y, Sanefuji M, et al. A nationwide survey of pediatric acquired demyelinating syndromes in Japan. *Neurology*. 2016;87(19):2006-15.
34. Lin WS, Wang HP, Chen HM, Lin JW, Lee WT. Epidemiology of pediatric multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and optic neuritis in Taiwan. *J Neurol*. 2020;267(4):925-32.
35. Hor JY, Asgari N, Nakashima I, Broadley SA, Leite MI, Kissani N, et al. Epidemiology of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Its Prevalence and Incidence Worldwide. *Front Neurol*. 2020;11:501.
36. Flanagan EP, Cabre P, Weinshenker BG, Sauver JS, Jacobson DJ, Majed M, et al. Epidemiology of aquaporin-4 autoimmunity and neuromyelitis optica spectrum. *Ann Neurol*. 2016;79(5):775-83.
37. Bukhari W, Khalilidehkordi E, Mason DF, Barnett MH, Taylor BV, Fabis-Pedrini M, et al. NMOSD and MS prevalence in the Indigenous populations of Australia and New Zealand. *J Neurol*. 2022;269(2):836-45.
38. Jacob A, Panicker J, Lythgoe D, Elson L, Mutch K, Wilson M, et al. The epidemiology of neuromyelitis optica amongst adults in the Merseyside county of United Kingdom. *J Neurol*. 2013;260(8):2134-7.
39. Musubire AK, Derdelinckx J, Reynders T, Meya DB, Bohjanen PR, Cras P, et al. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders in Africa: A Systematic Review. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(6).
40. Bukhari W, Prain KM, Waters P, Woodhall M, O'Gorman CM, Clarke L, et al. Incidence and prevalence of NMOSD in Australia and New Zealand. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(8):632-8.
41. Bagherieh S, Afshari-Safavi A, Vaheb S, Kiani M, Ghaffary EM, Barzegar M, et al. Worldwide prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) and neuromyelitis optica (NMO): a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*. 2023.
42. Mireles-Ramírez MA, Velázquez-Brizuela IE, Sánchez-Rosales N, Márquez-Pedroza Y, Hernández-Preciado MR, Gabriel Ortiz G. The prevalence, incidence, and clinical assessment of neuromyelitis optica spectrum disorder in patients with demyelinating diseases. *Neurologia (Engl Ed)*. 2022.
43. Ibis SC, Omaira M, Arnoldo S, Elizabeth A, Sandra M, Carlota CM, et al. Epidemiological findings of neuromyelitis optica spectrum disorders in a Venezuelan study. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;47:102652.
44. Henríquez K, Molt F, Gajardo J, Cortés B, Ramírez-Santana M. Sociodemographic and clinical characteristics of people with multiple sclerosis and neuro-myelitis optica spectrum disorder in a central northern region of Chile: A prevalence study. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;61:103750.
45. Cossburn M, Tackley G, Baker K, Ingram G, Burtonwood M, Malik G, et al. The prevalence of neuromyelitis optica in South East Wales. *Eur J Neurol*. 2012;19(4):655-9.
46. O'Connell K, Hamilton-Shield A, Woodhall M, Messina S, Mariano R, Waters P, et al. Prevalence and incidence of neuromyelitis optica spectrum disorder, aquaporin-4 antibody-positive

- NMOSD and MOG antibody-positive disease in Oxfordshire, UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(10):1126-8.
47. Papp V, Iljicsov A, Rajda C, Magyari M, Koch-Henriksen N, Petersen T, et al. A population-based epidemiological study of neuromyelitis optica spectrum disorder in Hungary. *Eur J Neurol*. 2020;27(2):308-17.
48. Aboul-Enein F, Seifert-Held T, Mader S, Kuenz B, Lutterotti A, Rauschka H, et al. Neuromyelitis optica in Austria in 2011: to bridge the gap between neuroepidemiological research and practice in a study population of 8.4 million people. *PLoS One*. 2013;8(11):e79649.
49. Papp V, Illes Z, Magyari M, Koch-Henriksen N, Kant M, Pflieger CC, et al. Nationwide prevalence and incidence study of neuromyelitis optica spectrum disorder in Denmark. *Neurology*. 2018;91(24):e2265-e75.
50. Jonsson DI, Sveinsson O, Hakim R, Brundin L. Epidemiology of NMOSD in Sweden from 1987 to 2013: A nationwide population-based study. *Neurology*. 2019;93(2):e181-e9.
51. Sepúlveda M, Aldea M, Escudero D, Llufríu S, Arrambide G, Otero-Romero S, et al. Epidemiology of NMOSD in Catalonia: Influence of the new 2015 criteria in incidence and prevalence estimates. *Mult Scler*. 2018;24(14):1843-51.
52. Martinovic V. Klinicko-epidemioloska studija devikove bolesti u centralnoj Srbiji [Doctoral Dissertation]. Beograd: Beograd; 2020.
53. Viswanathan S, Wah LM. A nationwide epidemiological study on the prevalence of multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder with important multi-ethnic differences in Malaysia. *Mult Scler*. 2019;25(11):1452-61.
54. Cabre P, Gonzalez-Quevedo A, Lannuzel A, Bonnan M, Merle H, Olindo S, et al. [Descriptive epidemiology of neuromyelitis optica in the Caribbean basin]. *Rev Neurol (Paris)*. 2009;165(8-9):676-83.
55. Yoon HH, Park JY, Kim SY, Lee NM, Yi DY, Yun SW, et al. Epidemiology of Demyelinating Diseases in Korean Pediatric Patients. *J Child Neurol*. 2021;36(2):141-7.
56. Gudbjornsson BT, Haraldsson Á, Einarsdóttir H, Thorarensen Ó. Nationwide Incidence of Acquired Central Nervous System Demyelination in Icelandic Children. *Pediatr Neurol*. 2015;53(6):503-7.
57. Boesen MS, Jensen PEH, Born AP, Magyari M, Nilsson AC, Hoei-Hansen C, et al. Incidence of pediatric neuromyelitis optica spectrum disorder and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease in Denmark 2008–2018: A nationwide, population-based cohort study. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;33:162-7.
58. Drulovic J, Martinovic V, Basuroski ID, Mesaros S, Mader S, Weinshenker B, et al. Long-term outcome and prognosis in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder from Serbia. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;36:101413.
59. Kashipazha D, Mohammadianinejad SE, Majdinasab N, Azizi M, Jafari M. A descriptive study of prevalence, clinical features and other findings of neuromyelitis optica and neuromyelitis optica spectrum disorder in Khuzestan Province, Iran. *Iran J Neurol*. 2015;14(4):204-10.

60. Boesen MS, Magyari M, Koch-Henriksen N, Thygesen LC, Born AP, Uldall PV, et al. Pediatric-onset multiple sclerosis and other acquired demyelinating syndromes of the central nervous system in Denmark during 1977-2015: A nationwide population-based incidence study. *Mult Scler*. 2018;24(8):1077-86.
61. Kim SH, Mealy MA, Levy M, Schmidt F, Ruprecht K, Paul F, et al. Racial differences in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Neurology*. 2018;91(22):e2089-e99.
62. Kitley J, Leite MI, Nakashima I, Waters P, McNeillis B, Brown R, et al. Prognostic factors and disease course in aquaporin-4 antibody-positive patients with neuromyelitis optica spectrum disorder from the United Kingdom and Japan. *Brain*. 2012;135(Pt 6):1834-49.
63. Bonnan M, Berthelot E, Cabre P. Familial clustering of neuromyelitis optica and multiple sclerosis: clues pointing towards shared risks? *Mult Scler Relat Disord*. 2020;44:102371.
64. Bekavac I, Matejic M, Woods RJ, Halloran JI. Simultaneous new onset of neuromyelitis optica spectrum disorder in identical twins. *BMJ Neurol Open*. 2021;3(2):e000174.
65. Koduah P, Paul F, Dörr JM. Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *Epma j*. 2017;8(4):313-25.
66. Shaygannejad V, Maljaei MB, Bank SS, Mirmosayyeb O, Maracy MR, Askari G. Association between Sun Exposure, Vitamin D Intake, Serum Vitamin D Level, and Immunoglobulin G Level in Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Int J Prev Med*. 2018;9:68.
67. Rodney C, Rodney S, Millis RM. Vitamin D and Demyelinating Diseases: Neuromyelitis Optica (NMO) and Multiple Sclerosis (MS). *Autoimmune Dis*. 2020;2020:8718736.
68. Wu N, Li X, Ma H, Zhang X, Liu B, Wang Y, et al. The role of the gut microbiota and fecal microbiota transplantation in neuroimmune diseases. *Front Neurol*. 2023;14:1108738.
69. Cree BA, Spencer CM, Varrin-Doyer M, Baranzini SE, Zamvil SS. Gut microbiome analysis in neuromyelitis optica reveals overabundance of *Clostridium perfringens*. *Ann Neurol*. 2016;80(3):443-7.
70. Zamvil SS, Spencer CM, Baranzini SE, Cree BAC. The Gut Microbiome in Neuromyelitis Optica. *Neurotherapeutics*. 2018;15(1):92-101.
71. Cui C, Tan S, Tao L, Gong J, Chang Y, Wang Y, et al. Intestinal Barrier Breakdown and Mucosal Microbiota Disturbance in Neuromyelitis Optical Spectrum Disorders. *Front Immunol*. 2020;11:2101.
72. Gong J, Qiu W, Zeng Q, Liu X, Sun X, Li H, et al. Lack of short-chain fatty acids and overgrowth of opportunistic pathogens define dysbiosis of neuromyelitis optica spectrum disorders: A Chinese pilot study. *Mult Scler*. 2019;25(9):1316-25.
73. Mirzaei R, Bouzari B, Hosseini-Fard SR, Mazaheri M, Ahmadyousefi Y, Abdi M, et al. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in nervous system disorders. *Biomed Pharmacother*. 2021;139:111661.

74. Hou D, Yang G, Guo T, Zhou F, Yu D. Infection and neuromyelitis optica spectrum disorders. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2020;45(2):181-6.
75. Gebhardt A, Buehler R, Wiest R, Tewald F, Sellner J, Humpert S, et al. Mycoplasma pneumonia as a cause of neuromyelitis optica? *J Neurol*. 2008;255(8):1268-9.
76. Koga M, Takahashi T, Kawai M, Fujihara K, Kanda T. A serological analysis of viral and bacterial infections associated with neuromyelitis optica. *J Neurol Sci*. 2011;300(1-2):19-22.
77. Sridhar S, Chan JF, Yuen KY. Fatal anti-aquaporin-4 seropositive neuromyelitis optica spectrum disorder in tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2014;14:470.
78. Zhong X, Zhou Y, Lu T, Wang Z, Fang L, Peng L, et al. Infections in neuromyelitis optica spectrum disorder. *J Clin Neurosci*. 2018;47:14-9.
79. Carnero Contentti E, Correale J. Association between infections, the microbiome, vaccination, and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler*. 2022:13524585221113272.
80. Harahsheh E, Callister M, Hasan S, Gritsch D, Valencia-Sanchez C. Aquaporin-4 IgG neuromyelitis optica spectrum disorder onset after Covid-19 vaccination: Systematic review. *J Neuroimmunol*. 2022;373:577994.
81. Misra MK, Damotte V, Hollenbach JA. The immunogenetics of neurological disease. *Immunology*. 2018;153(4):399-414.
82. Rotstein DL, Wolfson C, Carruthers R, Freedman MS, Morrow SA, Lee L, et al. A national case-control study investigating demographic and environmental factors associated with NMOSD. *Mult Scler*. 2023:13524585231151953.
83. Wang X, Shi Z, Zhao Z, Chen H, Lang Y, Kong L, et al. The causal relationship between neuromyelitis optica spectrum disorder and other autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2022;13:959469.
84. Eskandarieh S, Nedjat S, Abdollahpour I, Azimi AR, Moghadasi AN, Asgari N, et al. Environmental risk factors in neuromyelitis optica spectrum disorder: a case-control study. *Acta Neurol Belg*. 2018;118(2):277-87.
85. Eskandarieh S, Moghadasi AN, Sahraian MA, Azimi AR, Molazadeh N. Association of cigarette smoking with neuromyelitis optica-immunoglobulin G sero-positivity in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Iran J Neurol*. 2019;18(3):93-8.
86. Graves J, Grandhe S, Weinfurtner K, Krupp L, Belman A, Chitnis T, et al. Protective environmental factors for neuromyelitis optica. *Neurology*. 2014;83(21):1923-9.
87. Yang TT, Yin H, Liu PJ, Niu TT, Wang ZY, He Y, et al. A preliminary study of association of cigarette smoking with risk of neuromyelitis optica spectrum disorder. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(37):e27234.
88. Rafiee F, Tarjoman T, Moghadasi AN, Sahraian MA, Azimi A, Rezaeimanesh N, et al. Stressful life events, socioeconomic status, and the risk of neuromyelitis optica spectrum disorder: A population-based case-control study. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;46:102544.

89. Ghafouri-Fard S, Azimi T, Taheri M. A Comprehensive Review on the Role of Genetic Factors in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front Immunol.* 2021;12:737673.
90. Wannaphut C, Ongphichetmetha T, Satiraphan P, Jitprapaikulsan J, Apiwattanakul M, Siritho S, et al. Familial neuromyelitis optica spectrum disorders: Case series and systematic review. *Mult Scler Relat Disord.* 2023;73:104627.
91. Matiello M, Kim HJ, Kim W, Brum DG, Barreira AA, Kingsbury DJ, et al. Familial neuromyelitis optica. *Neurology.* 2010;75(4):310-5.
92. Matsushita T, Masaki K, Isobe N, Sato S, Yamamoto K, Nakamura Y, et al. Genetic factors for susceptibility to and manifestations of neuromyelitis optica. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020;7(11):2082-93.
93. Alonso VR, de Jesus Flores Rivera J, Garci YR, Granados J, Sanchez T, Mena-Hernandez L, et al. Neuromyelitis Optica (NMO IgG+) and Genetic Susceptibility, Potential Ethnic Influences. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2018;18(1):4-7.
94. Alvarenga MP, do Carmo LF, Vasconcelos CCF, Alvarenga MP, Alvarenga-Filho H, de Melo Bento CA, et al. Neuromyelitis optica is an HLA associated disease different from Multiple Sclerosis: a systematic review with meta-analysis. *Sci Rep.* 2021;11(1):152.
95. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:301-23.
96. Kulski JK, Suzuki S, Shiina T. Human leukocyte antigen super-locus: nexus of genomic supergenes, SNPs, indels, transcripts, and haplotypes. *Hum Genome Var.* 2022;9(1):49.
97. Alper CA. The Path to Conserved Extended Haplotypes: Megabase-Length Haplotypes at High Population Frequency. *Front Genet.* 2021;12:716603.
98. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet.* 2009;54(1):15-39.
99. Dawkins R, Leelayuwat C, Gaudieri S, Tay G, Hui J, Cattley S, et al. Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunol Rev.* 1999;167:275-304.
100. Petersdorf EW, O'HUigin C. The MHC in the era of next-generation sequencing: Implications for bridging structure with function. *Hum Immunol.* 2019;80(1):67-78.
101. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol.* 2017;8:292.
102. Milner CM, Campbell RD. Genetic organization of the human MHC class III region. *Front Biosci.* 2001;6:D914-26.
103. Xie T, Rowen L, Aguado B, Ahearn ME, Madan A, Qin S, et al. Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res.* 2003;13(12):2621-36.

104. Claas FH, Duquesnoy RJ. The polymorphic alloimmune response in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(5):566-7.
105. Medhasi S, Chantratita N. Human Leukocyte Antigen (HLA) System: Genetics and Association with Bacterial and Viral Infections. *J Immunol Res.* 2022;2022:9710376.
106. Sznarkowska A, Mikac S, Pilch M. MHC Class I Regulation: The Origin Perspective. *Cancers (Basel).* 2020;12(5).
107. Muñoz-Castrillo S, Vogrig A, Honnorat J. Associations between HLA and autoimmune neurological diseases with autoantibodies. *Auto Immun Highlights.* 2020;11(1):2.
108. Zéphir H, Fajardy I, Outteryck O, Blanc F, Roger N, Fleury M, et al. Is neuromyelitis optica associated with human leukocyte antigen? *Mult Scler.* 2009;15(5):571-9.
109. Blanco Y, Ercilla-González G, Llufríu S, Casanova-Estruch B, Magraner MJ, Ramió-Torrentá L, et al. [HLA-DRB1 typing in Caucasians patients with neuromyelitis optica]. *Rev Neurol.* 2011;53(3):146-52.
110. Asgari N, Nielsen C, Stenager E, Kyvik KO, Lillevang ST. HLA, PTPN22 and PD-1 associations as markers of autoimmunity in neuromyelitis optica. *Mult Scler.* 2012;18(1):23-30.
111. Hofer LS, Ramberger M, Gredler V, Pescoller AS, Rostásy K, Sospedra M, et al. Comparative Analysis of T-Cell Responses to Aquaporin-4 and Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Inflammatory Demyelinating Central Nervous System Diseases. *Front Immunol.* 2020;11:1188.
112. Bruijstens AL, Wong YYM, van Pelt DE, van der Linden PJE, Haasnoot GW, Hintzen RQ, et al. HLA association in MOG-IgG- and AQP4-IgG-related disorders of the CNS in the Dutch population. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020;7(3).
113. Tabansky I, Tanaka AJ, Wang J, Zhang G, Dujmovic I, Mader S, et al. Rare variants and HLA haplotypes associated in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Front Immunol.* 2022;13:900605.
114. Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Yonekawa T, Masaki K, Sato S, et al. Distinct genetic and infectious profiles in Japanese neuromyelitis optica patients according to anti-aquaporin 4 antibody status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(1):29-34.
115. Ogawa K, Okuno T, Hosomichi K, Hosokawa A, Hirata J, Suzuki K, et al. Next-generation sequencing identifies contribution of both class I and II HLA genes on susceptibility of multiple sclerosis in Japanese. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):162.
116. Watanabe M, Nakamura Y, Sato S, Niino M, Fukaura H, Tanaka M, et al. HLA genotype-clinical phenotype correlations in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders based on Japan MS/NMOSD Biobank data. *Sci Rep.* 2021;11(1):607.
117. Wang H, Dai Y, Qiu W, Zhong X, Wu A, Wang Y, et al. HLA-DPB1 0501 is associated with susceptibility to anti-aquaporin-4 antibodies positive neuromyelitis optica in southern Han Chinese. *J Neuroimmunol.* 2011;233(1-2):181-4.

118. Pandit L, Malli C, D'Cunha A, Mustafa S. Human leukocyte antigen association with neuromyelitis optica in a south Indian population. *Mult Scler.* 2015;21(9):1217-8.
119. Alvarenga MP, Fernandez O, Leyva L, Campanella L, Vasconcelos CF, Alvarenga M, et al. The HLA DRB1\*03:01 allele is associated with NMO regardless of the NMO-IgG status in Brazilian patients from Rio de Janeiro. *J Neuroimmunol.* 2017;310:1-7.
120. Deschamps R, Paturel L, Jeannin S, Chausson N, Olindo S, Béra O, et al. Different HLA class II (DRB1 and DQB1) alleles determine either susceptibility or resistance to NMO and multiple sclerosis among the French Afro-Caribbean population. *Mult Scler.* 2011;17(1):24-31.
121. Yang B, Ma T, Verkman AS. cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel. Evidence for distinct transcriptional units. *J Biol Chem.* 1995;270(39):22907-13.
122. Lu M, Lee MD, Smith BL, Jung JS, Agre P, Verdijk MA, et al. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10908-12.
123. Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(26):13052-6.
124. De Bellis M, Pisani F, Mola MG, Rosito S, Simone L, Buccoliero C, et al. Translational readthrough generates new astrocyte AQP4 isoforms that modulate supramolecular clustering, glial endfeet localization, and water transport. *Glia.* 2017;65(5):790-803.
125. Mueller SM, White KM, Fass SB, Chen S, Shi Z, Ge X, et al. Evaluation of gliovascular functions of Aqp4 readthrough isoforms. *bioRxiv.* 2023.
126. Ortiz GG, Torres-Mendoza BMG, Ramírez-Jirano J, Marquez-Pedroza J, Hernández-Cruz JJ, Mireles-Ramirez MA, et al. Genetic Basis of Inflammatory Demyelinating Diseases of the Central Nervous System: Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum. *Genes (Basel).* 2023;14(7).
127. Wang H, Zhong X, Wang K, Qiu W, Li J, Dai Y, et al. Interleukin 17 gene polymorphism is associated with anti-aquaporin 4 antibody-positive neuromyelitis optica in the Southern Han Chinese--a case control study. *J Neurol Sci.* 2012;314(1-2):26-8.
128. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol.* 2008;28(1):44-9.
129. Akiba H, Oshima H, Takeda K, Atsuta M, Nakano H, Nakajima A, et al. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J Immunol.* 1999;162(12):7058-66.
130. Alidadiani P, Eskandari N, Shaygannejad V, Dabiri A, Manian M, Jahanbani-Ardakani H, et al. Expression of OX40 Gene and its Serum Levels in Neuromyelitis Optica Patients. *Biomol Concepts.* 2019;10(1):62-7.

131. Manian M, Motallebnezhad M, Nedaeinia R, Salehi R, Khani L, Ferns GA, et al. Comparison of OX40 expression in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica as an approach to diagnosis. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2023;19(1):19.
132. Pohl M, Kawakami N, Kitic M, Bauer J, Martins R, Fischer MT, et al. T cell-activation in neuromyelitis optica lesions plays a role in their formation. *Acta Neuropathol Commun.* 2013;1:85.
133. Sacristán C, Schattgen SA, Berg LJ, Bunnell SC, Roy AL, Rosenstein Y. Characterization of a novel interaction between transcription factor TFII-I and the inducible tyrosine kinase in T cells. *Eur J Immunol.* 2009;39(9):2584-95.
134. Xie JL, Liu J, Lian ZY, Chen HX, Shi ZY, Zhang Q, et al. Association of GTF2IRD1-GTF2I polymorphisms with neuromyelitis optica spectrum disorders in Han Chinese patients. *Neural Regen Res.* 2019;14(2):346-53.
135. Huang YJ, Lee JJ, Fan WL, Hsu CW, Tsai NW, Lu CH, et al. A CD33 frameshift variant is associated with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Biomed J.* 2021;44(6 Suppl 1):S93-s100.
136. Xing W, Hong M, Wei Z, Zhang W. Correlation between ER $\alpha$  gene polymorphism and multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Medicine (Baltimore).* 2022;101(41):e31126.
137. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
138. Foo JN, Liu JJ, Tan EK. Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(9):508-17.
139. Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2017;1525:3-33.
140. Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med.* 2015;17(6):444-51.
141. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol.* 2021;82(11):801-11.
142. Pervez MT, Hasnain MJU, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *Biomed Res Int.* 2022;2022:3457806.
143. Estrada K, Whelan CW, Zhao F, Bronson P, Handsaker RE, Sun C, et al. A whole-genome sequence study identifies genetic risk factors for neuromyelitis optica. *Nat Commun.* 2018;9(1):1929.
144. Siuko M, Valori M, Kivelä T, Setälä K, Morin A, Kwan T, et al. Exome and regulatory element sequencing of neuromyelitis optica patients. *J Neuroimmunol.* 2015;289:139-42.
145. Zhong X, Chen C, Sun X, Wang J, Li R, Chang Y, et al. Whole-exome sequencing reveals the major genetic factors contributing to neuromyelitis optica spectrum disorder in Chinese patients with aquaporin 4-IgG seropositivity. *Eur J Neurol.* 2021;28(7):2294-304.

146. Li T, Li H, Li Y, Dong SA, Yi M, Zhang QX, et al. Multi-Level Analyses of Genome-Wide Association Study to Reveal Significant Risk Genes and Pathways in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Front Genet.* 2021;12:690537.
147. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
148. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):103-23.
149. Chinnery PF. Mitochondrial disease in neurology-Past, present, and future. *Handb Clin Neurol.* 2023;194:3-6.
150. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6(5):389-402.
151. Hudson G, Mowbray C, Elson JL, Jacob A, Boggild M, Torroni A, et al. Does mitochondrial DNA predispose to neuromyelitis optica (Devic's disease)? *Brain.* 2008;131(Pt 4):e93.
152. Ghezzi A, Baldini S, Zaffaroni M, Leoni G, Koudriavtseva T, Casini AR, et al. Devic's neuromyelitis optica and mitochondrial DNA mutation: a case report. *Neurol Sci.* 2004;25 Suppl 4:S380-2.
153. Celebisoy N, Akyurekli O, Copur A. Devic's neuromyelitis optica: a case with mitochondrial DNA mutations. *Eur Neurol.* 2006;55(2):93-5.
154. Shimizu M, Okuno T, Kinoshita M, Sumi H, Fujimura H, Yamashita K, et al. Mitochondrial DNA enhance innate immune responses in neuromyelitis optica by monocyte recruitment and activation. *Sci Rep.* 2020;10(1):13274.
155. Yamashita K, Kinoshita M, Miyamoto K, Namba A, Shimizu M, Koda T, et al. Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA in neuromyelitis optica spectrum disorder. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):125.
156. Lee JJ, Tsai MH, Lien CY, Huang YJ, Chang WN. Intra-family phenotype variations in familial neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;30:57-62.
157. Benga G, Popescu O, Borza V, Pop VI, Muresan A, Mocsy I, et al. Water permeability in human erythrocytes: identification of membrane proteins involved in water transport. *Eur J Cell Biol.* 1986;41(2):252-62.
158. Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem.* 1988;263(30):15634-42.
159. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* 1992;256(5055):385-7.
160. Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol.* 1993;265(3 Pt 2):F461.

161. Ma T, Yang B, Verkman AS. Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;240(2):324-8.
162. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;287:1-41.
163. Li S, Li C, Wang W. Molecular aspects of aquaporins. *Vitam Horm.* 2020;113:129-81.
164. Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int.* 2010;57(4):468-88.
165. Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature.* 2001;414(6866):872-8.
166. Benga G. On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). *Mol Aspects Med.* 2012;33(5-6):514-7.
167. Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, Agre P. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry.* 1999;38(34):11156-63.
168. Engel A, Fujiyoshi Y, Gonen T, Walz T. Junction-forming aquaporins. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18(2):229-35.
169. Sorbo JG, Moe SE, Ottersen OP, Holen T. The molecular composition of square arrays. *Biochemistry.* 2008;47(8):2631-7.
170. Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11981-6.
171. Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem.* 1994;269(8):5497-500.
172. Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(3):224-34.
173. Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J. Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2001;63(3):321-36.
174. Noda Y, Sohara E, Ohta E, Sasaki S. Aquaporins in kidney pathophysiology. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6(3):168-78.
175. Ye Y, Ran J, Yang B, Mei Z. Aquaporins in Digestive System. *Adv Exp Med Biol.* 2023;1398:145-54.
176. Dermietzel R. Visualization by freeze-fracturing of regular structures in glial cell membranes. *Naturwissenschaften.* 1973;60(4):208.

177. Dermietzel R. Junctions in the central nervous system of the cat. 3. Gap junctions and membrane-associated orthogonal particle complexes (MOPC) in astrocytic membranes. *Cell Tissue Res.* 1974;149(1):121-35.
178. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS.* 2020;17(1):69.
179. Huber VJ, Igarashi H, Ueki S, Kwee IL, Nakada T. Aquaporin-4 facilitator TGN-073 promotes interstitial fluid circulation within the blood-brain barrier: [17O]H<sub>2</sub>O JJVCPE MRI study. *Neuroreport.* 2018;29(9):697-703.
180. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Sci Transl Med.* 2012;4(147):147ra11.
181. Peng S, Liu J, Liang C, Yang L, Wang G. Aquaporin-4 in glymphatic system, and its implication for central nervous system disorders. *Neurobiol Dis.* 2023;179:106035.
182. Carosino M, Procino G, Tamma G, Mannucci R, Svelto M, Valenti G. Trafficking and phosphorylation dynamics of AQP4 in histamine-treated human gastric cells. *Biol Cell.* 2007;99(1):25-36.
183. Vandebroek A, Yasui M. Regulation of AQP4 in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5).
184. Benarroch EE. Aquaporin-4, homeostasis, and neurologic disease. *Neurology.* 2007;69(24):2266-8.
185. Cui H, Wang W, Zheng X, Xia D, Liu H, Qin C, et al. Decreased AQP4 Expression Aggravates  $\alpha$ -Synuclein Pathology in Parkinson's Disease Mice, Possibly via Impaired Glymphatic Clearance. *J Mol Neurosci.* 2021;71(12):2500-13.
186. Rosic B, Dukefoss DB, Åbjørsbråten KS, Tang W, Jensen V, Ottersen OP, et al. Aquaporin-4-independent volume dynamics of astroglial endfeet during cortical spreading depression. *Glia.* 2019;67(6):1113-21.
187. Sun C, Lin L, Yin L, Hao X, Tian J, Zhang X, et al. Acutely Inhibiting AQP4 With TGN-020 Improves Functional Outcome by Attenuating Edema and Peri-Infarct Astroglialosis After Cerebral Ischemia. *Front Immunol.* 2022;13:870029.
188. Wang Y, Huang C, Guo Q, Chu H. Aquaporin-4 and Cognitive Disorders. *Aging Dis.* 2022;13(1):61-72.
189. Zeppenfeld DM, Simon M, Haswell JD, D'Abreo D, Murchison C, Quinn JF, et al. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol.* 2017;74(1):91-9.
190. Chang VTW, Chang HM. Review: Recent advances in the understanding of the pathophysiology of neuromyelitis optica spectrum disorder. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020;46(3):199-218.

191. Kawachi I, Lassmann H. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(2):137-45.
192. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med*. 2005;202(4):473-7.
193. Bennett JL, O'Connor KC, Bar-Or A, Zamvil SS, Hemmer B, Tedder TF, et al. B lymphocytes in neuromyelitis optica. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(3):e104.
194. Cotzomi E, Stathopoulos P, Lee CS, Ritchie AM, Soltys JN, Delmotte FR, et al. Early B cell tolerance defects in neuromyelitis optica favour anti-AQP4 autoantibody production. *Brain*. 2019;142(6):1598-615.
195. Içöz S, Tüzün E, Kürtüncü M, Durmuş H, Mutlu M, Eraksoy M, et al. Enhanced IL-6 production in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica patients. *Int J Neurosci*. 2010;120(1):71-5.
196. McMillan R, Longmire RL, Yelenosky R, Lang JE, Heath V, Craddock CG. Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production. *J Immunol*. 1972;109(6):1386-94.
197. Jarius S, Franciotta D, Paul F, Ruprecht K, Bergamaschi R, Rommer PS, et al. Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *J Neuroinflammation*. 2010;7:52.
198. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9):3701-6.
199. Jarius S, Ruprecht K, Wildemann B, Kuempfel T, Ringelstein M, Geis C, et al. Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation*. 2012;9:14.
200. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*. 2012;11(6):535-44.
201. Jasiak-Zatońska M, Pietrzak A, Wyciszkievicz A, Więsik-Szewczyk E, Pawlak-Buś K, Leszczyński P, et al. Different blood-brain-barrier disruption profiles in multiple sclerosis, neuromyelitis optica spectrum disorders, and neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Neurol Neurochir Pol*. 2022;56(3):246-55.
202. Winkler A, Wrzos C, Haberl M, Weil MT, Gao M, Möbius W, et al. Blood-brain barrier resealing in neuromyelitis optica occurs independently of astrocyte regeneration. *J Clin Invest*. 2021;131(5).
203. Takeshita Y, Obermeier B, Cotleur AC, Spampinato SF, Shimizu F, Yamamoto E, et al. Effects of neuromyelitis optica-IgG at the blood-brain barrier in vitro. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017;4(1):e311.
204. Uzawa A, Mori M, Masuda S, Kuwabara S. Markedly elevated soluble intercellular adhesion molecule 1, soluble vascular cell adhesion molecule 1 levels, and blood-brain barrier breakdown in neuromyelitis optica. *Arch Neurol*. 2011;68(7):913-7.

205. Bartanusz V, Jezova D, Alajajian B, Digicaylioglu M. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Ann Neurol*. 2011;70(2):194-206.
206. Broadwell RD, Sofroniew MV. Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for extracellular entry to the central nervous system. *Exp Neurol*. 1993;120(2):245-63.
207. Hofman P, Hoyng P, vanderWerf F, Vrensen GF, Schlingemann RO. Lack of blood-brain barrier properties in microvessels of the prelaminar optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(5):895-901.
208. Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, et al. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(3):288-97.
209. Vincent T, Saikali P, Cayrol R, Roth AD, Bar-Or A, Prat A, et al. Functional consequences of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment. *J Immunol*. 2008;181(8):5730-7.
210. Crane JM, Lam C, Rossi A, Gupta T, Bennett JL, Verkman AS. Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays. *J Biol Chem*. 2011;286(18):16516-24.
211. Bennett JL, Lam C, Kalluri SR, Saikali P, Bautista K, Dupree C, et al. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Ann Neurol*. 2009;66(5):617-29.
212. Hinson SR, Romero MF, Popescu BF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Wolburg H, et al. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1245-50.
213. Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Roemer SF, Fryer JP, Kryzer TJ, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2007;69(24):2221-31.
214. Carnero Contentti E, Correale J. Neuromyelitis optica spectrum disorders: from pathophysiology to therapeutic strategies. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):208.
215. Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med*. 2012;63:303-16.
216. Arlaud GJ, Gaboriaud C, Thielens NM, Rossi V, Bersch B, Hernandez JF, et al. Structural biology of C1: dissection of a complex molecular machinery. *Immunol Rev*. 2001;180:136-45.
217. Gadjeva MG, Rouseva MM, Zlatarova AS, Reid KB, Kishore U, Kojouharova MS. Interaction of human C1q with IgG and IgM: revisited. *Biochemistry*. 2008;47(49):13093-102.
218. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):729-40.
219. Phuan PW, Ratelade J, Rossi A, Tradtrantip L, Verkman AS. Complement-dependent cytotoxicity in neuromyelitis optica requires aquaporin-4 protein assembly in orthogonal arrays. *J Biol Chem*. 2012;287(17):13829-39.

220. Ratelade J, Zhang H, Saadoun S, Bennett JL, Papadopoulos MC, Verkman AS. Neuromyelitis optica IgG and natural killer cells produce NMO lesions in mice without myelin loss. *Acta Neuropathol.* 2012;123(6):861-72.
221. Ratelade J, Asavapanumas N, Ritchie AM, Wemlinger S, Bennett JL, Verkman AS. Involvement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in inflammatory demyelination in a mouse model of neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol.* 2013;126(5):699-709.
222. Saadoun S, Waters P, MacDonald C, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, et al. Neutrophil protease inhibition reduces neuromyelitis optica-immunoglobulin G-induced damage in mouse brain. *Ann Neurol.* 2012;71(3):323-33.
223. Chen T, Bosco DB, Ying Y, Tian DS, Wu LJ. The Emerging Role of Microglia in Neuromyelitis Optica. *Front Immunol.* 2021;12:616301.
224. Chen T, Lennon VA, Liu YU, Bosco DB, Li Y, Yi MH, et al. Astrocyte-microglia interaction drives evolving neuromyelitis optica lesion. *J Clin Invest.* 2020;130(8):4025-38.
225. Howe CL, Kaptzan T, Magaña SM, Ayers-Ringler JR, LaFrance-Corey RG, Lucchinetti CF. Neuromyelitis optica IgG stimulates an immunological response in rat astrocyte cultures. *Glia.* 2014;62(5):692-708.
226. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014;34(36):11929-47.
227. Dang VD, Hilgenberg E, Ries S, Shen P, Fillatreau S. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 2014;28:77-83.
228. Kira J. Neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: Mechanisms and pathogenesis. *Pathophysiology.* 2011;18(1):69-79.
229. Mitsdoerffer M, Kuchroo V, Korn T. Immunology of neuromyelitis optica: a T cell-B cell collaboration. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1283:57-66.
230. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(32):14292-7.
231. Varrin-Doyer M, Spencer CM, Schulze-Topphoff U, Nelson PA, Stroud RM, Cree BA, et al. Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter. *Ann Neurol.* 2012;72(1):53-64.
232. Yick LW, Ma OK, Chan EY, Yau KX, Kwan JS, Chan KH. T follicular helper cells contribute to pathophysiology in a model of neuromyelitis optica spectrum disorders. *JCI Insight.* 2023;8(4).
233. Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, et al. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol.* 2009;66(5):630-43.
234. Jarius S, Aktas O, Azyzenberg I, Bellmann-Strobl J, Berthele A, Giglihuber K, et al. Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) - revised

recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). Part I: Diagnosis and differential diagnosis. *J Neurol*. 2023;270(7):3341-68.

235. Duan T, Smith AJ, Verkman AS. Complement-dependent bystander injury to neurons in AQP4-IgG seropositive neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):294.

236. Duan T, Smith AJ, Verkman AS. Complement-independent bystander injury in AQP4-IgG seropositive neuromyelitis optica produced by antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7(1):112.

237. Dinoto A, Sechi E, Flanagan EP, Ferrari S, Solla P, Mariotto S, et al. Serum and Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Associated Disease. *Front Neurol*. 2022;13:866824.

238. Reindl M, Waters P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(2):89-102.

239. Linnington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol*. 1988;130(3):443-54.

240. Johns TG, Bernard CC. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem*. 1999;72(1):1-9.

241. Linnington C, Webb M, Woodhams PL. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol*. 1984;6(6):387-96.

242. Peschl P, Bradl M, Höftberger R, Berger T, Reindl M. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:529.

243. Corbali O, Chitnis T. Pathophysiology of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody disease. *Front Neurol*. 2023;14:1137998.

244. Tanaka K, Kezuka T, Ishikawa H, Tanaka M, Sakimura K, Abe M, et al. Pathogenesis, Clinical Features, and Treatment of Patients with Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) Autoantibody-Associated Disorders Focusing on Optic Neuritis with Consideration of Autoantibody-Binding Sites: A Review. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17).

245. Höftberger R, Guo Y, Flanagan EP, Lopez-Chiriboga AS, Endmayr V, Hochmeister S, et al. The pathology of central nervous system inflammatory demyelinating disease accompanying myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody. *Acta Neuropathol*. 2020;139(5):875-92.

246. Lassmann H, Brunner C, Bradl M, Linnington C. Experimental allergic encephalomyelitis: the balance between encephalitogenic T lymphocytes and demyelinating antibodies determines size and structure of demyelinated lesions. *Acta Neuropathol*. 1988;75(6):566-76.

247. Pöllinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bösl MR, Dunn R, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med*. 2009;206(6):1303-16.

248. Saadoun S, Waters P, Owens GP, Bennett JL, Vincent A, Papadopoulos MC. Neuromyelitis optica MOG-IgG causes reversible lesions in mouse brain. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:35.
249. Wu Y, Geraldes R, Juryńczyk M, Palace J. Double-negative neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler.* 2023;29(11-12):1353-62.
250. S M, A F, S M, A G, G Z, K S, et al. Serum Neurofilament Light Chain in NMOSD and Related Disorders: Comparison According to Aquaporin-4 and Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibodies Status. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2017;3(4):2055217317743098.
251. Hyun JW, Kim Y, Kim KH, Kim SH, Olesen MN, Asgari N, et al. CSF GFAP levels in double seronegative neuromyelitis optica spectrum disorder: no evidence of astrocyte damage. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):86.
252. Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Nakashima I, Fujihara K. Seronegative Neuromyelitis Optica Spectrum--the challenges on disease definition and pathogenesis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014;72(6):445-50.
253. Wei Y, Chang H, Li X, Wang H, Du L, Zhou H, et al. Cytokines and Tissue Damage Biomarkers in First-Onset Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Significance of Interleukin-6. *Neuroimmunomodulation.* 2018;25(4):215-24.
254. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain.* 2002;125(Pt 7):1450-61.
255. Kim W, Kim SH, Lee SH, Li XF, Kim HJ. Brain abnormalities as an initial manifestation of neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler.* 2011;17(9):1107-12.
256. Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BF, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T. The pathology of an autoimmune astrocytopathy: lessons learned from neuromyelitis optica. *Brain Pathol.* 2014;24(1):83-97.
257. Pittock SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol.* 2006;63(3):390-6.
258. Viegas S, Weir A, Esiri M, Kuker W, Waters P, Leite MI, et al. Symptomatic, radiological and pathological involvement of the hypothalamus in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(6):679-82.
259. Misu T, Fujihara K, Kakita A, Konno H, Nakamura M, Watanabe S, et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain.* 2007;130(Pt 5):1224-34.
260. Pittock SJ, Lucchinetti CF. Neuromyelitis optica and the evolving spectrum of autoimmune aquaporin-4 channelopathies: a decade later. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1366(1):20-39.
261. Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, et al. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain.* 2007;130(Pt 5):1194-205.

262. Wingerchuk DM, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA, Weinshenker BG. A secondary progressive clinical course is uncommon in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2007;68(8):603-5.
263. Collongues N, Marignier R, Zéphir H, Papeix C, Blanc F, Ritleng C, et al. Neuromyelitis optica in France: a multicenter study of 125 patients. *Neurology*. 2010;74(9):736-42.
264. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, Linbo L, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol*. 2006;59(3):566-9.
265. Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA. Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. *Arch Neurol*. 2006;63(7):964-8.
266. Jarius S, Paul F, Weinshenker BG, Levy M, Kim HJ, Wildemann B. Neuromyelitis optica. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):85.
267. Petzold A, Fraser CL, Abegg M, Alroughani R, Alshowaier D, Alvarenga R, et al. Diagnosis and classification of optic neuritis. *Lancet Neurol*. 2022;21(12):1120-34.
268. Ramanathan S, Prelog K, Barnes EH, Tantsis EM, Reddel SW, Henderson AP, et al. Radiological differentiation of optic neuritis with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies, aquaporin-4 antibodies, and multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22(4):470-82.
269. Dutra BG, da Rocha AJ, Nunes RH, Maia ACMJ. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Spectrum of MR Imaging Findings and Their Differential Diagnosis. *Radiographics*. 2018;38(1):169-93.
270. Huang-Link Y, Yang G, Gustafsson G, Gauffin H, Landtblom AM, Mirabelli P, et al. The Importance of Optical Coherence Tomography in the Diagnosis of Atypical or Subclinical Optic Neuritis: A Case Series Study. *J Clin Med*. 2023;12(4).
271. Khadse R, Ravindran M, Pawar N, Maharajan P, Rengappa R. Clinical profile and neuroimaging in pediatric optic neuritis in Indian population: A case series. *Indian J Ophthalmol*. 2017;65(3):242-5.
272. Kim NH, Kim HJ, Park CY, Jeong KS, Cho JY. Optical Coherence Tomography versus Visual Evoked Potentials for Detecting Visual Pathway Abnormalities in Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *J Clin Neurol*. 2018;14(2):200-5.
273. Otake K, Tagami T, Kido N, Watanabe A, Sakamaki M, Mochizuki T, et al. Neuromyelitis optica with rapid respiratory failure: a case report. *Acute Med Surg*. 2021;8(1):e655.
274. Clarke L, Arnett S, Lilley K, Liao J, Bhuta S, Broadley SA. Magnetic resonance imaging in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Clin Exp Immunol*. 2021;206(3):251-65.
275. Kremer L, Mealy M, Jacob A, Nakashima I, Cabre P, Bigi S, et al. Brainstem manifestations in neuromyelitis optica: a multicenter study of 258 patients. *Mult Scler*. 2014;20(7):843-7.
276. Lana-Peixoto MA, Callegaro D. The expanded spectrum of neuromyelitis optica: evidences for a new definition. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012;70(10):807-13.

277. Lana-Peixoto MA, Talim N. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Anti-MOG Syndromes. *Biomedicines*. 2019;7(2).
278. Shosha E, Dubey D, Palace J, Nakashima I, Jacob A, Fujihara K, et al. Area postrema syndrome: Frequency, criteria, and severity in AQP4-IgG-positive NMOSD. *Neurology*. 2018;91(17):e1642-e51.
279. Camara-Lemarroy CR, Burton JM. Area postrema syndrome: A short history of a pearl in demyelinating diseases. *Mult Scler*. 2019;25(3):325-9.
280. Pedigo NW, Jr., Brizzee KR. Muscarinic cholinergic receptors in area postrema and brainstem areas regulating emesis. *Brain Res Bull*. 1985;14(2):169-77.
281. Price CJ, Hoyda TD, Ferguson AV. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. *Neuroscientist*. 2008;14(2):182-94.
282. Zhang C, Kaye JA, Cai Z, Wang Y, Prescott SL, Liberles SD. Area Postrema Cell Types that Mediate Nausea-Associated Behaviors. *Neuron*. 2021;109(3):461-72.e5.
283. Dubey D, Pittock SJ, Krecke KN, Flanagan EP. Association of Extension of Cervical Cord Lesion and Area Postrema Syndrome With Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *JAMA Neurol*. 2017;74(3):359-61.
284. Misu T, Fujihara K, Nakashima I, Sato S, Itoyama Y. Intractable hiccup and nausea with periaqueductal lesions in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2005;65(9):1479-82.
285. Matsumoto Y, Misu T, Mugikura S, Takai Y, Nishiyama S, Kuroda H, et al. Distinctive lesions of brain MRI between MOG-antibody-associated and AQP4-antibody-associated diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020.
286. Kim SH, Hyun JW, Joung A, Lee SH, Kim HJ. Occurrence of Asymptomatic Acute Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder-Typical Brain Lesions during an Attack of Optic Neuritis or Myelitis. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167783.
287. Etemadifar M, Nouri H, Khorvash R, Salari M, Ghafari K, Aghababae A. Frequency of diencephalic syndrome in NMOSD. *Acta Neurol Belg*. 2022;122(4):961-7.
288. Hamid SHM, Whittam D, Saviour M, Alorainy A, Mutch K, Linaker S, et al. Seizures and Encephalitis in Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein IgG Disease vs Aquaporin 4 IgG Disease. *JAMA Neurol*. 2018;75(1):65-71.
289. Hümmert MW, Stern C, Paul F, Duchow A, Bellmann-Strobl J, Ayzenberg I, et al. Cognition in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders: A prospective multicentre study of 217 patients (CogniNMO-Study). *Mult Scler*. 2023;29(7):819-31.
290. Nakamura M, Misu T, Fujihara K, Miyazawa I, Nakashima I, Takahashi T, et al. Occurrence of acute large and edematous callosal lesions in neuromyelitis optica. *Mult Scler*. 2009;15(6):695-700.
291. Kim HJ, Paul F, Lana-Peixoto MA, Tenenbaum S, Asgari N, Palace J, et al. MRI characteristics of neuromyelitis optica spectrum disorder: an international update. *Neurology*. 2015;84(11):1165-73.

292. Asseyer S, Schmidt F, Chien C, Scheel M, Ruprecht K, Bellmann-Strobl J, et al. Pain in AQP4-IgG-positive and MOG-IgG-positive neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2018;4(3):2055217318796684.
293. Ayzenberg I, Richter D, Henke E, Asseyer S, Paul F, Trebst C, et al. Pain, Depression, and Quality of Life in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder: A Cross-Sectional Study of 166 AQP4 Antibody-Seropositive Patients. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(3).
294. Carnero Contentti E, Leguizamón F, Hryb JP, Celso J, Pace JL, Ferrari J, et al. Neuromyelitis optica: association with paroxysmal painful tonic spasms. *Neurologia*. 2016;31(8):511-5.
295. He Z, Ren M, Wang X, Guo Q, Qi X. Pruritus may be a common symptom related to neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;13:1-3.
296. Liu J, Zhang Q, Lian Z, Chen H, Shi Z, Feng H, et al. Painful tonic spasm in neuromyelitis optica spectrum disorders: Prevalence, clinical implications and treatment options. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;17:99-102.
297. Pellkofer HL, Havla J, Hauer D, Schelling G, Azad SC, Kuempfel T, et al. The major brain endocannabinoid 2-AG controls neuropathic pain and mechanical hyperalgesia in patients with neuromyelitis optica. *PLoS One*. 2013;8(8):e71500.
298. Crnošija L, Krbot Skorić M, Andabaka M, Junaković A, Martinović V, Ivanović J, et al. Autonomic dysfunction in people with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler*. 2020;26(6):688-95.
299. Furlan JC. Autonomic dysreflexia following acute myelitis due to neuromyelitis optica. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;23:1-3.
300. Kwon S, Kim YS, Kim J, Kim BJ, Min JH. Clinical and MRI correlates of autonomic dysfunction in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;43:102215.
301. Habek M, Andabaka M, Fanciulli A, Brecl Jakob G, Drulović J, Leys F, et al. Sudomotor dysfunction in people with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Eur J Neurol*. 2022;29(9):2772-80.
302. Baudoin D, Gambarelli D, Gayraud D, Bensa P, Nicoli F, Sudan N, et al. Devic's neuromyelitis optica: a clinicopathological review of the literature in connection with a case showing fatal dysautonomia. *Clin Neuropathol*. 1998;17(4):175-83.
303. Bugshan TF, Asiri M, Alqahtani M, Maghrabi R, Alotaibi HS, Alharbi N. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder: A Rare Case of Transverse Myelitis and Autonomic Dysfunction. *Cureus*. 2023;15(5):e38791.
304. Yang L, Li W, Xie Y, Ma S, Zhou X, Huang X, et al. Impact of dysautonomic symptom burden on the quality of life in Neuromyelitis optica spectrum disorder patients. *BMC Neurol*. 2023;23(1):112.
305. Solomon AJ, Arrambide G, Brownlee WJ, Flanagan EP, Amato MP, Amezcuca L, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: an updated consensus approach. *Lancet Neurol*. 2023;22(8):750-68.

306. Waters PJ, Pittock SJ, Bennett JL, Jarius S, Weinshenker BG, Wingerchuk DM. Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2014;5(3):290-303.
307. Williams JP, Abbatemarco JR, Galli JJ, Rodenbeck SJ, Peterson LK, Haven TR, et al. Aquaporin-4 Autoantibody Detection by ELISA: A Retrospective Characterization of a Commonly Used Assay. *Mult Scler Int*. 2021;2021:8692328.
308. Hayakawa S, Mori M, Okuta A, Kamegawa A, Fujiyoshi Y, Yoshiyama Y, et al. Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neuroimmunol*. 2008;196(1-2):181-7.
309. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods Mol Biol*. 2023;2612:1-17.
310. Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Kawano Y, Masaki K, Yoshimura S, et al. Quantitative assays for anti-aquaporin-4 antibody with subclass analysis in neuromyelitis optica. *Mult Scler*. 2012;18(11):1541-51.
311. Jarius S, Franciotta D, Paul F, Bergamaschi R, Rommer PS, Ruprecht K, et al. Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: sensitivity, specificity, and direct comparison with immunohistochemistry. *J Neurol Sci*. 2012;320(1-2):32-7.
312. Kim W, Lee JE, Li XF, Kim SH, Han BG, Lee BI, et al. Quantitative measurement of anti-aquaporin-4 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant human aquaporin-4. *Mult Scler*. 2012;18(5):578-86.
313. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2022;2508:115-34.
314. Tampoia M, Abbracciavento L, Barberio G, Fabris M, Bizzaro N. A new M23-based ELISA assay for anti-aquaporin 4 autoantibodies: diagnostic accuracy and clinical correlation. *Auto Immun Highlights*. 2019;10(1):5.
315. Pittock SJ, Lennon VA, Bakshi N, Shen L, McKeon A, Quach H, et al. Seroprevalence of aquaporin-4-IgG in a northern California population representative cohort of multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. 2014;71(11):1433-6.
316. Waters PJ, McKeon A, Leite MI, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology*. 2012;78(9):665-71; discussion 9.
317. Fazio R, Malosio ML, Lampasona V, De Feo D, Privitera D, Marnetto F, et al. Anti-aquaporin 4 antibodies detection by different techniques in neuromyelitis optica patients. *Mult Scler*. 2009;15(10):1153-63.
318. Prain K, Woodhall M, Vincent A, Ramanathan S, Barnett MH, Bundell CS, et al. AQP4 Antibody Assay Sensitivity Comparison in the Era of the 2015 Diagnostic Criteria for NMOSD. *Front Neurol*. 2019;10:1028.
319. Fryer JP, Lennon VA, Pittock SJ, Jenkins SM, Fallier-Becker P, Clardy SL, et al. AQP4 autoantibody assay performance in clinical laboratory service. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2014;1(1):e11.

320. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299-311.
321. Liu C, Zhu M, Wang Y. Human Serum Anti-aquaporin-4 Immunoglobulin G Detection by Cell-based Assay. *J Vis Exp.* 2019(146).
322. Redenbaugh V, Montalvo M, Sechi E, Buciu M, Fryer JP, McKeon A, et al. Diagnostic value of aquaporin-4-IgG live cell based assay in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2021;7(4):20552173211052656.
323. Selliah N, Eck S, Green C, Oldaker T, Stewart J, Vitaliti A, et al. Flow Cytometry Method Validation Protocols. *Curr Protoc Cytom.* 2019;87(1):e53.
324. Jarius S, Wildemann B, Paul F. Neuromyelitis optica: clinical features, immunopathogenesis and treatment. *Clin Exp Immunol.* 2014;176(2):149-64.
325. Banwell B, Bennett JL, Marignier R, Kim HJ, Brilot F, Flanagan EP, et al. Diagnosis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: International MOGAD Panel proposed criteria. *Lancet Neurol.* 2023;22(3):268-82.
326. Gastaldi M, Scaranzin S, Jarius S, Wildeman B, Zardini E, Mallucci G, et al. Cell-based assays for the detection of MOG antibodies: a comparative study. *J Neurol.* 2020;267(12):3555-64.
327. Lopez JA, Houston SD, Tea F, Merheb V, Lee FXZ, Smith S, et al. Validation of a Flow Cytometry Live Cell-Based Assay to Detect Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibodies for Clinical Diagnostics. *J Appl Lab Med.* 2022;7(1):12-25.
328. Reindl M, Schanda K, Woodhall M, Tea F, Ramanathan S, Sagen J, et al. International multicenter examination of MOG antibody assays. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020;7(2).
329. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Madireddy L, Pawlitzki M, Strippel C, Räuber S, et al. Classification of neurological diseases using multi-dimensional CSF analysis. *Brain.* 2021;144(9):2625-34.
330. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10:726.
331. Hepnar D, Adam P, Žáková H, Krušina M, Kalvach P, Kasík J, et al. Recommendations for cerebrospinal fluid analysis. *Folia Microbiol (Praha).* 2019;64(3):443-52.
332. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Ruprecht K, Ringelstein M, Bergamaschi R, et al. Cerebrospinal fluid findings in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica: results from 211 lumbar punctures. *J Neurol Sci.* 2011;306(1-2):82-90.
333. Carta S, Ferraro D, Ferrari S, Briani C, Mariotto S. Oligoclonal bands: clinical utility and interpretation cues. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2022;59(6):391-404.
334. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013;262(1-2):1-10.
335. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-73.

336. Iyer A, Elson L, Appleton R, Jacob A. A review of the current literature and a guide to the early diagnosis of autoimmune disorders associated with neuromyelitis optica. *Autoimmunity*. 2014;47(3):154-61.
337. Shahmohammadi S, Doosti R, Shahmohammadi A, Mohammadianinejad SE, Sahraian MA, Azimi AR, et al. Autoimmune diseases associated with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: A literature review. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;27:350-63.
338. Min JH, Kim HJ, Kim BJ, Lee KW, Sunwoo IN, Kim SM, et al. Brain abnormalities in Sjogren syndrome with recurrent CNS manifestations: association with neuromyelitis optica. *Mult Scler*. 2009;15(9):1069-76.
339. Gkaniatsou T, Papadopoulou A, Paul F, Brandt AU, Oertel FC. Frequency of autoimmune disorders and autoantibodies in European patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Acta Neurol Belg*. 2020;120(1):223-5.
340. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. The emerging relationship between neuromyelitis optica and systemic rheumatologic autoimmune disease. *Mult Scler*. 2012;18(1):5-10.
341. Exuzides A, Sheinson D, Sidiropoulos P, Magrini F, Gholizadeh S, Surinach A, et al. Burden and cost of comorbidities in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder. *J Neurol Sci*. 2021;427:117530.
342. Kümpfel T, Giglhuber K, Aktas O, Ayzenberg I, Bellmann-Strobl J, Häußler V, et al. Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) - revised recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). Part II: Attack therapy and long-term management. *J Neurol*. 2024;271(1):141-76.
343. Paul F, Marignier R, Palace J, Arrambide G, Asgari N, Bennett JL, et al. International Delphi Consensus on the Management of AQP4-IgG+ NMOSD: Recommendations for Eculizumab, Inebilizumab, and Satralizumab. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2023;10(4).
344. Abboud H, Salazar-Camelo A, George N, Planchon SM, Matiello M, Mealy MA, et al. Symptomatic and restorative therapies in neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neurol*. 2022;269(4):1786-801.
345. Kleiter I, Gahlen A, Borisow N, Fischer K, Wernecke KD, Wegner B, et al. Neuromyelitis optica: Evaluation of 871 attacks and 1,153 treatment courses. *Ann Neurol*. 2016;79(2):206-16.
346. Abboud H, Petrak A, Mealy M, Sasidharan S, Siddique L, Levy M. Treatment of acute relapses in neuromyelitis optica: Steroids alone versus steroids plus plasma exchange. *Mult Scler*. 2016;22(2):185-92.
347. Akaishi T, Takeshita T, Himori N, Takahashi T, Misu T, Ogawa R, et al. Rapid Administration of High-Dose Intravenous Methylprednisolone Improves Visual Outcomes After Optic Neuritis in Patients With AQP4-IgG-Positive NMOSD. *Front Neurol*. 2020;11:932.
348. Demuth S, Guillaume M, Bourre B, Ciron J, Zephir H, Sirejacob Y, et al. Treatment regimens for neuromyelitis optica spectrum disorder attacks: a retrospective cohort study. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):62.

349. Siritho S, Nopsopon T, Pongpirul K. Therapeutic plasma exchange vs conventional treatment with intravenous high dose steroid for neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD): a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2021;268(12):4549-62.
350. Bonnan M, Valentino R, Debeugny S, Merle H, Fergé JL, Mehdaoui H, et al. Short delay to initiate plasma exchange is the strongest predictor of outcome in severe attacks of NMO spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(4):346-51.
351. Palace J, Lin DY, Zeng D, Majed M, Elson L, Hamid S, et al. Outcome prediction models in AQP4-IgG positive neuromyelitis optica spectrum disorders. *Brain*. 2019;142(5):1310-23.
352. Mealy MA, Mossburg SE, Kim SH, Messina S, Borisow N, Lopez-Gonzalez R, et al. Long-term disability in neuromyelitis optica spectrum disorder with a history of myelitis is associated with age at onset, delay in diagnosis/preventive treatment, MRI lesion length and presence of symptomatic brain lesions. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;28:64-8.
353. Lebrun C, Rocher F. Cancer Risk in Patients with Multiple Sclerosis: Potential Impact of Disease-Modifying Drugs. *CNS Drugs*. 2018;32(10):939-49.
354. Oray M, Abu Samra K, Ebrahimiadib N, Meese H, Foster CS. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(4):457-65.
355. Confavreux C, Saddier P, Grimaud J, Moreau T, Adeleine P, Aimard G. Risk of cancer from azathioprine therapy in multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology*. 1996;46(6):1607-12.
356. Costanzi C, Matiello M, Lucchinetti CF, Weinshenker BG, Pittock SJ, Mandrekar J, et al. Azathioprine: tolerability, efficacy, and predictors of benefit in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2011;77(7):659-66.
357. Giglhuber K, Berthele A. Adverse Events in NMOSD Therapy. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8).
358. Montcuquet A, Collongues N, Papeix C, Zephir H, Audoin B, Laplaud D, et al. Effectiveness of mycophenolate mofetil as first-line therapy in AQP4-IgG, MOG-IgG, and seronegative neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler*. 2017;23(10):1377-84.
359. Tahara M, Oeda T, Okada K, Kiriyama T, Ochi K, Maruyama H, et al. Safety and efficacy of rituximab in neuromyelitis optica spectrum disorders (RIN-1 study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2020;19(4):298-306.
360. Oomen I, Nassar-Sheikh Rashid A, Bouts AHM, Gouw SC, Kuijpers TW, Rispens T, et al. Anti-rituximab antibodies affect pharmacokinetics and pharmacodynamics of rituximab in children with immune-mediated diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2022;40(1):183-90.
361. Li T, Zhang LJ, Zhang QX, Yang CS, Zhang C, Li YJ, et al. Anti-Rituximab antibody in patients with NMOSDs treated with low dose Rituximab. *J Neuroimmunol*. 2018;316:107-11.
362. Cree BAC, Bennett JL, Kim HJ, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM, et al. Inebilizumab for the treatment of neuromyelitis optica spectrum disorder (N-MOmentum): a double-blind, randomised placebo-controlled phase 2/3 trial. *Lancet*. 2019;394(10206):1352-63.
363. Bennett JL, Aktas O, Rees WA, Smith MA, Günsior M, Yan L, et al. Association between B-cell depletion and attack risk in neuromyelitis optica spectrum disorder: An exploratory analysis

from N-MOMentum, a double-blind, randomised, placebo-controlled, multicentre phase 2/3 trial. *EBioMedicine*. 2022;86:104321.

364. Pittock SJ, Berthele A, Fujihara K, Kim HJ, Levy M, Palace J, et al. Eculizumab in Aquaporin-4-Positive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *N Engl J Med*. 2019;381(7):614-25.

365. Pittock SJ, Fujihara K, Palace J, Berthele A, Kim HJ, Oreja-Guevara C, et al. Eculizumab monotherapy for NMOSD: Data from PREVENT and its open-label extension. *Mult Scler*. 2022;28(3):480-6.

366. Pittock SJ, Lennon VA, McKeon A, Mandrekar J, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, et al. Eculizumab in AQP4-IgG-positive relapsing neuromyelitis optica spectrum disorders: an open-label pilot study. *Lancet Neurol*. 2013;12(6):554-62.

367. Wingerchuk DM, Fujihara K, Palace J, Berthele A, Levy M, Kim HJ, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Eculizumab in Aquaporin-4 IgG-Positive NMOSD. *Ann Neurol*. 2021;89(6):1088-98.

368. Pittock SJ, Barnett M, Bennett JL, Berthele A, de Sèze J, Levy M, et al. Ravulizumab in Aquaporin-4-Positive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Ann Neurol*. 2023;93(6):1053-68.

369. Traboulsee A, Greenberg BM, Bennett JL, Szczechowski L, Fox E, Shkrobot S, et al. Safety and efficacy of satralizumab monotherapy in neuromyelitis optica spectrum disorder: a randomised, double-blind, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2020;19(5):402-12.

370. Yamamura T, Kleiter I, Fujihara K, Palace J, Greenberg B, Zakrzewska-Pniewska B, et al. Trial of Satralizumab in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *N Engl J Med*. 2019;381(22):2114-24.

371. Kleiter I, Traboulsee A, Palace J, Yamamura T, Fujihara K, Saiz A, et al. Long-term Efficacy of Satralizumab in AQP4-IgG-Seropositive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder From SAKuraSky and SAKuraStar. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2023;10(1).

372. Lim YM, Kim H, Lee EJ, Kim HW, Kim HJ, Kim KK. Beneficial effects of intravenous immunoglobulin as an add-on therapy to azathioprine for NMO-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;42:102109.

373. Chen B, Wu Q, Ke G, Bu B. Efficacy and safety of tacrolimus treatment for neuromyelitis optica spectrum disorder. *Sci Rep*. 2017;7(1):831.

374. Miyamoto K, Kusunoki S. Intermittent plasmapheresis prevents recurrence in neuromyelitis optica. *Ther Apher Dial*. 2009;13(6):505-8.

375. Mao-Draayer Y, Thiel S, Mills EA, Chitnis T, Fabian M, Katz Sand I, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorders and pregnancy: therapeutic considerations. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(3):154-70.

376. Vukusic S, Marignier R, Ciron J, Bourre B, Cohen M, Deschamps R, et al. Pregnancy and neuromyelitis optica spectrum disorders: 2022 recommendations from the French Multiple Sclerosis Society. *Mult Scler*. 2023;29(1):37-51.

377. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
378. Haraldstad K, Wahl A, Andenæs R, Andersen JR, Andersen MH, Beisland E, et al. A systematic review of quality of life research in medicine and health sciences. *Qual Life Res*. 2019;28(10):2641-50.
379. Kim S, Lee EJ, Kim KW, Seo D, Moon S, Kim KK, et al. Quality of life of patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorders: Cross-sectional and longitudinal analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;58:103500.
380. Meca-Lallana JE, Gómez-Ballesteros R, Pérez-Miralles F, Forero L, Sepúlveda M, Calles C, et al. Impact of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder on Quality of Life from the Patients' Perspective: An Observational Cross-Sectional Study. *Neurol Ther*. 2022;11(3):1101-16.
381. Hümmert MW, Schöppe LM, Bellmann-Strobl J, Siebert N, Paul F, Duchow A, et al. Costs and Health-Related Quality of Life in Patients With NMO Spectrum Disorders and MOG-Antibody-Associated Disease: CHANCE(NMO) Study. *Neurology*. 2022;98(11):e1184-e96.
382. Lopez-Soley E, Meca-Lallana JE, Llufríu S, Blanco Y, Gómez-Ballesteros R, Maurino J, et al. Cognitive Performance and Health-Related Quality of Life in Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *J Pers Med*. 2022;12(5).
383. Meca-Lallana JE, Prefasi D, Pérez-Miralles F, Forero L, Sepúlveda M, Calles C, et al. Perception of Stigma in Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Patient Prefer Adherence*. 2021;15:713-9.
384. Wang T, Ruan H, Fan P, Jia M, Qiu W, Li K, et al. Social participation and quality of life among patients with neuromyelitis optica spectrum disorders: The mediating effects of depression. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;57:103445.
385. Berthele A, Levy M, Wingerchuk DM, Pittock SJ, Shang S, Kielhorn A, et al. A single relapse induces worsening of disability and health-related quality of life in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder. *Front Neurol*. 2023;14:1099376.
386. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
387. Kambara H. Development of capillary array DNA sequencers for genome analysis. *Chem Rec*. 2010;10(1):8-16.
388. Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D884-d91.
389. Poplin R, Ruano-Rubio V, DePristo MA, Fennell TJ, Carneiro MO, Auwera GAVd, et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv*. 2018:201178.
390. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46(3):310-5.

391. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4):877-85.
392. Pekmezovic T, Kistic Tepavcevic D, Kostic J, Drulovic J. Validation and cross-cultural adaptation of the disease-specific questionnaire MSQOL-54 in Serbian multiple sclerosis patients sample. *Qual Life Res.* 2007;16(8):1383-7.
393. Vickrey BG, Hays RD, Harooni R, Myers LW, Ellison GW. A health-related quality of life measure for multiple sclerosis. *Qual Life Res.* 1995;4(3):187-206.
394. Ware JE, Jr., Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care.* 1992;30(6):473-83.
395. Drulović J, Gavrilović A, Crnošija L, Kisić-Tepavčević D, Krbot Skorić M, Ivanović J, et al. Validation and cross-cultural adaptation of the COMPASS-31 in Croatian and Serbian patients with multiple sclerosis. *Croat Med J.* 2017;58(5):342-8.
396. Sletten DM, Suarez GA, Low PA, Mandrekar J, Singer W. COMPASS 31: a refined and abbreviated Composite Autonomic Symptom Score. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(12):1196-201.
397. Beck AT, Beck RW. Screening depressed patients in family practice. A rapid technic. *Postgrad Med.* 1972;52(6):81-5.
398. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull.* 1992;112(1):155-9.
399. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434-43.
400. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 2010;20(1):110-21.
401. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol.* 2004;11(2-3):377-94.
402. Landrum MJ, Chitipiralla S, Brown GR, Chen C, Gu B, Hart J, et al. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D835-d44.
403. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat.* 2011;32(5):557-63.
404. Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med.* 2021;13(1):31.
405. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010;7(8):575-6.
406. Matiello M, Schaefer-Klein JL, Hebrink DD, Kingsbury DJ, Atkinson EJ, Weinshenker BG. Genetic analysis of aquaporin-4 in neuromyelitis optica. *Neurology.* 2011;77(12):1149-55.

407. Crane JM, Rossi A, Gupta T, Bennett JL, Verkman AS. Orthogonal array formation by human aquaporin-4: examination of neuromyelitis optica-associated aquaporin-4 polymorphisms. *J Neuroimmunol.* 2011;236(1-2):93-8.
408. Pisani F, Mola MG, Simone L, Rosito S, Alberga D, Mangiatordi GF, et al. Identification of a point mutation impairing the binding between aquaporin-4 and neuromyelitis optica autoantibodies. *J Biol Chem.* 2014;289(44):30578-89.
409. García-Miranda P, Morón-Civanto FJ, Martínez-Olivo MDM, Suárez-Luna N, Ramírez-Lorca R, Lebrato-Hernández L, et al. Predictive Value of Serum Antibodies and Point Mutations of AQP4, AQP1 and MOG in A Cohort of Spanish Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22).
410. Wei Q, Yanyu C, Rui L, Caixia L, Youming L, Jianhua H, et al. Human aquaporin 4 gene polymorphisms in Chinese patients with neuromyelitis optica. *J Neuroimmunol.* 2014;274(1-2):192-6.
411. Yang TT, He Y, Xiang YJ, Ao DH, Wang YY, Zhang Q, et al. No association of AQP4 polymorphisms with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Transl Neurosci.* 2016;7(1):76-83.
412. Park TJ, Kim JH, Kim HJ, Bae JS, Cheong HS, Park BL, et al. Lack of association between AQP4 polymorphisms and risk of inflammatory demyelinating disease in a Korean population. *Gene.* 2014;536(2):302-7.
413. Mai W, Hu X, Lu Z, Qiu W, Peng F, Wang Y. Preliminary study on the association of AQP4 promoter polymorphism with anti-aquaporin-4 antibody positivity in southern Han Chinese patients with idiopathic demyelinating disorders of central nervous system. *J Neuroimmunol.* 2013;255(1-2):75-80.
414. Ogasawara M, Meguro A, Sakai T, Mizuki N, Takahashi T, Fujihara K, et al. Genetic analysis of the aquaporin-4 gene for anti-AQP4 antibody-positive neuromyelitis optica in a Japanese population. *Jpn J Ophthalmol.* 2016;60(3):198-205.
415. Qiu W, Chang Y, Li R, Long Y, Huang J, Mai W, et al. [Correlation of AQP4 gene polymorphism with NMO clinical phenotypes and its underlying mechanism]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2015;95(7):501-6.
416. Gong XY, Chen HB, Zhang LQ, Chen DS, Li W, Chen DH, et al. NOTCH1 mutation associates with impaired immune response and decreased relapse-free survival in patients with resected T1-2N0 laryngeal cancer. *Front Immunol.* 2022;13:920253.
417. Jiang W, Ouyang X, Jiang C, Yin L, Yao Q, Pei X, et al. A NOTCH1 Mutation Found in a Newly Established Ovarian Cancer Cell Line (FDOVL) Promotes Lymph Node Metastasis in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
418. Mangolini M, Maiques-Diaz A, Charalampopoulou S, Gerhard-Hartmann E, Bloehdorn J, Moore A, et al. Viral transduction of primary human lymphoma B cells reveals mechanisms of NOTCH-mediated immune escape. *Nat Commun.* 2022;13(1):6220.
419. Wang F, Huang C, Long J, Zhao ZB, Ma HQ, Yao XQ, et al. Notch signaling mutations increase intra-tumor chemokine expression and predict response to immunotherapy in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2022;22(1):933.

420. Mora P, Chapouly C. Astrogliosis in multiple sclerosis and neuro-inflammation: what role for the notch pathway? *Front Immunol.* 2023;14:1254586.
421. Huang J, Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Yonekawa T, Sato S, et al. A NOTCH4 missense mutation confers resistance to multiple sclerosis in Japanese. *Mult Scler.* 2013;19(13):1696-703.
422. Dežman K, Korošec P, Rupnik H, Rijavec M. SPINK5 is associated with early-onset and CHI3L1 with late-onset atopic dermatitis. *Int J Immunogenet.* 2017;44(5):212-8.
423. Sarri CA, Roussaki-Schulze A, Vasilopoulos Y, Zafiriou E, Patsatsi A, Stamatis C, et al. Netherton Syndrome: A Genotype-Phenotype Review. *Mol Diagn Ther.* 2017;21(2):137-52.
424. Tartaglia-Polcini A, Bonnart C, Micheloni A, Cianfarani F, André A, Zambruno G, et al. SPINK5, the defective gene in netherton syndrome, encodes multiple LEKTI isoforms derived from alternative pre-mRNA processing. *J Invest Dermatol.* 2006;126(2):315-24.
425. Grant CL, López-Valdez J, Marsden D, Ezgü F. Mucopolysaccharidosis type VII (Sly syndrome) - What do we know? *Mol Genet Metab.* 2024;141(3):108145.
426. Tomatsu S, Montaña AM, Dung VC, Grubb JH, Sly WS. Mutations and polymorphisms in GUSB gene in mucopolysaccharidosis VII (Sly Syndrome). *Hum Mutat.* 2009;30(4):511-9.
427. Mena J, Alloza I, Tulloch Navarro R, Aldekoa A, Díez García J, Villanueva Etxebarria A, et al. Genomic Multiple Sclerosis Risk Variants Modulate the Expression of the ANKRD55-IL6ST Gene Region in Immature Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2021;12:816930.
428. Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Mohammad Tabatabaei S, Namaki S, Rezaei-Tavirani M. Identification of common key genes and pathways between type 1 diabetes and multiple sclerosis using transcriptome and interactome analysis. *Endocrine.* 2020;68(1):81-92.
429. Liu B, Ding Y, Li P, Wang T, He S, Jia Z, et al. MicroRNA-219c-5p regulates bladder fibrosis by targeting FN1. *BMC Urol.* 2020;20(1):193.
430. Cai X, Liu C, Zhang TN, Zhu YW, Dong X, Xue P. Down-regulation of FN1 inhibits colorectal carcinogenesis by suppressing proliferation, migration, and invasion. *J Cell Biochem.* 2018;119(6):4717-28.
431. Wang H, Zhang J, Li H, Yu H, Chen S, Liu S, et al. FN1 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancers. *Front Oncol.* 2022;12:918719.
432. Xu XL, Liu H, Zhang Y, Zhang SX, Chen Z, Bao Y, et al. SPP1 and FN1 are significant gene biomarkers of tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2021;22(4):713.
433. Zhang XX, Luo JH, Wu LQ. FN1 overexpression is correlated with unfavorable prognosis and immune infiltrates in breast cancer. *Front Genet.* 2022;13:913659.
434. Shimizu Y, Ota K, Kubo S, Kabasawa C, Kobayashi M, Ohashi T, et al. Association of Th1/Th2-related chemokine receptors in peripheral T cells with disease activity in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Eur Neurol.* 2011;66(2):91-7.
435. Andalib A, Doulabi H, Najafi M, Tazhibi M, Rezaie A. Expression of chemokine receptors on Th1/Th2 CD4+ lymphocytes in patients with multiple sclerosis. *Iran J Immunol.* 2011;8(1):1-10.

436. Hakobyan S, Luppe S, Evans DR, Harding K, Loveless S, Robertson NP, et al. Plasma complement biomarkers distinguish multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler.* 2017;23(7):946-55.
437. Pache F, Ringelstein M, Aktas O, Kleiter I, Jarius S, Siebert N, et al. C3 and C4 complement levels in AQP4-IgG-positive NMOSD and in MOGAD. *J Neuroimmunol.* 2021;360:577699.
438. Tatomir A, Talpos-Caia A, Anselmo F, Kruszewski AM, Boodhoo D, Rus V, et al. The complement system as a biomarker of disease activity and response to treatment in multiple sclerosis. *Immunol Res.* 2017;65(6):1103-9.
439. Zelek WM, Fathalla D, Morgan A, Touchard S, Loveless S, Tallantyre E, et al. Cerebrospinal fluid complement system biomarkers in demyelinating disease. *Mult Scler.* 2020;26(14):1929-37.
440. Coss SL, Zhou D, Chua GT, Aziz RA, Hoffman RP, Wu YL, et al. The complement system and human autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2023;137:102979.
441. Mannes M, Halbgebauer R, Wohlgemuth L, Messerer DAC, Savukoski S, Schultze A, et al. Combined Heterozygous Genetic Variations in Complement C2 and C8B: An Explanation for Multidimensional Immune Imbalance? *J Innate Immun.* 2023;15(1):412-27.
442. Martin I, Vourc'h P, Mahé M, Thépault RA, Antar C, Védrine S, et al. Association study of the ubiquitin conjugating enzyme gene UBE2H in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10(5-6):432-5.
443. Shin U, Choi Y, Ko HS, Myung K, Lee S, Cheon CK, et al. A heterozygous mutation in UBE2H in a patient with developmental delay leads to an aberrant brain development in zebrafish. *Hum Genomics.* 2023;17(1):44.
444. Vourc'h P, Martin I, Bonnet-Brilhault F, Marouillat S, Barthélémy C, Pierre Müh J, et al. Mutation screening and association study of the UBE2H gene on chromosome 7q32 in autistic disorder. *Psychiatr Genet.* 2003;13(4):221-5.
445. Araki T, Milbrandt J. ZNRF proteins constitute a family of presynaptic E3 ubiquitin ligases. *J Neurosci.* 2003;23(28):9385-94.
446. Lee CY, Lai TY, Tsai MK, Chang YC, Ho YH, Yu IS, et al. The ubiquitin ligase ZNRF1 promotes caveolin-1 ubiquitination and degradation to modulate inflammation. *Nat Commun.* 2017;8:15502.
447. Giles AC, Grill B. Roles of the HUWE1 ubiquitin ligase in nervous system development, function and disease. *Neural Dev.* 2020;15(1):6.
448. Borg R, Herrera P, Purkiss A, Cacciottolo R, Cauchi RJ. Reduced levels of ALS gene DCTN1 induce motor defects in *Drosophila*. *Front Neurosci.* 2023;17:1164251.
449. Evans CS, Holzbaur ELF. Autophagy and mitophagy in ALS. *Neurobiol Dis.* 2019;122:35-40.
450. Jia F, Fellner A, Kumar KR. Monogenic Parkinson's Disease: Genotype, Phenotype, Pathophysiology, and Genetic Testing. *Genes (Basel).* 2022;13(3).

451. Konno T, Ross OA, Teive HAG, Sławek J, Dickson DW, Wszolek ZK. DCTN1-related neurodegeneration: Perry syndrome and beyond. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017;41:14-24.
452. Xu Y, Li L, Ren HT, Yin B, Yuan JG, Peng XZ, et al. Mutation of the cellular adhesion molecule NECL2 is associated with neuromyelitis optica spectrum disorder. *J Neurol Sci.* 2018;388:133-8.
453. Chang Y, Zhou L, Zhong X, Shi Z, Sun X, Wang Y, et al. Clinical and genetic analysis of familial neuromyelitis optica spectrum disorder in Chinese: associated with ubiquitin-specific peptidase USP18 gene variants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2022;93(12):1269-75.
454. Carnero Contentti E, Eizaguirre MB, López PA, Rojas JI, Tkachuk V, Alonso R. Health-related quality of life in neuromyelitis optica spectrum disorder patients in an Argentinean cohort. *Mult Scler Relat Disord.* 2022;59:103647.
455. Fujihara K, Hattori S, Kleiter I, Levy M, Matsuda Y, Mitsutake A, et al. Patient-reported burden of symptoms in neuromyelitis optica: A secondary analysis on pain and quality of life. *J Neurol Sci.* 2021;428:117546.
456. Huang W, Zhang Bao J, Chang X, Wang L, Zhao C, Lu J, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorder in China: Quality of life and medical care experience. *Mult Scler Relat Disord.* 2020;46:102542.
457. Schmidt F, Zimmermann H, Mikolajczak J, Oertel FC, Pache F, Weinhold M, et al. Severe structural and functional visual system damage leads to profound loss of vision-related quality of life in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;11:45-50.
458. Levy M, Haycox AR, Becker U, Costantino C, Damonte E, Klingelschmitt G, et al. Quantifying the relationship between disability progression and quality of life in patients treated for NMOSD: Insights from the SAKura studies. *Mult Scler Relat Disord.* 2022;57:103332.
459. Moghadasi AN, Mirmosayyeb O, Mohammadi A, Sahraian MA, Ghajarzadeh M. The prevalence of cognitive impairment in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD): A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;49:102757.
460. Oertel FC, Schließert J, Brandt AU, Paul F. Cognitive Impairment in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: A Review of Clinical and Neuroradiological Features. *Front Neurol.* 2019;10:608.
461. Beekman J, Keisler A, Pedraza O, Haramura M, Gianella-Borradori A, Katz E, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorder: Patient experience and quality of life. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2019;6(4):e580.
462. Gerbaud L, Deffond D, Mulliez A, Benausse F, Vernay D, Clavelou P. [Cognitive impairment and quality of life in multiple sclerosis patients]. *Rev Neurol (Paris).* 2006;162(10):970-9.
463. Chanson JB, Zéphir H, Collongues N, Outteryck O, Blanc F, Fleury M, et al. Evaluation of health-related quality of life, fatigue and depression in neuromyelitis optica. *Eur J Neurol.* 2011;18(6):836-41.

464. Debouverie M, Pittion-Vouyovitch S, Louis S, Guillemin F. Validity of a French version of the fatigue impact scale in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2007;13(8):1026-32.
465. Radat F, Lafittau M, Ouallet JC, Brochet B, Jouvent R. [Validation of EHD self questionnaire in multiple sclerosis]. *Encephale*. 2007;33(1):49-57.
466. Barzegar M, Badihian S, Mirmosayyeb O, Ashtari F, Jamadi M, Emami S, et al. Comparative study of quality of life, anxiety, depression, and fatigue among patients with neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis: The first report from Iran. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;22:161-5.
467. Mikula P, Nagyova I, Krokavcova M, Vitkova M, Rosenberger J, Szilasiova J, et al. Self-esteem, social participation, and quality of life in patients with multiple sclerosis. *J Health Psychol*. 2017;22(8):984-92.
468. Koutsouraki E, Theodoros K, Eleni G, Marianna K, Areti N, Ariadni K, et al. Autonomic nervous system disorders in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2023;270(8):3703-13.
469. Racosta JM, Kimpinski K, Morrow SA, Kremenchutzky M. Autonomic dysfunction in multiple sclerosis. *Auton Neurosci*. 2015;193:1-6.
470. Findling O, Hauer L, Pezawas T, Rommer PS, Struhal W, Sellner J. Cardiac Autonomic Dysfunction in Multiple Sclerosis: A Systematic Review of Current Knowledge and Impact of Immunotherapies. *J Clin Med*. 2020;9(2).
471. Foschi M, Giannini G, Merli E, Mancinelli L, Zenesini C, Viti B, et al. Frequency and characteristics of dysautonomic symptoms in multiple sclerosis: a cross-sectional double-center study with the validated Italian version of the Composite Autonomic Symptom Score-31. *Neurol Sci*. 2021;42(4):1395-403.
472. Adamec I, Bach I, Barušić AK, Mišmaš A, Habek M. Assessment of prevalence and pathological response to orthostatic provocation in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2013;324(1-2):80-3.
473. Habek M, Crnošija L, Lovrić M, Junaković A, Krbot Skorić M, Adamec I. Sympathetic cardiovascular and sudomotor functions are frequently affected in early multiple sclerosis. *Clin Auton Res*. 2016;26(6):385-93.
474. Kurne A, Karabudak R, Yalcin-Cakmakli G, Gursoy-Ozdemir Y, Aydin P, Ilksen-Colpak A, et al. Recurrent optic neuritis: clues from a long-term follow up study of recurrent and bilateral optic neuritis patients. *Eye Brain*. 2010;2:15-20.
475. Winter A, Chwalisz B. MRI Characteristics of NMO, MOG and MS Related Optic Neuritis. *Semin Ophthalmol*. 2020;35(7-8):333-42.
476. Gil-Casas A, Piñero DP, Molina-Martín A. Dynamic Pupillary Response in Multiple Sclerosis Patients with and without Optic Neuritis. *Biomedicines*. 2023;11(12).
477. Pozzessere G, Rossi P, Valle E, Froio CP, Petrucci AF, Morocutti C. Autonomic involvement in multiple sclerosis: a pupillometric study. *Clin Auton Res*. 1997;7(6):315-9.

478. Adamec I, Krbot Skorić M, Habek M. Understanding and managing autonomic dysfunction in persons with multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2021;21(12):1409-17.
479. Crnošija L, Adamec I, Krbot Skorić M, Habek M. How to explore and explain autonomic changes in multiple sclerosis. *Neurophysiol Clin.* 2023;53(2):102854.
480. Cortez MM, Nagi Reddy SK, Goodman B, Carter JL, Wingerchuk DM. Autonomic symptom burden is associated with MS-related fatigue and quality of life. *Mult Scler Relat Disord.* 2015;4(3):258-63.

## SPISAK RADOVA PROISTEKLIH IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

**1. Andabaka M,** Pekmezovic T, Crnosija L, Veselinovic N, Junakovic A, Tamas O, Budimkic Stefanovic M, Jovicevic V, Momcilovic N, Roganovic M, Maric G, Jovanovic A, Gabelic T, Krbot Skoric M, Mesaros S, Radulovic LJ, Habek M, Drulovic J. Impact of the autonomic dysfunction on the quality of life in people with NMOSD and MS: An international cross-sectional study. *Mult Scler Relat Disord.* 2023 Nov;79:104953. DOI: 10.1016/j.msard.2023.104953

**2. Andabaka M,** Drulović J, Novaković I. Značaj molekularnih biomarkera u dijagnostici neuromijelitis optika spektra bolesti. *MedPodml.* DOI: 10.5937/mp76-48309

## BIOGRAFIJA

Dr Marko Andabaka upisao je Doktorske akademske studije – smer Neuronauke na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2016 godine. Dobitnik je stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (oblast: Medicina) na naučno-istraživačkom projektu pod nazivom: “Analiza genetičkih markera mišićne distonije” na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u periodu od 2016-2018 godine. U sklopu pomenutog projekta, bio je angažovan u Laboratoriji za molekularnu i genetičku dijagnostiku neuroloških bolesti Klinike za neurologiju Kliničkog centra Srbije. Tokom 2017 godine započinje angažovanje i u neuroimunološkoj laboratoriji Klinike za neurologiju Kliničkog centra Srbije baveći se određivanjem molekularnih biomarkera imunski posredovanih neuroloških bolesti. U periodu od 2018-2022 godine bio je zaposlen na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi, a potom kao asistent na Katedri za humanu genetiku. Aktuelno je zaposlen u Klinici za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu u Beogradu na Odeljenju razvojne neurologije. Specijalizaciju iz neurologije upisuje 2023 godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Učestvovao je na mnogim domaćim i stranim naučnim i stručnim sastancima. Autor je više radova objavljenih u relevantnim naučnim časopisima.

Marko Andabaka je član: Lekarske komore Srbije, Srpskog lekarskog društva, Društva mladih neurologa Srbije, Udruženja neuroimunologa Srbije, Društva genetičara Srbije, Društva za neuronauke Srbije, Federacije društava za neuronauke Evrope i Evropske akademije neurologa.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марко Андабака

Број индекса 5113/16

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

МОЛЕКУЛАРНО-ГЕНЕТИЧКА АНАЛИЗА АКВАПОРИНА 4 И КОРЕЛАЦИЈА СА КЛИНИЧКИМ  
КАРАКТЕРИСТИКАМА ОБОЛЕЛИХ ОД НЕУРОМИЈЕЛИТИС ОПТИКА СПЕКТРА БОЛЕСТИ

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марко Андабака

Број индекса 5113/16 \_\_\_\_\_

Студијски програм Неуронауке

Наслов рада Молекуларно-генетичка анализа аквапорина 4 и

корелација са клиничким карактеристикама оболелих од

неуромијелитис оптика спектра болести

Ментор Проф. др Јелена Друловић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

МОЛЕКУЛАРНО-ГЕНЕТИЧКА АНАЛИЗА АКВАПОРИНА 4 И КОРЕЛАЦИЈА СА КЛИНИЧКИМ  
КАРАКТЕРИСТИКАМА ОБОЛЕЛИХ ОД НЕУРОМИЈЕЛИТИС ОПТИКА СПЕКТРА БОЛЕСТИ

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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