

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

**Ana V. Nikolić**

**KLINIČKE, ELEKTROFIZIOLOŠKE, PATOGENETSKE I  
IMUNOLOŠKE SPECIFIČNOSTI STEČENE AUTOIMUNE  
MIASTENIJE GRAVIS UDRUŽENE SA ANTITELIMA PREMA MIŠIĆ-  
SPECIFIČNOJ TIROZIN KINAZI**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

MEDICAL FACULTY

**Ana V. Nikolić**

**CLINICAL, ELECTROPHYSIOLOGICAL, PATHOGENETIC AND  
IMMUNOLOGICAL SPECIFICITIES OF ACQUIRED AUTOIMMUNE  
MYASTHENIA GRAVIS ASSOCIATED WITH ANTIBODIES AGAINST  
MUSCLE SPECIFIC TYROSINE KINASE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

## **Podaci o mentoru i članovima komisije**

**Mentor:** Prof.dr Dragana Lavrnić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

### **Članovi komisije:**

1. Akademik Prof.dr Vladimir Kostić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. Prof.dr Vidosava Rakočević Stojanović, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. Prof.dr Gordana Očić, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, profesor u penziji

## ZAHVALNICA

Ova studija je sprovedena na Klinici za neurologiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu. Želela bih da zahvalim svom osoblju Klinike za neurologiju, posebno III kliničkog odeljenja, svim kolegama, sestrama, saradnicima i prijateljima na podršci i doprinosu ovom radu.

Posebnu zahvalnost bi želela da iskažem:

**Prof.dr Dragani Lavrnić** – mom mentoru, koja me je još kao studenta uvela u ovu divnu nauku i kasnije me podržavala, podsticala i nesebično mi pomagala u ostvarivanju novih ciljeva. Zahvaljujući njoj sam poželeva da otkrijem sve tajne miastenije gravis i uspešno sam obavila ovo istraživanje.

**G-di Ljiljani Hajduković** i njenom timu sa Instituta za primenu nuklearne energije (INEP) u Beogradu na obavljanju analize seruma na anti-AChR At i anti-MuSK At.

**Prof. dr Marc De Baetsu** sa Odeljenja Čelijskih Neuronauka, Univerziteta u Mastrohtu, Holandija na obavljanju analize anti-MuSK At kod jednog broja analiziranih bolesnika.

**Prof.dr Petru Đukiću** i njegovom timu sa Klinike za kardiovaskularne bolesti Kliničkog Centra Srbije u Beogradu za uspešno obavljanje timektomija kod naših bolesnika.

**Dr Vesni Božić** sa Instituta za patologiju Klinike za kardiovaskularne bolesti Kliničkog Centra Srbije u Beogradu za patohistološke preglede timusa obrađenih bolesnika.

**Prim.dr Slobodanu Lavrniću, Doc. Marku Dakoviću** i njihovom timu iz Centra za magnetnu rezonancu Kliničkog Centra Srbije u Beogradu na brzom i uspešnom obavljanju magnetne spektroskopije mišića jezika kod obrađenih bolesnika.

**Dr Tanji Nišić** sa Klinike za endokrinologiju i bolesti metabolizma Kliničkog Centra Srbije u Beogradu na brzom i efikasnom obavljanju testiranja autonomnog nervnog sistema analiziranih bolesnika i izuzetnu saradnju.

**Dr Zorani Andrić i molekularnom biologu Ružici Simonović** iz Instituta za transfuziju krvi Republike Srbije na obavljanju HLA tipizacije analiziranih bolesnika.

**Dr Anđeli Gavrilović** na velikoj i ekspeditivnoj pomoći oko statističke analize rezultata ove studije.

**Kolegama sa III kliničkog odeljenja:** Prof.dr Vidosavi Rakočević Stojanović, Prof.dr Zorici Stević, Ass.dr Ivani Basti, dr Ivanu Marjanoviću i dr Stojanu Periću na velikoj pomoći pri regrutaciji, obradi i lečenju analiziranih bolesnika.

**Vms Danici Maksimović i vms Dragani Turčinov** na velikoj pomoći pri elektrofiziološkom ispitivanju.

**Svojoj porodici:**

Roditeljima Mirjani i Vasiliju i sestri Vesni, na beskrajnoj ljubavi, na tome što su me uvek učili pravim vrednostima, na brojnim odricanjima koja su meni omogućila napredak u životu i karijeri, na dragocenim savetima, verovanju u mene i neizmernoj podršci svemu što sam radila.

Suprugu Dimitriju, na beskrajnoj ljubavi, neizmernom strpljenju, pomoći i podršci, na svim kompromisima i na pravim rečima u pravom trenutku.

Svojim sinovima, Mihailu i Matiji, na ogromnoj ljubavi i toplini, na svakom osmehu, zagrljaju i poljupcu, kojim mi ulepšavaju svaki pojedinačni dan.

Dr Ana Nikolić

Mojoj deci,  
Mihailu i Matiji

# KLINIČKE, ELEKTROFIZIOLOŠKE, PATOGENETSKE I IMUNOLOŠKE SPECIFIČNOSTI STEČENE AUTOIMUNE MIASTENIJE GRAVIS UDRUŽENE SA ANTITELIMA PREMA MIŠIĆ-SPECIFIČNOJ TIROZIN KINAZI

## SAŽETAK

**Cilj:** da se kod bolesnika sa miastenijom gravis udruženom sa antitelima prema mišić-specifičnoj tirozin kinazi (MuSK MG) analiziraju kliničke, elektrofiziološke, patogenetske i imunološke specifičnosti u odnosu na bolesnike sa miastenijom gravis udruženom sa antitelima prema nikotinskom acetilholinskom repotoru (AChR MG).

**Metodologija:** Analizirano je 31 MuSK MG i 28 AChR MG bolesnika, kod kojih je sprovedena detaljna klinička obrada, elektrofiziološko ispitivanje, magnetna spektroskopija (MRS) mišića jezika, testiranje autonomnog nervnog sistema i HLA (humani leukocitni antigen) tipizacija.

**Rezultati:** Dominantna klinička prezentacija MuSK MG je bila okulobulbarna i mimična slabost, a teške forme bolesti su zabeležene kod preko 80% bolesnika. Prostigminski test je bio pozitivan kod 77% MuSK MG u odnosu na 100% AChR MG pacijenata, a hipersenzitivna reakcija na inhibitore acetilholinesteraze je bila prisutna kod 39% MuSK MG bolesnika, dok je u grupi AChR MG pacijenata ona registrovana kod svega 4% bolesnika. Timus je kod bolesnika sa MuSK MG bio normalan u 67% ili atrofičan u 33% slučajeva, dok je kod AChR MG bolesnika najčešća bila limfofolikularna hiperpalzija (80%). Test repetitivne stimulacije je bio ređe pozitivan kod MuSK u odnosu na AChR bolesnike (52%:93%), i to najčešće na mišićima lica i proksimalnim mišićima ekstremiteta. SFEMG je bio pozitivan kod preko 90% obolelih obe grupe, kod MuSK MG bolesnika češće na licu. Prisustvo miopatije je kod MuSK MG bolesnika bilo znatno češće u odnosu na pacijente sa AChR MG. Kod MuSK MG miopatija je bila prisutna u mišićima lica kod čak 80% pacijenata, dok je u mišićima ekstremiteta ona registrovana kod trećine obolelih. Za razliku od ovoga kod AChR MG bolesnika miopatske promene su zabeležene kod svega 7% pacijenata na mišićima ekstremiteta i kod 32% na mimičnim mišićima. MRS mišića jezika je kod MuSK MG bolesnika opisana intramiocelularna masna infiltracija kod čak 85% obolelih, dok je kod AChR MG bolesnika ona zabeležena kod svega 20% pacijenata. Dobar ishod bolesti je

evidentiran kod bolesnika obe grupe, ali je najveći broj MuSK MG bolesnika zahtevao produženo lečenje imunosupresivnom terapijom.

**Zaključak:** Analiza naše kohorte pacijenata sa MG je ukazala da se MuSK MG u značajnoj meri razlikuje od AChR pozitivne forme bolesti, kako u pogledu kliničke slike, patohistoloških promena timusa i odgovora na terapiju, tako i elektrofizioloških karakteristika (TRS i SFEMG), strukturnih promena u mišićima (MRS jezika) i genetske predispozicije za nastanak bolesti (HLA fenotip). U odnosu na sve pomenuto MuSK MG se u okviru stečene autoimune MG izdvaja kao zaseban, specifičan entitet, usled čega oboleli od ove forme MG zahtevaju specifičan dijagnostički i terapijski pristup.

**Ključne reči:** miastenija gravis, mišić specifična tirozin kinaza, elektrofiziologija, MR spektroskopija jezika, disfunkcija autonomnog nervnog sistema, HLA tipizacija

**Naučna oblast:** neurologija

**Uža naučna oblast:** neuromišićne bolesti



# CLINICAL, ELECTROPHYSIOLOGICAL, PATHOGENETIC AND IMMUNOLOGICAL SPECIFICITIES OF ACQUIRED AUTOIMMUNE MYASTHENIA GRAVIS ASSOCIATED WITH ANTIBODIES AGAINST MUSCLE SPECIFIC TYROSINE KINASE

## ABSTRACT

**Objectives:** To analyze clinical, electrophysiological, pathogenetic and immunological specificities of the patients with myasthenia gravis associated with anti-muscle specific tyrosine kinase antibodies (MuSK MG) in relation to the patients with myasthenia gravis associated with anti-nicotinic acetylcholine receptor antibodies (AChR MG).

**Methods:** We analyzed 31 MuSK MG and 28 AChR MG patients, in whom we conducted detailed clinical and electrophysiological examination, proton magnetic resonance spectroscopy (MRS) of the intrinsic tongue muscles, autonomic nervous system testing and HLA (humane leukocyte antigen) typing.

**Results:** Predominant clinical presentation of MuSK MG was oculobulbar and facial weakness, and severe disease forms were present in over 80% of patients. Neostigmine testing was positive in 77% of MuSK MG in relation to the 100% of AChR MG patients, and hypersensitive reaction to acetylcholine esterase inhibitors was registered in 39% of MuSK MG patients and only in 4% of AChR MG patients. Thymus was normal (67%) or atrophic (33%) in patients with MuSK MG, while in patients with AChR MG the most frequent finding was lymphohyperplasia (80%). Repetitive nerve stimulation test was rarely positive in MuSK in relation to the AChR MG patients (52%:93%), most frequently in facial and proximal limb muscles. Single fibre electromyography was positive in over 90% of patients from both groups, in MuSK MG patients more often in facial muscles. The presence of myopathy was more frequent in MuSK compared to AChR MG patients. It was registered in the facial muscles in 80%, and in limb muscles in 30% of MuSK MG patients, while it was present in 7% of AChR MG patients in the limb muscles and in 32% of AChR MG patients in the facial muscles. In accordance to this finding, examination of the tongue muscles with MRS showed intramyocellular fatty infiltration in 85% of MuSK and 20% of AChR MG

patients. Good disease outcome was observed in the patients from both groups, but the majority of the MuSK MG patients were dependant on prolonged immunosuppressive therapy.

**Conclusion:** Analysis of our cohort of MuSK MG patients showed that MuSK MG was significantly different from AChR MG, both in the means of different clinical presentation, pathohistological thymus changes and response to therapy, as well as in the relation to the electrophysiological findings, tongue MRS and HLA haplotype. Based on all these findings it is clear that MuSK MG represents separate clinical entity of MG.

**Key words:** myasthenia gravis, muscle specific tyrosine kinase, electrophysiology, tongue MR spectroscopy, autonomic nervous system dysfunction, HLA typing

**Scientific field:** neurology

**Scientific subfield:** neuromuscular disorders

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1 Etiopatogeneza MG.....	1
1.1.1. Neuromišićna spojnica.....	2
1.1.2. Nikotinski acetilholinski receptor.....	4
1.1.3. Mišić specifična tirozin kinaza.....	5
1.1.4. Imunopatogeneza MG.....	6
1.1.4.1. Imunopatogeneza AChR pozitivne MG.....	6
1.1.4.2. Imunopatogeneza MuSK pozitivne MG.....	9
1.1.4.3. Antitela na Lrp4.....	12
1.1.4.4. Anti-agrin At i anti-ColQ At.....	13
1.1.5. Uloga genetskih faktora.....	13
1.2. Klinička slika.....	14
1.2.1. Epidemiologija.....	14
1.2.2. Kliničke manifestacije bolesti.....	15
1.2.2.1. Klinička slika MuSK MG.....	16
1.2.3. Atrofija mišića kod MuSK MG bolesnika.....	18
1.2.3.1. Miopatija kod MuSK MG.....	18
1.2.3.2. Patofiziološka osnova atrofije mišića kod MuSK MG bolesnika.....	19
1.2.4. Sličnost kliničkih karakteristika između MuSK MG i kongenitalnog miasteničnog sindroma sa Dok-7 mutacijama.....	20
1.3. Klasifikacije MG.....	21
1.3.1. MGFA klasifikacija.....	21
1.4. Dijagnoza MG.....	22
1.4.1. Anamneza.....	23
1.4.2. Klinička slika.....	23
1.4.3. Farmakološki testovi.....	23
1.4.4. Elektrofiziološki testovi.....	24

1.4.4.1. Test repetitivne stimulacije nerva.....	24
1.4.4.2. Elektromiografija pojedinačnog mišićnog vlakna.....	25
1.4.5. Detekcija autoantitela.....	26
1.4.5.1. Određivanje anti-AChR At u serumu.....	26
1.4.5.1.1. Antitela koja se vezuju za AChR.....	27
1.4.5.2. Određivanje anti-MuSK At u serumu.....	27
1.5. Terapija MG.....	28
1.5.1. Timektomija.....	30
1.6. Prognoza bolesti.....	32
2. Cilj rada.....	33
3. Materijal i metode.....	34
3.1. Bolesnici.....	34
3.1.1. Klinička slika.....	34
3.1.1.1. MGFA klasifikacija.....	34
3.1.1.2. Kvantitativni miastenija gravis skor.....	35
3.1.2. Timektomija.....	35
3.1.2.1. Patohistološki pregled timusa.....	35
3.1.3. Terapija.....	36
3.1.4. Ishod lečenja.....	36
3.2. Metodologija.....	36
3.2.1. Određivanje titra anti-AChR At.....	36
3.2.2. Određivanje titra anti-MuSK At.....	37
3.2.3. Elektrofiziološko ispitivanje.....	37
3.2.3.1. Test repetitivne stimulacije nerva.....	38
3.2.3.2. SFEMG.....	38
3.2.3.3. Detekcija kasnih potencijala.....	38
3.2.3.4. Kvantitativne EMG metode.....	39
3.2.4. HLA tipizacija.....	39
3.2.5. MR spektroskopija jezika.....	39
3.2.6. Testiranje autonomnog nervnog sistema.....	40
3.3. Statistička analiza.....	40
4. Rezultati.....	42
4.1. Demografski podaci.....	42
4.2. Klinička slika.....	43

4.3. Timektomija.....	48
4.4. Elektrofiziološka evaluacija.....	49
4.4.1. Test repetitivne stimulacije nerva.....	49
4.4.2. SFEMG.....	53
4.4.3. EMG pregled.....	57
4.4.4. Analiza obrt-amplituda.....	59
4.4.5. Multi MUP analiza.....	60
4.4.6. Detekcija kasnih potencijala.....	61
4.5. MR spektroskopija mišića jezika.....	61
4.6. Testiranje autonomnog nervnog sistema.....	64
4.7. HLA tipizacija.....	67
4.8. Primjenjena terapija.....	68
4.9. Ishod bolesti.....	71
4.10. Udružena pojava drugih bolesti sa MG.....	72
5. Diskusija.....	74
5.1. Demografske i kliničke osobine.....	74
5.2. Patohistološke promene timusa.....	76
5.3. Elektrofiziološko ispitivanje.....	77
5.4. MR spektroskopija mišića jezika.....	80
5.5. Testiranje ANS.....	82
5.6. HLA tipizacija.....	83
5.7. Odgovor na primenjenu terapiju.....	84
5.8. Ishod bolesti.....	86
6. Zaključak.....	88
7. Literatura.....	91
Spisak skraćenica.....	109
Prilog 1.....	111
Biografija autora.....	112

## 1. UVOD

Stečena autoimuna mijastenija gravis (MG) je relativno retko neuromišićno oboljenje, koje se karakteriše promenljivom slabošću i zamorljivošću različitih skeletnih mišića posle ponavljane ili produžene mišićne aktivnosti (1, 2), kao i poboljšanjem stanja nakon odmora ili primene antiholinesteraznog leka. Prvi klinički opis ovog oboljenja dao je *Thomas Willis* 1672.god. (3) u žurnalu "De anima brutorum", gde je opisao pacijenta sa tipičnom kliničkom prezentacijom ove bolesti.

### 1.1. Etiopatogeneza MG

MG je T ćelijski zavisna, B ćelijski posredovana autoimuna bolest, koja nastaje usled postsinaptičkog bloka neuromišićne transmisije. Njenu autoimunu osnovu prvi je pretpostavio *Simpson*, na osnovu kliničkih sličnosti MG i sistemskog lupusa eritematodesa (4). Međutim, pravo rasvetljavanje patogeneze MG potiče od eksperimenata *Patric*-a i *Lindstrom*-a, koji su nakon imunizacije zečeva sa nikotinskim acetil-holinskim receptorom (AChR) *Torpedo californica*, kod eksperimentalnih životinja registrovali znake mijastenične slabosti, a u njihovom serumu dokazali istovremeno prisustvo antitela protiv AChR (anti-AChR At) (5). Kasnije je veliki broj različitih studija dokazao patogenetsku ulogu anti-AChR At u strukturnom i funkcionalnom oštećenju neuromišićne spojnice (6-10). Dokazano je da su anti-AChR At prisutna kod 70-90% obolelih sa MG i da njihova koncentracija tokom praćenja bolesnika korelira sa težinom simptoma bolesti (11, 12). Međutim, zapaženo je da i bolesnici u čijim serumima nije potvrđeno prisustvo anti-AChR At, tzv. AChR negativni bolesnici, imaju dobar odgovor na imunosupresivnu i imunomodulatornu terapiju (1, 2), bebe majki sa AChR negativnom MG razvijaju neonatalnu MG (13, 14), a antitela iz seruma ovih bolesnika ubrizgana u miševе dovode do oštećenja neuromišićne transmisije (2). Time je pokazano da je mišićna slabost i kod ovih bolesnika takođe uzrokovana autoantitelima na određene antigene neuromišićne spojnice.

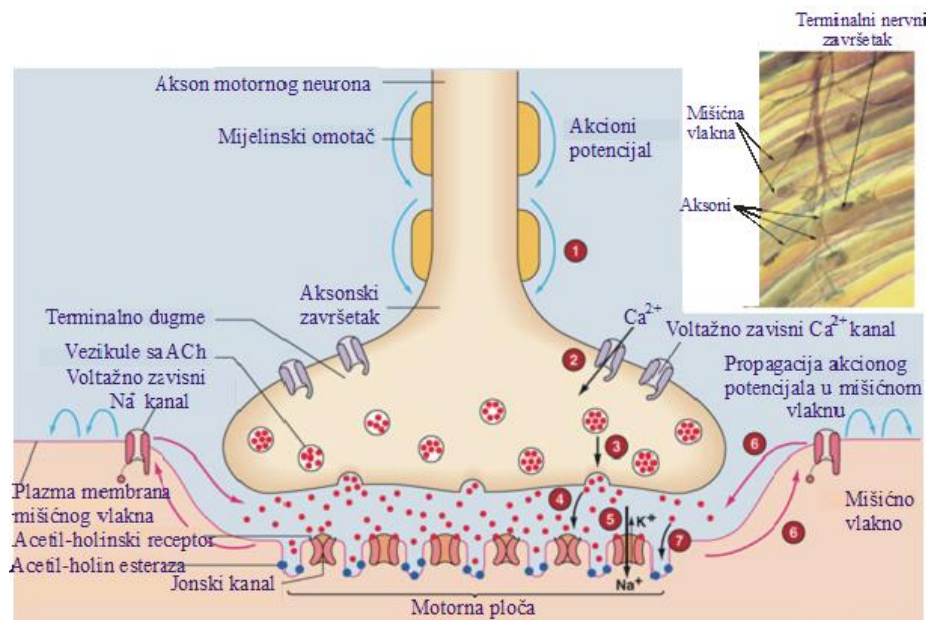
Veliki preokret u rasvetljavanju etiologije AChR negativne MG načinjen je 2001. godine kada su *Hoch* i saradnici identifikovali autoantitela prema mišić-specifičnoj tirozin kinazi (anti-MuSK At) kod oko 40% bolesnika sa AChR negativnom generalizovanom MG (7). Deset godina kasnije, *Higuchi* i saradnici su kod manjeg procenta seronegativnih (i AChR i MuSK negativnih) pacijenata detektovali postojanje antitela na *low density lipoprotein receptor related protein 4* (anti-Lrp4 At), koji se danas izučava kao nov target imunskog odgovora u

MG (15). Ipak, kod oko polovine AChR negativnih bolesnika ciljni antigen još uvek nije identifikovan, niti je etiopatogeneza ove grupe bolesnika u potpunosti razjašnjena.

Da bi se razumela etiopatogeneza MG potrebno je dobro poznavanje normalne anatomije i fiziologije neuromišićne spojnice (NMS).

### 1.1.1. Neuromišićna spojnica

NMS formiraju prošireni terminalni završetak motornog nerva, čija ćelijska membrana predstavlja presinaptičku membranu, nabrana postsinaptička membrana poprečno-prugastog mišića sa kojim terminalni nervni završetak neposredno stupa u kontakt i sinaptička pukotina, koja predstavlja prostor između pre- i postsinaptičke membrane (Slika 1).



Slika 1. Anatomija i fiziologija neuromišićne spojnice

(Modifikovano sa [www.colorado.edu](http://www.colorado.edu))

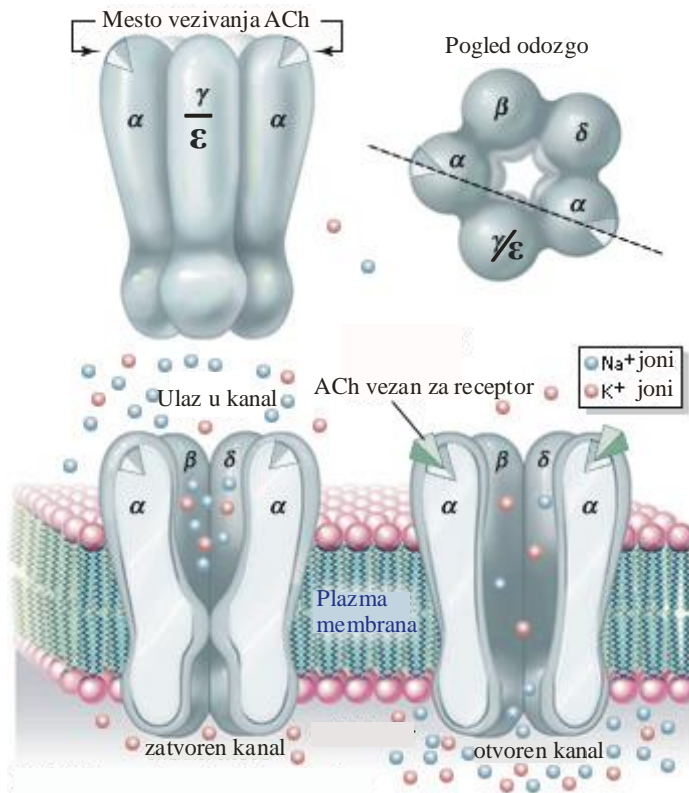
Presinaptički nervni završetak sadrži vezikule ispunjene acetil-holinom (ACh), koje mogu biti primarne (odmah dostupne), sekundarne (rezerve spremne za mobilizaciju) i tercijarne (rezervni depo) i koje su pomoću aktina vezane za citoskeletne elemente nervnog završetka. Kada akcioni potencijal nerva pristigne do terminalnog nervnog završetka aktiviraju se voltažno zavisni kalcijumovi kanali, koji omogućavaju influks kalcijuma u presinaptički nervni završetak, što dovodi do oslobađanja ACh iz vezikula presinaptičkog nervnog završetka u sinaptičku pukotinu. Kalcijumski kanali su na presinaptičkoj membrani lokalizovani u predelu aktivnih zona u vidu dva paralelna, dupla niza pora, gde se nalaze i

mesta oslobađanja ACh. U stanju mirovanja, i membrana vezikula ACh i presinaptička membrana imaju negativni naboj, usled čega se odbijaju. Kalcijum, koji po pristizanju akcionog potencijala nerva, ulazi u terminalni nervni završetak i vezuje se za površinu membrana, neutrališe negativan naboj, približava vezikule sa ACh i omogućava fuziju njihovih membrana sa presinaptičkom membranom (16). Kalcijum pokreće i kaskadu konformacionih promena molekula citoskeleta presinaptičkog nervnog završetka (17). Nezaobilazni učesnik u ovoj kaskadi je sinaptički fuzioni kompleks koji se sastoji od *SNARE* proteina (solubilni vezujući faktor N-etilmaleimid senzitivnih fuzionih proteina). Za egzocitozu ACh u sinaptičku pukotinu, ključni *SNARE* proteini su sinaptobrevin, *SNAP-25* (sinaptozom-udruženi protein od 25 kD) i sintaksin 1, a od značaja su i sinapsin, sinaptotagmin i sineksin, koji omogućavaju odvajanje vezikula sa ACh od ovih citoskeletnih proteina. Oslobođeni ACh se zatim vezuje za AChR na postsinaptičkoj membrani mišića. AChR je jonski kanal i nakon vezivanja ACh otvara se na kratko, dovodeći do influksa natrijumovih jona u unutrašnjost mišićne ćelije, što dovodi do parcijalne depolarizacije postsinaptičke membrane i generisanja ekscitatornog postsinaptičkog potencijala (EPSP). Ukoliko broj otvorenih natrijumovih kanala dostigne izvestan prag, generiše se mišićni akcioni potencijal na postsinaptičkoj membrani. Po odvajanju od AChR molekuli ACh se u sinaptičkoj pukotini hidrolizuju uz pomoć enzima acetil-holin esteraze (AChE) i zatim se holin vraća u presinaptički nervni završetak ili molekuli ACh difunduju izvan regije motorne ploče. U normalnim okolnostima, EPSP uvek prelazi prag okidanja akcionog potencijala mišićnog vlakna. Amplituda EPSP je u zdravom mišiću uvek 4-5 puta iznad praga potrebnog za okidanje akcionog potencijala mišićnog vlakna, a takođe i broj AChR na postsinaptičkoj membrani je mnogostruko veći od potrebnog za propagaciju akcionog potencijala. Ova dva elementa čine faktor sigurnosti NMS. Kod bolesnika sa MG faktor sigurnosti neuromišićne transmisije je snižen na postsinaptičkom nivou. Na početku mišićne kontrakcije, i pored redukovano broja AChR, obzirom da je količina oslobođenog ACh 4-5 puta veća nego što je potrebno, dolazi do izbijanja akcionog potencijala mišićnog vlakna. Međutim, sa produženom ili ponavljanom kontrakcijom mišića količina oslobođenog ACh se normalno redukuje i tada postaje manifestan redukovani broj AChR na postsinaptičkom nivou, što za posledicu ima mišićnu slabost, a elektrofiziološki se registruje kao dekrementni odgovor pri testu repetitivne stimulacije nerva (TRS).



### 1.1.2. Nikotinski acetil-holinski receptor

Nikotinski AChR je kompleksni transmembranski kiseli glikoprotein, koji ima najveći ekstraćelijski, manji transmembranski i najmanji citoplazmatski deo (Slika 2.).



Slika 2. Nikotinski acetil-holinski receptor

(Modifikovano iz: Encyclopaedia Britannica, Inc., 2002.)

Ekstraćelijski deo je primarno sastavljen od N-terminalnih regiona subjedinica AChR i ima negativan naboj. Na ekstraćelijskom regionu svake  $\alpha$  subjedinice u regionu aminokiselina 192-193 nalazi se mesto vezivanja ACh (18). Međutim, najveći broj anti-AChR At se vezuje za region lokalizovan na distalnom spoljnom ekstraćelijskom delu receptora, na  $\alpha$  subjedinici, u regionu aminokiselina 66-76 (19) zbog čega se ovaj region i naziva glavni imunogeni region (engl. *main immunogenic region* – MIR). Intraćelijski deo receptora poseduje mesta za koja se vezuju citoskeletni elementi mišićnog vlakna (20), kao i regulatorni proteini. Receptori su međusobno povezani u grupe pomoću proteina rapsina (21), a svaka grupa receptora je vezana za citoskeletne elemente mišićnog vlakna pomoću distrofinsko-glikoproteinskog kompleksa (22). U toku embriogeneze, a i kasnije, funkcionalnu organizaciju i postsinaptičku agregaciju

AChR ostvaruje protein agrin putem aktivacije enzima mišić specifične tirozin kinaze (MuSK) (23). AChR se sastoji od 5 subjedinica (24) i ima najmanje 2 izoforme. U zreom i uredno inervisanom poprečnoprugastom mišiću nalazi se izoforma sastavljena od 2  $\alpha$  i po jedne  $\beta$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  subjedinice, dok se u fetalnom i denervisanom mišiću nalazi izoforma kod koje je  $\epsilon$  subjedinica zamenjena  $\gamma$  subjedinicom (25). Ovakav fetalni oblik receptora nalazi se i u timusu odraslih osoba (26). Ekstraokularni mišići su jedini mišići u kojima se nalaze obe izoforme receptora, što verovatno objašnjava najčešću zahvaćenost upravo ovih mišića kod obolelih od MG (27). Sve navedene subjedinice AChR su raspoređene kružno formirajući u sredini jonski kanal kroz koji, posle vezivanja ACh za receptor, dolazi do influksa natrijumovih jona u unutrašnjost mišićnog vlakna.

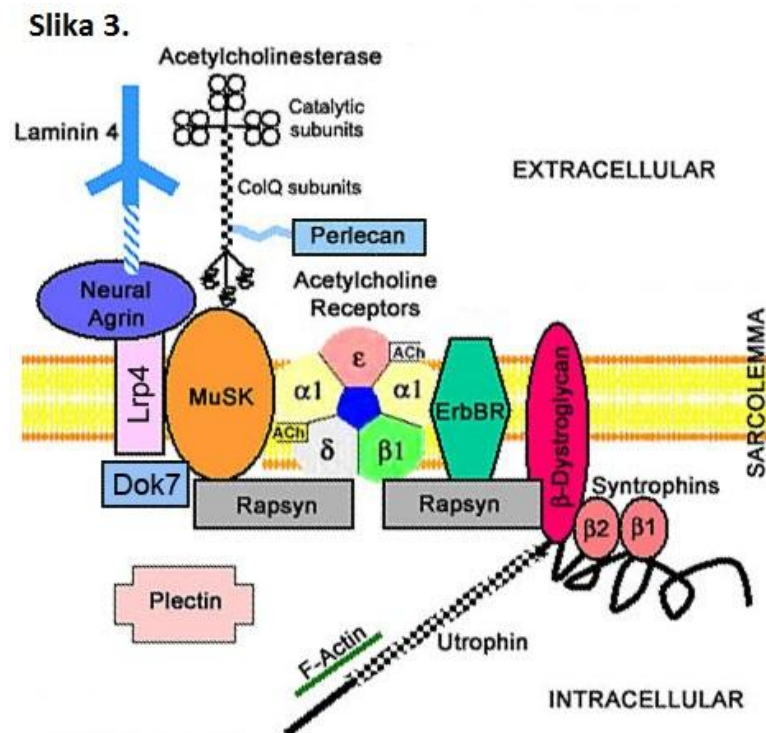
AChR su najgušće lokalizovani u predelu motorne ploče, na vrhovima sekundarnih sinaptičkih nabora, a u znatno manjem broju i na ostalim delovima ćelijske membrane mišića (28). Natrijumovi kanali se nalaze u dubini sekundarnih sinaptičkih nabora.

### **1.1.3. Mišić specifična tirozin kinaza (MuSK)**

MuSK je transmembranski polipeptid od 100 kDa koji je selektivno eksprimiran na skeletnim mišićima i električnom organu *Torpedo californica* (29). Njegovi ekstracelularni regioni sadrže četiri dela slična imunoglobulinima i deo bogat cistinom; njegov intracelularni region je sačinjen od jukstamembranskog dela, kinaznog dela i C-terminalnog repa (30). MuSK je deo receptora za agrin, protein iz nerva koji je esencijalan za formiranje NMS (31). Iako interakcija agrina i MuSK još uvek nije u potpunosti jasna, eksperimentalni podaci pokazuju da agrin aktivira MuSK fosforilacijom tirozina, što za posledicu ima nakupljanje AChR u regiji motorne ploče (32, 33). Aktivacija MuSK zahteva fosforilaciju tirozinske rezidue (Y553) na jukstamembranskom delu (34), dok spoljašnji deo MuSK interaguje sa agrinom. Pokazano je da se imunoglobulini iz seruma AChR negativnih MG bolesnika vezuju za spoljašnji deo MuSK i da smanjuju agrinom indukovano grupisanje AChR u kulturi miotubula (7).

MuSK je zajedno sa proteinima Lrp4 (35, 36) i Tid1 (37), zadužen za razvoj i održanje NMS, a naročito za grupisanje AChR na postsinaptičkoj membrani i fiksiranje AChE za bazalnu laminu sinaptičke pukotine kroz interakciju sa njenim vezujućim proteinom ColQ (33, 38). Iako je mnogo učinjeno na razjašnjavanju molekularnog mehanizma kojim MuSK/Lrp4/Tid1 regulišu formiranje i održanje NMS (39, 40) patogenetska uloga anti-MuSK At i patofiziološki mehanizmi kojim ova antitela mogu uzrokovati mišićnu slabost kod bolesnika

sa MuSK MG još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Odnosi MuSK i ostalih struktura NMS su prikazani na Slici 3.



Slika 3. Odnosi MuSK i ostalih struktura NMS  
(preuzeto sa [www.neuromuscular.wustl.edu](http://www.neuromuscular.wustl.edu))

#### 1.1.4. Imunopatogeneza MG

##### 1.1.4.1. Imunopatogeneza AChR pozitivne MG

Iako je danas autoimuna osnova MG definitivno potvrđena, tačan mehanizam gubitka tolerancije na AChR još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Zna se da je MG B ćelijski posredovana bolest, jer je patogenetska uloga anti-AChR At u indukciji i održavanju simptoma bolesti danas jasno potvrđena, kao i da je ona T ćelijski zavisna bolest, što potvrđuje uloga timusa u njenoj patogenezi. Na značaj timusa u patogenezi MG upravo je ukazalo zapažanje da je timus izmenjen kod čak 80% obolelih od MG (41). Najčešća promena timusa je limfoproliferativna hiperplazija (LFH) koja se sreće kod 50-70% obolelih, a znatno reda tumor timusa - timom, koji je prisutan kod oko 10-15% bolesnika (42-45). Kod preostalih 20% bolesnika timus je normalan ili involuisan tj. atrofičan i zamenjen masnim tkivom (43). Sva dosadašnja istraživanja su pokazala da senzibilizacija na AChR u MG

verovatno nastaje unutar timusa. Timus je organ koji je neophodan u nastajanju funkcionalno zrelih T limfocita. Tokom ontogeneze imunskog sistema veliki broj autoreaktivnih klonova, koji ekspimiraju T ćelijske receptore za sopstvene antigene, biva uništen unutar timusa, a preživeli autoreaktivni klon biva tolerisan van timusa. Pokazano je da epitelne i mioidne ćelije timusa, kao i pojedine subpopulacije timusnih limfocita (46) ekspimiraju AChR (47, 48). Medjutim, u kasnijim eksperimentima je potvrđeno da sama ekspresija receptorskih subjednica nije dovoljna za nastanak MG (47), već da osnov patogeneze MG može ležati u primarnoj alteraciji timusne mikrosredine sa poremećajem diferentovanja T limfocita ili da imunska reaktivnost prema AChR nastaje usled oštećenja supresorskih mehanizama (49). Ekspresija AChR na epitelnim i mioidnim ćelijama timusa koje se nalaze u neposrednoj blizini imunokompetentnih ćelija mogućeg neuništenog autoreaktivnog klona stvara uslove za imunske autoreaktivnosti. Oslobođeni AChR biva preuzet od strane interdigitatnih antigenprezentujućih ćelija i predstavljen CD4+ (engl. *cluster of differentiation positive*) T limfocitima. Autoreaktivni intratimuso diferentovani CD4+ T limfociti prepoznaju epitop AChR i stimulišu B limfocite na produkciju anti-AChR At unutar timusa, sa kasnijom migracijom u periferne limfoidne organe (18). U prilog ovakve hipoteze govori činjenica da se kod većine bolesnika sa AChR pozitivnom MG nalazi timusna hiperplazija. Ona se karakteriše hiperplastičnom medulom sa obiljem germinativnih centara koji su okruženi zonom T limfocita. Ovako izmenjen timus sadrži veliki broj AChR-specifičnih T limfocita i povećan broj B limfocita koji produkuju anti-AChR At (50). Na ulogu timusa u patogenezi MG ukazuje i patohistološki (PH) nalaz timusa obolelih od MG gde se uočavaju B ćelijski limfoidni folikuli u meduli timusa sa razvijenim germinativnim centrima, dok je korteks timusa najčešće neizmenjen ili pokazuje znake delimične atrofije (51). Timusni perivaskularni prostori su prošireni i ispunjeni limfoidnim infiltratima. Često se sreće oštećenje epitelne granice između perivaskularnih prostora i medularnog epitelnog prostora. U meduli timusa se nalazi povećan broj B limfocita, koji se nalaze grupisani u limfoidnim folikulima ili difuzno raspoređeni između medularnih epitelnih ćelija i timocita. Pored njih, u limfoidnim folikulima se nalaze i interdigitatne i dendritske ćelije, mioidne ćelije i CD4+ T limfociti (51). Za razliku od hiperplastičnog timusa, u timomu nije dokazano prisustvo AChR, međutim na njegovim epitelnim ćelijama pokazano je ekspimiranje proteina koji deli zajedničku antigensku determinantu sa citoplazmatskim delom AChR (52). Moguće objašnjenje za udruženu pojavu MG i timoma moglo bi da leži u pretpostavci da antitumorska ili paraneoplastična autoimuna reakcija biva pokrenuta tumorskim antigenima (53).

Istraživanja mehanizama sinaptičke transmisije na NMS je otkrilo određene patogenetske efekte antitela usmerenih prema AChR, a koji leže u osnovi MG (54). Ova antitela su poliklonska i sastoje se od različitih klasa imunoglobulina G (IgG), a predominantno su IgG1 i IgG3 subklase. Dokazano je da se ona mogu vezivati za različita mesta na AChR, ali su najčešće usmerena prema MIR  $\alpha$  subjedinice (55). Na ovoj subjedinici receptora se takođe nalazi i mesto vezivanja ACh, koje ne pripada MIR regionu (56). Vezivanje anti-AChR At za ovo mesto ometa normalno vezivanje ACh i na taj način, tzv. „farmakološkom blokadom“ receptora dovodi do direktnog oštećenja neuromišićne transmisije (57). Pored ovoga anti-AChR At mogu delovati tako što svojim Fab krajem mogu vezati 2 susedna AChR, dovodeći do ubrzane internalizacije i degradacije ovih receptora u lizozomima (58). I konačno, najvažniji put kojim anti-AChR At ostvaruju svoj efekat na neuromišićnom spoju je aktivacija sistema komplementa. Konačan efekat ovakvog delovanja antitela je liza postsinaptičke membrane, destrukcija njenih sekundarnih nabora i smanjenje broja raspoloživih AChR u regionu motorne ploče (59). Obzirom da efikasna neuromišićna transmisija zavisi od brojnih interakcija između ACh i AChR, poremećaj neuromišićne transmisije koji nastaje usled promena postsinaptičke membrane mišića uzrokovanih vezivanjem anti-AChR At za AChR, rezultira u mijasteničnoj slabosti i zamorljivosti. Da bi se izazvao akcioni potencijal koji će dovesti do kontrakcije mišićnih vlakana, na postsinaptičkoj membrani mora biti prisutan dovoljan broj AChR. Međutim, još 1973.g., *Fambrough* i saradnici su kod pacijenata sa MG našli abnormalno smanjenje broja AChR na postsinaptičkoj membrani NMS (1, 2). Usled značajno smanjenog broja AChR, pojedinačni nervni impuls ne može da generiše dovoljnu postsinaptičku depolarizaciju koja je neophodna za postizanje praga neophodnog za otvaranje dovoljnog broja voltažno zavisnih natrijumovih kanala, što je neophodno za generisanje akcionog potencijala mišićnog vlakna (54).

Anti-AChR At se otkrivaju u oko 70-90% obolelih od MG (60) (AChR pozitivna MG), i to kod 80-90% bolesnika sa generalizovanom i oko 50-70% bolesnika sa okularnom formom bolesti (61). Zapaženo je da kod svakog pojedinačnog bolesnika titar antitela prati težinu kliničke slike (62), dok definitivno nema korelacije između titra anti-AChR At i težine kliničke slike kod različitih bolesnika. Objašnjenje za ovu pojavu verovatno leži u heterogenosti ovih antitela.

Pretpostavlja se da su anti-AChR At prisutna i kod oko oko 60% tzv “seronegativnih” MG (SNMG) bolesnika, kod kojih se ova, kao ni anti-MuSK At ne mogu dokazati u serumu obolelih. Objašnjenje za ovakav nalaz leži u činjenici da su kod ovih pacijenata zapravo

prisutna niskoafinitetna anti-AChR At koja se slabo ili nikako ne vezuju za AChR u rastvoru, već se isključivo mogu vezati za AChR eksprimiran na površini ćelije. Ovakva pretpostavka je dokazana kroz eksperiment u kome je nakon grupisanja AChR rapsinom kod prethodno negativnih seruma potvrđeno vezivanje antitela za grupisane AChR (63). Činjenica da se antitela bolesnika sa AChR MG mogu vezati u rastvoru implicira da je afinitet za vezivanje za svaki Fab fragment antitela veoma visok. Nasuprot tome, antitela sa nižim afinitetom mogu lako da se odvoje od AChR u rastvoru, i da daju lažno negativan rezultat analize, dok se u prirodnom modelu ona vezuju za AChR koji su gusto grupisani i fiksirani u mišićnoj plazma membrani. Činjenica da se antitela SNMG pacijenata vezuju za AChR na HEK 293 ćelijama samo kada su one grupisane rapsinom, proteinom koji imobilizuje AChR na NMS i da su ova antitela dominantno IgG1 subklase i sposobna za aktivaciju komplekta podržava zapažanja o sličnostima kliničkih osobina ove dve grupe bolesnika.

#### **1.1.4.2. Imunopatogeneza MuSK pozitivne MG**

Pretpostavlja se da postoje brojni mehanizmi kojima MuSK utiče na grupisanje AChR tokom razvoja postsinaptičke membrane NMS (40, 64). Kontakt završetka urastajućeg motornog nerva sa mišićem dovodi do pojave uske zone motorne ploče na sredini mišića, koju karakteriše grupisanje gusto zbijenih AChR. Tom prilikom, agrin oslobođen iz motoneurona aktivira MuSK i dovodi do redistribucije grupa AChR u regiju sinapse (64). Međutim, direktan fizički kontakt između MuSK i agrina, i pored brojnih pokušaja, nije dosadašnjim istraživanjima potvrđen (40). Tako, još uvek nisu razjašnjeni mehanizmi aktivacije MuSK i posledični događaji, iako je pretpostavljeno da se radi o izvesnoj posttranslacionoj modifikaciji ili agrina ili MuSK (40). Međutim, MuSK je neophodan za adekvatno grupisanje AChR i u odsustvu motorne inervacije (64). Ipak, utvrđivanje tačnog scenarija učešća MuSK u čitavom procesu je mnogo komplikovanije. Na primer, MuSK može biti aktiviran i nekim drugim proteinom osim agrina, što može biti okidač za postsinaptičku organizaciju NMS. Simultano ili alternativno, MuSK može da deluje i kao primarni transportni molekul bez aktivacije. Međutim, pokazano je da grupisanje AChR može biti indukovano i bez aktivacije MuSK, u prisustvu laminina-1 i *N*-acetilgalaktozamin (GalNAc)-specifičnog lektin *Vicia villosa* aglutinina (VVA-B4). Navedene pleotropne uloge MuSK u grupisanju AChR tokom razvoja NMS mogu biti neophodne i za održavanje zrele NMS (65-67). Brojne *in vivo* studije su pokazale da se sinaptički AChR u potpunosti obnove u periodu od 4 dana, iako sinaptička membrana zrelog mišića izgleda makroskopski stabilno (68). Na taj način mehanizmi

uključeni u grupisanje AChR tokom razvoja NMS su neophodni i kasnije, na zreloj NMS, gde se postsinaptički kompleksi, uključujući one sa AChR i MuSK, dinamički smenjuju u cilju održanja mišićne funkcije.

Aktuelni stav je da je MuSK stimulisan “iz unutrašnjosti” mišićne ćelije od strane Dok7 (69), a iz “spoljašne sredine” od strane Lrp4, koji je receptor za agrin i to u prisustvu agrina ili bez njega (35, 36, 70). MuSK tako učestvuje u stabilizaciji i grupisanju AChR preko različitih kaskada intracelularnih kinaza (71). Interesantno je napomenuti da MuSK sadrži receptor za Wnts koji pripada familiji sekretovanih glikoproteina i koji stupa u interakciju sa “*the muscle-expressed Dishevelled*”(Dvl) koji je neophodan za nekanonsku Wnt signalnu kaskadu koja doprinosi grupisanju AChR (71-73). Ovaj signalni put takođe reguliše slanje retrogradnih signala u nervne završetke (72). Danas je prihvaćeno da prvi i drugi imunoglobulinu sličan region MuSK(Ig1/2) učestvuju u signalnom putu agrin–Lrp4 (74), dok njegov cisteinom bogat region (CRD) učestvuje u Wnt signalnom putu (75). Utvrđeno je (76) da anti-MuSK At kod određenog broja bolesnika sa MG prepoznaju ne samo glavni imunogeni region (Ig1/2 regioni) odgovoran za agrinski signalni put (77), već takođe i CRD koji je odgovoran za Wnt signalni put (75). Ostaje da se detaljnije ispita da li prisustvo različitih anti-MuSK At korelira sa aktivnošću ili karakteristikama bolesti.

Nasuprot opšte prihvaćenim i dokazanim mehanizmima kojim anti-AChR At kod obolelih od MG oštećuju neuromišićnu transmisiju, patogenetska uloga anti-MuSK At je još uvek nedovoljno razjašnjena (78). Prvo, u biopsijskom uzorku mišića bicepsa bolesnika sa MuSK MG nije nađen značajan gubitak AChR na NMS (79). Drugo, anti-MuSK At su dominantno IgG4 klase, za koja je poznato da ne aktiviraju komplement (80), a komplementom posredovano oštećenje postsinaptičke membrane se smatra glavnim patogenetskim mehanizmom kod AChR pozitivnih bolesnika sa MG.

Ipak, skorašnje studije su nedvosmisleno pokazale da anti-MuSK At mogu imati patogenetsku ulogu u nastanku MuSK MG. U prilog ovome govore i eksperimenti u kojima je aktivna imunizacija eksperimentalnih životinja sa ekstracelularnim delom MuSK dovela do pojave eksperimentalne autoimmune MG (EAMG) i odgovarajućih promena na NMS (65, 67). Jha i saradnici (65) su pokazali da serum MuSK pozitivnih bolesnika inhibira agrinom indukovano grupisanje AChR čime su postavili osnovu pretpostavci da MG može biti izazvana blokiranjem agrinskog signalnog puta izolovano ili u kombinaciji sa drugim faktorima. Prema ovoj hipotezi, anti-MuSK At bolesnika dovode do oštećenja sinaptičke transmisije blokiranjem funkcija MuSK na postsinaptičkoj membrani, što indukuje nastanak kliničke

slike MG. Ova hipoteza je najšire prihvaćena kao mehanizam oštećenja neuromišićne transmisije kod MuSK MG bolesnika. Smatra se da je jedan od mogućih mehanizama oštećenja funkcije MuSK, do koga dolazi vezivanjem blokirajućih anti-MuSK At, zapravo blokiranje vezivanja ColQ za MuSK, što je pokazano *in vitro* studijama (81). Potvrdu patogenetskog značaja anti-MuSK At na nivou neuromišićnog spoja dali su i eksperimenti u kojima je pasivni transfer anti-MuSK At kod miševa je doveo do smanjenja veličine i gustine ColQ na oko 10% od kontrolnih vrednosti, uz manji efekat na veličinu i gustinu AChR i MuSK receptora (81). Kako nedostatak ColQ ugrožava agrinom posredovano grupisanje AChR kod ColQ<sup>-/-</sup> miševa, sličan mehanizam se može očekivati i kod MuSK MG bolesnika (81). S druge strane, pokazano je da anti-MuSK At ne utiču na agrin–Lrp4–MuSK signalni put (82). Međutim, anti-MuSK At osim što smanjuju koncentraciju MuSK na postsinaptičkoj membrani, dovode i do razgrupisavanja klastera AChR i do retrakcije terminalnog nervnog završetka (83, 84).

Visoka specifičnost anti-MuSK At, korelacija visine njihovog titra sa težinom mišićne slabosti, (85) i eksperimentalni dokaz da ova antitela mogu da uzrokuju smanjenje MuSK zavisnog grupisanja AChR u miotubulima (7, 86) sugerišu njihovu patogenetsku ulogu. Međutim, jasne histološke abnormalnosti koje bi mogle objasniti oštećenu neuromišićnu transmisiju kod MuSK MG bolesnika nisu nađene u bioptiranim uzorcima zahvaćenih mišića. U ovoj grupi pacijenata morfološke studije nisu zabeležile smanjenje gustine AChR, što je jasno pokazano u tkivu AChR pozitivnih bolesnika sa MG (79, 87). Takođe, *Shiraishi* i saradnici (79) kod obolelih od MuSK MG, za razliku od bolesnika sa AChR MG, nisu našli depozite komplementa na NMS. Ipak, donekle iznenađujuće, većina seruma MuSK pozitivnih bolesnika može da dovede do stvaranja depozita C3b *in vitro*, što korelira sa prisustvom izvesne količine IgG1 antitela prema MuSK u njihovim serumima. Moguće je da relativno mala gustina MuSK na NMS i/ili efikasna regulacija komplementa smanjuje sposobnost antitela da aktiviraju komplement, čime bi se objasnili nalazi u mišićima ekstremiteta ovih bolesnika dobijenih biopsijom. Ipak, treba spomenuti da su *Shiraishi* i saradnici (79) testirali bioptirane uzorke mišića ekstremiteta, za koje se zna da su i ređe i blaže zahvaćeni kod pacijenata sa MuSK MG, usled čega se pretpostavlja da se u mimičnim mišićima, koji su najviše klinički zahvaćeni može očekivati da patohistološki nalaz bude drugačiji. Moguće je da objašnjenje ovog fenomena leži u različitoj količini eksprimiranog MuSK na NMS, jer gustina antigena svakako utiče na verovatnoću aktivacije komplementa. Ovo je podržano zapažanjem da u slučajevima izraženog eksprimiranja MuSK na HEK ćelijama, MuSK IgG1 antitela mogu da se vežu u dovoljnoj meri da efikasno aktiviraju komplement.



Iako je još uvek nejasno kako anti-MuSK At dovode do pojave mijasteničnih simptoma, ova antitela su vrlo specifična za bolest i nalaze se samo kod izvesnog broja bolesnika sa MG, usmerena su prema ekstracelularnim epitopima i do sada nisu opisana kod osoba koje nemaju kliničku sliku MG. Osim toga, bebe majki sa MuSK MG ispoljavaju kliničku sliku tranzitorne neonatalne MG sa sličnom distribucijom mišićnih slabosti (88).

Anti-MuSK At se nalaze u serumu 30-70% AChR negativnih bolesnika sa MG (7, 8, 89, 90). Nivo ovih antitela varira od 0.02–10 nM, najčešće manje od 2 nM, za razliku od anti-AChR At koja su obično prisutna u višem titru, koji se kreće od 0.2 do preko 1000 nM. Anti-MuSK At imaju visok afinitet, slično kao anti-AChR At, ali su dominantno IgG4 klase (77), sa relativno malo IgG1. Ona se mogu detektovati i vezivanjem za MuSK-ekspimirajuće ćelijske linije, što je inicijalno opisano vezivanjem za TE671 ćelije od strane *Blaes*-a i saradnika (91) a u današnje vreme je pokazano imunofluorescencem. Dokazano je da titar anti-MuSK At korelira sa težinom MG (92).

Za razliku od bolesnika sa AChR pozitivnom MG, kod kojih je jasno dokazana uloga timusa u etiopatogenezi bolesti, timusne promene su kod bolesnika sa MuSK MG praktično odsutne i smatra se da timus ne igra značajnu ulogu u nastanku ove forme bolesti. Tako su kod MuSK pozitivnih bolesnika i T i B limfociti prisutni u limfoidnim infiltratima, epitelná granica je obično intaktna, a morfologija timusnih perivaskularnih prostora je obično zavisna od uzrasta bolesnika (93).

Obzirom da mioidne ćelije ekspimiraju MuSK (94), mogli bi se očekivati perivaskularni infiltrati kao kod AChR pozitivnih bolesnika, ali se infiltrati nalaze u malom obimu i kod malog broja bolesnika (95). Međutim, ovi infiltrati mogu biti i varijanta normalnog nalaza, jer su ispitivanja velikih serija zdravih osoba pokazale značajnu varijabilnost PH nalaza i u timusima zdravih osoba (96). Ipak, promene u timusu pacijenata sa MuSK MG mogu biti odraz napada na mioidne ćelije IgG1 antitelima koja fiksiraju komplement, što je opisano kod nekih bolesnika (77) ili nekim faktorom sličnim IgM koji je opisan kod izvesnog broja i MuSK pozitivnih i MuSK negativnih pacijenata (97).

#### **1.1.4.3. Antitela na Lrp-4**

Novi doprinos rasvetljavanju etiologije SNMG dat je 2011. god. kada su identifikovana autoantitela usmerena prema Lrp4 receptoru (15). Pokazano je da ova antitela inhibiraju

vezivanje Lrp4 za agrin i da su predominantno IgG1 subklase (98). Serumi pacijenata sa anti-Lrp4 At su inhibirali agrinom indukovanu agregaciju AChR u kulturi miotubula, sugerišući patogenetsku ulogu ovih antitela u disfunkciji NMS. Ovakvi rezultati su jasno izdvojili Lrp4 kao treći mogući autoantigen kod MG. Danas se pretpostavlja da anti-Lrp4 autoantitela svoj patogeni efekat ostvaruju preko agrin-Lrp4-MuSK signalnog puta. Ova antitela su u prvom izveštaju (15) opisana kod malog broja SNMG bolesnika (9 od 300) i nisu bila detektovana ni kod jednog AChR pozitivnog bolesnika niti kod bolesnika sa Lambert Eatonovim mijasteničnim sindromom (LEMS). Sa druge strane, anti-Lrp4 At su u ovoj studiji dokazana i kod 3 MuSK pozitivna bolesnika. Međutim u populaciji MG bolesnika sa teritorije Srbije, anti-Lrp4 At su skoro detektovana kod oko 30% AChR pozitivnih pacijenata, 11% MuSK pozitivnih i 21% pacijenata sa SNMG (neobjavljeni podaci).

#### **1.1.4.4. Anti-agrin At i anti-ColQ At**

Poznato je da se neuralni agrin oslobađa iz motoneurona i da se vezuje za Lrp4 (35, 36, 99), koji zatim aktivira MuSK i pokreće kaskadu događaja koji kulminiraju u grupisanju AChR na postsinaptičkoj membrani. ColQ je deo AChE koja hidrolizuje ACh i time brzo prekida transmisiju impulsa. ColQ je sastavljen od 3 identične subjedinice i on vezuje ovaj kompleks za sinaptičku bazalnu laminu (100). Agrin i ColQ su prisutni u sinaptičkoj pukotini i dostupni su autoantitelima *in vivo*, pa je moguće da antitela usmerena prema ovim antigenima mogu dovesti do oštećenja neuromišićne transmisije. Anti-agrin At su detektovana kod 15% bolesnika sa MG, od kojih je jedan deo bio AChR pozitivan, a drugi kompletno seronegativan (101).

Anti-ColQ At su detektovana kod oko 4% bolesnika sa MG od čega je nekoliko bolesnika imalo i anti-MuSK At (101).

#### **1.1.5. Uloga genetskih faktora**

Danas se smatra da u razvoju MG, kao i drugih autoimunih oboljenja, genetski faktori svakako imaju izvestan udeo. Osnova za ovakvo razmišljanje leži u činjenici da je MG, kao i druge autoimune bolesti, povezana sa određenim HLA (humani leukocitni antigen) haplotipovima. Međutim, ova povezanost nije precizno mapirana, jer mnogi haplotipovi sadrže različite kombinacije HLA gena, a takođe brojni lokusi u okviru HLA kompleksa kodiraju ne-HLA gene koji povećavaju podložnost za oboljevanje od različitih autoimunih bolesti. U prilog ovoj hipotezi govori visoka učestalost udruženog javljanja MG i drugih

autoimunih bolesti, kao i postojanje familijarnih slučajeva MG. Genetska predispozicija se zasniva na nasleđivanju gena koji determinišu antigene MHC (glavni histokompatibilni kompleks) I i II klase,  $\alpha$  subjedinicu AChR, teške i lake lance IgG i T ćelijske receptore (102, 103). Imunogenetska predispozicija MG se objašnjava nalazom značajno veće učestalosti HLA B8 i DR3 antigena kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti ranog početka kod kojih postoji hiperplazija timusa (104, 105). Za razliku od ovoga, kod timomske MG se gotovo nikada ne sreće HLA DR3 antigen (106), a kod bolesnika sa MuSK MG postoji visoka učestalost antigena DQ5 (107). MG kasnog početka pokazuje manje snažnu udruženost sa HLA-DR2 i B7 (108). HLA-DR3 i DR7 izgleda da imaju suprotne efekte na MG fenotip, DR3 se češće sreće kod MG ranog početka (105). Kod obolelih od MG Azijskog porekla utvrđeno je prisustvo različitih HLA u odnosu na belu rasu. Kod Kineskih i Japanskih MG bolesnika je zabeležena visoka učestalost HLA-DR9 antigena (109, 110), a kod pacijenata Kineskog porekla sa očnom formom MG HLA-BW46 antigen (111). Sa druge strane, iako nije nađena jasna genetska predispozicija za timomsku MG, uočeno je da bolesnici sa timomom i određenim genetskim profilom imaju veći rizik za razvoj MG (112).

Takođe, u populaciji bolesnika sa MG zapaženo je i učestalo prisustvo nekoliko ne-HLA gena (*PTPN22*, *FCGR2*, *CHRNA1*), od kojih su neki udruženi i sa drugim autoimunim bolestima (108), te se mogu smatrati parametrom nespecifične susceptibilnosti prema autoimunim bolestima. Izuzetak je *CHRNA1* gen, koji kodira alfa subjedinicu AChR i koji se opisuje samo kod bolesnika sa MG.

Iz ovakvih zapažanja se može izvesti zaključak da postoje najmanje dva faktora koja su neophodna za razvoj MG, različit HLA haplotip koji je karakterističan za različite podvrste MG, kao i transmisija ne-HLA genetskog faktora koji dovodi do povećane podložnosti za razvoj autoimunih oboljenja. Gubitak tolerancije na sopstvene antigene može biti baza za razvoj MG, dok klinički fenotip verovatno zavisi od vrste antigena uključenog u patološki proces (113).

## **1.2. Klinička slika**

### **1.2.1. Epidemiologija**

MG se javlja sa prevalencom od 45-204 obolelih na milion stanovnika, što znači da u svetu danas ima oko million bolesnika sa MG. Godišnja incidenca iznosi od 0.25 do 15 obolelih na milion stanovnika (114). U našoj sredini, na teritoriji Beograda, incidenca MG iznosi 9, a

prevalenca 195 na 1.000.000 stanovnika (115). Među obolelima od MG postoji jasna predominacija osoba ženskog pola (44, 116). Krivulja oboljevanja je bimodalna, sa prvim pikom u uzrastu od 20. do 30. godine života, gde značajno preovladava ženski pol, i drugim pikom u uzrastu od 60. do 80. godine života, gde oba pola oboljevaju podjednako često (44, 116).

Učestalost MuSK MG varira od 0% do preko 40% od ukupnog broja AChR negativnih bolesnika. Rezultati međunarodnog istraživanja anti-MuSK At pokazuju da su ova antitela naročito česta oko geografske širine 40°N, kako u Mediteranskim zemljama, tako i u odgovarajućem delu Sjedinjenih Američkih Država (SAD). Učestalost MuSK MG se smanjuje kako se ide severno od Mediterana ili ekvivalentne geografske širine (oko 40°N) u SAD i Aziji i relativno je niska u Severnoj Evropi i Kanadi, što sugeriše postojanje nekog sredinskog faktora od značaja u indukciji bolesti. O učestalosti MuSK MG u Aziji ima manje podataka, ali se prema dostupnoj literaturi čini da je ova forma MG česta u Japanu, slično kao u Evropi i SAD na geografskoj širini od 40°N, što sugeriše da genetski faktori u indukciji ove forme MG nemaju značajnu ulogu i da verovatno postoji neki sredinski faktor koji utiče na njenu pojavu, iako za ovakvu tvrdnju u ovom trenutku nema sigurnih dokaza (63). Zapaženo je da se MuSK MG nešto ređe sreće u Koreji (117), a veoma retko u unutrašnjosti Kine (118). Postoje podaci o prisustvu MuSK MG i u zemljama južne hemisfere, kao što su Australija, Južna Afrika i Argentina, a u Severnoj Americi je zabeleženo češće oboljevanje Afro-Amerikanaca u odnosu na Amerikance bele rase (8, 119, 120).

### **1.2.2. Kliničke manifestacije bolesti**

MG se klinički karakteriše fluktuirajućom slabošću poprečno-prugastih mišića, koja se pogoršava nakon produžene ili ponavljane mišićne aktivnosti. Bolest obično počinje slabošću ekstraokularnih mišića, koja je inicijalno prisutna kod preko 50% obolelih (44, 116). U daljem toku bolesti ovi mišići su zahvaćeni u čak oko 90% obolelih, što se objašnjava prisustvom i zrele i fetalne forme AChR u zrelim i uredno inervisanim ekstraokularnim mišićima (27). Kod 5-25% bolesnika tokom čitavog toka bolesti simptomi ostaju ograničeni isključivo na ekstraokularne mišiće i ovi bolesnici se označavaju kao oboleli od očne forme bolesti (121, 122). Međutim, kod većine pacijenata (70-80%) bolest se u daljem toku generalizuje (44, 121), sa pojavom slabosti i zamorljivosti i drugih mišićnih grupa, što se najčešće događa unutar prve dve godine trajanja bolesti (44, 123). Danas se, međutim, smatra da je ovaj procenat značajno manji, jer rana i adekvatna terapija bolesnika imunosupresivnim lekovima

smanjuje rizik od generalizacije za čak 75% (124). Kod obolelih od MG često se sreće i slabost bulbarnih mišića, što je deo kliničke slike težih formi bolesti, a kod 15-26% obolelih može biti i njen inicijalni simptom (44, 116, 123). Slabost može zahvatiti i bilo koje druge poprečno-prugaste mišiće u telu, kao npr. različite mišiće ekstremiteta i to češće proksimalne nego distalne, mišiće za disanje, mišiće vrata, slušne mišiće ili volje mišićne sfinktere bešike i creva. Osnovna karakteristika ovih slabosti po kojima se one suštinski razlikuju od drugih vrsta mišićne adinamije je da posle odmora ili primene antiholinesteraznog leka obično nastupa značajno poboljšanje ili potpuni oporavak snage zahvaćenih mišića. Slabost orofaringealnih i respiratornih mišića se sreće u najtežim formama bolesti (mijastenična kriza) i često zahteva respiratornu potporu asistiranom ventilacijom.

### **1.2.2.1. Klinička slika MuSK MG**

Klinička slika MuSK MG se u velikoj meri razlikuje od dobro poznate kliničke prezentacije MG udružene sa antitelima na AChR. MuSK MG se može javiti u bilo kom uzrastu, ali se češće javlja kod mlađih bolesnika. U grupi pacijenata sa MuSK MG postoji izražena predominacija ženskog pola (do 7.5:1) (89). U pogledu kliničkog ispoljavanja bolesti MuSK MG se karakteriše generalno težom kliničkom slikom, sa predominantnom afekcijom okulobulbarnih, mimičnih mišića, mišića vrata i respiratornih mišića (8, 89). Kod ove forme MG tok bolesti je generalno lošiji, a pojava mijastenične krize značajno češća nego kod MG udružene sa anti-AChR antitelima (125). Težina bolesti se posebno razlikuje između bolesnika sa MuSK MG i SNMG, u smislu da SNMG bolesnici imaju značajno blažu kliničku sliku. Ipak, kod sve tri grupe obolelih se mogu naći sve forme bolesti po MGFA klasifikaciji, a nakon lečenja je zabeležen sličan terapijski odgovor, nezavisno od primarne težine simptoma i prisustva različitih antitela (63).

S druge strane, najblaža, čisto očna forma bolesti je izuzetno retka manifestacija MuSK MG i svodi se na pojedinačne prikaze bolesnika (126).

MuSK MG se tipično može javiti u vidu tri različita klinička ispoljavanja (8, 127). Najčešća klinička prezentacija se karakteriše brzo progresivnom bulbarnom slabošću sa disfonijom, disfagijom i otežanim žvakanjem. Ovi bolesnici i dalje tokom bolesti ostaju sa najtežom kliničkom slikom. Očni simptomi (diplopije i ptoza) su kod ove forme MuSK MG iako blagi obično prisutni, dok je zahvaćenost ekstremiteta blaga i nekonzistentna. U 3 različite serije bolesnika, slabost ekstremiteta je bila prisutna u svega 30-40% slučajeva (6, 80, 128). Suprotno ovome, u američkoj studiji, *Oh* i saradnici su zabeležili slabost ekstremiteta

kod čak 80% obolelih (129). Kod ovih pacijenata je opisano i obavezno prisustvo slabosti mimičnih mišića, bulbarne slabosti i slabosti ekstraokularnih mišića (129). Respiratorna slabost je često prisutna i zabeležena je kod oko polovine obolelih (129). Kao jedna od osnovnih karakteristika ove forme MuSK MG ističe se i izražena atrofija mišića jezika i mimičnih mišića (130).

Drugi klinički obrazac MuSK MG karakteriše fokalna, predominantno slabost mišića vrata, ramena i respiratornih mišića sa blagom i po pravilu kasnom pojavom okulobulbarne slabosti. U seriji *Sanders*-a i saradnika (8), ovo je bio najčešći obrazac MuSK pozitivne MG, zabeležen kod 7 od 12 MuSK MG bolesnika. *Kostera-Pruszyki* i saradnici su objavili jednog bolesnika sa slabošću mišića vrata i respiratornih mišića (128), a *Spengos* i saradnici (131) su opisali slučaj pacijenta sa “dropped head” sindromom kao osnovnom kliničkom prezentacijom MuSK MG sa timusnom hiperplazijom. Kod ovakvih pacijenata dijagnoza MG može biti dodatno otežana urednim nalazom na standardnom elektrofiziološkom testiranju, kao što je to npr. bio slučaj kod 3 pacijenta (119, 132) kod kojih je dijagnoza MG postavljena tek na osnovu elektromiografije pojedinačnog mišićnog vlakna (engl. *single fibre EMG* - SFEMG) u cervikalnim paraspinalnim mišićima. Ovakvi slučajevi ističu značaj SFEMG pregleda, ne samo u rutinski ispitivanim, već i u klinički zahvaćenim mišićima.

Treći obrazac kliničke slike je sličan nalazu kod AChR MG.

Značajno je istaći da se i kod žena obolelih od MuSK MG može očekivati pojava neonatane bolesti kod njihovih novorođenčadi. Neonatalna MG je opisana kod 3 novorođenčeta MuSK pozitivnih majki (133-135). Dvoje je imalo klasičnu tranzitornu neonatalnu MG koja je trajala 3 nedelje (133, 135), dok je jedna beba imala produžen oporavak sa rezidualnim simptomima u vidu povremeno otežanog gutanja, intermitentne ptoze i stridora tokom plakanja do uzrasta od 20 meseci (134).

Neobične kliničke prezentacije MuSK MG obuhvataju i paralizaciju glasnih žica koja je bila opisana kod 2 MuSK pozitivna bolesnika (136, 137) i jednog bolesnika sa MG i Morvanovim sindromom koji je imao pozitivna antitela na AChR, MuSK i voltažno zavisne kalijumove kanale (138).

Klinička slika i odgovor na terapiju bolesnika sa SNMG su slični kao kod AChR pozitivnih bolesnika (139).

### **1.2.3. Atrofija mišića kod MuSK MG bolesnika**

Jedna od osnovnih karakteristika AChR MG jeste da su mišićne slabosti i zamorljivost prisutne u mišićima uredne trofike. Atrofija mišića se kod ove forme bolesti sreće u do 10% obolelih, i to najčešće u mišićima lica i jezika, što se može uočiti kliničkim pregledom, a potvrditi pregledom ovih mišića magnetnom rezonancom (MR) (130). Za razliku od ovoga, kod MuSK pozitivne MG atrofija mišića lica i jezika predstavlja relativno čest nalaz i opisuje se kod oko polovine pacijenata (140).

#### **1.2.3.1. Miopatija kod MuSK MG**

Ultrastrukturalne studije biopsiranog materijala bolesnika sa MuSK pozitivnom MG otkrivaju često teške miopatske promene, kao što je gubitak miofibrila, edem mitohondrija i sarkoplazmatske retikularne lipidne vezikule udružene sa uvećanim mitohondrijama sa fragmentiranim kristama. Mitohondrije se nalaze u obliku agregata u subsarkolemalnom i intermiofibrilarnom delu, pripojene normalnim mitohondrijama. Suprotno od toga, mišići AChR pozitivnih bolesnika na biopsiji pokazuju samo blage i nespecifične miopatske promene, ali se često registruju atrofija mišićnih vlakana i malo agregata normalnih mitohondrija (141).

Kod MuSK pozitivnih bolesnika sa MG je zapaženo da su atrofije selektivno prisutne pre svega na očnim i bulbarnim mišićima, kao i mišićima jezika i antefleksorima vrata (130), što je objašnjeno različitim mehanizmima dejstva anti-MuSK antitela (89, 126, 142). U grupi MuSK pozitivnih MG bolesnika atrofije mišića su bile značajno češće i po pravilu ograničene na mišić jezika i lica (130). Između AChR pozitivne i MuSK pozitivne MG je nađena jasna razlika u PH nalazu mišićnog tkiva. Mišićna atrofija kod AChR MG odgovara atrofiji neurogenog porekla, dok su kod MuSK pozitivnih bolesnika blage miopatske lezije prisutne češće i detektabilne su i elektromiografskim (EMG) pregledom. U ovoj grupi bolesnika su češće registrovane histohemijske abnormalnosti mitohondrija (119, 143), kao i COX-negativna vlakna, iako prisustvo ovih vlakana nije značajnije koreliralo sa stepenom mišićne slabosti i zamorljivosti (143).

Uporedna MR studija mišića AChR i MuSK MG pacijenata sa predominantno bulbarnom simptomatologijom i sličnim trajanjem bolesti je pokazala da su sveukupno MuSK MG bolesnici imali izraženiju atrofiju mišića lica i jezika u odnosu na AChR MG bolesnike. Atrofija mišića je zabeležena na jeziku, maseteru, bukcinatoru, m.orbicularis oculi (m.OO) i m.orbicularis oris. Kvantitativne MR studije su u grupi MuSK pozitivnih MG bolesnika

takođe pokazale pojačan intenzitet signala u jeziku u odnosu na mišiće AChR MG bolesnika i zdravih kontrola. Druge MR sekvence su potvrdile da je nalaz pojačanog intenziteta signala u mišićima jezika kod MuSK MG posledica masne degeneracije koja je slična kao kod bolesnika sa primarno mišićnim bolestima, kao što je to npr. slučaj kod miotonične distrofije. U skladu sa ovim je bilo i neurofiziološko ispitivanje MuSK MG bolesnika na m.OO i m.orbicularis oris, koje je obuhvatilo primenu kvantitativnih EMG tehnika, i koje je pokazalo da su ovi nalazi kod MuSK MG bolesnika takođe bili veoma slični bolesnicima sa primarnim mišićnim oboljenjima (140). Ovo je dovelo do hipoteze da je atrofijska mišićna atrofija u grupi MuSK MG obolelih sekundarna, tj. da se javlja zbog miopatskog procesa, verovatno kao rezultat sužavanja mišića. Međutim, kako je većina MuSK pozitivnih MG bolesnika u pomenutoj studiji prethodno lečena kortikosteroidima, pretpostavljeno je da masna degeneracija unutar atrofičnih mišića može biti i posledica hronične terapije kortikosteroidima.

### **1.2.3.2. Patofiziološka osnova atrofije mišića kod MuSK MG bolesnika**

Poznato je da su anti-MuSK At visoko specifična za bolest i da su usmerena prema ekstracelularnim epitopima MuSK. Ova antitela inhibiraju agrinom indukovano MuSK zavisno grupisanje AChR i regulišu sintezu *muscle ring finger* proteina 1 (MURF-1) i *muscle atrophy F-box* proteina ili atrogina-1. Ove mišićno specifične ubikvitin ligaze su ključni regulatori mišićne atrofije i njihova ekspresija je povećana u kulturi miotubula (86, 144). One takođe ispoljavaju nishodnu regulaciju na ekspresiju AChR i/ili drugih neuromišićnih proteina. U skladu sa ovim su i pomenute razlike u PH nalazima mišića kod AChR MG i MuSK MG (143, 145). U grupi pacijenata sa AChR MG je zapaženo značajno povećanje faktora atrofije mišićnih vlakana (145) i to za oba tipa vlakana.

Sa druge strane, s obzirom na nepotpuno razjašnjenu patogenetsku osnovu mišićne atrofije kod bolesnika sa MuSK MG praćen je efekat seruma bolesnika sa anti-MuSK antitelima na mišićne ćelije u kulturi. Ranije je pokazano da serumi MuSK bolesnika smanjuju broj agrin-indukovanih grupa AChR na površini C2C12 mišićnih miotubula (7), bez značajnog uticaja na broj AChR (86), ali nije dokazano da li se ovo dešava ekstracelularnim ili intracelularnim mehanizmima. Jedno od mogućih objašnjenja je da anti-MuSK At, vezivanjem za ekstracelularni deo MuSK, dovode do aktivacije njene intracelularne tirozin kinazne aktivnosti. Serumi MuSK MG bolesnika su ushodnom regulacijom uticali na ekspresiju MURF-1 (144), proteina koji se stvara u periodu kada mišić podleže atrofiji (146). Slične



rezultate su zabeležili i *Boneva* i saradnici (147), koji su u grupi MuSK MG pacijenata našli porast atrogina (gena koji se takođe vezuje za atrofiju mišića) na nivou informacione ribonukleinske kiseline (mRNK), kao i miotoksični efekat MuSK seruma, koji drugim istraživanjima nije potvrđen.

Uticaj kortikosteroidne terapije na nastanak atrofija mišića kod MuSK pozitivnih MG bolesnika je objašnjen povećanom ekspresijom MURF-1, što je zabeleženo u eksperimentima u kojima je posmatran efekat Dexametasona na C2C12 ćelije (144). Šta više, atrofija mišića jezika i lica, kao i stepen visokog signala u mišićima jezika registrovan MR pregledom su korelirala trajanjem terapije kortikosteroidima umerenim i visokim dozama ovih lekova (130).

#### **1.2.4. Sličnost kliničkih karakteristika između MuSK MG i kongenitalnog miasteničnog sindroma sa Dok-7 mutacijama**

Dok-7 je protein koji je relativno skoro otkriven na neuromišićnoj spojnici. Danas se zna da je on član Dok familije citoplazmatskih proteina i da interaguje sa MuSK receptorom (148). Pretpostavlja se da Dok-7 ima 3 dela odgovorna za njegovu funkciju: plekstrin homologni deo, zadužen za vezivanje za membranu, fosfotirozin-vezujući deo, zadužen za Dok-7 indukovanu aktivaciju MuSK i veliki C-terminalni deo koji sadrži višestruke tirozinske rezidue. Na značaj i ulogu Dok-7 proteina su najbolje ukazali eksperimenti sa Dok-7 *knock-out* miševima, kod kojih je pokazano izraženo oštećenje neuromišićne sinaptogeneze, što je bilo veoma slično nalazu zabeleženom kod MuSK-deficijentnih miševa. Na taj način je zaključeno da je Dok-7 neophodan za neuromišićnu sinaptogenezu, upravo kroz svoju interakciju sa MuSK proteinom.

Poznato je da mutacije u Dok-7 proteinu dovode do pojave genetske forme udno-pojasne MG (klasifikovane kao kongenitalni miastenični sindrom) (149). Zapaženo je da neke kliničke karakteristike ovih pacijenata liče na kliničko ispoljavanje težih formi MuSK MG (150). Slično pacijentima sa MuSK MG, u ovoj grupi obolelih se često sreće semiptoza, a proksimalni mišići su obično teže zahvaćeni od distalnih. Slabost mišića ekstremiteta je blaža. Sa druge strane, jedna od osnovnih razlika između stečene MuSK MG i kongenitalnog miasteničnog sindroma sa Dok-7 mutacijom je vreme početka prvih tegoba. Pacijenti sa kongenitalnim miasteničnim sindromom obično imaju otežan hod od samog početka, neposredno po uspostavljanju njegove funkcije, dok se pojava slabosti kod bolesnika sa MG obično javlja u odraslom dobu. Posmatrano patomorfološki, interesantno je napomenuti da je i

kod pacijenata sa Dok-7 mutacijom na nivou NMS registrovano smanjeno grupisanje AChR, kao i smanjena naboranost postsinaptičke membrane (151). Pretpostavlja se da Dok-7 mutacija može delovati na postsinaptičkom nivou i putemoštećenja retrogradnog prenosa signala na presinaptički nervni završetak, što za posledicu ima smanjenje veličine NMS kod ovih bolesnika. Na osnovu svega navedenog, danas se zna da Dok-7 protein, zajedno sa MuSK receptorom ima značajnu ulogu nesamo za sinaptogenezu već i za održanje NMS.

### **1.3. Klasifikacije MG**

Zbog izuzetne kliničke heterogenosti, a u cilju što boljeg grupisanja obolelih, ističući kao najznačajnije različite kliničke, imunogenetske i patohistološke karakteristike obolelih, predložene su različite klasifikacije MG.

Jedna od danas široko prihvaćenih klasifikacija MG je klasifikacija *Gilhus*-a i saradnika koja je prema najznačajnijim kliničkim, patohistološkim i imunološkim karakteristikama podelila MG na 6 različitih grupa(152), i to:

- (1) MG ranog početka: uzrast na početku bolesti ispod 50 godina, timusna hiperplazija;
- (2) MG kasnog početka: uzrast na početku bolesti preko 50 godina, timusna atrofija;
- (3) MG udružena sa timomom;
- (4) MG sa anti-MuSK At;
- (5) Okularna MG: izolovana slabost ekstraokularnih mišića;
- (6) MG sa nedetektabilnim anti-AChR ni anti-MuSK At.

Međutim, u ovom trenutku, najšire je prihvaćena klasifikacija Američkog udruženja za MG, MGFA (engl. *Myasthenia gravis Foundation of America*), koja je zasnovana na čisto kliničkim karakteristikama bolesti i kao takva pogodna i za praćenje učinka različitih terapijskih opcija.

#### **1.3.1. MGFA klasifikacija**

Od 1971. godine, kada su *Osserman* i *Genkins* predložili kliničku klasifikaciju MG (153) ona je dugi niz godina bila opšte prihvaćena i široko korišćena u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Međutim, tokom višegodišnje upotrebe ova klasifikacija MG je pokazala svoje značajne nedostatke, u smislu nedovoljne preciznosti u određivanju kliničke forme i težine simptoma kod svih bolesnika sa MG, usled čega je Američko udruženje za MG osmislilo novu kliničku MGFA klasifikaciju bolesti (154). Ova klasifikacija je omogućila znatno

preciznije određivanje stanja i težine bolesti kod svakog pojedinačnog pacijenta. Prema ovoj podeli, svi bolesnici sa MG se mogu klasifikovati u 5 različitih grupa (Tabela 1.):

- 1) klasa I – označava prisustvo izolovane zahvaćenosti ekstraokularnih mišića;
- 2) klasa II – označava prisustvo blage generalizovane simptomatologije, sa ili bez zahvaćenosti ekstraokularnih mišića;
- 3) klasa III – označava prisustvo umereno izraženih generalizovanih slabosti sa ili bez slabosti ekstraokularnih mišića;
- 4) klasa IV – označava prisustvo veoma izraženih, teških, generalizovanih slabosti mišića sa ili bez slabosti ekstraokularnih mišića;
- 5) klasa V – predstavlja najtežu formu MG, sa prisustvom teških, generalizovanih slabosti koje obavezno zahvataju i vitalne mišićne grupe, orofaringealne i respiratorne mišiće, koji su slabi u takvom stepenu da zahtevaju obaveznu primenu nazogastrične sonde i intubaciju sa ili bez primene aparata za asistiranu ventilaciju.

Klase II, III i IV imaju po 2 subklase: subklasa (a) označava predominantnu zahvaćenost mišića trupa i ekstremiteta uz moguće prisustvo blaže zahvaćenosti orofaringealnih mišića, dok subklasa (b) označava predominantnu zahvaćenost orofaringealnih i/ili respiratornih mišića sa mogućom blažom afekcijom mišića trupa i ekstremiteta.

**Tabela 1. MGFA (*Myasthenia gravis Foundation of America*) klasifikacija težine kliničke slike SAMG**

<i>Forma SAMG</i>	<i>Kliničke manifestacije bolesti</i>
<b>I</b>	Isključivo očna simptomatologija
<b>IIa</b>	Blaga slabost predominantno mišića trupa i/ili ekstremiteta
<b>IIb</b>	Blaga slabost predominantno bulbarne i/ili respiratorne muskulature
<b>IIIa</b>	Umerena slabost predominantno mišića trupa i/ili ekstremiteta
<b>IIIb</b>	Umerena slabost predominantno bulbarne i/ili respiratorne muskulature
<b>IVa</b>	Teška slabost predominantno mišića trupa i/ili ekstremiteta
<b>IVb</b>	Teška slabost predominantno bulbarne i/ili respiratorne muskulature
<b>V</b>	Potreba za intubacijom

#### **1.4. Dijagnoza MG**

Dijagnoza MG se postavlja na osnovu tipične anamneze, odgovarajuće kliničke slike sa pozitivnim testovima zamaranja, pozitivnih farmakoloških i elektrofizioloških testova, karakterističnog radiografskog nalaza i prisustva anti-AChR, anti-MuSK i drugih antitela u serumu obolelih.

### **1.4.1. Anamneza**

Tipična anamneza bolesnika sa MG obuhvata, pre svega, podatak o prisustvu prekomerne zamorljivosti i slabosti mišića koja je po pravilu fluktuirajućeg karaktera, najblažeg stepena u jutarnjim časovima i nakon odmora, a najviše izražena u večernjim satima i nakon čak i minimalnog fizičkog napora. Često se u anamnezi dobija podatak da je početku bolesti prethodio neki provokativni događaj, npr. infekcija, stres, operacija, trudnoća ili porođaj.

### **1.4.2. Klinička slika**

Klinička slika bolesnika sa MG je često sasvim tipična i lako prepoznatljiva. U neurološkom nalazu dominiraju znaci slabosti i zamorljivosti mišića inervisanih kranijalnim nervima i mišića ekstremiteta i trupa. Najčešće su prisutni ptoza i diplopije, slabost mišića lica sa nepotpunim emotivnim izrazom i nemogućim naduvavanjem obraza, smetnje u govoru, gutanju i žvakanju, slabost mišića vrata sa padanjem glave, slabost mišića ruku i nogu, sa otežanim obavljanjem uobičajenih dnevnih aktivnosti (umivanje, brijanje, češljanje, hod uz stepenice, ustajanje sa stolice, itd.), smetnje u disanju i dr. U ovakvim slučajevima dijagnoza bolesti je laka i dodatnim testovima se ona samo potvrđuje. Međutim, ne retko, klinička slika može biti atipična, kao npr. u slučajevima kada postoji slabost samo jednog izolovanog mišića, tzv. „fokalna forma“ bolesti, kada postoje znaci vegetativne disautonomije, atrofija određenih mišićnih grupa ili akutni razvoj respiratorne insuficijencije u prethodno potpuno zdrave osobe. Kod ovakvih pacijenata jedino veliko znanje i kliničko iskustvo mogu da usmere dijagnostičko razmišljanje u pravcu dijagnoze MG.

### **1.4.3. Farmakološki testovi**

Kako je poznato, kod bolesnika sa MG broj AChR na postsinaptičkoj membrani mišića je značajno redukovan, što za rezultat ima smanjenu interakciju između ACh i ovih receptora. Nakon oslobađanja iz presinaptičkog nervnog završetka ACh se vezuje za AChR i dalje metaboliše uz pomoć enzima AChE. Farmakološka inhibicija ovog enzima povećava koncentraciju ACh na NMS, pojačavajući interakciju između ACh i AChR, zbog čega se i u dijagnostičke, a kasnije i u terapijske svrhe, koriste inhibitori AChE. Među njima se u dijagnostici koriste pre svega kratkodelujući inhibitori AChE, neostigmin-bromid (Prostigmin) i edrophonium-hlorid (Tensilon), koji poboljšavaju mišićnu snagu kod većine obolelih od

MG, ali i kod bolesnika sa drugim neuromišićnim bolestima, kao što su LEMS, bolest motornog neurona, pa čak i različite miopatije, što smanjuje specifičnost ovih testova.

Sa druge strane, ovi testovi mogu biti negativni čak i kod bolesnika sa MG, češće kod MuSK MG bolesnika, a znatno ređe i kod AChR pozitivnih i SNMG bolesnika. U grupi MuSK pozitivnih bolesnika ovi testovi su pozitivni kod 50-70% obolelih (6, 155), a zapaženo je da kod njih primena antiholinesteraznih lekova može dovesti čak i do paradoksalnog odgovora sa pogoršanjem simptoma mijastenije, uz pojavu nikotinskih i muskarinskih neželjenih efekata (fascikulacije, grčevi u stomaku ili dijareja, hipersalivacija...) (8, 87, 126). U jednoj seriji bolesnika, samo 30% MuSK pozitivnih bolesnika je imalo pozitivan odgovor na piridostigmin i bilo je u dužem vremenskom periodu na ovoj terapiji, što je niži procenat u odnosu na AChR pozitivne ili SNMG bolesnike (90). Preko 70% MuSK pozitivnih bolesnika nije imalo odgovor na antiholinesteraznu terapiju, što je značajno veći procenat u odnosu na ostale populacije bolesnika sa MG (155). Slična zapažanja su evidentirana i pri elektrofiziološkom ispitivanju tokom farmakološkog testiranja MuSK pozitivnih pacijenata. Nakon davanja umerenih doza piridostigmina u ovoj grupi obolelih su registrovana repetitivna pražnjenja pri niskofrekventnoj stimulaciji nerva, koja su često bila i indikator loše tolerancije leka (156).

#### **1.4.4. Elektrofiziološki testovi**

Suština primene elektrofizioloških testova u dijagnostici MG leži u potrebi elektrofiziološke potvrde i kvantifikacije oštećenja neuromišićne transmisije. Elektrofiziološko testiranje se započinje TRS, dok je u slučaju negativnog nalaza, kod bolesnika kod kojih postoji izražena klinička sumnja na MG ispitivanje potrebno dopuniti i SFEMG pregledom.

##### **1.4.4.1. Test repetitivne stimulacije nerva**

TRS se obavlja niskofrekventnom, supramaksimalnom stimulacijom nerva, obično frekvencijom od 3 Hz. Tokom ove stimulacije, usled ponavljanih nervnih impulsa dolazi do trošenja lokalno raspoloživog ACh koji se oslobađa iz presinaptičkog nervnog završetka, što rezultira smanjenjem EPSP. Kod zdravih osoba svi EPSP dostižu prag generisanja akcionog potencijala i nema promene u amplitudi zbirnog akcionog potencijala mišića (CMAP). Za razliku od ovoga, kod bolesnika sa MG, broj AChR je smanjen, pa tokom repetitivne stimulacije nerva svaki EPSP ne dostiže prag za generisanje akcionog potencijala, što rezultira u padu amplitude CMAP. Obično se maksimalni dekrement registruje na IV ili V potencijalu, a zatim sledi postepen oporavak. Dekrement od preko 10% se smatra patološkim. Pacijenti sa

MG retko imaju patološki dekrement u klinički nezahvaćenom mišiću, pa se savetuje testiranje klinički slabih mišića. Rutinsko testiranje se vrši obično na tri standardno prihvaćena sistema i ovako urađen pregled daje pozitivan nalaz u oko polovine bolesnika sa očnom i oko 2/3 bolesnika sa generalizovanom MG (8, 157).

Dosadašnje studije su pokazale da TRS ima relativno malu korist kod MuSK MG bolesnika (6, 8). Na primer, u jednoj studiji je TRS mišića ekstremiteta bio patološki kod 57% MuSK pozitivnih bolesnika u odnosu na 78% SNMG bolesnika (6). Ipak, s obzirom na dobro poznatu činjenicu da su kod MuSK MG mimični mišići veoma često zahvaćeni, kada se pregled radi i na ovim mišićima, procenat bolesnika sa patološkim dekrementom se značajno povećava (119, 120). Procenat patološkog dekrementa na mimičnim mišićima je značajno veći kod bolesnika sa MuSK MG u odnosu na AChR MG i SNMG bolesnike (120). Zbog navedenih činjenica danas se smatra da je uključivanje mimičnih mišića u protokol TRS veoma važno upravo zbog mogućnosti regrutovanja obolelih od MG, koji bi potencijalno mogli biti MuSK pozitivni. Slično iskustvo je zabeleženo i u 8 univerzitetskih neuromišićnih klinika koje u populaciji MuSK MG bolesnika potvrđuju veću verovatnoću nalaženja dekrementa u mimičnim mišićima (133).

#### **1.4.4.2. Elektromiografija pojedinačnog mišićnog vlakna (SFEMG)**

U odnosu na TRS, SFEMG predstavlja osetljiviji, ali istovremeno i tehnički zahtevniji i dugotrajniji test za detekciju poremećaja neuromišićne transmisije. SFEMG se izvodi tako što se posebnom iglenom elektrodom male površine registracije beleži aktivnost pojedinačnih mišićnih vlakana. Ovim pregledom se utvrđuje vrednost *jitter*-a, koji predstavlja varijabilnost interpotencijalnog intervala između 2 ili više mišićnih vlakana iste motorne jedinice, a koja je povišena kod obolelih od MG. Kod generalizovanih formi MG ovaj test je pozitivan kod 87% obolelih u m.EDC, a testiranjem i m.OO senzitivnost testa se povećava na 99%. Kod bolesnika sa okularnom formom bolesti povišena vrednost *jitter*-a se sreće kod 97% bolesnika, i to najčešće u mišićima lica, ali je kod 60% obolelih on povišen i u m.EDC (8, 157). Međutim, iako ovaj test ima visoku senzitivnost (preko 95%), on nije dovoljno specifičan, već se patološki nalaz može zabeležiti i kod bolesnika sa različitim vrstama neuropatija ili mišićnih oboljenja (158-160). Stoga je značajno da se rezultati oba primenjena elektrofiziološka testa uvek tumače u kontekstu celokupne kliničke simptomatologije (158).

Ono što je posebno interesantno je da su kod pacijenata sa MG i prisutnim različitim antitelima (anti-AChR ili anti-MuSK antitelima) uočene izvesne razlike u učestalosti

pozitivnog nalaza na SFEMG pregledu. Naime, dosadašnje studije su pokazale da je oštećenje neuromišićne transmisije u mišićima ekstremiteta relativno retko kod bolesnika sa MuSK pozitivnom MG (119, 125), dok je kod obolelih sa AChR MG ono prisutno kod značajno većeg procenta bolesnika, usled čega je nalaz SFEMG na m.EDC patološki kod najmanje 80% obolelih. U jednoj studiji je, ipak, nađen patološki *jitter* u m. EDC sa sličnom učestalošću kod MuSK MG bolesnika i ostalih populacija MG pacijenata. U ovoj studiji je kod svih tipova MG učestalost patološkog SFEMG nalaza prelazila 80% (120). S druge strane, u grupi MuSK MG bolesnika je zabeležena veoma često patološka vrednost *jitter*-a na mimičnim mišićima i ekstenzorima vrata, čak i kod bolesnika kod kojih je *jitter* u m. EDC bio u potpunosti uredan (8, 138, 161).Upravo zbog ovakvog zapažanja danas je široko prihvaćen stav da se kod pacijenata kod kojih postoji sumnja na MuSK MG, SFEMG radi na mišićima lica i drugim klinički zahvaćenim mišićima.

Takođe je veoma interesantno zapažanje izvesnih autora da se kod pacijenata sa MuSK MG na uobičajenom EMG pregledu često mogu registrovati miopatski potencijali kratkog trajanja i male amplitude (8, 132). Ovakav nalaz su pokušali da objasne *Farrugia* i saradnici koristeći kvantitativni EMG pregled. Oni su zaključili da je atrofija mimičnih mišića viđena kod MuSK MG bolesnika zapravo miopatskog porekla i da nastaje kao rezultat sužavanja mišićnih vlakana ili gubitka mišićnih vlakana iz motornih jedinica (140).

#### **1.4.5. Detekcija autoantitela**

Prisustvo autoantitela kod obolelih od MG je od velikog značaja za donošenje odluke o optimalnoj terapiji za svakog pojedinačnog bolesnika. Stoga se u rutinskoj dijagnostici ovih bolesnika određuje titar anti-AChR i anti-MuSK At i na osnovu toga određuje dalji postupak dijagnostike i lečenja.

##### **1.4.5.1. Određivanje anti-AChR antitela u serumu**

Anti-AChR At su visoko specifična za MG i prisutna su u serumu oko 85% obolelih, usled čega je njihovo određivanje deo rutinske obrade svakog bolesnika kod koga postoji sumnja na ovo oboljenje. Međutim, potrebno je istaći da pozitivan nalaz ne znači uvek i sigurnu dijagnozu MG, jer su lažno pozitivni rezultati ove analize, iako izuzetno retko, uočeni i kod bolesnika sa timomom bez MG, kod bolesnika sa LEMS (61), sitnoćelijskim karcinomom bronha (162), reumatoidnim artritisom lečenih D-penicilaminom, pacijenata sa primarnom

bilijarnom cirozom (163), kao i kod 1-3% zdravih osoba starijih od 70 god. ili bliskih rođaka obolelih od MG.

U rutinskoj praksi se određuje ukupan titar antitela koja se vezuju za AChR, dok se u slučajevima od posebnog interesa i u eksperimentalne svrhe mogu odrediti posebne podvrste ovih antitela.

#### **1.4.5.1.1. Antitela koja se vezuju za AChR**

Detekcija ovih antitela u serumu predstavlja test izbora za potvrdu dijagnoze MG. Ova antitela se određuju radioimunoesej (RIA) metodom, tako što se precipitiraju serumska IgG i IgM antitela vezana za kompleks AChR i  $^{125}\text{I}$ - obeleženog alfa-bungarotoksina. U daljem postupku se određuje emisija  $\gamma$  zraka iz precipitata, jer ona odgovara količini AChR vezanog za serumske imunoglobuline (164). Test se smatra pozitivnim ukoliko je koncentracija antitela veća od 0.2 nM (61).

U želji da se ova analiza pojednostavi, razvijen je i *enzyme linked immunoassay* (ELISA) test za detekciju anti-AChR At (165). Iako je jednostavniji, ELISA test se pokazao podjednako validnim kao RIA metod. Naime, pokazano je da se, ukoliko se test ploče prvo oblože avidinom, zatim biotiniziranim monoklonskim anti-AChR At, pa tek onda ekstraktom humanog mišića koji sadrži receptor, dobija se puna korelacija između rezultata dobijenih RIA metodom i ELISA testom.

#### **1.4.5.2. Određivanje anti-MuSK antitela u serumu**

S obzirom da je u poslednjih 10 godina pokazano da se u serumu 10-40% bolesnika sa MG kod kojih nisu mogla biti detektovana anti-AChR antitela nalaze antitela na MuSK receptor, danas je u svakodnevnom kliničkom radu praksa da se kod svih obolelih od MG kod kojih nije registrovano prisustvo anti-AChR At, rutinski određuju anti-MuSK At. Detekcija ovih antitela u serumu obolelih je značajna zbog različite kliničke prezentacije i različitog pristupa u terapiji ovih bolesnika u odnosu na AChR pozitivne bolesnike. Prisustvo IgG anti-MuSK At se utvrđuje imunoprecipitacijom nativnog MuSK receptora ekstrahovanog iz TE671 plazma membrana (166). Drugi mogući način analize prisustva anti-MuSK At je imunoprecipitacija rekombinovanih  $^{125}\text{I}$ -MuSK ekstracelularnih domena (77).



## 1.5. Terapija MG

Osnovni cilj lečenja obolelih od MG je postizanje pune i trajne remisije bolesti. Potrebno je istaći da ne postoji jedinstven terapijski protokol za sve bolesnike, što znači da je terapiju potrebno prilagoditi potrebama svakog pojedinačnog pacijenta. Postoje dva osnovna terapijska usmerenja, simptomatsko i kauzalno lečenje. Osnov simptomatske terapije čine inhibitori AChE koji mogu biti i jedina terapija kod sasvim blagih oblika bolesti. Ovom terapijom se popravljaju neuromišićna transmisija i ublažava slabost i zamorljivost mišića. Kod većine bolesnika je, međutim, pored simptomatskog lečenja potrebno uključiti i imunomodulatorne lekove kojima se deluje na bazični patogenetski poremećaj i time utiče ne samo na simptome, već i na tok bolesti. Osnov ove terapije čine kortikosteroidni lekovi, a pored njih tu se ubrajaju i imunosupresivi kao što su azatioprin, ciklosporin A, mikofenolat mofetil, takrolimus, rituksimab i drugi lekovi. Osim ovoga, u lečenju MG se primenjuju i tzv. „privremeni terapijski postupci“, kao što su terapijske izmene plazme (TIP) i intravenski imunoglobulini (IVIg). U odnosu na osnovni princip lečenja obolelih od MG, a to je pomenuta individualizacija terapije, kod bolesnika mlađih od 50 godina, sa generalizovanom formom MG i prisutnim anti-AChR antitelima lečenje se počinje kombinacijom antiholinesterazne i kortikosteroidne terapije, a nakon odgovarajuće stabilizacije stanja sprovodi se i timektomija kojom se postignuti učinak poboljšava. Za razliku od ovoga, kod pacijenata sa nastankom simptoma MG posle 50. godine života, ova operacija se sprovodi samo kod bolesnika sa timomom. U ovoj grupi obolelih, lečenje se najčešće započinje kombinacijom antiholinesteraznih lekova, kortikosteroida i azatioprina, s obzirom da je dodatni imunosupresivni lek neophodan, kako zbog poboljšanja učinka kortikosteroidne terapije, tako i zbog omogućavanja brže i bezbednije redukcije doze kortikosteroida. Ovaj efekat je posebno značajan zbog dobro poznatih neželjenih efekata kortikosteroidne terapije (167). Neželjeni efekti kortikosteroidnih lekova se mogu umanjiti i korišćenjem osnovnih principa njihove primene, a to su postepeno uvođenje ovih lekova do njihove pune efikasne doze, davanje lekova po principu visokih pojedinačnih doza svakog drugog dana (HSDAD – engl. *high single dose alternate day*) i veoma postepena redukcija do minimalne efikasne doze održavanja, uz neophodnu suportivnu terapiju. Kortikosteroidna terapija se započinje malom dozom leka, koja se postepeno povećava do doze od 1 mg/kg svakog, a po postizanju željenog efekta svakog drugog dana. U slučaju potrebe za uvođenjem azatioprina, terapija se ordinira u dozi do 2.5 mg/kg dnevno. Pun terapijski efekat ovog leka se ostvaruje u periodu od 8 do 12 meseci, kada se savetuje postepeno smanjenje doze kortikosteroida do najniže doze

održavanja kojom se bolest dobro kontroliše. U slučaju razvoja netolerancije azatioprina, a potrebe da se pored kortikosteroidne uvede i dodatna imunosupresivna terapija, bolesniku se mogu dati i ciklosporin A, mikofenolat mofetil, takrolimus i drugi imunosupresivni lekovi, a u periodima izraženog pogoršanja sprovode se TIP ili terapija IVIg.

S druge strane, terapijski pristup bolesnicima sa MuSK pozitivnom MG je značajno drugačiji od gore navedenog terapijskog pristupa AChR pozitivnim bolesnicima. Naime, kod velikog broja MuSK MG bolesnika opisan je generalno nezadovoljavajući odgovor na inhibitore AChE. Kliničko poboljšanje nakon injekcije edrofoniuma je značajno ređe nego kod tipične MG (155), a može da se pojavi čak i pogoršanje slabosti (6, 155). Ova reakcija na edrofonium je u principu udružena sa lošim odgovorom na oralni piridostigmin, što je primećeno kod većine bolesnika (8, 89, 90, 155).

Kod izvesnog broja bolesnika sa anti-MuSK At postoji povećana osetljivost na ACh, što se može videti i na EMG pregledu kao ekstra pražnjenja posle CMAP na niskofrekventnom TRS (156). Biološka osnova za ovu pojavu još uvek nije utvrđena, mada se pretpostavlja da je moguće objašnjenje u novootkrivenoj funkciji MuSK u vezivanju AChE za sinaptičku pukotinu (168).

S druge strane, u kliničkoj praksi je pokazano da kod manjeg procenta MuSK pozitivnih MG pacijenata ipak postoji izvestan pozitivan odgovor na antiholinesteraznu terapiju, što je posebno zapaženo bar kod bolesnika sa pozitivnim odgovorom na edrofonium, iako se i ovoj grupi obolelih savetuje uvođenje malih doza piridostigmina. Ipak, kod svih pacijenata sa MuSK MG, a posebno onih sa bulbarnom slabošću i/ili pretećom respiratornom krizomantiholinesteraznu terapiju je neophodno uvoditi vrlo oprezno, zbog moguće hipersenzitivne reakcije sa pogoršanjem često već vrlo teških simptoma bolesti. Upravo zbog pomenute težine bolesti i lošeg odgovora na inhibitore AChE, većina MuSK pozitivnih bolesnika zahteva imunosupresivnu terapiju i to u procentu većem od 90% (8, 89, 169).

Međutim, potrebno je istaći da, iako kod MG bolesnika sa anti-MuSK antitelima imunosupresivna terapija ostvaruje nedvosmisleno pozitivan učinak, ovi pacijenti ipak na nju pokazuju lošiji odgovor nego AChR pozitivni bolesnici (6, 170). Stoga se kod pojedinih MuSK MG bolesnika moraju primeniti i drugi imunomodulatorni lekovi, kao što su mikofenolat mofetil i rituksimab, koji su se pokazali kao vrlo efikasni u terapiji ove grupe pacijenata (8, 171). Takođe, izvesni autori su opisali i dobar odgovor na visoke doze ciklofosfamida (172, 173).

Po do sada objavljenim kliničkim observacijama, MuSK MG ima dobar odgovor na TIP i IVIg, što predstavlja neprocenjive terapijske mere kod bolesnika sa akutnim, životono

ugrožavajućim simptomima (6, 8, 90). Kliničke studije su pokazale da nema značajnih razlika između ova dva načina lečenja u pogledu stepena i dužine trajanja kliničkog efekta (174), iako ima centara koji smatraju da je efekat IVIg u grupi obolelih od MuSK MG nešto skromniji u poređenju sa efektom ovih lekova kod AChR pozitivnih pacijenata (133, 175).

Dakle, MG sa anti-MuSK At je često teška bolest koja zahteva neodložnu i agresivnu terapiju. U ovoj grupi obolelih su inhibitori AChE često samo delimično efikasni, međutim, na sreću, većina bolesnika ima dobar odgovor na kortikosteroide, a u kombinaciji sa imunosupresivnom terapijom se kod najvećeg procenta bolesnika postiže dobra kontrola bolesti. Težina simptoma i razvoj konstantne slabosti i mišićnih atrofija kod određenog broja bolesnika može biti uzrok nižeg stepena remisije u odnosu na AChR pozitivne bolesnike.

### **1.5.1. Timektomija**

Timektomija je već dugi niz godina opšte prihvaćena u savremenom lečenju MG, a posebno kod pacijenata sa timomom i onih sa ranim početkom, generalizovanom formom bolesti i prisutnim anti-AChR At. Prvi put je kod bolesnice sa MG uvećan timus odstranjen još 1911.g. (176), dok je povoljan efekat ove operacije na tok MG prvi put istaknut 30-ih i 40-ih godina prošlog veka (177, 178). Empirijski je registrovano da ova operacija dovodi do poboljšanja kod čak 85% obolelih i da značajno povećava verovatnoću nastupanja remisije. Na osnovu ovakvog zapažanja, timektomija je postala standardna terapijska procedura u lečenju obolelih od MG (179), iako do danas još uvek nije u potpunosti rasvetljeno kojim sve mehanizmima ona dovodi do kliničkog poboljšanja. Smatra se da je moguće objašnjenje odstranjenje primarnog neoantigena, AChR mioidnih timusnih ćelija, odstranjenje primarnog mesta produkcije anti-AChR At, ili odstranjenje senzibilisanih, AChR specifičnih T limfocita i senzibilisanih T helper ćelija neophodnih za produkciju anti-AChR At (180). Opšte prihvaćen je stav da se timektomija sprovodi kod svih bolesnika sa timomom, kao i kod mladih pacijenata sa generalizovanom simptomatologijom i prisutnim anti-AChR At. Za razliku od ovoga, nije utvrđen konsenzus oko efikasnosti timektomije kod AChR negativnih bolesnika. Ima autora koji smatraju da timektomiju treba sprovoditi samo kod AChR pozitivnih bolesnika (181), dok drugi autori ističu podjednaku efikasnost timektomije kod pacijenata sa AChR antitelima i kod pacijenata bez anti-AChR i anti-MuSK antitela, tzv. SNMG bolesnika (182).

Skorija istraživanja potvrđuju potrebu sprovođenja ove intervencije u obe grupe MG bolesnika kod koji postoji generalizovana klinička forma MG. Naime, za pacijente bez

dokazanih anti-AChR At standardnim radioimunoesejom i bez MuSK At se smatra da u preko 60% zapravo imaju anti-AChR At niskog afiniteta koja se standardnim metodama određivanja anti-AChR At ne mogu detektovati (63), te da ovi bolesnici zapravo pripadaju grupi AChR pozitivnih pacijenata gde timektomija definitivno ima svoje terapijsko mesto. U prilog ovoj pretpostavci govori i činjenica da su timusne promene kod ovih bolesnika veoma slične promenama kod AChR pozitivnih pacijenata. Dakle, timektomija je jedino diskutabilna kod bolesnika sa anti-MuSK antitelima, jer većina istraživanja ne nalazi dokaze koji govore u prilog opravdanosti ove terapijske intervencije (6). Ipak, ima radova koji pokazuju da je timektomija korisna čak i u ovoj grupi bolesnika (89). Međutim, potrebno je naglasiti da su sva zapažanja o efektu timektomije ili njegovom odsustvu u grupi obolelih sa MuSK MG donošena na osnovu analize malih serija bolesnika, i da su bila retrospektivnog tipa. Pored ovoga ni potencijalni udruženi faktori kao što su efekat imunosupresivne terapije i različita težina i trajanje bolesti nisu mogli biti isključeni. Sa ovim ograničenjima, ove studije nisu pokazale bolji ishod bolesti kod timektomisanih u odnosu na netimektomisane MuSK pozitivne bolesnike, kako u pogledu stepena remisije, tako i u pogledu potrebe za imunosupresivnom terapijom (6, 8, 89, 90, 117, 169). Šta više, analiza timusa je kod MuSK MG bolesnika pokazala da je on kod najvećeg broja obolelih bio normalan za uzrast. Hiperplastične promene su u literaturi objavljenoj na engleskom jeziku nađene u samo četiri od 60 timektomisanih bolesnika (6, 8, 89, 90, 117, 169, 174, 183-185). U prilog stavu da timus nema značajnije mesto u patogenezi MuSK MG govorile su i dve studije koje su se bavile poređenjem morfologije timusa kod MuSK pozitivnih bolesnika u odnosu na AChR pozitivne bolesnike (93) i zdrave kontrole (95). Zaključci obe pomenute studije su bili da kod MuSK pozitivnih bolesnika nema LFH, tj. da nedostaju prošireni perivaskularni prostori sa limfoidnim infiltratima i germinativnim centrima, što je jasno ukazivalo da u ovoj formi MG timus ne igra patogenetsku ulogu. U saglasnosti sa ovom hipotezom, timektomija nije bila praćena značajnom redukcijom koncentracije serumskih anti-MuSK At (92). Međutim, dok ovi podaci jasno govore protiv timektomije, dodatnu zabunu oko mesta timektomije u lečenju MuSK obolelih je uneo rad *Saka-e* i saradnika (186) koji su kod bolesnika sa anti-MuSK At opisali timom. Prikazani pacijent je imao mali timomski nodus (dijametra <1 cm) koji je nađen PH pregledom i verovatno ne bi bio detektovan radiološkim pregledom. Udruženost sa timomom teško da se može proglasiti slučajnom, i iako retka dodaje još kontroverzi u vezi indikacija za timektomiju kod ovih bolesnika.

Danas je prihvaćen stav da timektomiju ne treba sprovoditi kod bolesnika sa očnom formom bolesti (179), iako ima autora koji je preporučuju čak i u ovim slučajevima, ističući da rano

urađena operacija značajno redukuje stopu kasnije generalizacije bolesti. Ipak, svi autori su saglasni da su najbolji efekti timektomije zabeleženi kod mladih bolesnika sa kratkim trajanjem bolesti, hiperplastičnim timusom i visokim titrom anti-AChR At.

### ***1.6. Prognoza bolesti***

MG je do skoro bila teško onesposobljavajuća i fatalna bolest. Stopa mortaliteta kod nelečene MG iznosila je 25-30%, ali uz danas dostupnu, savremenu terapiju ona ne prelazi 4% (187). Kod bolesnika sa generalizovanom formom bolesti, najteža klinička slika nastaje obično u prve 3 godine trajanja bolesti. Značajno pogoršanje tegoba je posle ovog perioda relativno retko, tako da se kod bolesnika koji prežive trogodišnji period, obično zapaža blago ili umereno poboljšanje bolesti sa kasnijim održavanjem stabilnog stanja. Faktori rizika za lošiju prognozu bolesti su stariji uzrast, brza progresija izraženih slabosti i prisustvo timoma.

Kada su poređene kliničke karakteristike MuSK pozitivnih i ACR pozitivnih MG pacijenata zapaženo je da u grupi MuSK pozitivnih bolesnika postoji generalno teže kliničko ispoljavanje, sa predominantnim zahvatanjem okulobulbarne muskulature, antefleksora vrata i respiratornih mišića. Međutim, praćenjem bolesnika sa MuSK MG tokom dužeg vremenskog perioda, dobri terapijski rezultati, koji su obuhvatali stanja od blagog poboljšanja do remisije bolesti, zabeleženi su kod 64–100% bolesnika, što je bilo slično rezultatima obolelih od AChR pozitivne MG (6, 8, 89, 90, 117, 130, 169). Ipak, kod pacijenata sa MuSK MG je, u poređenju sa AChR pozitivnim bolesnicima, zabeležen značajno niži stepen remisije. U ovoj grupi obolelih je, i pored jasnog pozitivnog učinka imunosupresivne terapije, čest nalaz teške slabosti mimičnih mišića i bulbarne muskulature, sa nazalnim govorom i atrofijom mišića lica i jezika (6, 89, 170). U saglasnosti sa ovim je i zapažanje brojnih autora da veliki broj pacijenata sa MuSK MG tokom svoje bolesti ispoljava višegodišnju zavisnost od imunosupresivnih lekova (6, 89, 169).

## 2. CILJ RADA

Osnovni cilj ove studije je bio da se analiziraju različite kliničke, elektrofiziološke, neuroradiološke, patogenetske i imunološke specifičnosti populacije obolelih od MuSK MG.

Osnovni ciljevi ove studije su bili:

1. Da se definišu demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa MuSK pozitivnom MG i da se uporede sa istim karakteristikama pacijenata sa AChR pozitivnom formom bolesti.
2. Da se uporede nalazidobijeni elektrofiziološkim ispitivanjem bolesnika sa MuSK i AChR pozitivnom MG.
3. Da se analizira učestalost različitih HLA antigena u populaciji obolelih od MuSK MG.
4. Da se utvrdi učestalost atrofije mišića jezika i lica kliničkim pregledom, kao i lipidni sastav mišića jezika magnetnom spektroskopijom (MRS) kod MuSK i AChR pozitivnih MG bolesnika i da se izvrši poređenje ovih grupa obolelih od MG.
5. Da se utvrdi učestalost prisustva autonomne disfunkcije putem analize autonomnog nervnog sistema (ANS) kod MuSK pozitivnih i AChR pozitivnih MG bolesnika i da se izvrši poređenje ovih grupa obolelih.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### ***3.1. Bolesnici***

U ovu studiju preseka je uključeno 58 bolesnika sa generalizovanom formom MG, koji su lečeni na Klinici za neurologiju Kliničkog Centra Srbije (KCS) u Beogradu u periodu od 01.01.2005.g. do 01.01.2013.g.

Ciljna grupa ove studije su bili svi MuSK pozitivni bolesnici koji su do sada dijagnostikovani i lečeni na Klinici za neurologiju KCS u Beogradu, a koji su želeli da učestvuju u studiji (31 bolesnik). Pored njih, sve navede analize bile su sprovedene i na grupi od 28 AChR pozitivnih bolesnika sa generalizovanom formom MG, koji su radi što boljeg poređenja sa obolelima od MuSK MG, bili mečovani sa MuSK pozitivnim bolesnicima po polu, uzrastu, dužini trajanja bolesti i težini kliničke slike.

Kriterijumi za isključenje iz studije bili su neprihvatanje bolesnika da učestvuje u studiji ili prisustvo psihijatrijske bolesti ili konzumiranje alkohola, koji bi po proceni lekara bili smetnja za adekvatan pregled ANS, elektrofiziološko ispitivanje ili MRS.

Dijagnoza MG je, kod svih pacijenata uključenih u studiju, postavljena na osnovu danas opšte prihvaćenih dijagnostičkih kriterijuma, tipične kliničke prezentacije u vidu promenljivih slabosti i zamorljivosti različitih skeletnih mišića i pozitivnog dekrementnog odgovora za više od 10% na TRS ili povećanja *jitter*-a pri SFEMG. Pozitivan odgovor na inhibitore AChE (neostigmin ili edrofonium) je smatran dodatnim elementom koji je potvrđivao dijagnozu.

#### **3.1.1. Klinička slika**

Svi bolesnici su klinički evaluirani od strane neurologa Klinike za neurologiju KCS u Beogradu. Težina bolesti je bila određena uz pomoć MGFA klasifikacije (154), kao i pomoću Kvantitativnog miastenija gravis skora (QMGS) (188) (Prilog 1).

##### **3.1.1.1. MGFA klasifikacija**

Prema MGFA klasifikaciji, svi bolesnici su klasifikovani u 7 različitih grupa.

Prema težini kliničke slike, oni su podeljeni u 4 klase od kojih: klasa II predstavlja blagu, klasa III umerenu i klasa IV izraženu generalizovanu slabost, dok su u klasu V svrstani isključivo bolesnici koji su zahtevali intubaciju.

Klase II, III i IV su dodatno bile podeljene u po 2 subklase: subklasa (a) označava predominantnu zahvaćenost mišića trupa i ekstremiteta, dok subklasa (b) označava predominantnu bulbarnu slabost.

### **3.1.1.2. Kvantitativni miastenija gravis skor**

QMGS predstavlja kvantitativni test koji se koristi za procenu snage mišića kod obolelih od MG, a koji je preporučen od strane Američkog udruženja za MG u cilju testiranja mišićne snage, a pre svega radi procene terapijskog učinka različitih lekova i terapijskih procedura korišćenih u lečenju ove bolesti. QMGS se sastoji od ukupno 13 podtestova od kojih se svaki skoruje ocenom od 0 (puna mišićna snaga ispitane grupe mišića) do 3 (potpuna afunkcija ispitivanih mišića), tako da se ukupna vrednost QMGS kreće u intervalu od 0 (odsustvo slabosti ili zamorljivosti bilo koje ispitane grupe mišića) do 39 (izražena slabost svih ispitanih mišićnih grupa) (Prilog 1). Dosadašnjim studijama je pokazano da je validnost i reproducibilnost ovog testa odlična, zbog čega se on preporučuje kao primarna mera za praćenje ishoda bolesti, a posebno za procenu efikasnosti primenjene terapije (188).

### **3.1.2. Timektomija**

Timektomija je sprovedena, kod svih AChR pozitivnih bolesnika uključenih u studiju koji su u trenutku postavljanja dijagnoze bili mlađi od 50 godina i koji su imali generalizovanu formu MG ili prisustvo timoma na kompjuterizovanoj tomografiji grudnog koša, kao i kod određenog broja MuSK pozitivnih bolesnika, prema istim indikacijama, za koje u vreme timektomije nismo bili u mogućnosti da odredimo niti anti-AChR niti anti-MuSK antitela. Operativni zahvat je sproveden na Klinici za kardiovaskularne bolesti KCS u Beogradu. Svi bolesnici su operisani transsternalnim pristupom. Kod 57 bolesnika (98.3%) je sprovedena ekstenzivna timektomija, što podrazumeva uklanjanje timusa i celokupnog medijastinalnog masnog tkiva, dok je kod samo jednog bolesnika (1.7%) urađena standardna, tkz. „simplex“ timektomija sa uklanjanjem samo timusnog tkiva.

#### **3.1.2.1. PH pregled timusa**

Timusi svih bolesnika su, neposredno posle timektomije, pregledani patohistološki od strane patologa Klinike za kardiovaskularne bolesti KCS u Beogradu. Dobijeni nalazi su klasifikovani u 4 grupe:



- 1) LFH
- 2) timom
- 3) atrofija timusa
- 4) normalno tkivo timusa.

### **3.1.3. Terapija**

Svi bolesnici su lečeni antiholinesteraznom (piridostigmin) i imunosupresivnom (prednison, azatioprin, ciklosporin A) terapijom u standardnim terapijskim dozama, u zavisnosti od težine kliničke slike. Nekoliko bolesnika je, pored navedene terapije, zbog izrazito teške kliničke slike, zahtevalo i primenu dodatnih terapijskih intervencija, kao što su TIP i/ili IVIg.

### **3.1.4. Ishod lečenja**

Svi obrađeni bolesnici su klinički praćeni tokom 1 do 34 god.

Ishod bolesti je definisan kod svih obrađenih bolesnika, u skladu sa MGFA preporukama (154) kao:

- 1) remisija (odsustvo bilo kakvih simptoma ili znakova bolesti sa ili bez terapije);
- 2) minimalne manifestacije - MM (odsustvo bilo kakvih simptoma bolesti, ali sa prisutnim izvesnim znacima bolesti tokom neurološkog pregleda);
- 3) poboljšanje (poboljšanje za 1 ili više klasa po MGFA klasifikaciji);
- 4) bez promene (bez ikakve promene ili sa promenom stanja u okviru iste klase po MGFA klasifikaciji);
- 5) pogoršanje (pogoršanje za najmanje 1 klasu po MGFA klasifikaciji) i
- 6) letalan ishod.

## **3.2. Metodologija**

### **3.2.1. Određivanje titra anti-AChR antitela**

Titar anti-AChR At je određen u serumu svih ispitanih bolesnika na Institutu za primenu nuklearne energije (INEP) u Beogradu. Koncentracija ovih antitela je određena RIA metodom, dijagnostičkim kompletom firme CIS Biointernational, Francuska.

Test je zasnovan na upotrebi rastvorenih AChR izdvojenih iz humane ćelijske linije, koji su obeleženi sa <sup>125</sup>I-alfa bungarotoksinom. Radioaktivno obeleženi receptori su inkubirani sa

serumima koji potencijalno sadrže autoantitela na AChR. Kompleks obeleženih receptora i autoantitela je zatim precipitiran sa anti-humanim IgG. Koncentracija autoantitela je računata iz izmerene radioaktivnosti taloga posebno za svaki uzorak seruma (189).

Test je smatran pozitivnim ukoliko je koncentracija antitela bila veća od 0.2 nM, iako je vrednost između 0.2 nM i 0.5 nM smatrana graničnom i test se po pravilu kod ovih pacijenata ponavljao.

### **3.2.2. Određivanje titra anti-MuSK antitela**

Kod svih ispitanih pacijenata u čijem serumu nisu nađena anti-AChR At (AChR negativni bolesnici), vršena je analiza seruma na prisustvo anti-MuSK At. Kod jednog broja obolelih je u periodu kada se analiza nije radila u našoj zemlji ona rađena u Odeljenju Ćelijskih Neuronauka Univerziteta u Mastrohtu, u Holandiji, ali je kod najvećeg broja obolelih ona urađena na Institutu za primenu nuklearne energije (INEP) u Beogradu.

Anti-MuSK At su određena kod svih obolelih u našoj studiji RIA metodom uz pomoć komercijalnog dijagnostičkog kompleta za anti-MuSK At firme RSR Ltd, Kardif, Velika Britanija prema protokolu proizvođača. Ukratko, 5  $\mu$ l seruma je inkubirano sa 50  $\mu$ l  $^{125}$ I-MuSK (ekstracelularni domeni) tokom 16 časova. Humana antitela su zatim imunoprecipitirana tokom 2 časa, i nakon toga centrifugirana, a radioaktivnost precipitata je merena gama brojačem.

Test je smatran pozitivnim ukoliko je koncentracija antitela bila veća od 0.05 nM.

### **3.2.3. Elektrofiziološko ispitivanje**

Elektrofiziološko ispitivanje je sprovedeno na Klinici za neurologiju KCS na EMG aparatu Care Fusion Synergy. Testiranje je obuhvatilo TRS, SFEMG, detekciju kasnih potencijala prilikom distalne stimulacije dva motorna nerva, multi-MUP (potencijali motornih jedinica) analizu i analizu obrt/amplituda (TA analiza - engl. *turns/amplitude*). Antiholinesterazna terapija je obustavljena 12h pre elektrofiziološke evaluacije kod svih bolesnika. Sva elektrofiziološka ispitivanja su sprovedena uz održavanje temperature kože bolesnika iznad 34°C.

### **3.2.3.1. TRS**

TRS je obavljen niskofrekventnom (3 Hz) stimulacijom određenih nerava, sa registrovanjem CMAP u mišićima inervisanim od strane ovih nerava. Test je obavljen na m.abductor digiti minimi (m.ADM), m.deltoideus, m.trapezius, m.nasalis i m.OO. Inicijalno je određena jačina supraksimalne stimulacije, tj. jačina stimulacije nerva kojim se dobija maksimalna amplituda CMAP uvećana za 30%. Ovom jačinom stimulacije je kasnije tokom celog testa obavljana stimulacija nerva. Nerv je stimulisan 10 puta frekvencom od 3 Hz pre zamora, neposredno nakon voljne aktivacije mišića u trajanju od 20 sekundi, 1 i 3 minuta nakon zamora. TRS je smatran patološkim ukoliko je pad amplitude (dekrement) CMAP četvrtog u odnosu na prvi CMAP bio veći od 10%.

### **3.2.3.2. SFEMG**

SFEMG je obavljen svim analiziranim bolesnicima na m.EDC i m.OO. Pregled je obavljen koncentričnom iglenom elektrodom za jednokratnu upotrebu veličine 25mm x 30G uz podešavanje filtera na 1 kHz i 10 kHz, što je do sada u stručnoj literaturi jasno validirano (190). Pacijentu je naloženo da blago voljno aktivira ispitivani mišić. Igljena elektroda je plasirana u mišić na mesto na kome je bilo moguće registrovanje potencijala bar 2 pojedinačna mišićna vlakna koja pripadaju istoj motornoj jedinici. Registrovano je 20 parova ovakvih potencijala u svakom ispitanom mišiću i izračunata je vrednost *jitter*-a ovih 20 parova potencijala, kao i srednja konsekutivna razlika - MCD (engl. *mean consecutive difference*), koja predstavlja srednju vrednost razlike između uzastopnih interpotencijalnih intervala. SFEMG nalaz je proglašen patološkim ako je srednja vrednost *jitter*-a 20 parova potencijala bila veća od referentne vrednosti ili ukoliko je više od 10% pojedinačnih vrednosti *jitter*-a bilo preko gornje granice referentnih vrednosti. Referentne vrednosti su zavisile od ispitanog mišića i uzrasta bolesnika.

### **3.2.3.3. Detekcija kasnih potencijala**

Ovaj pregled se sastojao u detekciji kasnih potencijala koji se mogu javiti neposredno nakon CMAP registrovanog tokom distalne stimulacije nerva. Ovaj pregled je obavljen na standardnim mestima stimulacije i registracije za elektroneurografski pregled i to stimulacijom n.ulnaris-a i registrovanjem CMAP u m.ADM, kao i stimulacijom n.peroneus-a sa registracijom u m.extensor digitorum brevis.

#### **3.2.3.4. Kvantitativne EMG metode**

Metode kvantitativne EMG analize su obuhvatile TA analizu u m.EDC, m.deltoideus i m.OO, kao i multi-MUP analizu u m.deltoideus i m.OO. TA analizom je analizirana amplituda i broj obrta MUP prilikom maksimalne voljne aktivacije mišića, kojom je registrovano najmanje 20 zapisa, prema opisanom protokolu (191). Multi-MUP analizom je analizirana amplituda, trajanje i broj faza MUP prilikom blage do umerene voljne aktivacije ispitivanog mišića, pri čemu je registrovano najmanje 20 MUP za svaki ispitani mišić prema opisanom protokolu (192).

#### **3.2.4. HLA tipizacija**

Molekularna HLA tipizacija je urađena svim MuSK pozitivnim bolesnicima na Institutu za transfuziju krvi Srbije iz uzorka periferne krvi. DNK je ekstrahovana iz uzorka krvi potpuno automatskim sistemom Maxwell 16 Purification Kit (Maxwell, Promega). Tipizacija niske rezolucije za lokuse HLA-DRB1 i DQB1 je sprovedena uz pomoć PCR-SSO (Luminex xMAP, One Lambda). Tipizacija visoke rezolucije za lokus DQB1 je sprovedena uz pomoć PCR-SSP (Olerup).

#### **3.2.5. MR spektroskopija jezika**

Postojanje atrofije mišića jezika je bilo utvrđeno kliničkim pregledom, a prisustvo intramiocelularne masne infiltracije MRS srednje zadnjeg dela jezika, koja je obavljena u Centru za magnetnu rezonancu KCS. *Single voxel point-resolved proton MRS* je obavljena na aparatu za MR od 1.5 T (Siemens Avanto, Erlangen, Nemačka). Korišćena je šestokanalna zavojnica za glavu. Prostorna lokalizacija voksel (15×15×15 mm) je bila bazirana na *TrueFISP* (TR/TE=900/89 ms) snimcima načinjenim u sagitalnim, aksialnim i koronalnim ravnima. Korišćeni su *Point resolved* spektroskopija (PRESS) sa srednjim eho vremenom (135 ms) i 128 usrednjavanja. Srednje zadnji deo jezika je analiziran (193). U cilju minimizovanja artefakata usled pokreta, pacijentima je naloženo da drže vrh jezika između prednjih zuba i da izbegavaju gutanje tokom pregleda. Celokupno vreme trajanja pregleda je bilo 7 minuta i 22 sekunde po pacijentu. Kvalitet svih analiziranih spektara je obezbeđen zahtevom da devijacija hemijskih šiftova linija od njihove referentne pozicije mora biti 0.02 ppm ili manje. Isto tako, odnos signal/smetnje je morao biti iznad 4. Korekcije osnovne linije i faza je obavljen uz pomoć *jMRUI* v4.0 softvera (194), dok su *fitting*, procena pune širine

napolovini maksimuma (FWHM) kao i visina svake linije u spektru obavljene korišćenjem AMARES koda (195).

### **3.2.6. Testiranje autonomnog nervnog sistema**

Testiranje funkcija ANS je bilo sprovedeno na Klinici za endokrinologiju i bolesti metabolizma KCS i uključilo je sledeće testove: standardno testiranje kardiovaskularnih refleksa prema *Ewing-u* (196), varijabilnost krvnog pritiska kao odgovor na stezanje ruke i ortostatski položaj za utvrđivanje funkcije simpatičkog nervnog sistema, varijabilnost srčane frekvence kao odgovor na ustajanje, duboko disanje i Valsalva manevar kao indikator parasimpatičke funkcije. Rezultati ovih testova su ocenjeni kao normalni (skor 0), granični (skor 1) ili patološki (skor 2). Sveukupna autonomna disfunkcija je izražena kao suma skorova za simpatičke i parasimpatičke testove i dobijene vrednosti su se kretale u rasponu od 0 do 10. Vrednosti navedenog skora od 0 ili 1 su okarakterisane kao normalne, dok su vrednosti skora od 2 i 3 označavale blagu, od 4 do 6 umerenu i od 7 do 10 tešku autonomnu disfunkciju. Kratkotrajna spektralna analiza varijabilnosti srčanog rada u miru se radila pomoću 20-o minutnog EKG zapisa sa *fast Fourier* transformacijom (Task Force Monitor 3040i, CNSystemMedizintechnik AG, Grac, Austrija). Srednji RR interval i vremenski zavisni parametri srčane varijabilnosti su bili izdvojeni iz 24-o časovnog EKG zapisa (CardioVisions, Meditech) (197). Procenat ventrikularnih i supraventrikularnih ekstrasistola i atrijalna fibrilacija su bili automatski izračunati iz 24-o časovnog EKG zapisa. Korigovani QT interval (QTc) je bio određen i smatrao se normalnim ukoliko je bio manji od 460ms za žene i manje od 450 ms za muškarce (198).

Osetljivost barorefleksa u miru (BRS) je izračunata kao stepen regresije između spontanih sekvenci promena krvnog pritiska i varijacija RR intervala koje su se simultano javljale i bio je izražen u ms/mm Hg (197).

### **3.3. Statistička analiza**

Statistička analiza dobijenih rezultata je sprovedena uz pomoć statističkog paketa SPSS, verzija 15.0 za *Windows*. Numerička obeležja posmatranja su predstavljena kao opseg minimalna – maksimalna vrednost (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija). Za deskriptivnu analizu atributivnih obeležja posmatranja, izračunate su apsolutne i relativne učestalosti.

$\chi^2$  test u vidu testa slaganja je korišćen za utvrđivanje značajnosti razlike učestalosti različitih gradacija jednog obeležja posmatranja, dok su  $\chi^2$  test u vidu tablica kontingencije ili

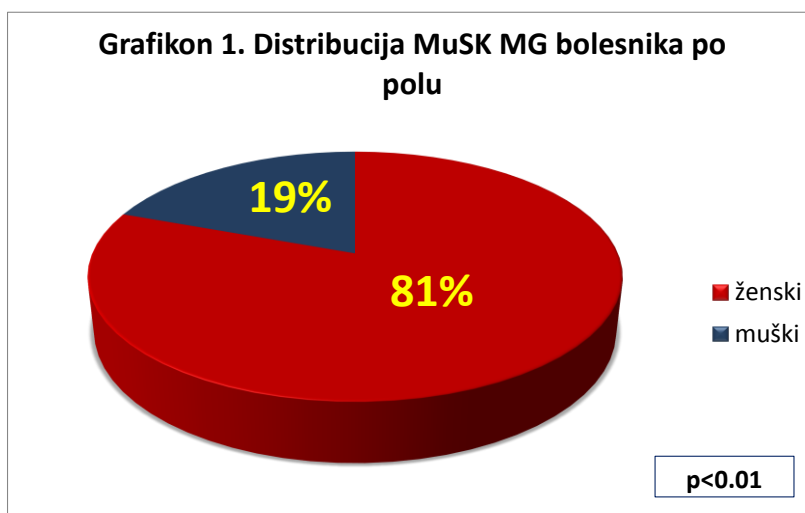
*Fisherov*test korišćeni za utvrđivanje značajnosti razlike učestalosti različitih obeležja posmatranja u grupi analiziranih bolesnika. Za procenu značajnosti razlike parametarskih homogenih vrednosti obeležja posmatranja dve grupe podataka korišćen je *Studentov* t-test. Ispitivanje povezanosti 2 grupe numeričkih obeležja posmatranja sprovedeno je Spirmanovim koeficijentom korelacije ranga. Vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane statistički značajnim, a vrednosti  $p < 0.01$  su smatrane visoko statistički značajnim.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografski podaci

U ovu studiju je uključeno ukupno 59 bolesnika sa generalizovanom formom MG. Među ispitanim bolesnicima je bio 31 bolesnik sa MuSK pozitivnom formom bolesti i 28 bolesnika sa AChR pozitivnom MG. Titar anti-MuSK At u ispitanjoj grupi bolesnika se kretao od 0.08 do 1.81 nM, sa srednjom vrednošću od  $0.75 \pm 0.5$  nM. Zabeležene su statistički značajno ( $p=0.032$ ;  $p<0.05$ ) više vrednosti titra anti-MuSK At kod žena (prosečno  $0.83 \pm 0.50$  nM) u odnosu na muškarce (prosečno  $0.37 \pm 0.08$  nM). Titar anti-AChR At je varirao od 0.51 do 19.60 nM, sa prosečnom vrednošću od  $8.0 \pm 4.6$  nM. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima titra ovih antitela u odnosu na pol ( $p=0.150$ ;  $p>0.05$ ).

Bolesnici sa AChR pozitivnom formom bolesti su mečovani sa MuSK MG bolesnicima po polu, uzrastu, dužini trajanja bolesti i težini kliničke slike. Grupu analiziranih MuSK MG bolesnika je činilo 25 (80.6%) bolesnika ženskog i 6 (19.4%) bolesnika muškog pola, a ova jasna predominacija bolesnika ženskog pola je bila i statistički značajna ( $p=0.001$ ;  $p<0.01$ ) (Grafikon 1). U grupu bolesnika sa AChR MG bilo je uključeno 25 (89.3%) žena i 3 (10.1%) muškarca. S obzirom da je cilj rada bio da se uporede karakteristike MuSK pozitivnih MG pacijenata sa kontrolnom grupom AChR pacijenata mečovanih po polu, godinama i dužini trajanja MG nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji polova između bolesnika MuSK MG i AChR MG grupe ( $p=0.477$ ;  $p>0.05$ ).



Slično ovome, starost bolesnika je u momentu uključivanja u ovu studiju bila slična kod pacijenata obe grupe ( $p=0.09$ ;  $p>0.05$ ) i iznosila je od 19 do 75 ( $49.4 \pm 14.8$ ) godina za grupu

MuSK bolesnika i od 19 do 74 ( $42.5 \pm 15.8$ ) godina za pacijente sa AChR MG. Bolest je kod 14 (45.2%) MuSK MG bolesnika počela pre 40. godine života, dok je 17 bolesnika (54.8%) na početku bolesti bilo starije od 40 godina. U okviru grupe AChR pozitivnih pacijenata, njih 19 (67.9%) je imalo rani početak bolesti, pre 40. godine života, dok je kod 9 (32.1%) bolesnika bolest počela posle 40. godine. Starost pacijenata sa MuSK i AChR MG je takođe bila približna. Prosečna starost MuSK MG bolesnika na početku bolesti iznosila je  $43.0 \pm 15.4$  god., sa opsegom od 16 do 68 god, dok se uzrast AChR MG bolesnika na početku bolesti kretao od 15 do 70, sa srednjom vrednošću od  $35.8 \pm 14.9$  god. Najveći broj MuSK MG pacijenata (8; 25.8%) je bio u uzrastu od 51-60 god. na početku bolesti, kod 7 bolesnika (22.6%) su se prve tegobe javile sa 31-40 god., a 5 (16.1%) bolesnika je bilo uzrasta 41-50 god. u trenutku nastanka bolesti. Oboljevanje u veoma ranom i veoma kasnom životnom dobu je bilo ređe i registrovano je kod po 4 (12.9%) bolesnika u drugoj i sedmoj deceniji života, dok su samo 3 (9.7%) bolesnika imala početak bolesti u svojim 20-im godinama. Obzirom daje cilj u izboru kontrolnih AChR MG pacijenata bio da se ne razlikuju značajnije obolelih od MuSK MG, odsustvo statistički značajne razlike u distribuciji analiziranih grupa bolesnika u odnosu na uzrast na početku bolesti ( $p=0.075$ ;  $p>0.05$ ) je potvrdilo dobar kontrolni uzorak obolelih. U okviru grupe MuSK MG bolesnika zapaženo je nešto ranije oboljevanje žena (prosečno u uzrastu od  $41.4 \pm 15.9$  god.) u odnosu na muškarce (prosečno u uzrastu od  $49.5 \pm 11.8$  god.), ali takođe bez statistički značajne razlike ( $p=0.301$ ;  $p>0.05$ ).

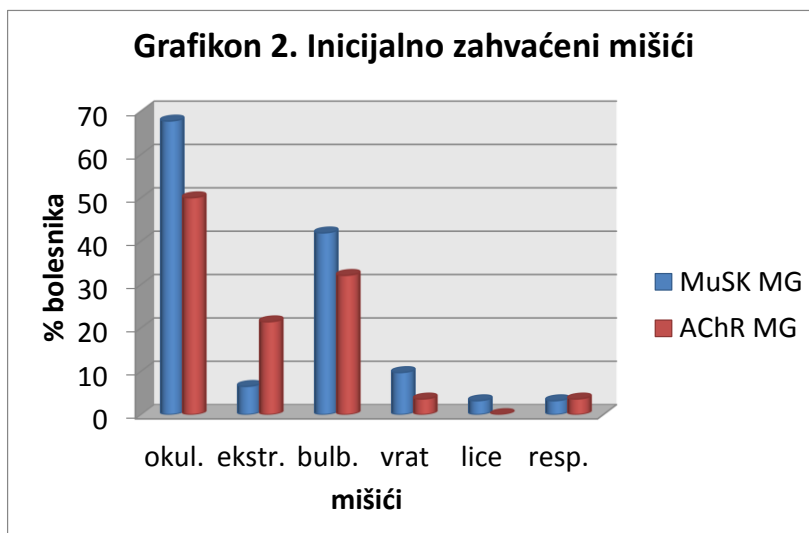
Bolesnici obe analizirane grupe su mečovani i u odnosu na dužinu trajanja bolesti ( $p=0.827$ ;  $p>0.05$ ). Tako se dužina trajanja bolesti, od pojave prvih simptoma do trenutka evaluacije u ovoj studiji, kretala od 1 do 34 godine, sa prosečnom vrednošću od  $6.4 \pm 6.8$  god. za MuSK MG bolesnike i od 0.1 do 20 god., sa srednjom vrednošću od  $6.8 \pm 5.6$  god. za bolesnike sa AChR pozitivnom MG.

#### ***4.2. Klinička slika***

Inicijalni simptomi na početku bolesti su u grupi MuSK bolesnika bili najčešće okularni (21; 67.7%) i bulbarni (13; 41.9%), a ređe se javljala inicijalna zahvaćenost mišića vrata (3; 9.7%) i ekstremiteta (2; 6.5%), dok je inicijalna afekcija mišića lica i respiratorne muskulature bila veoma retka i evidentirana je kod po jednog (3.2%) bolesnika. Navedena razlika u učestalosti inicijalne afekcije različitih mišića u okviru same grupe MuSK MG bolesnika je bila visoko statistički značajna ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ). AChR pozitivni bolesnici su najčešće imali afekciju ekstraokularnih mišića kao inicijalnu manifestaciju bolesti i ona je registrovana kod 14 (50%)



bolesnika ove grupe. Inicijalna klinička prezentacija u vidu predominantne bulbarne slabosti je verifikovana kod 9 (32.1%) bolesnika, dok su mišići ekstremiteta bili zahvaćeni kod 6 (21.4%) bolesnika na početku bolesti. Inicijalna afekcija respiratorne muskulature i mišića vrata je bila veoma retka i zapažena je kod po jednog (3.6%) AChR MG bolesnika. Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u inicijalno zahvaćenim mišićima između pacijenata sa MuSK i AChR MG ( $p=0.135$ ;  $p>0.05$ ) (Grafikon 2). Kada su analizirani samo pacijenti sa okularnim i/ili bulbarnim inicijalnim simptomima, zapaženo je da je izolovana slabost ekstraokularnih mišića bila prisutna kod 15 (48.4%) MuSK i 13 (46.4%) AChR pozitivnih bolesnika, isključiva bulbarna slabost je evidentirana kod 7 (22.6%) MuSK i 8 (28.6%) AChR MG pacijenata, dok je kombinovana okulobulbarna slabost kao inicijalna manifestacija bolesti bila karakteristična za bolesnike sa MuSK pozitivnom formom bolesti, kod kojih je zabeležena u 6 (19.4%) slučajeva, u odnosu na samo jednog (3.6%) AChR MG bolesnika, ali ni ova razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0.212$ ;  $p>0.05$ ).



Težina kliničke slike u trenutku pregleda, prikazana MGFA klasifikacijom, bila je slična u obe grupe bolesnika jer su AChR pozitivni bolesnici mečovani sa MuSK pozitivnim pacijentima i prema težini kliničke slike ( $p=0.925$ ;  $p>0.05$ ). Najveći broj pacijenata je imao blage kliničke manifestacije, pa je tako IIA forma bolesti bila prisutna kod 10 (32.3%) MuSK bolesnika i 11 (39.3%) AChR bolesnika, IIB forma bolesti je registrovana kod 10 (32.3%) MuSK i 10 (35.7%) AChR pacijenata, po jedan bolesnik iz obe grupe je imao IIIA formu bolesti, dok je IIIB forma MG bila prisutna kod 5 (16.1%) bolesnika iz grupe MuSK MG i kod 3 (10.7%) bolesnika koji su pripadali grupi AChR pozitivne MG. Teže forme bolesti (IVA, IVB i V) nije imao ni jedan analizirani bolesnik u trenutku pregleda. U vreme ove

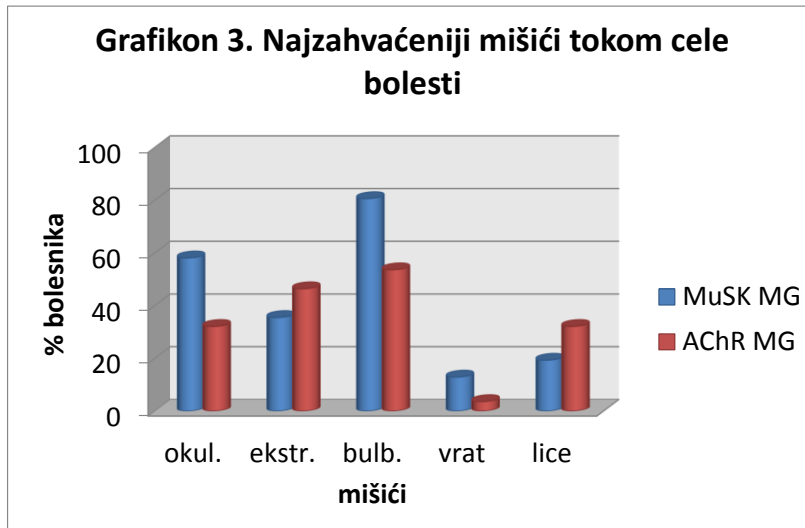
evaluacije 5 (16.1%) bolesnika sa MuSK MG i 3 (10.7%) bolesnika sa AChR pozitivnom MG se nalazilo u remisiji bolesti.

Stepen izraženosti simptoma bolesti je u trenutku pregleda za ovu studiju kvantifikovan i izračunavanjem QMGS. Kod bolesnika sa MuSK MG ovaj skor se kretao u rasponu od 0 do 14, sa prosečnom vrednošću od  $5.3 \pm 3.8$ , dok je u grupi bolesnika sa AChR MG njegova srednja vrednost iznosila  $5.6 \pm 4.4$ , sa variranjem od 0 do 18 i ova razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.134$ ;  $p>0.05$ ). U okviru grupe MuSK MG bolesnika registrovano je postojanje klinički težih formi bolesti, iskazanih višim vrednostima QMGS, kod bolesnika sa višim titrom anti-MuSK At ( $p=0.015$ ;  $p<0.05$ ), dok slična korelacija između težine bolesti prikazane MGFA klasifikacijom i vrednosti titra anti-MuSK At nije uočena ( $p=0.934$ ;  $p>0.05$ ). Kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti nije postojala korelacija između titra anti-AChR At i težine kliničke slike iskazane ni MGFA klasifikacijom ( $p=0.377$ ;  $p>0.05$ ) niti QMGS ( $p=0.363$ ;  $p>0.05$ ).

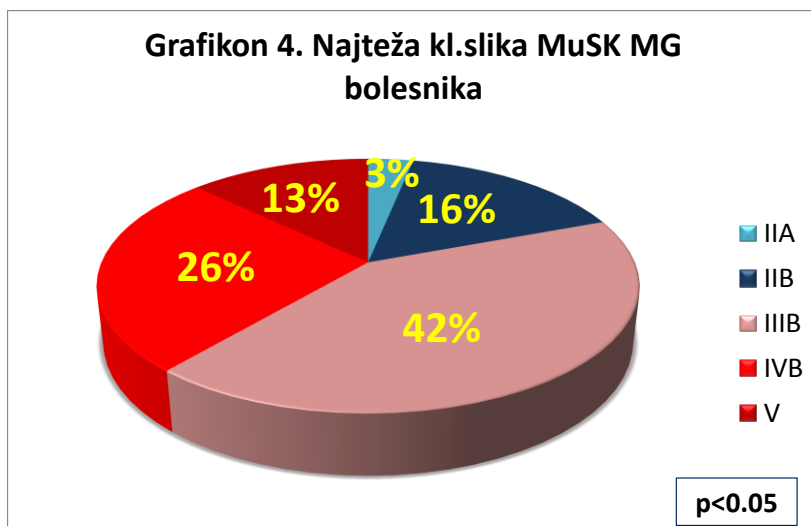
I distribucija klinički najzahvaćenijih mišića u trenutku pregleda za ovu studiju je bila slična kod obe grupe pacijenata ( $p=0.529$ ;  $p>0.05$ ). Tako je najveći broj obrađenih bolesnika imao jasno prisutnu slabost mimičnih mišića, kako u okviru grupe MuSK pozitivnih (17; 54.8%), tako i u okviru grupe AChR pozitivnih (15; 53.6%) pacijenata. Slabost mišića ekstremiteta je bila prisutna kod 13 (41.9%) MuSK pozitivnih i 11 (39.3%) AChR pozitivnih bolesnika, bulbarna slabost kod 8 (25.8%) bolesnika sa MuSK i 7 (25%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti, dok su očni simptomi evidentirani kod 7 (22.6%) MuSK pozitivnih i 4 (14.3%) AChR pozitivna bolesnika. Slabost mišića vrata je, u trenutku pregleda, bila prisutna kod samo 1 (3.2%) MuSK pozitivnog bolesnika, dok kod 5 bolesnika iz MuSK MG grupe (16.1%) i 3 bolesnika iz AChR grupe (10.7%) nije tokom pregleda evidentirano postojanje mišićnih slabosti.

Distribucija najviše zahvaćenih mišića tokom celokupnog trajanja bolesti je bila nešto drugačija, ali ova razlika između MuSK i AChR MG bolesnika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0.426$ ;  $p>0.05$ )(Grafikon 3). Naime, u grupi MuSK pozitivnih MG bolesnika najveći broj pacijenata je imao znake slabosti bulbarnih mišića (25; 80.6%), afekcija ekstraokularnih mišića je verifikovana kod 18 (58.1%), a mišića ekstremiteta kod 11 (35.5%) bolesnika. Mimični mišiću su, tokom trajanja bolesti, predominantno bili zahvaćeni kod 6 (19.3%), a mišići vrata kod 4 (12.9%) bolesnika. Navedena razlika u distribuciji najviše zahvaćenih mišića tokom celokupnog trajanja bolesti u okviru grupe bolesnika sa MuSK MG

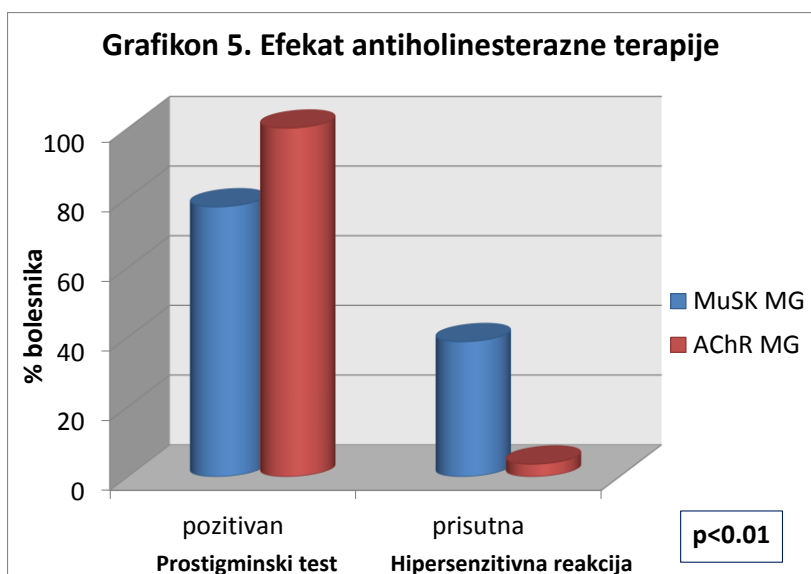
je bila visoko statistički značajna ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ). Bolesnici sa AChR pozitivnom MG su imali predominantnu zahvaćenost bulbarnih mišića (15; 53.6%) i mišića ekstremiteta (13; 46.4%), zatim ekstraokularnih i mimičnih mišića (po 9 bolesnika; 32.1%), dok je najizraženija zahvaćenost mišića vrata registrovana samo kod jednog (3.6%) pacijenta.



Analizom najteže kliničke slike koju su bolesnici imali tokom celokupnog trajanja bolesti zabeležena je predominacija teških formi bolesti kod MuSK MG bolesnika ( $p=0.01$ ;  $p<0.05$ ), nezavisno od pola ( $p=0.219$ ;  $p>0.05$ ). Kada je najteža klinička slika tokom celokupnog trajanja bolesti prikazana kao laka (forme bolesti IIA, IIB i IIIA) ili teška (forme bolesti IIIB, IVA, IVB i V), zapaženo je da je čak 25 (80.6%) MuSK MG bolesnika imalo teške forme bolesti prema MGFA klasifikaciji u najlošijoj fazi bolesti i ova predominacija teških kliničkih manifestacija je bila i visoko statistički značajna ( $p=0.001$ ;  $p<0.01$ )(Grafikon 4). Tako je najveći broj MuSK bolesnika (13; 41.9%) kao najtežu kliničku prezentaciju imao IIIB formu bolesti prema MGFA klasifikaciji, njih 8 (25.8%) je imalo IVB formu bolesti, 4 (12.9%) formu bolesti V, dok je blaga klinička slika u formi bolesti IIB bila prisutna kod 5 (16.1%), a forma IIA samo kod jednog (3.2%) pacijenta. Bolesnici sa AChR pozitivnom formom MG su mečovani sa MuSK MG bolesnicima u odnosu na težinu bolesti ( $p=0.396$ ;  $p>0.05$ ), tako da su u ovoj grupi bolesnika, kao najteža klinička prezentacija, bile prisutne: forma V kod 3 (10.7%), forma IVB kod 8 (28.6%), forma IVA kod 1 (3.6%), forma IIIB kod 7 (25.0%), forma IIIA kod 3 (10.7%), forma IIB kod 4 (14.3%) i najblaža forma IIA kod 2 (7.1%) bolesnika.



Prostigminski test, kao prvi dijagnostički test koji se radi u evaluaciji bolesnika sa MG, je bio pozitivan kod svih 28 (100%) AChR pozitivnih bolesnika. Za razliku od toga, u grupi MuSK MG pacijenata ovaj test je pokazao znatno manju senzitivnost, koja je bila i visoko statistički značajna ( $p=0.007$ ;  $p < 0.01$ ) (Grafikon 5). On je bio pozitivan kod 24 (77.4%) bolesnika, dok je kod skoro četvrtine bolesnika (7; 22.6%) ovaj test bio jasno negativan. Pored toga, bolesnici sa MuSK pozitivnom MG su značajno češće ispoljavali hipersenzitivnu reakciju na antiholinesteraznu terapiju u formi izraženih fascikulacija, zamućenja vida, hipersalivacije ili abdominalnih grčeva. Ovakva reakcija je zabeležena kod 12 (38.7%) MuSK MG bolesnika i samo kod 1 (3.6%) AChR pozitivnog pacijenta i ova razlika je bila visoko statistički značajna ( $p=0.001$ ;  $p < 0.01$ ) (Grafikon 5).



### **4.3. Timektomija**

Timektomija je obavljena kod 7 (22.6%) MuSK pozitivnih bolesnika jer su ovi bolesnici dijagnostikovani u vreme kada nam nije bila dostupna detekcija za bolest specifičnih antitela, tako da su oni timektomisani u skladu sa tadašnjim indikacijama za ovu terapijsku proceduru, a to su bili uzrast ispod 50 godina i generalizovana forma bolesti.

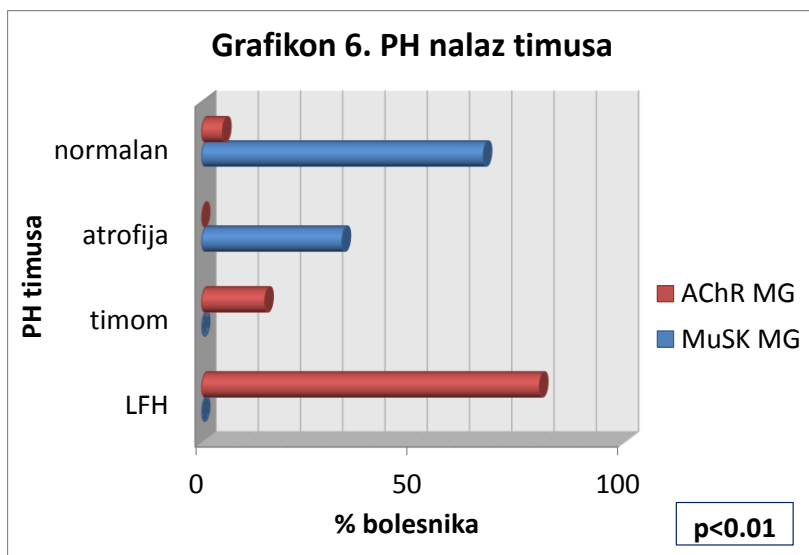
Timektomija je sprovedena i kod 20 (71.4%) AChR pozitivnih bolesnika, koji su bili u trenutku postavljanja dijagnoze mlađi od 50 godina, koji su imali generalizovanu formu bolesti, prisustvo serumskih anti-AChR At ili radiološki evidentirano postojanje timoma.

Uzrast u vreme timektomije je bio sličan između MuSK pozitivnih i AChR pozitivnih MG bolesnika ( $p=0.833$ ;  $p>0.05$ ). Tako su MuSK MG pacijenti timektomisani u uzrastu od 18 do 50 godina, prosečno sa  $32.1\pm 11.2$  god., dok je u grupi AChR MG bolesnika ova terapijska intervencija sprovedena u uzrastu od 16 do 54 godine, prosečno sa  $31.1\pm 11.1$  god.

Bolest je, od pojave prvih simptoma do trenutka operacije, prosečno trajala  $10.3\pm 10.1$  meseci sa varijacijama u opsegu od 1 do 24 meseca za MuSK MG bolesnike, dok se u grupi AChR pozitivnih pacijenata ona kretala u intervalu od 2 do 48 meseci, sa srednjom vrednošću od  $11.3\pm 10.7$  meseci ( $p=0.829$ ;  $p>0.05$ ).

PH analizom timusa operisanih MuSK bolesnika je utvrđeno postojanje atrofije timusa kod 2 (33.3%) i normalnog timusa kod 4 (66.7%) pacijenta, dok LFH i timom nisu bili prisutni ni kod jednog operisanog bolesnika iz ove grupe. Za jednog bolesnika sa MuSK MG, operisanog pre 34 godine, nismo imali uvid u PH nalaz timusa. Za razliku od toga, u okviru grupe AChR MG pacijenata, najčešće je bilo prisustvo LFH (16; 80%), dok je timom verifikovan kod 3 (15%), a normalan timus kod 1 (5%) bolesnika. Atrofija timusa nije bila prisutna ni kod jednog od obrađenih AChR MG pacijenata. Opisane razlike u PH nalazu timusa između MuSK i AChR MG bolesnika su bile visoko statistički značajne ( $p=0$ ;  $p<0.01$ )(Grafikon 6).

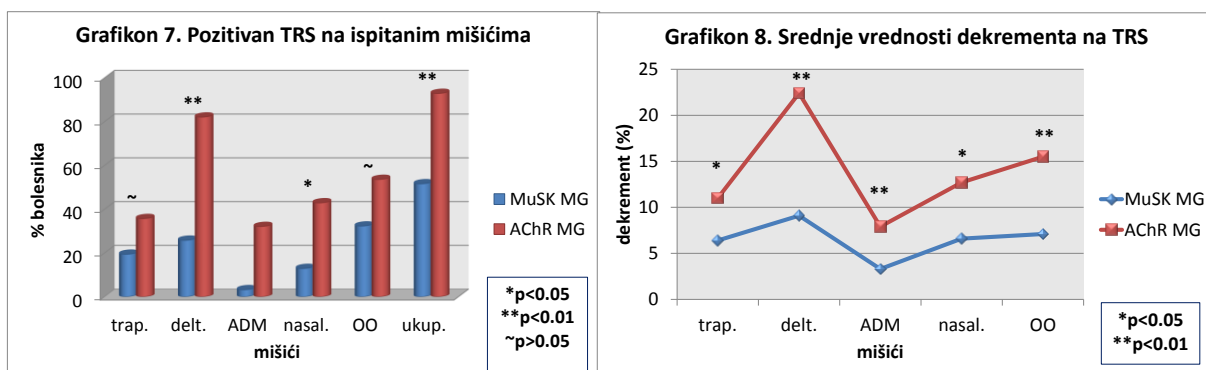
U okviru grupe MuSK MG bolesnika uočena je jasna korelacija između PH nalaza timusa i uzrasta na početku bolesti ( $p=0.042$ ;  $p<0.05$ ), tako da su svi mlađi pacijenti imali normalan, a stariji atrofičan timus. PH nalaz timusa je bio u jasnoj korelaciji sa uzrastom na početku bolesti i u okviru AChR MG grupe ( $p=0.018$ ;  $p<0.05$ ). Tako je kod mlađih bolesnika zabeleženo dominantno prisustvo LFH, dok je kod starijih bolesnika bilo češće prisustvo timoma.



#### 4.4. Elektrofiziološko ispitivanje

##### 4.4.1. TRS

TRS je obavljen na pet različitih mišića kod svih ispitanih bolesnika obe grupe. Dobijeni nalazi su prikazani na Grafikonima 7 i 8.



Ovaj test je na m.ADM bio pozitivan kod samo 1 (3.2%) MuSK pozitivnog bolesnika. Kod pacijenata iz ove grupe zabeležene vrednosti dekrementa su se kretale od 0.1 do 11.2%, sa prosečnom vrednošću od  $3.3 \pm 2.4\%$ . U grupi AChR pozitivnih pacijenata, senzitivnost ovog testa je bila statistički značajno veća nego kada su u pitanju MuSK pozitivni bolesnici ( $p=0.003$ ;  $p<0.01$ ), mada i dalje niska. Tako je kod svega 9 (32.1%) AChR MG pacijenata zabeležen pozitivan TRS na ovom mišiću, sa variranjem dekrementa u opsegu od 1.2 do 42.3% i srednjom vrednošću od  $7.9 \pm 8.7\%$ . Navedena razlika u zabeleženim vrednostima

dekrementa između bolesnika sa MuSK i AChR pozitivnom formom bolesti je takođe bila visoko statistički značajna ( $p=0.006$ ;  $p<0.01$ ).

TRS na m.deltoideus-u je bio pozitivan samo kod 8 (25.8%) MuSK pozitivnih pacijenata. Kod ovih bolesnika se vrednost registrovanog dekrementa kretala u opsegu od 0.9 do 25.8%, sa srednjom vrednošću od  $9.1\pm 6.5\%$ . Za razliku od toga, u grupi AChR pozitivnih bolesnika ovaj test je bio znatno češće pozitivan ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ) i to kod čak 23 (82.1%) pacijenta sa značajno višom prosečnom vrednošću dekrementa od  $22.4\pm 15.6\%$  i variranjem u rasponu od 1.3 do 57.6% ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ).

Kada je TRS obavljen na m.trapezius-u, MuSK pozitivni bolesnici su imali srednju vrednost dekrementa od  $6.4\pm 3.4\%$  sa varijacijama u rasponu od 1.4 do 15.4%, a pozitivan test je zabeležen kod samo 6 (19.4%) bolesnika. Slično tome, i u grupi AChR pozitivnih bolesnika TRS je na ovom mišiću bio pozitivan kod samo 10 (35.7%) pacijenata sa kretanjem vrednosti dekrementa od 0.4 do 47.4% i prosečnom vrednošću od  $11.0\pm 11.3\%$ . Navedena razlika u učestalosti pozitivnog TRS na ovom mišiću nije bila statistički značajna između MuSK MG i AChR MG bolesnika ( $p=0.158$ ;  $p>0.05$ ), ali razlika u vrednostima dekrementa između bolesnika navedene dve grupe je bila statistički značajna ( $p=0.035$ ;  $p<0.05$ ).

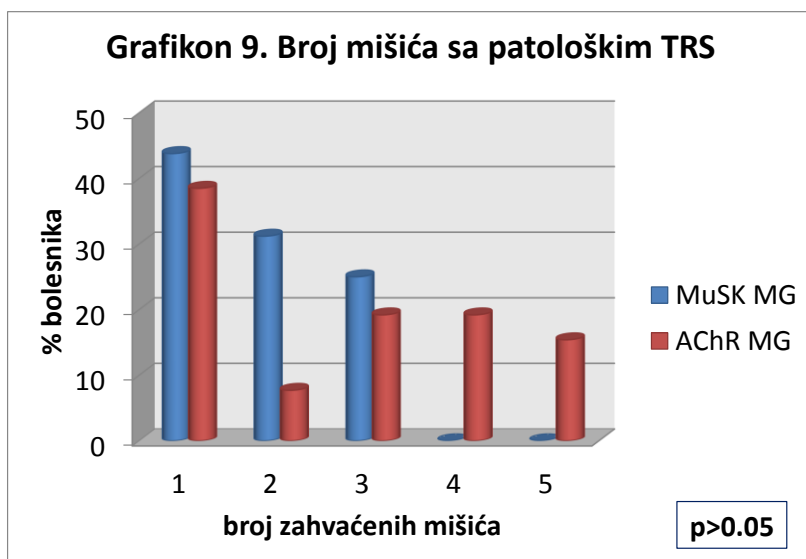
Ispitivanjem mišića lica je registrovan pozitivan TRS na m.nasalis-u kod 4 (12.9%) MuSK pozitivna bolesnika i kod 12 (42.9%) AChR MG pacijenata i ova razlika je bila statistički značajna ( $p=0.01$ ;  $p<0.05$ ). U grupi MuSK MG bolesnika, vrednost zabeleženog dekrementa na ovom mišiću je prosečno iznosila  $6.6\pm 6.4\%$  sa variranjem u opsegu od 0.6 do 32.6%, dok se kod AChR MG bolesnika ova vrednost kretala u rasponu od 0.1 do 51.3%, sa srednjom vrednošću od  $12.7\pm 12.6\%$  i ova razlika je bila statistički značajna ( $p=0.021$ ;  $p<0.05$ ).

Na m.OO, registrovan je pozitivan TRS kod 10 (32.3%) bolesnika iz grupe MuSK pozitivne MG i kod 15 (53.6%) AChR pozitivnih bolesnika, ali ova razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.098$ ;  $p>0.05$ ). Međutim, razlika u vrednostima dekrementa na ovom mišiću između bolesnika nevedene dve grupe je bila statistički značajna ( $p=0.002$ ;  $p<0.01$ ). Naime, prosečna vrednost dekrementa na ovom mišiću je kod MuSK MG pacijenata iznosila  $7.1\pm 6.4\%$ , sa variranjem u opsegu od 0.1 do 23.8%, dok se kod AChR pozitivnih bolesnika ona kretala u rasponu od 0.5 do 50.1% sa srednjom vrednošću od  $15.5\pm 12.4\%$ .

Kada je obavljena sveukupna analiza rezultata TRS na svim ispitanim mišićima, patološki nalaz je bar na jednom ispitanom mišiću verifikovan kod 16 (51.6%) MuSK pozitivnih i kod

26 (92.9%) AChR pozitivnih bolesnika, dok je kod preostalih 15 (48.4%) MuSK i 2 (7.1%) AChR MG bolesnika TRS bio negativan na svim ispitanim mišićima. Navedena razlika je bila visoko statistički značajna ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ).

U okviru grupe MuSK pozitivnih bolesnika, kod najvećeg broja obolelih sa patološkim TRS, zabeležen je značajan dekrement veći od 10% samo na jednom ispitano mišiću (7; 43.8%), ređe na 2 (5; 31.2%) ili 3 (4; 25%) ispitana mišića, dok patološki TRS na 4 ili svih 5 ispitanih mišića nije zabeležen ni kod jednog MuSK MG bolesnika (Grafikon 9). Od pacijenata sa patološkim TRS samo na jednom ili dva ispitana mišića, najčešće je bio povišen dekrement na m.OO (7; 58.3%), m.deltoideus-u (4; 33.3%), m.nasalis-u i m.trapezius-u (po 3; 25%), što jasno ističe najizraženije promene na mimičnim mišićima i proksimalnim mišićima ekstremiteta. Za razliku od MuSK pozitivnih pacijenata, kod bolesnika sa AChR MG i patološkim TRS, značajan dekrement je zabeležen kod 10 (38.5%) bolesnika na 1 mišiću, kod 2 (7.7%) na 2 mišića, kod po 5 bolesnika (19.2%) na 3 i 4 mišića i kod 4 (15.4%) AChR pozitivna pacijenta na svih 5 ispitanih mišića (Grafikon 9). Ovi rezultati su pokazali jasnu predominantno fokalnu afekciju bolesnika sa MuSK MG i više generalizovanu zahvaćenost različitih mišića bolešću kod AChR pozitivnih pacijenata, ali navedena razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0.060$ ;  $p>0.05$ ).



Kod bolesnika sa MuSK MG su zabeležene više vrednosti dekrementa kod žena u odnosu na muškarce na svim ispitanim mišićima, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost (Tabela 2).



<b>Tabela 2.</b> <b>Vrednosti</b> <b>dekrementa MuSK</b> <b>MG bolesnika</b>	<b>Ženski pol</b> <b>X ± SD (%)</b>	<b>Muški pol</b> <b>X ± SD (%)</b>	<b>Statist.</b> <b>značaj.</b>
<b>m. trapezius</b>	6.62 ± 3.52	5.53 ± 3.08	p>0.05
<b>m. deltoideus</b>	9.54 ± 6.74	7.12 ± 5.16	p>0.05
<b>m. ADM</b>	3.40 ± 2.55	2.90 ± 1.88	p>0.05
<b>m. nasalis</b>	7.25 ± 7.00	4.05 ± 1.75	p>0.05
<b>m. OO</b>	7.81 ± 6.82	4.23 ± 3.30	p>0.05

S druge strane, u okviru AChR MG grupe su zabeležene statistički značajno više vrednosti dekrementa kod žena u odnosu na muškarce na m. ADM ( $p=0.038$ ;  $p<0.05$ ) i m.deltoideusu ( $p=0.031$ ;  $p<0.05$ ), dok na ostalim ispitanim mišićima ova razlika nije bila statistički značajna (Tabela 3).

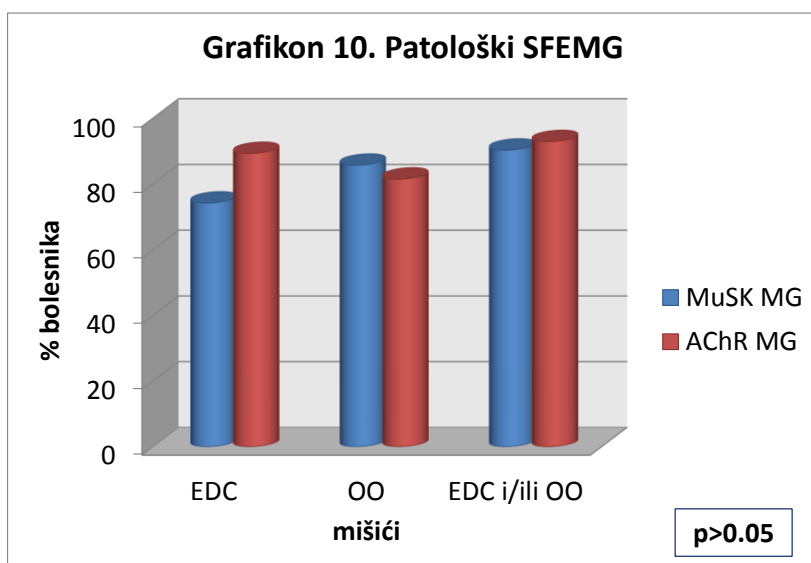
<b>Tabela 3.</b> <b>Vrednosti</b> <b>dekrementa AChR</b> <b>MG bolesnika</b>	<b>Ženski pol</b> <b>X ± SD (%)</b>	<b>Muški pol</b> <b>X ± SD (%)</b>	<b>Statist.</b> <b>značaj.</b>
<b>m. trapezius</b>	11.8 ± 11.8	4.5 ± 1.1	p>0.05
<b>m. deltoideus</b>	24.0 ± 15.8	9.2 ± 2.8	p<0.05
<b>m. ADM</b>	8.6 ± 8.9	1.9 ± 0.6	p<0.05
<b>m. nasalis</b>	12.0 ± 12.1	18.4 ± 18.3	p>0.05
<b>m. OO</b>	15.7 ± 12.6	13.8 ± 12.7	p>0.05

Kod MuSK MG bolesnika, prisustvo patološkog nalaza na TRS kao i zabeležene vrednosti dekrementa nisu bile u korelaciji sa težinom kliničke slike prema MGFA klasifikaciji niti sa titrom anti-MuSK At ni za jedan ispitan mišić ( $p>0.05$ ). S druge strane, kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti su zabeležene statistički značajno više vrednosti dekrementa kod bolesnika sa težim formama bolesti prema MGFA klasifikaciji samo na m.OO ( $p=0.044$ ;  $p<0.05$ ), dok je težina kliničke slike iskazana QMGS jasno korelirala sa vrednostima dekrementa na m.OO ( $p=0.029$ ;  $p<0.05$ ) i na m.deltoideus-u ( $p=0.004$ ;  $p<0.01$ ), kao i sa pozitivnošću TRS na m.deltoideus-u ( $p=0.025$ ;  $p<0.05$ ). Vrednost titra anti-AChR At je bila u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima dekrementa na m. ADM ( $p=0.034$ ;  $p<0.05$ ) i m. deltoideus-u ( $p=0.018$ ;  $p<0.05$ ), kao i sa pozitivnošću TRS na m. ADM ( $p=0.047$ ;  $p<0.05$ ), dok je za pozitivnost TRS na m.trapezius-u statistička značajnost bila granična ( $p=0.05$ ).

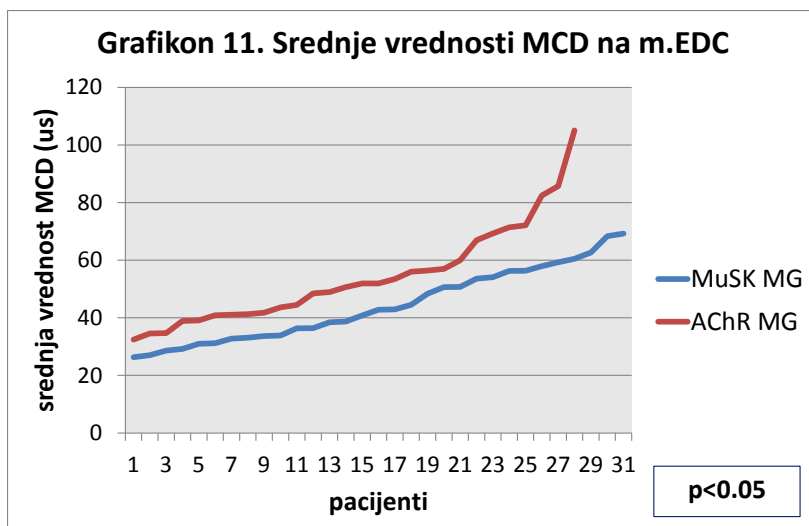
#### 4.4.2. SFEMG

SFEMG je obavljen na m.EDC kod svih bolesnika obe grupe uključenih u ovu studiju, kao i kod 28 MuSK pozitivnih i 27 AChR MG bolesnika na m.OO. Kod preostala 3 bolesnika sa MuSK MG i 1 bolesnika sa AChR formom bolesti ovaj pregled nije mogao biti obavljen usled izražene mišićne slabosti i nemogućnosti održanja produžene voljne mišićne kontrakcije koja je neophodna za obavljanje pregleda.

SFEMG pregledom m.EDC registrovan je patološki nalaz kod 23 (74.2%) bolesnika sa MuSK MG, kao i kod 25 (89.3%) AChR MG pacijenata ( $p=0.137$ ;  $p>0.05$ )(Grafikon 10).



Srednja vrednost *jitter*-a se u grupi MuSK MG bolesnika kretala u intervalu od 26.35 do 69.25 $\mu$ s, sa prosečnom vrednošću od 44.38 $\pm$ 12.79 $\mu$ s, dok je u okviru grupe AChR pozitivnih MG bolesnika ona prosečno iznosila 54.30 $\pm$ 17.32 $\mu$ s, sa variranjem u opsegu od 32.44 do 105.06 $\mu$ s, što je bilo statistički značajno ( $p=0.015$ ;  $p<0.05$ )(Tabela 4). Prilikom pregleda svakog bolesnika registrovano je po 20 parova potencijala pojedinačnih mišićnih vlakana koja pripadaju istoj motornoj jedinici. Od registrovanih 20 parova potencijala, u okviru MuSK MG grupe, prosečan broj parova potencijala kod kojih je registrovan povišen *jitter* je iznosio 7.7 $\pm$ 5.9, sa variranjem u rasponu od 0 do 17. Kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom MG, ovaj broj parova se kretao u opsegu od 1 do 20, sa srednjom vrednošću od 11.9 $\pm$ 6.2, što je takođe bilo statistički značajno ( $p=0.01$ ;  $p<0.05$ )(Tabela 4). Zabeležene su statistički značajno niže vrednosti MCD kod MuSK MG bolesnika u odnosu na bolesnike sa AChR pozitivnom formom bolesti ( $p=0.023$ ;  $p<0.05$ )(Grafikon 11).



Naime, među bolesnicima sa MuSK MG, srednja vrednost MCD na m.EDC se kretala od 27.24 do 73.94 $\mu$ s, sa srednjom vrednošću od 46.15 $\pm$ 13.70 $\mu$ s, dok su AChR MG bolesnici imali vrednosti ovog parametra u opsegu od 34.04 do 105.06 $\mu$ s, prosečno 55.93 $\pm$ 18.43 $\mu$ s (Tabela 4).

Tabela 4. SFEMG m.EDC	MuSK MG		AChR MG		Statist. značaj.
	Interval ( $\mu$ s)	X $\pm$ SD ( $\mu$ s)	Interval ( $\mu$ s)	X $\pm$ SD ( $\mu$ s)	
Sr.vredn.jittera	26.3-69.2	44.4 $\pm$ 12.8	32.4-105.1	54.3 $\pm$ 17.3	p<0.05
Br.parova pot. sa poviš.jitterom	0 - 17	7.7 $\pm$ 5.9	1 - 20	11.9 $\pm$ 6.2	p<0.05
Sr.vred. MCD	27.2-73.9	46.1 $\pm$ 13.7	34.0-105.1	55.9 $\pm$ 18.4	p<0.05

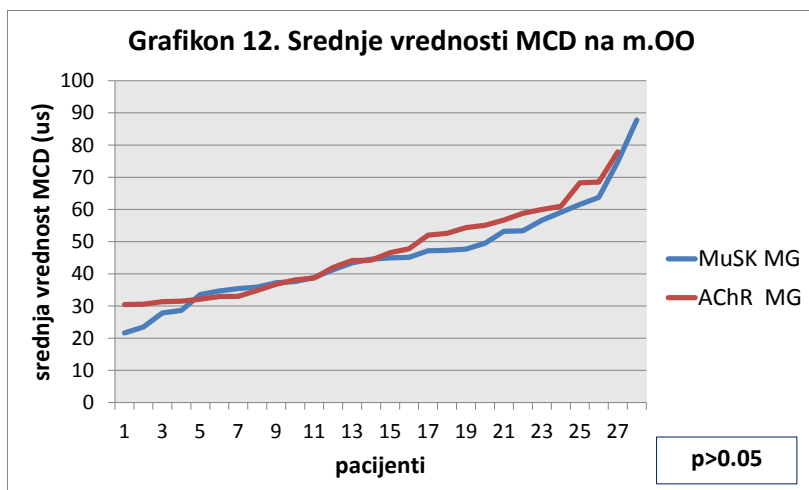
I kod MuSK MG (p=0.634; p>0.05) i kod AChR MG bolesnika (p=0.525; p>0.05) zapaženo je postojanje slične učestalosti patološkog nalaza na m.EDC kod bolesnika oba pola. Patološki nalaz na ovom mišiću je kod MuSK MG bolesnika bio u jasnoj korelaciji sa dužinom trajanja bolesti (p=0.013; p<0.05). Naime, bolesnici sa patološkim SFEMG nalazom na ovom mišiću su imali prosečno trajanje MG od 8.2 $\pm$ 7.7 god, dok je kod bolesnika sa urednim SFEMG nalazom bolest prosečno trajala 2.6 $\pm$ 1.3 god. Nasuprot tome, kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti nije uočena ovakva korelacija (p=0.942; p>0.05). U ovoj grupi je bolest prosečno trajala 5.7 $\pm$ 3.1 god. kod bolesnika sa urednim SFEMG pregledom i 6.9 $\pm$ 6.0 god. kod bolesnika sa patološkim SFEMG nalazom na m.EDC. Kod bolesnika sa MuSK MG je evidentirano postojanje jasne korelacije između težine bolesti prema MGFA klasifikaciji i stepena oštećenja neuromišićne transmisije, koji je iskazan kroz srednju vrednost jitter-a (p=0.003; p<0.01), broj pojedinačnih parova potencijala sa povišenim jitter-om (p=0; p<0.01)

i vrednost MCD ( $p=0.003$ ;  $p<0.01$ ) na ovom mišiću. Naime, najniže vrednosti svih analiziranih parametara su zapažene kod bolesnika u remisiji. Isto tako, nađena je statistički značajna korelacija u učestalosti patološkog SFEMG nalaza na m.EDC kod MuSK MG bolesnika i težine bolesti prema MGFA klasifikaciji ( $p=0.02$ ;  $p<0.05$ ). Tako je patološki SFEMG nalaz bio prisutan kod svih bolesnika sa formom bolesti IIA (10; 100%) i IIIA (1; 100%), kod 4 (80%) bolesnika sa formom IIIB, 7 bolesnika (70%) sa formom IIB i svega 1 (20%) bolesnika koji se u trenutku evaluacije nalazio u remisiji bolesti. S druge strane, kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom MG nije nađena korelacija između težine kliničke slike prema MGFA klasifikaciji i svih navedenih pokazatelja SFEMG pregleda na m.EDC ( $p>0.05$ ).

Kada je SFEMG pregledom ispitan m.OO postojanje patološkog nalaza je evidentirano kod 24 (85.7%) MuSK MG i kod 22 (81.5%) AChR MG bolesnika ( $p=0.671$ ;  $p>0.05$ )(Grafikon 10).

Tabela 5. SFEMG m.OO	MuSK MG		AChR MG		Statist. značaj.
	Interval ( $\mu$ s)	X $\pm$ SD ( $\mu$ s)	Interval ( $\mu$ s)	X $\pm$ SD ( $\mu$ s)	
Sr.vredn.jittera	21.6-87.8	45.6 $\pm$ 14.9	30.5-77.9	46.7 $\pm$ 13.5	$p>0.05$
Br.parova pot. sa poviš.jitterom	0 - 19	9.7 $\pm$ 6.6	0 - 20	9.4 $\pm$ 6.0	$p>0.05$
Sr.vred. MCD	21.7-91.9	46.4 $\pm$ 16.1	30.5-78.0	48.1 $\pm$ 13.6	$p>0.05$

Srednja vrednost *jitter*-a je bila slična kod bolesnika obe grupe ( $p=0.416$ ;  $p>0.05$ )(Tabela 5). Kod MuSK MG bolesnika vrednost ovog parametra je iznosila od 21.65 do 87.78 $\mu$ s, prosečno 45.57 $\pm$ 14.90 $\mu$ s, dok su AChR MG bolesnici imali vrednosti od 30.46 do 77.91 $\mu$ s, sa srednjom vrednošću od 46.67 $\pm$ 13.48 $\mu$ s. Od 20 registrovanih parova potencijala, u okviru MuSK MG grupe, registrovano je od 0 do 19 pojedinačnih parova potencijala sa povišenim vrednostima *jitter*-a, sa srednjom vrednošću od 9.7 $\pm$ 6.6. Pacijenti sa AChR pozitivnom formom bolesti su imali sličan nalaz ( $p=0.840$ ;  $p>0.05$ ) od prosečno 9.4 $\pm$ 6.0 pojedinačnih parova potencijala sa povišenim *jitter*-om, sa varijacijama u intervalu od 0 do 20 (Tabela 5). Vrednosti MCD na istom mišiću su se kretale u rasponu od 21.73 do 91.88 $\mu$ s, sa srednjom vrednošću od 46.38 $\pm$ 16.14 $\mu$ s kod MuSK MG pacijenata, dok je u grupi AChR pozitivnih bolesnika ova vrednost prosečno iznosila 48.08 $\pm$ 13.56 $\mu$ s, sa variranjem unutar vrednosti od 30.46 do 78.03 $\mu$ s, što nije bila statistički značajna razlika ( $p=0.676$ ;  $p>0.05$ )(Grafikon 12 i Tabela 5).



Kada je analizirana samo grupa bolesnika sa MuSK MG, zabeleženo je statistički značajno češće ( $p=0.022$ ;  $p<0.05$ ) prisustvo patološkog nalaza na m.OO kod žena (21; 95.5%) u odnosu na muškarce (3; 50%). Za razliku od toga, kod AChR MG bolesnika je prisustvo patološkog nalaza na m.OO zabeleženo kod 20 (83.3%) žena i 2 (66.7%) muškaraca, što nije bilo statistički značajno ( $p=0.474$ ;  $p>0.05$ ). Nije bilo statistički značajne korelacije između patološkog SFEMG nalaza na ovom mišiću i dužine trajanja bolesti ni kod bolesnika sa MuSK MG ( $p=0.437$ ;  $p>0.05$ ) niti kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti ( $p=0.903$ ;  $p>0.05$ ). Takođe, kod MuSK MG bolesnika nije nađena statistički značajna korelacija ni između težine kliničke slike u trenutku pregleda iskazane MGFA klasifikacijom i pokazatelja stepena oštećenja neuromišićne transmisije iskazane kao vrednost srednjeg *jitter*-a ( $p=0.254$ ;  $p>0.05$ ), broja parova potencijala sa povišenim *jitter*-om ( $p=0.270$ ;  $p>0.05$ ), MCD ( $p=0.302$ ;  $p>0.05$ ) i učestalosti patološkog SFEMG nalaza na m.OO ( $p=0.100$ ;  $p>0.05$ ). Isto tako, ni kod bolesnika sa AChR MG nije nađena korelacija između težine kliničke slike prema MGFA klasifikaciji i svih navedenih parametara SFEMG pregleda na m.OO ( $p>0.05$ ).

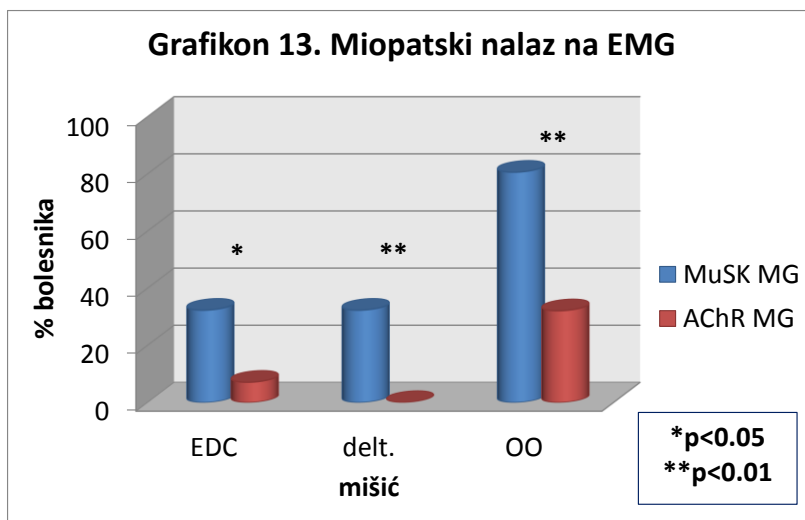
Kada je obavljena sveukupna analiza rezultata SFEMG pregleda na oba ispitana mišića, patološki nalaz je bar na jednom ispitanom mišiću verifikovan kod 28 (90.3%) MuSK pozitivnih i kod 26 (92.9%) AChR pozitivnih bolesnika, dok je kod preostala 2 (6.5%) MuSK i 2 (7.1%) AChR MG bolesnika SFEMG nalaz bio negativan na oba ispitana mišića ( $p=0.727$ ;  $p>0.05$ ). Kod jednog bolesnika (3.2%) sa MuSK MG SFEMG nalaz je bio uredan na m.EDC, dok je na m.OO pregled bio nemoguć usled veoma izražene slabosti mimičnih mišića.

U okviru grupe bolesnika sa povišenim *jitter*-om na SFEMG pregledu, patološki nalaz je evidentiran na oba ispitana mišića kod 19 (67.8%) MuSK MG i 21 (80.8%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti ( $p=0.279$ ;  $p>0.05$ ).

Nije bilo statistički značajne korelacije između niti jednog analiziranog parametra prilikom SFEMG pregleda i titra anti-MuSK At ni za jedan ispitan mišić ( $p>0.05$ ). S druge strane, nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između titra anti-AChR At i broja parova potencijala sa povišenim *jitter*-om na m.EDC ( $p=0.020$ ;  $p<0.05$ ), dok slična korelacija za ostale analizirane parametre SFEMG pregleda ni na m.EDC ni na m.OO nije uočena ( $p>0.05$ ).

#### 4.4.3. EMG pregled

Klasičan EMG pregled je obavljen na m.EDC, m.deltoideus-u i m.OO kod svih analiziranih pacijenata, a rezultati ovog ispitivanja su prikazani na Grafikonu 13.



Postojanje miopatskog EMG nalaza u m.EDC je evidentirano značajno češće ( $p=0.017$ ;  $p<0.05$ ) kod bolesnika sa MuSK pozitivnom MG (10; 32.3%) u odnosu na AChR pozitivne pacijente (2; 7.1%). Kada je pregledan m.deltoideus, miopatski nalaz je verifikovan kod 10 (32.3%) MuSK pozitivnih pacijenata, dok je kod svih 28 AChR MG bolesnika EMG nalaz u ovom mišiću bio uredan i ova razlika je bila visoko statistički značajna ( $p=0.001$ ;  $p<0.01$ ). Prilikom ispitivanja m.OO kod 25 (80.6%) MuSK MG bolesnika je registrovano postojanje miopatije, dok je ovakav nalaz bio prisutan kod samo 9 (32.1%) AChR pozitivnih bolesnika, što je bilo i visoko statistički značajno ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ).

U okviru grupe MuSK MG bolesnika zabeležena je češća pojava miopatskog nalaza kod bolesnika sa početkom bolesti u ranijem životnom dobu, ali samo u mišićima ekstremiteta. Naime, uzrast na početku bolesti kod bolesnika sa miopatskim nalazom u m.EDC je iznosila prosečno  $34.9\pm 14.4$  god, za razliku od bolesnika sa urednim EMG nalazom kod kojih je bolest počinjala u uzrastu od  $46.8\pm 14.6$  god. ( $p=0.036$ ;  $p<0.05$ ). Pacijenti sa miopatskim nalazom

um.deltoideus-u su imali prosečnu starost na početku bolesti od  $35.0 \pm 12.3$  god, dok su bolesnici sa urednim EMG nalazom u ovom mišiću bili dobi od  $46.8 \pm 15.5$  god. na početku bolesti ( $p=0.045$ ;  $p<0.05$ ). Za razliku od ovoga, u m.OO prisustvo miopatskog nalaza nije bilo u korelaciji sa uzrastom na početku bolesti ( $p=0.433$ ;  $p>0.05$ ). Naime, pacijenti koji su u ovom mišiću imali znake miopatije bili su prosečno u uzrastu od  $41.8 \pm 16.5$  god na početku bolesti, dok je kod bolesnika sa urednim EMG nalazom bolest počinjala u uzrastu od prosečno  $48.0 \pm 8.3$  god. Kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom MG nije nađena korelacija između prisustva miopatskog nalaza i uzrasta na početku bolesti ni u jednom ispitanom mišiću ( $p>0.05$ ). S druge strane, kod MuSK MG bolesnika je prisustvo miopatskog nalaza samo u m.OO bilo značajno češće ( $p=0.034$ ;  $p<0.05$ ) kod bolesnika ženskog pola (22; 88%) u odnosu na muški (3; 50%), dok je u mišićima ekstremiteta ova razlika bila bez statističke značajnosti ( $p=0.363$ ,  $p=0.06$ ;  $p>0.05$ ). Kod AChR MG bolesnika nije nađena statistički značajna razlika u pojavi miopatskog nalaza u odnosu na pol ni za jedan ispitan mišić ( $p=0.794$ ,  $p=0.530$ ;  $p>0.05$ ). Prisustvo miopatske lezije kod bolesnika sa MuSK MG nije bilo u korelaciji sa dužinom trajanja bolesti ( $p=0.663$ ,  $p=0.505$ ,  $p=0.980$ ;  $p>0.05$ ), ni sa težinom kliničke slike prema MGFA klasifikaciji u trenutku pregleda ( $p=0.966$ ,  $p=0.157$ ,  $p=0.372$ ;  $p>0.05$ ), kao ni sa primenom kortikosteroidne terapije ( $p=0.795$ ,  $p=0.795$ ,  $p=0.132$ ;  $p>0.05$ ) niti sa titrom anti-MuSK At ( $p=0.741$ ,  $p=0.789$ ,  $p=0.246$ ;  $p>0.05$ ) ni u jednom ispitanom mišiću. Isto tako, kod MuSK MG bolesnika, prisustvo miopatske lezije u m.deltoideus-u i m.OO nije bilo u korelaciji niti sa pozitivnim nalazom ( $p=0.226$ ,  $p=0.063$ ;  $p>0.05$ ) niti vrednostima dekrementa ( $p=0.120$ ,  $p=0.181$ ;  $p>0.05$ ) na TRS na istim mišićima. Kada je analizirana grupa bolesnika sa AChR MG zapaženo je postojanje korelacije između pojave miopatskog nalaza u m.OO i dužine trajanja kortikosteroidne terapije ( $p=0.048$ ;  $p<0.05$ ). Naime, prosečna dužina trajanja ovog vida lečenja je kod bolesnika sa urednim EMG nalazom bila  $3.2 \pm 4.1$  god., dok je kod bolesnika sa znacima miopatije u m.OO ona iznosila prosečno  $8.0 \pm 6.5$  god. S druge strane, prisustvo miopatske lezije u ovom mišiću nije bilo u korelaciji sa dužinom trajanja bolesti ( $p=0.110$ ;  $p>0.05$ ), ni sa težinom kliničke slike prema MGFA klasifikaciji u trenutku pregleda ( $p=0.345$ ;  $p>0.05$ ), kao ni sa primenom kortikosteroidne terapije ( $p=0.628$ ;  $p>0.05$ ) niti sa titrom anti-AChR At ( $p=0.207$ ;  $p>0.05$ ). Prisustvo miopatske lezije u m.EDC kod AChR MG bolesnika nije bilo u korelaciji ni sadužinom trajanja bolesti ( $p=0.632$ ;  $p>0.05$ ), ni sa težinom kliničke slike prema MGFA klasifikaciji u trenutku pregleda ( $p=0.713$ ;  $p>0.05$ ), kao ni sa primenom kortikosteroidne terapije ( $p=0.661$ ;  $p>0.05$ ) niti sa titrom anti-AChR At ( $p=0.382$ ;  $p>0.05$ ).

#### 4.4.4. Analiza obrt-amplituda

TA analiza je obavljena u m.EDC, m.deltoideus-u i m.OO. Kod 1 AChR pozitivnog bolesnika nije bilo moguće uraditi ovaj pregled u m.EDC i m.deltoideus-u zbog izražene slabosti ovih mišića. Iz istog razloga nije bilo moguće obaviti pregled u m.OO ni kod 2 MuSK MG pacijenta. Rezultati ovog ispitivanja su prikazani u Tabeli 6.

Tabela 6. TA analiza	MuSK MG		AChR MG		Stat. znač.
	Interval	X ± SD	Interval	X ± SD	
<b>m. EDC</b>					
Amplituda MUP (µV)	155-946	378.2±209.3	206-980	425.7±178.4	p>0.05
Br.obrta MUP	112-1193	515.2±222.6	173-1050	629.1±191.8	p<0.05
<b>m. deltoideus</b>					
Amplituda MUP (µV)	190-992	372.5±213.8	191-1106	460.1±292.9	p>0.05
Br.obrta MUP	236-1108	547.6±180.6	415-806	592.1±98.0	p>0.05
<b>m. OO</b>					
Amplituda MUP (µV)	143-570	254.1±89.7	114-696	293.1±135.5	p>0.05
Br.obrta MUP	127-1552	713.6±359.8	109-1945	651.3±384.6	p>0.05

Sprovedenom analizom u m.EDC MuSK MG bolesnika dobijene su srednje vrednosti amplitude MUP od 378.2±209.3 µV sa variranjem u opsegu od 155 do 946 µV, dok su se kod AChR MG pacijenata ove vrednosti kretale u rasponu od 206 do 980 µV, sa prosečnom vrednošću od 425.7±178.4 µV, bez postojanja statistički značajne razlike (p=0.360; p>0.05). Broj obrta MUP u istom mišiću se kretao unutar vrednosti od 112 do 1193, sa srednjom vrednošću od 515.2±222.6 unutar grupe MuSK pozitivnih bolesnika, dok su kod AChR MG pacijenata ove vrednosti iznosile prosečno 629.1±191.8, sa variranjem u opsegu od 173 do 1050, što je bilo i statistički značajno (p=0.043; p<0.05).

Vrednosti amplitude MUP u m.deltoideus-u su se kretale u rasponu od 190 do 992 µV, prosečno 372.5±213.8 µV u grupi MuSK MG bolesnika i u opsegu od 191 do 1106µV, prosečno 460.1±292.9 µV u okviru AChR pozitivne grupe obolelih (p=0.195; p>0.05). Broj obrta MUP, MuSK MG pacijenata, se prilikom TA analize m.deltoideus-a, kretao unutar vrednosti od 236 do 1108, prosečno 547.6±180.6, dok je isti parametar kod AChR pozitivnih bolesnika iznosio prosečno 592.1±98.0, sa variranjem u rasponu od 415 do 806 (p=0.259; p>0.05).



U m.OO su se vrednosti amplitude MUP MuSK pozitivnih pacijenata kretale u rasponu od 143 do 570  $\mu\text{V}$ , sa srednjom vrednošću od  $254.1 \pm 89.7 \mu\text{V}$ , dok su AChR MG bolesnici imali vrednosti ovog parametra u opsegu od 114 do 696  $\mu\text{V}$ , prosečno  $293.1 \pm 135.5 \mu\text{V}$  ( $p=0.204$ ;  $p>0.05$ ). Broj obrta MUP prilikom TA analize u m.OO se u okviru grupe MuSK MG bolesnika kretao od 127 do 1552, sa prosečnom vrednošću od  $713.6 \pm 359.8$ , dok su AChR pozitivni pacijenti imali prosečnu vrednost ovog parametra od  $651.3 \pm 384.6$ , sa kretanjem u opsegu od 109 do 1945 ( $p=0.530$ ;  $p>0.05$ ).

#### 4.4.5. Multi MUP analiza

Ovaj pregled je načinjen u m.deltoideus-u i m.OO, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 7.

Tabela 7. Multi MUP	MuSK MG		AChR MG		Stat. znač.
	Interval	X $\pm$ SD	Interval	X $\pm$ SD	
<b>m. deltoideus</b>					
Ampl. MUP ( $\mu\text{V}$ )	329.7-1205.3	$618.4 \pm 223.9$	280.6-829	$523.5 \pm 143.2$	$p>0.05$
Traj. MUP (ms)	3.7-12.2	$6.5 \pm 2.3$	3.4-13.3	$6.4 \pm 2.9$	$p>0.05$
Br.faza MUP	2.4-4.6	$3.6 \pm 0.5$	2.4-4.5	$3.4 \pm 0.6$	$p>0.05$
<b>m. OO</b>					
Ampl. MUP ( $\mu\text{V}$ )	147.8- 810.3	$346.6 \pm 153.8$	132.2- 2271.0	$376.8 \pm 386.7$	$p>0.05$
Traj. MUP (ms)	1.2-8.3	$3.3 \pm 1.3$	1.2-7.5	$3.4 \pm 1.6$	$p>0.05$
Br.faza MUP	2.2-7.8	$3.5 \pm 1.1$	2.0-4.8	$3.3 \pm 0.7$	$p>0.05$

Kada je ispitivan m.deltoideus zabeležena je srednja vrednost amplitude MUP od  $618.4 \pm 223.9 \mu\text{V}$  sa variranjem u opsegu od 329.7 do 1205.3  $\mu\text{V}$  kod MuSK MG bolesnika i raspon od 280.6 do 829  $\mu\text{V}$ , sa prosečnom vrednošću amplitude od  $523.5 \pm 143.2 \mu\text{V}$  u okviru AChR MG grupe ( $p=0.061$ ;  $p>0.05$ ). Srednje trajanje MUP u istom mišiću je iznosilo  $6.5 \pm 2.3$  ms, sa variranjem u opsegu od 3.71 do 12.17 ms u okviru grupe MuSK MG bolesnika, dok se kod AChR pozitivnih pacijenata ova vrednost kretala u rasponu od 3.45 do 13.3 ms, sa prosečnom vrednošću od  $6.4 \pm 2.9$  ms ( $p=0.868$ ;  $p>0.05$ ). Broj faza MUP u m.deltoideus-u je iznosio prosečno  $3.6 \pm 0.5$ , sa variranjem u okviru vrednosti od 2.4 do 4.6 u okviru grupe MuSK MG bolesnika, dok je isti parametar kod AChR pozitivnih MG bolesnika iznosio prosečno  $3.4 \pm 0.6$  sa varijacijama od 2.4 do 4.5 ( $p=0.116$ ;  $p>0.05$ ).

Isto ispitivanje je sprovedeno i u m.OO. Kod MuSK MG bolesnika je registrovana srednja amplituda MUP od  $346.6 \pm 153.8 \mu\text{V}$  sa variranjem vrednosti između 147.8 i 810.3  $\mu\text{V}$ , dok su AChR MG bolesnici imali vrednosti istog parametra u rasponu od 132.2 do 530.10  $\mu\text{V}$ , sa srednjom vrednošću od  $303.8 \pm 109.5 \mu\text{V}$  ( $p=0.227$ ;  $p>0.05$ ). Trajanje MUP se kretalo u vrednostima od 1.23 do 8.30 ms, sa srednjom vrednošću od  $3.3 \pm 1.3$  ms kod MuSK MG

bolesnika i od 1.22 do 7.47 ms, sa prosečnom vrednošću od  $3.4 \pm 1.6$  ms u okviru grupe AChR pozitivnih pacijenata ( $p=0.765$ ;  $p>0.05$ ). Broj faza MUP u m.OO je kod MuSK MG bolesnika prosečno iznosio  $3.5 \pm 1.1$ , sa variranjem vrednosti između 2.2 i 7.8, dok je kod AChR pozitivnih pacijenata zabeleženo kretanje ovog parametra u opsegu od 2.0 do 4.8, prosečno  $3.3 \pm 0.7$  ( $p=0.425$ ;  $p>0.05$ ).

U okviru grupe MuSK MG bolesnika su zabeležene niže vrednosti amplitude MUP u m.OO kod pacijenata sa dužim trajanjem bolesti ( $p=0.031$ ;  $p<0.05$ ), dok na m.deltoideus-u ovakva korelacija nije nađena ( $p=0.919$ ;  $p>0.05$ ). Kod AChR MG bolesnika nije zapaženo postojanje korelacije između dužine trajanja bolesti i vrednosti amplitude MUP ni u m.OO ( $p=0.936$ ;  $p>0.05$ ) ni u m.deltoideus-u ( $p=0.695$ ;  $p>0.05$ ).

#### **4.4.6. Detekcija kasnih potencijala**

Prilikom distalne stimulacije nerva je, neposredno nakon CMAP, registrovano prisustvo kasnih ekstra potencijala kod 3 (9.7%) MuSK pozitivna bolesnika za n.ulnaris i kod 2 (6.5%) MuSK pozitivna pacijenta za n.peroneus, dok ni kod jednog pacijenta iz grupe AChR pozitivne MG nije detektovano prisustvo navedenih kasnih potencijala neposredno nakon CMAP ni za jedan ispitanu nerv. Navedena razlika nije bila statistički značajna (za n.ulnaris  $p=0.091$ ;  $p>0.05$ , za n.peroneus  $p=0.171$ ;  $p>0.05$ ). Svi bolesnici kod kojih je detektovano prisustvo ovih kasnih ekstra potencijala su imali i hipersenzitivnu reakciju na piridostigmin. Treba takođe napomenuti, da u trenutku pregleda 4 MuSK MG bolesnika, kod kojih nije detektovano prisustvo kasnih potencijala, nisu primali antiholinesteraznu terapiju, dok su 2 pacijenta, koja takođe nisu imala kasne potencijale, bila na izuzetno malim dozama piridostigmina od 60 mg dnevno i 30mg dnevno.

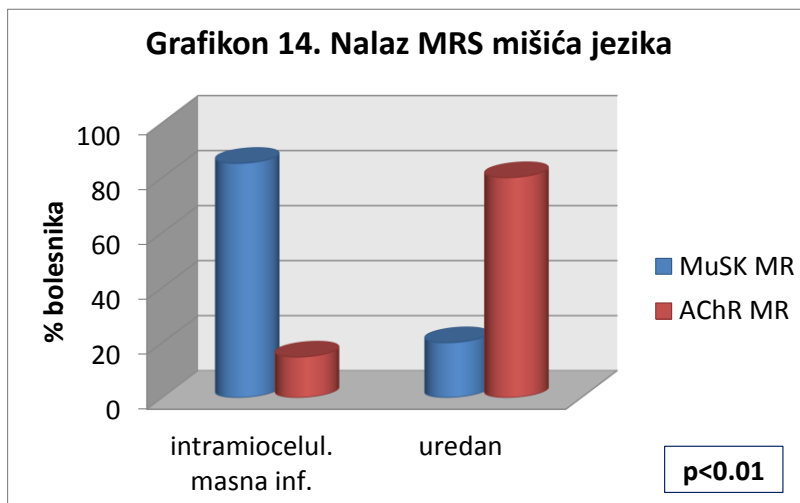
#### **4.5. MRS mišića jezika**

Kliničkim pregledom je verifikovano postojanje atrofije mišića jezika kod 7 (22.6%) pacijenata sa MuSK MG. Sličan nalaz nije registrovan ni kod jednog AChR pozitivnog bolesnika ( $p=0.011$ ;  $p<0.05$ ). Atrofija mišića jezika je bila češće prisutna kod MuSK MG bolesnika sa dužim trajanjem bolesti ( $p=0.025$ ;  $p<0.05$ ). Naime, kod bolesnika sa atrofijom jezika bolest je trajala prosečno  $11.43 \pm 10.94$  god., dok je trajanje MG kod bolesnika bez klinički prisutne atrofije mišića jezika iznosila  $4.98 \pm 4.46$  god. Kortikosteroidna terapija je primenjivana tokom  $6.57 \pm 5.38$  god. kod bolesnika sa atrofijom jezika, dok su bolesnici bez

atrofije jezika primali ovu terapiju tokom  $3.08 \pm 3.66$  god., ali navedena razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0.056$ ;  $p>0.05$ ). Nije nađena statistički značajna razlika u pojavi atrofije mišića jezika u odnosu na pol ( $p=0.596$ ;  $p>0.05$ ), trenutni uzrast ( $p=0.801$ ;  $p>0.05$ ), uzrast na početku bolesti ( $p=0.227$ ;  $p>0.05$ ), težinu kliničke slike ( $p=0.110$ ;  $p>0.05$ ), primenu kortikosteroidne terapije ( $p=0.596$ ;  $p>0.05$ ) niti titra anti-MuSK At ( $p=0.270$ ;  $p>0.05$ ).

U cilju detekcije intramiocelularne masne infiltracije mišića jezika načinjena je MRS srednje zadnjeg dela jezika kod 27 MuSK pozitivnih i 25 AChR pozitivnih bolesnika. Kod preostalih pacijenata obe grupe, uključenih u ovu studiju, navedeni pregled nije mogao biti obavljen usled postojanja metalnih implanta (1 AChR pozitivni bolesnik), klaustrofobije (1 MuSK pozitivni bolesnik) ili su dobijeni zapisi bili neinterpretabilni usled pomeranja jezika tokom pregleda (3 MuSK pozitivna i 2 AChR pozitivna bolesnika).

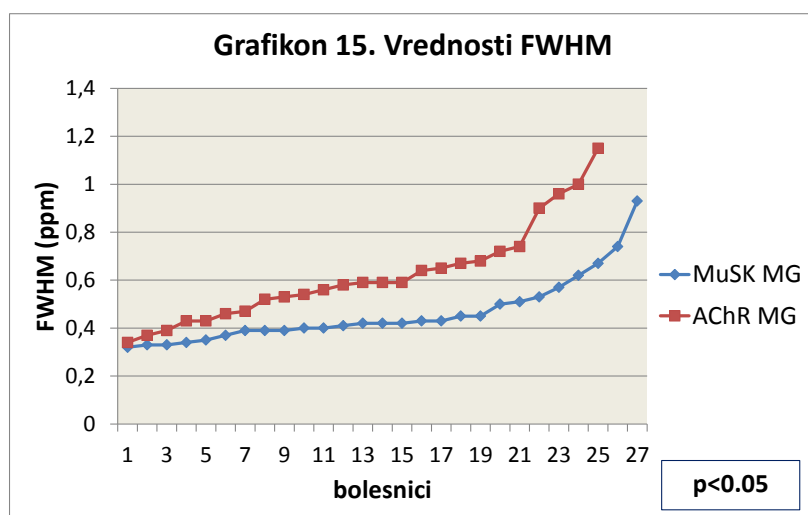
Pozitivan nalaz MRS mišića jezika je interpretiran kao nalaz intramiocelularne masne infiltracije mišića jezika, koja je definisana na osnovu vrednosti FWHM (199). Ovakav nalaz je registrovan kod 23 (85.2%) MuSK pozitivna i kod 5 (20%) AChR pozitivnih bolesnika, dok je kod preostalih pacijenata iz obe ispitane grupe ovaj nalaz bio uredan. Navedena razlika između bolesnika analiziranih grupa je bila visoko statistički značajna ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ) (Grafikon 14).



U okviru grupe MuSK MG bolesnika zapažena je statistički značajno ( $p=0.006$ ;  $p<0.01$ ) veća učestalost intramiocelularne masne infiltracije mišića jezika kod žena (20; 95.2%) u odnosu na muškarce (3; 50%). Sa druge strane, prisustvo intramiocelularne masne infiltracije jezika nije bilo u korelaciji sa uzrastom na početku bolesti ( $p=0.891$ ;  $p>0.05$ ), dužinom trajanja bolesti ( $p=0.867$ ;  $p>0.05$ ), težinom kliničke slike prema MGFA klasifikaciji ( $p=0.406$ ;

$p > 0.05$ ), primenom kortikosteroida ( $p = 0.238$ ;  $p > 0.05$ ) niti vrednostima titra anti-MuSK At ( $p = 0.791$ ;  $p > 0.05$ ). Kod bolesnika sa AChR MG nije nađena statistički značajna razlika u pojavi intramiocelularne masne infiltracije mišića jezika u odnosu na pol ( $p = 0.504$ ;  $p > 0.05$ ). Isto tako, ni u ovoj grupi pacijenat prisustvo intramiocelularne masne infiltracije jezika nije bilo u korelaciji sa uzrastom na početku bolesti ( $p = 0.318$ ;  $p > 0.05$ ), dužinom trajanja bolesti ( $p = 0.301$ ;  $p > 0.05$ ), težinom kliničke slike prema MGFA klasifikaciji ( $p = 0.528$ ;  $p > 0.05$ ), primenom kortikosteroida ( $p = 0.615$ ;  $p > 0.05$ ) niti vrednostima titra anti-AChR At ( $p = 0.895$ ;  $p > 0.05$ ).

Vrednost FWHM se u okviru grupe MuSK pozitivnih bolesnika kretala u rasponu od 0.32 do 0.93 ppm, sa srednjom vrednošću od  $0.46 \pm 0.14$  ppm, dok je isti parametar u grupi AChR pozitivnih bolesnika varirao u opsegu od 0.34 do 1.15 ppm, sa prosečnom vrednošću od  $0.62 \pm 0.20$  ppm. Opisane niže vrednosti FWHM kod bolesnika sa MuSK MG su bile i statistički značajne ( $p = 0.015$ ;  $p < 0.05$ ) (Grafikon 15).

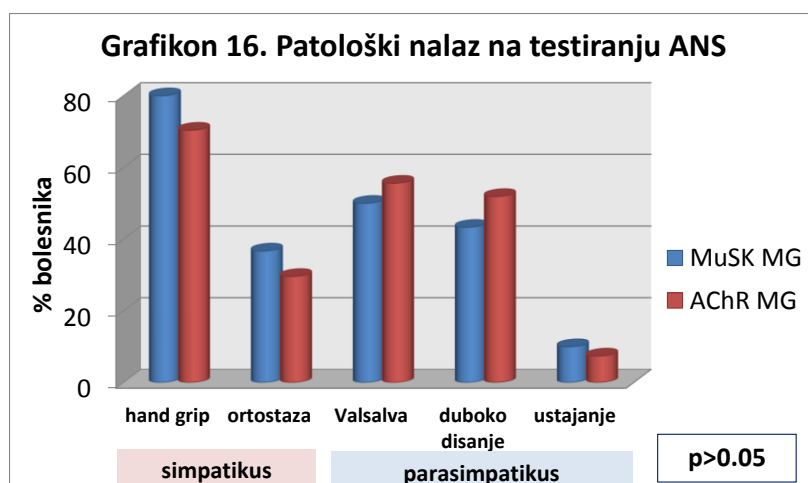


U okviru MuSK MG grupe, nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima FWHM u odnosu na pol bolesnika ( $p = 0.255$ ;  $p > 0.05$ ), uzrast na početku bolesti ( $p = 0.687$ ;  $p > 0.05$ ), uzrast u trenutku evaluacije ( $p = 0.802$ ;  $p > 0.05$ ), dužinu trajanja bolesti ( $p = 0.426$ ;  $p > 0.05$ ), težinu kliničke slike prema MGFA klasifikaciji ( $p = 0.364$ ;  $p > 0.05$ ) niti primenu kortikosteroida ( $p = 0.786$ ;  $p > 0.05$ ). Isto tako, ni kod bolesnika sa AChR MG nije nađena statistički značajna razlika u vrednostima FWHM u odnosu na pol bolesnika ( $p = 0.726$ ;  $p > 0.05$ ), uzrast na početku bolesti ( $p = 0.176$ ;  $p > 0.05$ ), uzrast u trenutku evaluacije ( $p = 0.109$ ;  $p > 0.05$ ), dužinu trajanja bolesti ( $p = 0.740$ ;  $p > 0.05$ ), težinu kliničke slike prema MGFA klasifikaciji ( $p = 0.811$ ;  $p > 0.05$ ) niti primenu kortikosteroida ( $p = 0.825$ ;  $p > 0.05$ ).

#### 4.6. Testiranje autonomnog nervnog sistema

Ispitivanje baroreceptorske senzitivnosti je obavljeno kod 20 MuSK MG i 11 AChR MG bolesnika. Kod ostalih pacijenata uključenih u studiju ovaj pregled nije obavljen iz tehničkih razloga. Kod bolesnika sa MuSK MG je registrovana srednja vrednost ovog parametra od  $8.72 \pm 3.75$  ms/mmHg, sa variranjem u opsegu od 3.5 do 18.20 ms/mmHg, dok je kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti zabeleženo kretanje vrednosti navedenog parametra u rasponu od 3.3 do 12.3 ms/mmHg, prosečno  $9.16 \pm 2.60$  ms/mmHg. Iako je uočena tendenca nižih vrednosti BRS kod MuSK u odnosu na AChR bolesike, zapažena razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.730$ ;  $p>0.05$ ). Obzirom da je normalna vrednost BRS preko 9.3 ms/mmHg, uredan nalaz je bio prisutan kod po 6 bolesnika i iz MuSK MG (30%) i iz AChR MG grupe (54.5%), bez postojanja statističke značajnosti ( $p=0.179$ ;  $p>0.05$ ).

Ostali pokazatelji funkcije ANS su ispitani kod 30 MuSK MG i 27 AChR MG bolesnika i dobijeni rezultati su prikazani na Grafikonu 16. Kod jedne pacijentkinje sa MuSK pozitivnom formom bolesti ispitivanje nije sprovedeno jer pacijentkinja nije mogla da ga izdrži, dok je nalaz jedne bolesnice sa AChR MG bio neinterpretabilan usled velikog broja ekstrasistola.

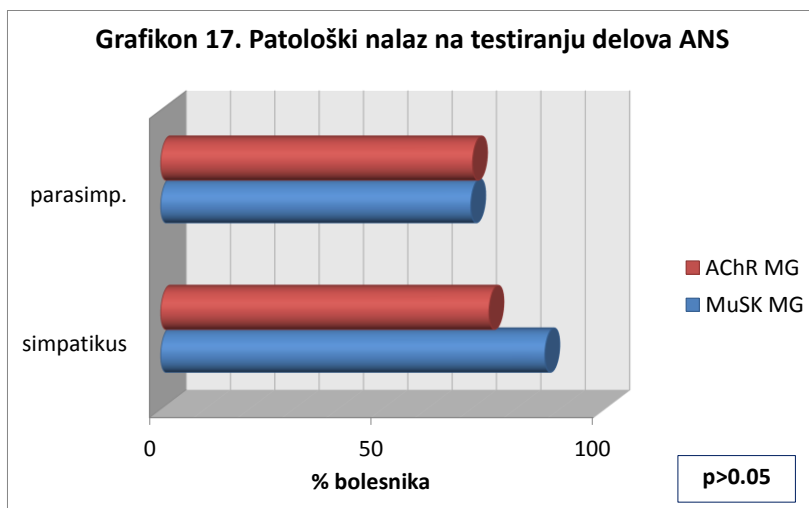


Kao pokazatelji funkcije simpatičkog dela ANS analizirani su hand grip i ortostaza test, kojima se ispituje varijabilnost krvnog pritiska kao odgovor na stezanje ruke i ortostatski položaj. Hand grip test je bio patološki kod 24 (80%) MuSK i 19 (70.4%) AChR MG bolesnika, ali ova razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.409$ ;  $p>0.05$ ). Pozitivan ortostaza test je evidentiran kod 11 (36.7%) bolesnika sa MuSK pozitivnom i 8 (29.6%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti, takođe bez statistički značajne razlike ( $p=0.574$ ;  $p>0.05$ ). Patološki nalaz na oba navedena testa kod bolesnika sa MuSK MG nije bio u korelaciji sa uzrastom na početku bolesti (za hand grip test  $p=0.094$ ; za ortostaza test  $p=0.056$ ;  $p>0.05$ ) niti

sa uzrastom bolesnika u trenutku testiranja (za hand grip test  $p=0.167$ ; za ortostaza test  $p=0.063$ ;  $p>0.05$ ). S druge strane, hand grip test je bio u korelaciji sa dužinom trajanja MG ( $p=0.008$ ;  $p<0.01$ ), dok kod ortostaza testa ovakva korelacija nije uočena ( $p=0.949$ ;  $p>0.05$ ). Naime, kod MuSK MG bolesnika sa patološkim hand grip testom bolest je trajala prosečno  $5.6\pm 7.4$  god., dok je dužina trajanja bolesti kod pacijenata sa urednim nalazom ovog testa iznosila  $9.1\pm 3.4$  god. Kod bolesnika sa AChR MG nije bilo korelacije između patoloških nalaza hand grip i ortostaza testa i uzrasta na početku bolesti ( $p=0.517$ ,  $p=0.679$ ;  $p>0.05$ ), uzrasta u trenutku evaluacije ( $p=0.516$ ,  $p=0.918$ ;  $p>0.05$ ) i dužine trajanja bolesti ( $p=0.548$ ,  $p=0.321$ ;  $p>0.05$ ).

Kao indikator parasimpatičke funkcije su ispitani varijabilnost srčane frekvence kao odgovor na ustajanje, duboko disanje i Valsalva manevar. Patološki test sa Valsalva maneuvrom je zabeležen kod sličnog broja MuSK (15; 50%) i AChR (15; 55.6%) MG bolesnika ( $p=0.675$ ;  $p>0.05$ ). Test dubokog disanja je bio pozitivan kod 13 (43.3%) bolesnika sa MuSK pozitivnom i 14 (51.9%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti, bez postojanja statistički značajne razlike između ove dve grupe obolelih ( $p=0.520$ ;  $p>0.05$ ). Test ustajanja je retko bio patološki u okviru obe analizirane grupe pacijenata ( $p=0.730$ ;  $p>0.05$ ) i to kod samo 3 (10%) MuSK MG i 2 (7.4%) AChR MG bolesnika. Kada su navedeni testovi analizirani kod MuSK MG bolesnika, zapaženo je postojanje statistički značajne korelacije između patološkog testa dubokog disanja i uzrasta na početku bolesti ( $p=0.004$ ;  $p<0.01$ ), kao i uzrasta bolesnika u trenutku testiranja ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ). Naime, navedeni test je bio češće patološki kod starijih pacijenata. Patološki test ustajanja je bio u korelaciji samo sa uzrastom na početku bolesti ( $p=0.029$ ;  $p<0.05$ ), ali ne i sa trenutnim uzrastom ( $p=0.071$ ;  $p>0.05$ ), dok patološki Valsalva test nije bio u korelaciji ni sa uzrastom na početku bolesti ( $p=0.871$ ;  $p>0.05$ ) ni sa trenutnim uzrastom ( $p=0.338$ ;  $p>0.05$ ) analiziranih MuSK MG bolesnika. S druge strane, ni jedan od navedenih testova nije bio u korelaciji sa dužinom trajanja bolesti ( $p=0.586$ ,  $p=0.211$ ,  $p=0.513$ ;  $p>0.05$ ). U okviru grupe AChR MG bolesnika, nije bilo korelacije u patološkim nalazima navedenih testova parasimpatičke funkcije i uzrasta na početku bolesti, uzrasta u trenutku evaluacije i dužine trajanja MG ( $p>0.05$ ).

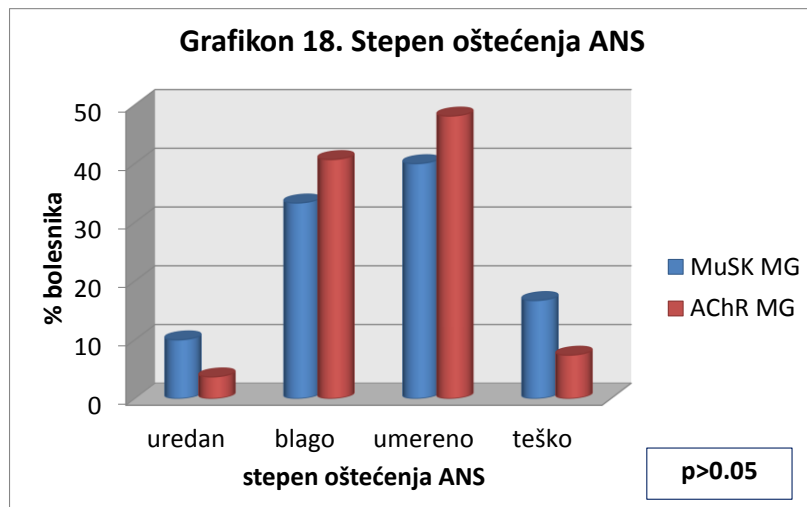
Patološki nalaz na nekom od testova za ispitivanje funkcije simpatičkog nervnog sistema je bio prisutan kod 26 (86.7%) bolesnika sa MuSK i 20 (74.1%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti ( $p=0.229$ ;  $p>0.05$ ), dok je patološki nalaz na nekom od testova za ispitivanje funkcije parasimpatičkog nervnog sistema evidentiran kod 21 (70%) MuSK i 19 (70.4%) AChR MG pacijenata ( $p=0.976$ ;  $p>0.05$ ) (Grafikon 17).



U okviru grupe MuSK MG bolesnika, patološki nalaz na testovima parasimpatičke funkcije je bio češće prisutan kod starijih bolesnika i to i na početku bolesti ( $p=0.013$ ;  $p<0.05$ ) i u trenutku aktuelne evaluacije ( $p=0.002$ ;  $p<0.01$ ), dok ovakva korelacija nije uočena kada je u pitanju testiranje funkcije simpatičkog dela ANS ( $p=0.061$  i  $p=0.137$ ;  $p>0.05$ ). S druge strane, patološki nalaz na testovima funkcije simpatikusa je bio u korelaciji sa dužinom trajanja bolesti ( $p=0.022$ ;  $p<0.05$ ), za razliku od pokazatelja parasimpatičke funkcije ( $p=0.756$ ;  $p>0.05$ ). Kod bolesnika sa AChR MG nije bilo korelacije između patološkog nalaza na testovima simpatičke i parasimpatičke funkcije i uzrasta na početku bolesti, uzrasta u trenutku pregleda i dužine trajanja MG ( $p>0.05$ ).

Ukupan skor autonomne disfunkcije se kod MuSK MG bolesnika kretao u rasponu od 0 do 9, sa srednjom vrednošću od  $4.17 \pm 2.51$ . AChR MG bolesnici su imali vrednosti istog parametra u opsegu od 0 do 8, prosečno  $3.89 \pm 2.06$ . Navedena razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.893$ ;  $p>0.05$ ). U odnosu na vrednosti ukupnog skora autonomne disfunkcije, registrovano je postojanje urednog nalaza (vrednosti skora 0 i 1) kod 3 (10%) MuSK i 1 (3.7%) AChR MG bolesnika, blaga autonomna disfunkcija (skor 2 i 3) je zabeležena kod 10 (33.3%) MuSK i 11 (40.7%) AChR MG bolesnika, umerenu autonomnu disfunkciju (skor od 4 do 6) je imalo 12 (40%) MuSK i 13 (48.1%) AChR MG bolesnika, dok je 5 (16.7%) bolesnika sa MuSK i 2 (7.4%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti imalo znake teške autonomne disfunkcije (skor od 7 do 10) (Grafikon 18). U okviru grupe MuSK MG bolesnika, vrednosti ukupnog skora autonomne disfunkcije su bile u korelaciji sa uzrastom bolesnika i na početku bolesti ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ) i u trenutku evaluacije za ovu studiju ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ). Tako su više vrednosti skora zabeležene kod starijih bolesnika. Nasuprot tome, kod AChR MG bolesnika vrednosti ukupnog skora autonomne disfunkcije nisu bile u korelaciji sa

uzrastom bolesnika na početku MG ( $p=0.153$ ;  $p>0.05$ ), uzrastom u trenutku evaluacije ( $p=0.150$ ;  $p>0.05$ ) niti dužinom trajanja MG ( $p=0.799$ ;  $p>0.05$ ).



Ni u okviru grupe MuSK MG bolesnika niti AChR MG bolesnika, nije nađena korelacija između nalaza ni jednog od sprovedenih testova autonomne disfunkcije sa težinom bolesti u trenutku pregleda prema MGFA klasifikaciji niti sa titrom odgovarajućih, za bolest specifičnih, antitela ( $p > 0.05$ ).

#### 4.7. HLA tipizacija

Rezultati HLA tipizacije analiziranih MuSK MG bolesnika su prikazani na Tabeli 8 i 9.

Tabela 8. Učestalost HLA-DRB1 i HLA-DQB1 alelskih grupa kod bolesnika sa MuSK MG

Alelska grupa	Broj alela (n=62)	Učestalost alela	Broj pacijenata (N = 31)	Učestalost fenotipa
DRB1*01	3	0,048387097	3	9.68%
DRB1*03	5	0,080645161	5	16.13%
DRB1*04	2	0,032258065	2	6.45%
DRB1*07	7	0,112903226	7	22.58%
DRB1*08	3	0,048387097	3	9.68%
DRB1*09	0	0	0	0
DRB1*10	0	0	0	0
DRB1*11	7	0,112903226	7	22.51%
DRB1*12	2	0,032258065	2	6.45%
DRB1*13	0	0	0	0
DRB1*14	11	0,177419355	11	35,48%
DRB1*15	4	0,064516129	4	12.90%
DRB1*16	18	0,290322581	17	54.84%



<b>DQB1*02</b>	12	0,19354839	12	38.70%
<b>DQB1*03</b>	11	0,17741935	9	29.03%
<b>DQB1*04</b>	3	0,0483871	3	4.40%
<b>DQB1*05</b>	32	0,51612903	26	83.87%
<b>DQB1*06</b>	4	0,06451613	4	12.90%

Zapažena je najveća učestalost DRB1\*14, DRB1\*16 i DQB1\*05 alela u populaciji obrađenih bolesnika sa MuSK pozitivnom MG. S druge strane, ni kod jednog bolesnika nije registrovano prisustvo alela DRB1\*13.

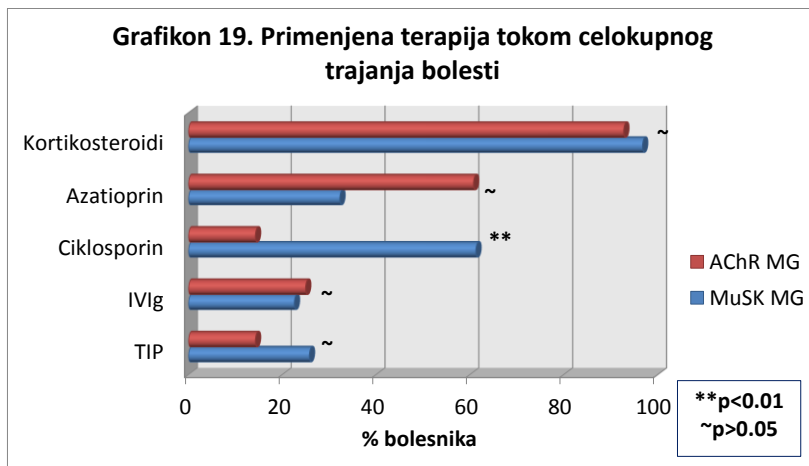
Tabela 9. Distribucija HLA-DQB1 udurženih haplotipova kod bolesnika sa MuSK MG

<b>Haplotip</b>	<b>Učestalost haplotipa N=31, n=62</b>	<b>Broj bolesnika (N=31)</b>
<b>DRB1*16-DQB1*0502</b>	0,274194	17
<b>DRB1*14-DQB1*0503</b>	0,177419	11
<b>DRB1*07-DQB1*0202</b>	0,112903	7
<b>DRB1*11-DQB1*0301</b>	0,112903	7
<b>DRB1*03-DQB1*0201</b>	0,080645	5
<b>DRB1*01-DQB1*0501</b>	0,048387	3
<b>DRB1*08-DQB1*0402</b>	0,048387	3
<b>DRB1*04-DQB1*0302</b>	0,032258	2
<b>DRB1*12-DQB1*0301</b>	0,032258	2
<b>DRB1*15-DQB1*0601</b>	0,032258	2
<b>DRB1*15-DQB1*0602</b>	0,032258	2
<b>DRB1*14-DQB1*0501</b>	0,016129	1

Najčešće registrovani haplotipovi kod obrađenih bolesnika sa MuSK MG su bili DRB1\*16-DQB1\*0502 (prisutan kod 54.8% bolesnika) i DRB1\*14-DQB1\*0503 (prisutan kod 35.5% bolesnika).

#### **4.8. Primenjena terapija**

Terapija primenjena u lečenju bolesnika obe analizirane grupe je prikazana na Grafikonu 19.

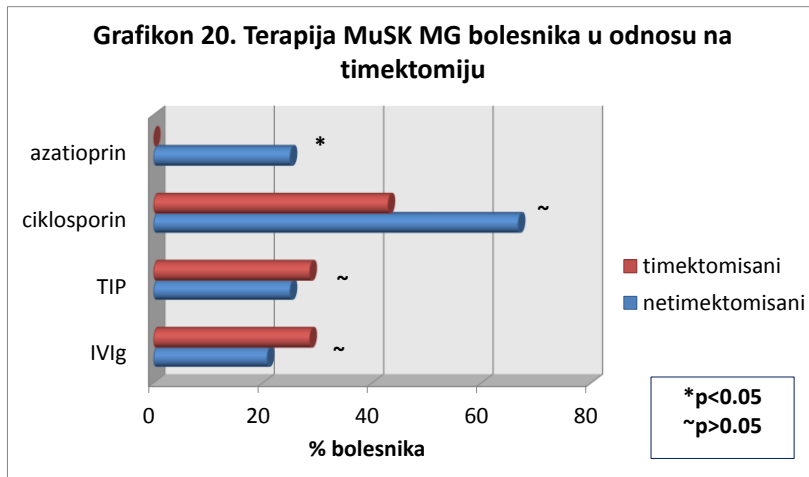


U cilju lečenja MG, kortikosteroidna terapija je primenjena kod svih bolesnika obe ispitane grupe. U trenutku pregleda tri bolesnika, jedan sa MuSK i dva sa AChR pozitivnom MG, nisu nikada primala kortikosteroide u cilju lečenja bolesti jer su u pitanju bili tek dijagnostikovani bolesnici. Njima je neposredno nakon pregleda započeta kortikosteroidna terapija. U trenutku pregleda je 22 (71%) bolesnika sa MuSK MG i 20 (71.4%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti primalo neki kortikosteroidni lek, dok je kod 8 (25.8%) bolesnika sa MuSK MG i kod 6 (21.4%) bolesnika sa AChR MG ova terapija primenjena u ranijem toku bolesti, ali je obustavljena usled postizanja remisije ili MM ( $p=0.755$ ;  $p>0.05$ ).

Pored kortikosteroidne terapije, kao imunosupresivne terapije prvog izbora, određenom broju bolesnika je morao biti ordiniran i azatioprin u cilju postizanja boljeg terapijskog efekta. Tako je, u trenutku evaluacije 6 (19.4%) MuSK pozitivnih bolesnika primalo ovaj lek, 4 (12.9%) bolesnika su ga primala ranije tokom trajanja bolesti, dok je kod 6 (19.4%) pacijenata ovaj lek morao biti obustavljen usled razvoja intolerancije. Skoro polovina ispitanih MuSK MG bolesnika (15; 48.4%) nikada tokom svoje bolesti nije dobijala azatioprin. S druge strane, u trenutku pregleda skoro polovina analiziranih AChR pozitivnih bolesnika (12; 42.9%) je dobijala ovaj lek, njih 5 (17.9%) ga je dobijalo ranije tokom trajanja bolesti, kod 3 (10.7%) bolesnika je on obustavljen usled razvoja intolerancije, dok ga 8 (28.6%) AChR pozitivnih bolesnika nikada nije primalo. Međutim, i pored uočene razlike u smislu češće primene azatioprina kod AChR nego kod MuSK MG bolesnika, ova razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0.164$ ;  $p>0.05$ ), verovatno usled malog broja ispitanika.

Kada se analizira samo grupa MuSK MG bolesnika, zapaženo je da je češća primena azatioprina bila neophodna kod bolesnika koji nisu timektomisani u odnosu na bolesnike kod kojih je sprovedena ova operacija ( $p=0.042$ ;  $p<0.05$ )(Grafikon 20). Naime, u trenutku

evaluacije je 6 (25%) netimektomisanih MuSK MG pacijenata dobijalo azatioprin, dok ovaj lek u trenutku pregleda nije primao ni jedan timektomisani pacijent. U ranijem toku bolesti, ovaj lek je bio deo terapijskog protokola kod 3 (42.9%) timektomisana i 1 (4.2%) netimektomisanog bolesnika, dok je kod 1 (14.3%) timektomisanog i 5 (20.8%) netimektomisanih bolesnika ovaj lek morao biti isključen iz terapije usled razvoja intolerancije. Tri (42.9%) timektomisana i 12 (50%) netimektomisanih bolesnika nikada nije dobijalo azatioprin u terapiji svoje bolesti.



U slučaju neadekvatnog terapijskog učinka kortikosteroida i azatioprina, ili usled razvoja intolerancije na azatioprin, ovaj lek je najčešće zamenjen ciklosporinom. Tako je on primenjen u lečenju čak 19 (61.3%) MuSK pozitivnih, za razliku od svega 4 (14.3%) AChR pozitivna bolesnika, što je bilo i visoko statistički značajno ( $p=0$ ;  $p<0.01$ ).

U okviru grupe MuSK MG bolesnika, ciklosporin je takođe češće bio neophodan u terapiji netimektomisanih u odnosu na timektomisane bolesnike, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0.182$ ;  $p>0.05$ ) verovatno usled malog broja ispitanika. Naime, u trenutku evaluacije, ovaj lek je primalo 3 (42.9%) timektomisanih i 16 (66.7%) netimektomisanih bolesnika sa MuSK pozitivnom formom bolesti (Grafikon 20).

U periodima izraženih pogoršanja simptoma bolesti ili u određenim slučajevima kao deo dugotrajne terapije usled terapijskog neuspeha sa navedenom imunosupresivnom terapijom, izvesnom broju bolesnika su u cilju lečenja rađene TIP ili su primali IVIg. Obe navedene terapijske intervencije su sprovedene na sličnom broju MuSK MG i AChR MG bolesnika. Tako su TIP bile deo terapijskog protokola kod 8 (25.8%) bolesnika sa MuSK i 4 (14.3%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom MG ( $p=0.272$ ;  $p>0.05$ ). IVIg je tokom trajanja bolesti

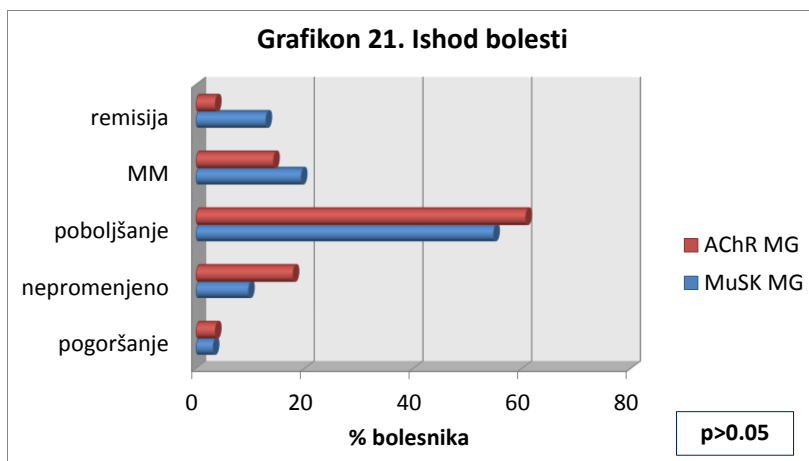
primilo 7 (22.6%) bolesnika iz grupe pacijenata sa MuSK MG, kao i 7 (25%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti ( $p=0.827$ ;  $p>0.05$ ).

Isključivo TIP su primenjivane kod 6 (19.3%) MuSK i 1 (3.6%) AChR MG bolesnika, IVIg je u nekom trenutku tokom trajanja bolesti primalo 5 (16.1%) MuSK i 4 (14.3%) AChR pozitivna bolesnika, dok je kombinovana terapija TIP i IVIg bila neophodna kod 2 (6.5%) bolesnika sa MuSK i kod 3 (10.7%) bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti. Više od polovine analiziranih MuSK MG pacijenata (18; 58.1%) nije nikada primalo IVIg niti je bilo podvrgnuto TIP, dok je procenat ovakvih bolesnika u AChR pozitivnoj grupi bio znatno veći (20; 71.4%), ali sve navedene razlike nisu bile statistički značajne ( $p=0.279$ ;  $p>0.05$ ).

Kada su analizirani samo bolesnici iz MuSK pozitivne grupe, u odnosu na činjenicu da li su podvrgnuti operativnom lečenju ili ne, sličan broj pacijenata obe grupe je imao TIP (2; 28.6% timektomisanih i 6; 25% netimektomisanih bolesnika) ( $p=0.849$ ;  $p>0.05$ ) i primao IVIg (2; 28.6% timektomisanih i 5; 20.8% netimektomisanih bolesnika) ( $p=0.667$ ;  $p>0.05$ ) kao deo svog terapijskog protokola (Grafikon 20).

#### ***4.9. Ishod bolesti***

Na primenjenu terapiju je zabeležen pozitivan odgovor kod najvećeg broja pacijenata obe ispitane grupe sa povoljnim ishodom bolesti ( $p=0.635$ ;  $p>0.05$ )(Grafikon 21). Tako je u grupi MuSK MG bolesnika kod najvećeg broja obolelih (17; 54.8%) došlo do poboljšanja stanja, njih 6 (19.4%) je imalo MM, a u remisiji se nakon perioda praćenja nalazilo 4 (12.9%) bolesnika. Nepromenjeno stanje je zabeleženo kod 3 (9.7%) pacijenta, dok je do pogoršanja došlo samo kod 1 (3.2%) ispitanog bolesnika. U okviru AChR pozitivne grupe, zabeležena je slična distribucija pacijenata u odnosu na ishod bolesti. Naime, kod 17 (60.7%) bolesnika iz ove grupe je zabeleženo poboljšanje, kod 4 (14.3%) MM, a jedan (3.6%) bolesnik je bio u remisiji bolesti. Nepromenjeno stanje je bilo prisutno kod 5 (17.9%) bolesnika, a pogoršanje stanja je registrovano kod samo 1 (3.6%) AChR pozitivnog pacijenta.



Kada su analizirani samo MuSK MG pacijenti u odnosu na to da li su podvrgnuti timektomiji, zabeležen je sličan ishod bolesti kod timektomisanih i netimektomisanih MuSK MG bolesnika ( $p=0.888$ ;  $p>0.05$ ). Tako se u remisiji bolesti nalazio 1 (14.3%) timektomisani i 3 (12.5%) netimektomisana bolesnika, MM su bile prisutne kod 2 (28.6%) timektomisana i 4 (16.7%) netimektomisana pacijenta, dok je poboljšanje stanja zabeleženo kod 3 (42.9%) timektomisana i 14 (58.3%) netimektomisanih MuSK pozitivnih bolesnika. Nepromenjeno stanje je evidentirano kod samo 1 (14.3%) timektomisanih i 2 (8.3%) netimektomisanih pacijenata, dok pogoršanje stanja nije registrovano ni kod jednog timektomisanih bolesnika, već samo kod 1 (4.2%) netimektomisanih pacijenata sa MuSK MG.

Ipak, iako je kod najvećeg broja analiziranih MuSK MG bolesnika zabeležen dobar ishod bolesti, najveći broj ovih pacijenata (27; 87.1%) je bio zavistan od imunosupresivne terapije, koja im je bila neophodna u cilju zadovoljavajuće kontrole bolesti.

#### **4.10. Udružena pojava drugih bolesti sa MG**

Prisustvo drugih bolesti je evidentirano kod 22 (71%) bolesnika sa MuSK MG i kod 15 (53.6%) AChR pozitivnih bolesnika i navedena razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.168$ ;  $p>0.05$ ).

U okviru grupe MuSK bolesnika sa udruženim drugim bolestima, njih 9 (40.9%) je imalo udruženu pojavu neke druge autoimune bolesti zajedno sa MG, dok je kod 13 (59.1%) zabeleženo udruženo javljanje druge bolesti neautoimune prirode. Od udruženih autoimunih bolesti, u okviru ove grupe pacijenata, zabeležena je udružena pojava: primarne bilijarne ciroze, alergija na lekove, diabetes mellitusa tip 1, reumatoidnog artritisa, sistemskog eritemskog lupusa, Henoch Schoenlein purpure, hipotireoze i psorijaze.

Kod AChR pozitivnih MG pacijenata sa udruženim drugim bolestima, ostale autoimune bolesti su bile prisutne kod 7 (46.7%) bolesnika, dok je 8 (53.3%) pacijenata imalo udruženu pojavu neke neautoimune bolesti zajedno sa MG. Kod ove grupe pacijenata, udruženo sa MG su se javljali: hipo i hipertireoza, reumatoidni artritis, alergije na lekove i atopijski dermatitis.

Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti javljanja drugih autoimunih bolesti udruženo sa MG između bolesnika sa MuSK pozitivnom i AChR pozitivnom formom bolesti ( $p=0.729$ ;  $p>0.05$ ).

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Demografske i kliničke osobine

MuSK pozitivna MG je poseban klinički entitet koji se u značajnoj meri razlikuje od AChR pozitivne forme bolesti. U cilju što adekvatnije obrade i lečenja ove grupe bolesnika, smatrali smo da bi bilo veoma korisno analizirati različite kliničke, elektrofiziološke, patogenetske i imunološke specifičnosti ove forme bolesti. U studiju je uključen 31 pacijent sa MuSK pozitivnim oblikom MG, čije su sve navedene specifičnosti bolesti detaljno analizirane i upoređene sa AChR pozitivnim MG bolesnicima. Pacijenti obe analizirane grupe su međusobno mečovani po polu, uzrastu, dužini trajanja bolesti i težini kliničke slike.

U grupi analiziranih MuSK MG bolesnika registrovana je jasna predominacija ženskog pola u odnosu 4.2:1, što je u saglasnosti sa rezultatima dosadašnjih istraživanja (6, 8, 89). Međutim, postoje i objavljene serije MuSK MG bolesnika sa podjednakom distribucijom učestalosti bolesti među polovima (90).

Bolest se može javiti u bilo kom uzrastu, od godinu dana do duboke starosti, ali najčešće počinje u mlađem životnom dobu (89, 90, 133). U analiziranoj grupi naših MuSK MG bolesnika, nije registrovana ovakva veća učestalost oboljevanja u mlađem životnom dobu. Naime, četvrtina analiziranih pacijenata je bila u uzrastu od 51-60 god. na početku bolesti, kod 23% bolesnika su se prve tegobe javile u četvrtoj deceniji života, a kod 16% obolelih su se prve tegobe javile u četrdesetim godinama života. Oboljevanje u veoma ranom i veoma kasnom životnom dobu je bilo ređe. Prosečna starost analiziranih MuSK MG bolesnika na početku bolesti je iznosila 43 god, a nešto manje od polovine obolelih je imalo rani početak bolesti, pre 40.god. života. Rezultati naše studije su, međutim, u korelaciji sa studijom objavljenom na velikoj seriji MuSK MG bolesnika (175) u kojoj je zapaženo nešto kasnije oboljevanje žena sa MuSK MG u odnosu na pacijentkinje sa AChR pozitivnom formom bolesti.

Većina MuSK MG pacijenata se u pogledu kliničkog ispoljavanja bolesti u izvesnoj meri razlikuje u odnosu na bolesnike sa AChR pozitivnom formom bolesti. Naime, MuSK MG se karakteriše generalno težom kliničkom slikom sa dominantnom afekcijom okulobulbarnih, mimičnih mišića, mišića vrata i respiratornih mišića (8, 89, 90) sa češćom pojavom mijastenične krize nego kod AChR pozitivnih bolesnika (125). S druge strane, najblaža forma

bolesti u smislu isključive zahvaćenosti ekstraokularnih mišića je vrlo retka kod bolesnika sa MuSK MG i svodi se na pojedinačne prikaze slučajeva (126). U našoj grupi obrađenih MuSK MG bolesnika nije bilo slučajeva isključivo okularne forme bolesti. Kod najvećeg broja naših bolesnika sa MuSK MG, bolest je počinjala pojavom okulobulbarne slabosti i zamorljivosti, koja je bila prisutna kod oko 2/3 bolesnika i koja je i kasnije tokom celokupnog trajanja bolesti, zajedno sa izraženom slabošću mimičnih mišića, perzistirala kao predominantna klinička manifestacija. U trenutku pregleda, u vreme uključenja u ovu studiju, približno polovina analiziranih bolesnika je imala predominantnu slabost mimične muskulature i mišića ekstremiteta, dok su afekcija ekstraokularnih i bulbarnih mišića evidentirane kod oko četvrtine obolelih. I druge studije su potvrdile čestu afekciju mimičnih mišića kod bolesnika sa MuSK MG (6). Slabost mišića ekstremiteta nije dominantna klinička prezentacija kod MuSK MG pacijenata, za razliku od bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti, kod kojih je ona znatno češće prisutna. U većini dosadašnjih studija je ekstremitetna slabost registrovana kod oko 30% do 40% slučajeva (6, 80, 128), što je u saglasnosti sa rezultatima naše studije. Međutim, u studiji *Oh*-a i saradnika, slabost mišića ekstremiteta je bila prisutna u čak 80% slučajeva (129), ali uz jasno prisutnu afekciju i ostalih mišića, prvenstveno ekstraokularnih, orofaringealnih i mimičnih. U dosadašnjim istraživanjima je objavljeno da je respiratorna slabost često prisutna i to kod oko polovine obolelih (129, 133), ali je u našoj studiji ona bila prisutna kod svega 12% bolesnika. Razlog za ovakvu diskrepancu može biti brza dijagnostika i rana, adekvatna i agresivna imunosupresivna terapija koju primenjujemo i čime je verovatno i sprečeno češće nastajanje najteže forme bolesti. Predominantna afekcija mišića vrata kod naših analiziranih bolesnika je bila retka i tokom celokupnog trajanja bolesti je bila prisutna kod svega 13% obolelih, dok su drugi autori objavili češće prisustvo slabosti ovih mišića, koja se kretala čak od 70% (90) do 90% (133). Šta više, ovo je bila klinička prezentacija prisutna kod najvećeg broja obolelih u studiji *Sanders*-a i saradnika (8). Mogući razlog ovakve diskrepance naših rezultata u odnosu na rezultate drugih autora je činjenica da smo mi analizirali distribuciju dominantno zahvaćenih mišića tokom trajanja bolesti, a ne svih zahvaćenih mišića čak i u blagom stepenu, što je bio slučaj sa prethodno citiranim studijama.

Izražena atrofija mišića jezika i mimičnih mišića je opisana kao jedna od osnovnih karakteristika MuSK MG od strane grupe iz Oksforda (130). U grupi naših MuSK MG pacijenata klinički znaci atrofije navedenih mišića su bili prisutni samo kod 7 bolesnika, ali je MRS mišića jezika, atrofija ovog mišića verifikovana kod čak 85% pacijenata. Slična, retka



pojava klinički manifestne atrofije mišića lica i jezika je opisana i na velikoj grupi MuSK MG bolesnika u SAD (133).

MuSK MG se, od strane većine autora, smatra težom bolešću u odnosu na AChR pozitivnu MG (6, 119, 133). U skladu sa ovakvim nalazima su bili i rezultati naše studije u kojoj je prisustvo teških formi bolesti zabeleženo kod čak 80% MuSK MG bolesnika u najtežoj fazi bolesti.

Titar anti-MuSK At koreliše sa težinom bolesti (85), dok titar anti-AChR At ne koreliše sa težinom bolesti kod različitih pacijenata, ali prati težinu kliničke slike kod svakog pojedinačnog bolesnika (62). I u grupi naših MuSK MG bolesnika, titar anti-MuSK At je korelirao sa težinom bolesti ali iskazanom samo QMGS, a ne i pomoću MGFA klasifikacije, dok kod bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti nije bilo korelacije između težine kliničke slike i titra ovih antitela.

## ***5.2. PH promene timusa***

PH promene timusa bolesnika sa MG se značajno razlikuju u odnosu na prisustvo različitih za bolest specifičnih antitela.

LFH timusa je najčešća promena timusa kod obolelih od MG. Najčešće se javlja udruženo sa anti-AChR At (u oko 2/3 slučajeva), znatno ređe kod SNMG bolesnika (u oko 1/3 obolelih), dok je kod bolesnika sa MuSK MG veoma retka (89, 90), a u dosadašnjim patološkim studijama, nije opisana (93). Ovakvi nalazi su u saglasnosti i sa rezultatima ove studije, u kojoj je prisustvo LFH registrovano kod čak 80% AChR MG pacijenata i ni kod jednog MuSK MG bolesnika.

Naime, kod MuSK pozitivnih bolesnika i T i B limfociti su prisutni u limfoidnim infiltratima, epitelna granica je obično intaktna, a morfologija timusnih perivaskularnih prostora je obično zavisna od uzrasta bolesnika (93). Obzirom da mioidne ćelije eksprimiraju MuSK (94), mogli bi se očekivati perivaskularni infiltrati kao kod AChR pozitivnih bolesnika, ali se infiltrati nalaze u malom obimu i kod malog broja pacijenata (95). Ovi infiltrati mogu međutim biti i varijanta normalnog nalaza, jer su ispitivanja velikih serija zdravih osoba pokazale značajnu varijabilnost PH nalaza u timusu zdravih osoba (96).

Timom se, u populaciji obolelih od MG, sreće kod 10-15% bolesnika, ali je kod starijih bolesnika njegovo prisustvo značajno češće (44, 200). Za razliku od hiperplastičnog timusa, u

timomu nije dokazano prisustvo AChR, međutim na njegovim epitelnim ćelijama pokazano je eksprimiranje proteina koji deli zajedničku antigensku determinantu sa citoplazmatskim delom AChR (52).

Za razliku od AChR pozitivnih MG bolesnika, prisustvo timoma je jako retko kod bolesnika sa MuSK MG i svodi se na pojedinačne prikaze slučajeva (175, 201). U populaciji naših MuSK MG bolesnika, ni kod jednog obrađenog bolesnika nije registrovano prisustvo timoma, dok je on bio prisutan kod 15% AChR pozitivnih pacijenata.

Za razliku od bolesnika sa AChR MG, kod kojih su najčešće PH promene timusa bile LFH i timom, kod MuSK MG bolesnika uključenih našu studiju, koji su timektomisani, najčešće je evidentirano prisustvo normalnog timusnog tkiva (kod 2/3 pacijenata), dok je atrofija timusa verifikovana kod 1/3 ovih bolesnika.

Normalno tkivo timusa se nalazi kod 10-25% obolelih od MG (43, 51) i u njemu se ne zapaža prisustvo limfoidnih folikula.

U grupi pacijenata sa MG, atrofija timusa se sreće kod 17-36% bolesnika, znatno češće kod bolesnika starijih od 50 godina (43). Osnovna karakteristika atrofičnog timusa su involutivne promene timusnog parenhima koji biva zamenjen obilnim masnim tkivom.

### ***5.3. Elektrofiziološko ispitivanje***

TRS je prvi elektrofiziološki dijagnostički test koji se sprovodi kod bolesnika koji se ispituju pod sumnjom na MG. Ovaj pregled daje pozitivan nalaz u oko 2/3 bolesnika sa generalizovanom formom bolesti (8, 157). Međutim, kod MuSK MG bolesnika se TRS pokazao kao mnogo manje senzitivna u do sada publikovanim studijama (6, 8). U najvećem broju publikacija je TRS na mišićima ekstremiteta bio patološki kod oko polovine MuSK pozitivnih bolesnika (6). Ipak, ako se radi pregled na mimičnim mišićima, veći je procenat bolesnika sa patološkim dekrementom na TRS i kreće se u rasponu od 47% (89) do 93% (129). U grupi naših MuSK pacijenata, TRS je bio pozitivan na nekom od ispitanih mišića kod polovine obolelih, što je u korelaciji sa navedenim ranije objavljenim studijama. Kao najsenzitivniji ispitani mišić u našem istraživanju se pokazao m.OO, na kome je kod trećine obolelih TRS bio pozitivan, dok je na ostalim mišićima ovaj procenat bio značajno niži. Najmanje su senzitivni distalni mišići ekstremiteta na kojima je TRS retko patološki (175), što je bio slučaj i u našoj populaciji bolesnika sa MuSK MG. Ipak, ima i objavljenih studija u kojima TRS na m.ADM ima sličnu senzitivnost kao i na m.trapezius-u od oko 36% (120), ali

su ovakvi nalazi retki. Na osnovu dobijenih rezultata TRS na različitim mišićima, i našom studijom je još jednom potvrđena potreba za ispitivanjem i mimičnih mišića kod ove grupe obolelih od MG. Još jedan dokaz naše studije, koji govori u prilog predominantno fokalne mišićne slabosti MuSK MG bolesnika jeste i nalaz patološkog TRS na malom broju ispitanih mišića, najčešće smo na jednom ispitanom mišiću, dok afekcija 4 ili 5 ispitanih mišića nije zabeležena ni kod jednog pacijenta ove grupe. Kod bolesnika sa patološkim TRS samo na jednom ili dva mišića, najčešće su bili u pitanju mimični mišići i proksimalni mišići ekstremiteta, čime je još jednom potvrđena potreba za obaveznim testiranjem ovih mišića kod pacijenata kod kojih se sumnja na MuSK pozitivnu formu MG. Relativno nizak procenat patološkog TRS u našoj grupi analiziranih MuSK MG pacijenata bi se mogao objasniti činjenicom da se čak 5 bolesnika (16%) iz ove grupe u trenutku elektrofiziološke evaluacije nalazilo u remisiji bolesti. Pored manje senzitivnosti TRS, u ovoj studiji su zabeležene i niže vrednosti dekrementa kod obrađenih MuSK MG bolesnika u odnosu na bolesnike sa AChR pozitivnom MG, a vrednosti dekrementa su bile u pozitivnoj korelaciji sa težinom bolesti samo u grupi AChR, a ne i MuSK MG bolesnika.

SFEMG je znatno senzitivniji pregled za detekciju oštećenja neuromišićne transmisije u odnosu na TRS, kako kod AChR pozitivnih, tako i kod MuSK pozitivnih pacijenata. Ovaj nalaz je, u našoj studiji, na nekom od ispitanih mišića bio patološki kod 90% MuSK MG bolesnika i to kod preko 70% MuSK MG pacijenata na m.EDC i kod skoro 86% bolesnika na m.OO. Veću diskrepancu u rezultatima SFEMG pregleda na mišićima lica i ekstremiteta su opisali *Guptill* i saradnici na velikoj populaciji MuSK MG bolesnika, kod kojih je patološki SFEMG pregled registrovan kod 46% bolesnika na m.EDC i kod čak 91% na mišićima lica (175). S druge strane, postoje studije u kojima je opisan visok procenat patoloških nalaza i na m.EDC od preko 80% (120), ali su pacijenti ove serije imali dominantno generalizovane slabosti. Kada su navedeni nalazi MuSK MG bolesnika dobijeni u našoj studiji upoređeni sa rezultatima SFEMG pregleda kod AChR pozitivnih bolesnika, zapaženo je da je na m.EDC procenat pozitivnih nalaza manji u grupi MuSK MG bolesnika u odnosu na AChR MG pacijente, dok je na m.OO procenat patoloških nalaza između ove dve grupe MG bolesnika bio sličan, što je u saglasnosti sa već objavljenim sličnim studijama (161). Ovakav nalaz dodatno naglašava potrebu za pregledom i mimične muskulature kada postoji sumnja na MuSK pozitivnu MG. Osim toga, ne samo da je procenat patoloških nalaza SFEMG pregleda ispitane grupe MuSK MG bolesnika bio niži u odnosu na bolesnike sa AChR pozitivnom formom bolesti, već je i vrednost zabeleženog *jitter*-a MuSK pozitivnih bolesnika bila

značajno niža u poređenju sa AChR MG pacijentima, što je u saglasnosti sa rezultatima i drugih autora (202). Srednja vrednost *jitter*-a naših MuSK MG bolesnika na m.OO je bila niska (45.57 $\mu$ s), što ukazuje na blago oštećenje neuromišićne transmisije, što je u saglasnosti sa nalazima italijanske grupe autora (132), kod čijih MuSK MG bolesnika je srednja vrednost *jitter*-a iznosila 47.5 $\mu$ s. S druge strane, Oh i saradnici (120) su opisali znatno više srednje vrednosti *jitter*-a od 68 $\mu$ s u m.EDC, koji je manje senzitivna od m.OO, ali ovakvi nalazi nisu potvrđeni od strane drugih autora. Još jedna razlika u SFEMG nalazu između MuSK MG i AChR MG bolesnika zapažena u našoj studiji, je bio nalaz izraženijeg stepena oštećenja neuromišićne transmisije kod bolesnika sa dužim trajanjem bolesti i sa težom kliničkom slikom samo u okviru MuSK MG grupe i to isključivo na m.EDC, dok ovakva korelacija nije uočena kod bolesnika sa MuSK MG na m.OO niti kod bolesnika sa AChR pozitivnom MG ni na jednom ispitanom mišiću. Objašnjenje ovakvog nalaza bi moglo biti da su kod najvećeg broja MuSK MG bolesnika mimični mišići zahvaćeni od samog početka bolesti, bez obzira na težinu kliničke slike, dok u kasnijem toku bolesti ili kod težih formi ovog oboljenja dolazi do afekcije i ostalih mišića sa jasnijom generalizacijom simptoma.

U cilju utvrđivanja postojanja miopatske lezije u mišićima obe grupe bolesnika sproveden je i klasičan EMG pregled. Ovim pregledom je utvrđeno postojanje miopatske lezije kod oko trećine bolesnika sa MuSK pozitivnom formom bolesti na m.EDC i m.deltoideus-u i kod čak 80% ovih pacijenata na m.OO, koji je najčešće jedan od klinički najzahvaćenijih mišića. Za razliku od ovih pacijenata, kod bolesnika sa AChR MG jako je retko nađeno prisustvo miopatije u mišićima ekstremiteta, dok je ona bila prisutna kod oko trećine ovih bolesnika u m.OO. Slične miopatske promene kod MuSK MG pacijenata su opisali i drugi autori (8, 132). Tako su *Padua* i saradnici opisali postojanje miopatskog nalaza u vidu MUP niske amplitude i kratkog trajanja kod 44% MuSK MG bolesnika (132). Prisustvo miopatije kod naših bolesnika sa MuSK MG je bilo u korelaciji sa uzrastom na početku bolesti i to samo na ispitanim mišićima ekstremiteta, ali ne i sa dužinom trajanja bolesti, težinom kliničke slike, primenom kortikosteroidne terapije niti težinom oštećenja neuromišićne transmisije. Izostanak korelacije između prisustva miopatske lezije i težine oštećenja neuromišićne transmisije je opisan i od strane drugih autora (140). S druge strane, prisustvo miopatske lezije na m.OO kod naših bolesnika sa AChR pozitivnom MG je češće zabeleženo kod bolesnika koji su bili na dugotrajnoj kortikosteroidnoj terapiji. Iz ovih nalaza proizilazi zaključak da je pojava miopatije kod AChR MG bolesnika verovatno uzrokovana dugotrajnom

kortikosteroidnomterapijom usled čega dolazi do razvoja steroidne miopatije, dok je mehanizam oštećenja mišićnih vlakana MuSK MG bolesnika neke druge etiologije.

U našoj studiji, kvantitativne EMG metode (Multi-MUP i TA analiza) nisu pokazale postojanje razlike između MuSK MG i AChR MG bolesnika, verovatno usled brze zamorljivosti pacijenata obe grupe, koja je zapažena tokom ovih pregleda, usled čega su bolesnici aktivirali samo male motorne jedinice. Međutim, ima objavljenih studija u kojima su kvantitativne EMG metode na mišićima lica MuSK MG bolesnika pokazale sličan nalaz kao kod bolesnika sa primarno mišićnim bolestima, kao što je miotonična distrofija (140). U navedenoj studiji je miopatski nalaz registrovan kod 50% bolesnika sa MuSK i 40% bolesnika sa AChR pozitivnom formom bolesti. Obzirom da je dominantan bio nalaz kratkog trajanja MUP, to je dovelo do hipoteze da je atrofija mimičnih mišića MuSK MG bolesnika sekundarna usled nastanka miopatskog procesa, verovatno kao rezultat uniformnog sužavanja mišićnih vlakana.

Razlog za pojavu miopatije kod ovih bolesnika, međutim, još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Naime, na biopsiji mišića je opisana izražena varijabilnost dijametra mišićnih vlakana, fokalna nekroza i atrofija pojedinačnih mišićnih vlakana, koja dominantno zahvata tip II vlakana (6, 203). Ovakav nalaz je krajnje nespecifičan, jer se sreće i kod drugih oboljenja, kao i kod AChR pozitivne MG (204, 205). Šta više, mitohondrijalne abnormalnosti, kako na aerobnom testu zamora, tako i na mišićnoj biopsiji, su takođe opisane kod bolesnika sa MuSK pozitivnom MG (143, 206) i, iako je priroda ove veze još uvek nepoznata, može doprineti pojavi mišićne atrofije i trajne mišićne slabosti.

#### ***5.4. MRS mišića jezika***

Poreklo mišićne atrofije kod MuSK MG bolesnika još uvek nije u potpunosti razjašnjeno. Korišćenjem određenih sekvenci MR je potvrđeno da je pojačan intenzitet signala unutar jezika posledica masne degeneracije koja je slična kao kod bolesnika sa primarno mišićnim bolestima, kao što je miotonična distrofija (130). Molekularni osnov mišićne atrofije kod MuSK MG pacijenata bi mogao biti objašnjen, bar delimično, činjenicom da anti-MuSK At regulišu sintezu mišićno specifičnih ubikvitin ligaza MURF-1 i muscle atrophy F-box proteina ili atrogina-1, koji su ključni regulatori mišićne atrofije (86, 144) sa različitom susceptibilnošću u različitim grupama mišića (65, 207). Stoga se u ovom trenutku smatra da je atrofija mimičnih mišića sekundarna usled miopatskog procesa.

Nije još uvek jasno zašto su mimični mišići i jezik selektivno zahvaćeni kod bolesnika sa MuSK MG. Ovi mišići su kompleksni, kako u pogledu sastava mišićnih vlakana, tako i u pogledu različitih metaboličkih potreba. Mišići m.OO i m.obicularis oris su dominantno sastavljeni od tipa II mišićnih vlakana (208, 209), dok se m. buccinator i mišići zaduženi za žvakanje sastoje pretežno od vlakana tipa I (208, 209). Jezik je heterogenog sastava, prednji segment se sastoji pretežno od vlakana tipa II, dok zadnji segment sačinjavaju predominantno mišićna vlakna tip I (193). Studijom *Farrugia*-e i saradnika je pregledom kranijalnih mišića MR utvrđeno postojanje tendence ka izraženijoj afekciji mišića sa vlaknima tip II kod obolelih od MuSK MG (130).

Moguće je i da terapija kortikosteroidima predisponira nastanak atrofija kod bolesnika sa anti-MuSK At, obzirom da kortikosteroidi dovode do mišićne atrofije, i to pretežno mišićnih vlakana tip II (210), a deksametazon povećava ekspresiju MURF-1 na C2C12 ćelijama (144). Šta više, u jednoj objavljenoj studiji je mišićna atrofija viđena MR pregledom korelirala sa trajanjem terapije kortikosteroidima umerenim do visokim dozama ovih lekova, kao i stepen visokog intenziteta signala na jeziku (130). Ova observacija bi mogla da znači da je nastanak mišićne atrofije olakšan primenom kortikosteroida ili da pak oslikava relativnu rezistentnost na imunosupresivnu terapiju. Mogućnost da kasno započinjanje i/ili neadekvatna primena imunosupresivnih lekova mogu biti uzrok ove pojave je pretpostavljena na osnovu višeg stepena remisije kod skoro dijagnostikovanih bolesnika kod kojih je rano uvedena imunosupresivna terapija (92). U svakom slučaju, terapija kortikosteroidima bi mogla biti samo jedan od faktora koji predisponiraju nastanak mišićnih atrofija kod MuSK MG pacijenata, nikako ne i jedini, jer su opisani i bolesnici sa izraženom atrofijom mišića jezika koji su bili na sasvim kratkotrajnoj kortikosteroidnoj terapiji (130), kao i slučajevi MuSK MG sa izraženim atrofijama mišića lica i jezika, verifikovanim MR pregledom, koji su tek dijagnostikovani, sa kratkotrajnim tokom bolesti i kod kojih je do pojave mišićne atrofije došlo pre primene bilo kakve terapije (211), što implicira da možda anti-MuSK At per se predisponiraju nastanak mišićne atrofije na još uvek nerazjašnjen način, a ovakvo stanovište podržavaju i rezultati sprovedenih *in vitro* studija (144, 147, 212). U saglasnosti sa ovakvim nalazima, u populaciji naših MuSK MG bolesnika pojava atrofije mišića jezika nije bila u korelaciji sa dužinom trajanja kortikosteroidne terapije. Moguće objašnjenje za ovu pojavu jeste upravo činjenica da se na našoj klinici pacijentima sa težim formama bolesti, kao što je većina MuSK MG bolesnika, brzo uvodi imunosupresivna terapija, zahvaljujući kojoj naši pacijenti nisu dugo na visokim dozama kortikosteroida.

Pored pregleda mišića lica i jezika MR, kojom je potvrđeno postojanje atrofije navedenih mišića kod bolesnika sa MuSK MG, i MRS je koristan pregled kod ovih bolesnika jer daje dodatne informacije o lipidnom metabolizmu ove podgrupe obolelih. Za razliku od AChR MG, kod koje je MRS pokazano postojanje masne infiltracije jezika usled migracije lipida iz intra- u ekstramiocelularni prostor, kod pacijenata sa MuSK MG, zapažena je tendenca ka povišenom odnosu zasićenih u odnosu na nezasićene masti, što može biti odraz intramiocelularne depozicije masti u jeziku (199). U populaciji naših bolesnika sa MuSK MG, na MRS mišića jezika je opisana intramiocelularna masna infiltracija ovog mišića u čak 85% slučajeva, za razliku od AChR MG bolesnika kod kojih je ovakav nalaz zabeležen kod svega 20% obolelih. Isto tako, evidentirane su i više vrednosti FWHM kod AChR pozitivnih u odnosu na MuSK MG bolesnike, što je i ranije opisano (199). Pored navedenog, u populaciji naših MuSK MG bolesnika zabeležena je češća pojava intramiocelularne masne infiltracije mišića jezika kod žena u odnosu na muškarce.

### **5.5. Testiranje ANS**

Pre više decenija je zapaženo postojanje poremećaja srčanog rada kod obolelih od MG, naročito u slučajevima njene udruženosti sa timomom (213). Kasnijim studijama je verifikovano postojanje oštećenja i simpatičkog (214, 215) i parasimpatičkog dela (216) ANS kod pacijenata sa MG. Ipak, iako se disautonomija ne smatra jednom od karakteristika MG i retko se dijagnostikuje kod ovih bolesnika, opisani su slučajevi koegzistiranja MG sa autonomnim oštećenjima, najčešće kod bolesnika sa timomom (217-219). Kod nekih bolesnika sa MG, autonomna disfunkcija se javlja u sklopu autoimunog odgovora usled ekspresije i neuronalnih i mišićnih autoantigena u timomskom tkivu (220). Naime, nikotinski AChR skeletnog mišića i gangliona, iako strukturno slični, bitno se razlikuju i imunološki i genetski. Svaki AChR se sastoji od 5 subjedinica, od kojih su najmanje dve  $\alpha$  subjedinice, koje sadrže mesto vezivanja ACh (221). Mišićni AChR ima dve  $\alpha 1$  subjedinice, zajedno sa  $\beta 1$ ,  $\delta$  i  $\gamma$  ili  $\epsilon$ , ali neuronalni AChR sadrži samo  $\alpha$  ( $\alpha 2$ – $\alpha 7$ ) i  $\beta$  ( $\beta 2$ – $\beta 4$ ) subjedinice (222). Ekstracelularni deo  $\alpha$  subjedinice neuronalnog AChR je u oko 60% identičan u aminokiselinskoj sekvenci  $\alpha$  subjedinici mišićnog AChR (223). Usled toga je moguća krosreaktivnost anti-AChR At kod bolesnika sa MG sa neuronalnim AChR i posledična pojava disautonomije. Ovakvu hipotezu podržava i činjenica da su zečevi imunizovani protiv neuronalne  $\alpha 3$  subjedinice AChR, razvili antitela i protiv drugih podtipova AChR, uključujući skeletni mišić (224). S druge strane, opisani su i slučajevi imunološki dokazane autoimune

autonomne ganglionopatije sa antitelima na neuronalni AChR, koji su u serumu imali i krosreaktivna anti-AChR At usmerena prema AChR skeletnog mišića, a bez kliničke i elektrofiziološke slike MG (225), što još više ukazuje na nejasnu prirodu ove povezanosti. Ipak, obzirom da postojanje oštećenja ANS utiče na prognozu bolesti u različitim neurološkim oboljenjima (226-229), važno je na vreme ih dijagnostikovati i po potrebi lečiti. Postojanje eventualne disfunkcije ANS kod pacijenata sa MuSK pozitivnom formom MG do sada nije ispitivano. Ovom studijom je utvrđeno postojanje jasne autonomne disfunkcije i kod ove grupe obolelih, i to kako simpatičkog (u 87% slučajeva), tako i parasimpatičkog (70%) dela ANS i to u sličnom procentu kao kod ispitanih AChR MG bolesnika. Da ova autonomna disfunkcija nije bezazlena govori i činjenica da je kod više od polovine MuSK MG bolesnika oštećenje ANS bilo umerenog ili teškog stepena. Prisustvo parasimpatičke disautonomije je, u okviru MuSK MG grupe, češće registrovano kod starijih bolesnika, dok slična korelacija nije uočena kada je u pitanju funkcija simpatičkog dela ANS. Kod analiziranih AChR MG bolesnika, ovakva korelacija nije zapažena. Isto tako, stepen oštećenja ANS, iskazan kao ukupni skor autonomne disfunkcije, je bio izraženiji kod starijih bolesnika, ali takođe samo u okviru MuSK MG grupe. Za razliku od ovih nalaza, kod AChR pozitivnih pacijenata sa timomskom MG u našoj populaciji opsežnim ispitivanjem je nađena dominantna afekcija parasimpatičkog dela ANS (230). Ovakvi rezultati otvaraju nove dileme u vezi sa poreklom autonomne disfunkcije kod bolesnika sa MG, jer kod pacijenata sa MuSK MG nema produkcije anti-AChR At koja bi mogla unakrsno reagovati sa neuronalnim AChR i na taj način dovesti do oštećenja ANS, što znači da je svakako još neki mehanizam uključen u nastanak autonomne disfunkcije kod ovih bolesnika.

### **5.6. HLA tipizacija**

Danas se smatra da u razvoju MG, kao i drugih autoimunih oboljenja, genetski faktori svakako imaju izvestan udeo, predominantno u smislu povezanosti određenih formi bolesti sa specifičnim HLA haplotipovima. Do sada je različit HLA profil evidentiran kod bolesnika sa MG, pretežno u odnosu na uzrast na početku bolesti i patologiju timusa (104-106, 108-110). HLA tipizacija MuSK MG bolesnika je do sada objavljena samo u 2 studije (107, 231). *Niks* i saradnici su u populaciji holandskih bolesnika opisali snažnu povezanost MuSK MG sa DR14-DQ5 haplotipom (107). U italijanskoj populaciji (231) je HLA tipizacija potvrdila udruženost DQ5 i MuSK MG. Konkretno, ovom studijom je pokazana snažna udruženost MuSK MG sa DRB1\*16 i DQB1\*0502 alelima. U toj grupi bolesnika, udruženost MuSK MG



sa HLA-DQ5 se odnosila na DQB1\*0502 alel, kao i u populaciji naših bolesnika sa MuSK pozitivnom formom bolesti. Pored toga, u našoj populaciji se zapažena i velika učestalost DRB1\*14, kao u holandskoj kohorti (107), kao i DRB1\*16, slično kao kod italijanskih bolesnika sa MuSK MG (231). Ono što do sada nije opisano jeste potpuno odsustvo DRB1\*13 alela u populaciji naših MuSK pozitivnih bolesnika, što sugerise na moguću protektivnu ulogu ovog alela u razvoju MuSK MG.

### ***5.7. Odgovor na primenjenu terapiju***

Kao što je slučaj sa brojnim drugim karakteristikama bolesti, tako se bolesnici sa MuSK MG razlikuju od AChR pozitivnih bolesnika i u odnosu na odgovor na standardnu terapiju ove bolesti.

Antiholinesterazni lekovi su simptomatska terapija prvog reda kod obolelih od MG i oni se primenjuju ne samo za lečenje već i za dijagnostiku ove bolesti. Međutim, bolesnici sa MuSK pozitivnom formom bolesti, pokazuju znatno manju senzitivnost, a često i intoleranciju na primenu ovih lekova. Tako je, u našoj studiji, prostigminski test bio pozitivan kod svih AChR pozitivnih bolesnika, dok je u grupi MuSK MG pacijenata ovaj test pokazao znatno manju senzitivnost od 77%. Ovakvi nalazi su u saglasnosti sa rezultatima većine do sada objavljenih studija, u kojima se procenat pozitivnog odgovora na antiholinesterazne lekove u grupi MuSK MG bolesnika kretao od 50-75% (6, 155, 175), dok je u jednoj studiji dobar odgovor na antiholinesteraznu terapiju zabeležen kod samo 30% MuSK MG pacijenata (90).

Tendencija da antiholinesterazni lekovi pogoršavaju mijastenične simptome ili izazivaju nikotinske i muskarinske neželjene efekte, kao što su pogoršanje slabosti, široko rasprostranjene fascikulacije, grčevi u stomaku ili dijareja, hiperhidroza i hipersalivacija su takođe zapaženi kod ovih bolesnika (156). Kod određenog broja MuSK MG bolesnika nakon uvođenja antiholinesterazne terapije, dolazi do pogoršanja simptoma, naročito na početku lečenja bolesnika sa bulbarnom ili respiratornom slabošću. Ova pojava je verovatno posledica činjenice da se kod određenog broja bolesnika anti-MuSK At u većoj meri vezuju za spoj MuSK-ColQ nego za agrin-Lrp4-MuSK kompleks (232). Još je češća pojava neželjenih nikotinskih ili muskarinskih efekata, zbog kojih ovi pacijenti ne mogu uopšte da tolerišu antiholinesterazni lek ili ga primaju u sasvim malim dozama. Ovakva reakcija je zabeležena kod skoro 40% naših MuSK MG bolesnika i samo kod jednog AChR pozitivnog pacijenta, a slične reakcije MuSK MG bolesnika na antiholinesteraznu terapiju su opisali i drugi autori (8, 87, 126). Opisana hipersenzitivnost na ACh može biti posledica oštećene morfologije

receptora postsinaptičke mišićne membrane, nastale usled smanjenog grupisanja AChR (207). Repetitivna pražnjenja na niskofrekventnoj stimulaciji koja su izazvana umerenim dozama piridostigmina su opisana kod bolesnika sa MuSK MG i mogu biti indikator loše tolerancije leka (156). Šta više, pojava ovih repetitivnih pražnjenja je u korelaciji sa prisustvom nikotinskih neželjenih efekata (233). Ovakva pražnjenja smo mi zabeležili kod oko 10% MuSK MG pacijenata, koji su svi ispoljavali hipersenzitivnu reakciju na piridostigmin. Moguće je da bi ovaj procenat bio i veći da su svi MuSK MG bolesnici primali uobičajene doze piridostigmina. Naime 6 MuSK MG bolesnika analizirane grupe u trenutku evaluacije ili nije dobijalo uopšte antiholinesteraznu terapiju ili je dobijalo veoma male doze usled intolerancije ovog leka.

Pored antiholinesterazne terapije, svi analizirani i MuSK i AChR MG bolesnici su u nekom periodu svoje bolesti primali i kortikosteroidnu terapiju. Međutim, usled nemogućnosti adekvatne kontrole bolesti samo sa navedenim lekovima ili usled potrebe za visokim dozama kortikosterida, većini analiziranih bolesnika je morala biti uvedena i imunosupresivna terapija. Kada su u pitanju MuSK MG pacijenti, oni često pokazuju lošiji odgovor na uobičajenu imunosupresivnu terapiju nego AChR pozitivni bolesnici (6, 170), iako ova terapija i kod njih nesumnjivo ostvaruje povoljan efekat. Tako je u našoj studiji kod MuSK MG bolesnika, najčešće primenjivan lek iz ove grupe je bio ciklosporin, dok je najvećem broju AChR pozitivnih bolesnika ordiniran azatioprin. Ovakav nalaz slabije efikasnosti azatioprina kod bolesnika sa MuSK MG je već opisan od strane *Sanders*-a i saradnika (8). S druge strane, u italijanskoj seriji bolesnika sa MuSK pozitivnom MG, zabeležen je povoljan terapijski odgovor i na azatioprin (6). Iako je težina kliničke slike bila slična između naših MuSK i AChR MG pacijenata, kod nešto većeg broja MuSK MG bolesnika u odnosu na pacijente sa AChR pozitivnom formom MG je bilo neophodno sprovođenje TIP radi postizanja zadovoljavajuće kontrole bolesti, najčešće u vidu redovne dugotrajne terapije, dok su IVIg podjednako često primenjivani u navedene dve grupe pacijenata, najčešće u periodima pogoršanja bolesti. Neka od navedenih terapijskih procedura (TIP i/ili IVIg) je bila neophodna u terapiji oko 42% analiziranih MuSK MG bolesnika usled loše kontrole bolesti sa primenjenom imunosupresivnom terapijom, što je slično nalazu u velikoj seriji MuSK MG bolesnika *Pasnoor*-a i saradnika (133). Odgovor naših MuSK MG bolesnika na ove terapijske mere je bio pozitivan, što su opisali i drugi autori (6, 8, 90). Međutim, ima i publikovanih studija, u kojima je evidentiran povoljan odgovor samo na TIP, dok se terapija IVIg pokazala manje efikasnom (133, 175).

Pored navedene medikamentozne terapije, timektomija je standardna terapijska procedura u lečenju obolelih od MG (179). Opšte je prihvaćen stav da se timektomija sporovodi kod svih bolesnika sa timomom, kao i kod mladih pacijenata sa generalizovanom simptomatologijom i prisutnim anti-AChR At, kao i kod SNMG bolesnika, za koje se smatra da u velikom broju imaju anti-AChR At niskog afiniteta (63). S druge strane, kod MuSK pozitivne MG, smatra se da timektomija ima mali značaj i pitanje da li ova terapijska procedura ima mesto u lečenju ovih bolesnika je i dalje kontroverzno. Naime, većina istraživanja ne nalazi dokaze koji govore u prilog opravdanosti ove terapijske intervencije (6, 8, 89, 90, 117, 169), kako zbog PH promena timusa koje su slične kao kod zdravih osoba, tako i usled izostanka boljeg ishoda i slične potrebe za imunosupresivnom terapijom kod timektomisanih u odnosu na netimektomisane MuSK MG bolesnike. Isto tako, opisano je da timektomija nije praćena značajnom redukcijom koncentracije serumskih anti-MuSK At (92). Međutim, rezultati naše studije su unekoliko različiti u odnosu na prethodno navedene podatke iz literature. Naime, u populaciji naših MuSK MG pacijenata, registrovana je češća potreba za imunosupresivnom terapijom i azatioprinom i ciklosporinom kod netimektomisanih u odnosu na timektomisane MuSK MG bolesnike, dok je ishod bolesti bio isti kod obe grupe obolelih, nezavisno od sprovođenja operativnog lečenja.

### ***5.8. Ishod bolesti***

Ishod bolesti se, na kraju perioda praćenja, nije značajno razlikovao između naših analiziranih MuSK i AChR MG bolesnika. Naime, čak 87% analiziranih MuSK MG bolesnika je imalo dobar ishod bolesti u smislu remisije, MM ili poboljšanja, što je u saglasnosti sa do sada opisanim serijama ove grupe MG bolesnika u kojima su dobri rezultati opisani kod 64–100% bolesnika (6, 8, 89, 90, 117, 130, 169). Ipak, iako pacijenti sa MuSK MG imaju u najvećem broju slučajeva dobar ishod bolesti, nekoliko studija je zabeležilo nižu stopu remisije (234), kao i češću zavisnost od produžene imunosupresivne terapije kod ovih bolesnika u odnosu na AChR pozitivne pacijente sa MG (6, 89, 169). I u našoj populaciji MuSK MG bolesnika, je registrovana slična stopa remisije od skoro 13%, koja je niža u odnosu na stopu remisije većih serija AChR pozitivnih bolesnika, koja se kretala oko 30% (129). Moguć razlog za ovako retko postizanje remisije bolesti može biti činjenica da veliki broj bolesnika sa MuSK MG, iako postiže nesumnjivo poboljšanje sa imunosupresivnom terapijom, razvija trajne kranijalne i bulbarne simptome, u prvom redu slabost mimičnih mišića i nazalni govor, zajedno sa atrofijom mišića lica i jezika (6, 89, 170). U skladu sa nalazima i drugih autora (6, 89, 169), i

kod najvećeg broja naših MuSK MG bolesnika (87%) je bila neophodna primena produžene imunosupresivne terapije u cilju postizanja zadovoljavajuće kontrole bolesti.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu analize različitih kliničkih, elektrofizioloških, patogenetskih i imunoloških parametara u populaciji bolesnika sa MuSK pozitivnom MG, mogu se doneti sledeći zaključci:

- U grupi MuSK MG bolesnika postoji jasna predominacija bolesnika ženskog pola ( $p < 0.01$ )
- Zabeležene su više vrednosti titra anti-MuSK At kod žena u odnosu na muškarce ( $p < 0.05$ ), dok je vrednost titra anti-AChR At bila slična kod pripadnika oba pola ( $p > 0.05$ )
- Prosečan uzrast MuSK MG bolesnika na početku bolesti je iznosio 43 god.
- Najčešći simptomi kod bolesnika sa MuSK MG su okulobulbarne slabosti ( $p < 0.01$ )
- Čak 80% MuSK MG bolesnika je imalo tešku kliničku sliku u najlošijoj fazi bolesti ( $p < 0.01$ )
- Prostigminski test ima značajno manju senzitivnost uz češću pojavu hipersenzitivne reakcije na ovaj lek kod MuSK MG u odnosu na AChR MG bolesnike ( $p < 0.01$ )
- PH pregledom timusa je evidentirano postojanje isključivo normalnog ili atrofičnog timusa kod bolesnika sa MuSK MG, u odnosu na AChR MG bolesnike kod kojih timus pokazuje LFH, prisustvo timoma ili normalan nalaz ( $p < 0.01$ )
- TRS je znatno ređe pozitivan na m.ADM, m.deltoides-u i m.nasalis-u i sa značajno nižim vrednostima dekrementa na svim ispitanim mišićima kod MuSK u odnosu na AChR MG bolesnike ( $p < 0.05$ )
- Kod MuSK MG bolesnika, prisustvo patološkog nalaza na TRS kao i vrednosti dekrementa nisu bile u korelaciji sa težinom kliničke slike niti sa titrom anti-MuSK At ni za jedan ispitan mišić ( $p > 0.05$ )
- Patološki SFEMG nalaz je registrovan kod sličnog broja MuSK MG i AChR MG bolesnika i na m.EDC i na m.OO ( $p > 0.05$ )
- Kod MuSK MG bolesnika su registrovane niže srednje vrednosti *jitter*-a i MCD i manji broj pojedinačnih parova potencijala sa povišenim *jitter*-om u odnosu na AChR MG pacijente ( $p < 0.05$ ) samo na m.EDC, dok su na m.OO svi parametri SFEMG pregleda bili slični između ove dve grupe bolesnika ( $p > 0.05$ )
- Patološki SFEMG nalaz je kod MuSK MG bolesnika bio u korelaciji sa dužinom trajanja bolesti samo na m.EDC ( $p < 0.05$ ), ne i na m.OO ( $p > 0.05$ )

- Kod bolesnika sa MuSK MG je evidentirano postojanje korelacije između težine bolesti prema MGFA klasifikaciji i stepena oštećenja neuromišićne transmisije prilikom SFEMG pregleda samo na m.EDC ( $p < 0.01$ ), ne i na m.OO ( $p > 0.05$ )
- Patološki SFEMG nalaz na m.OO je bio češći kod žena u odnosu na muškarce, samo kod bolesnika sa MuSK MG ( $p < 0.05$ )
- Miopatski nalaz na EMG pregledu je znatno češće registrovan kod MuSK MG u odnosu na AChR MG bolesnike na svim ispitanim mišićima ( $p < 0.05$ )
- U okviru grupe MuSK MG bolesnika zabeležena je češća pojava miopatskog nalaza kod bolesnika sa početkom bolesti u ranijem životnom dobu, ali samo na mišićima ekstremiteta ( $p < 0.05$ ), ne i lica ( $p > 0.05$ )
- Kod MuSK MG bolesnika je prisustvo miopatskog nalaza bilo značajno češće kod žena u odnosu na muškarce, ali samo na m.OO ( $p < 0.05$ ), ne i na mišićima ekstremiteta ( $p > 0.05$ )
- Prisustvo miopatske lezije kod bolesnika sa MuSK MG nije bilo u korelaciji sa dužinom trajanja bolesti, težinom kliničke slike u trenutku pregleda, stepenom oštećenja neuromišićne transmisije, primenom kortikosteroidne terapije niti titrom anti-MuSK At ( $p > 0.05$ ) ni na jednom ispitanom mišiću, dok je miopatski nalaz na m.OO kod AChR MG bolesnika korelirao sa dužinom primene kortikosteroidne terapije ( $p < 0.05$ )
- Kliničkim pregledom je verifikovano značajno češće prisustvo atrofije jezika kod MuSK MG u odnosu na AChR MG bolesnike ( $p < 0.05$ )
- MRS mišića jezika je registrovana značajno češća pojava intramiocelularne masne infiltracije ovog mišića kod MuSK pozitivnih u odnosu na AChR pozitivne bolesnike ( $p < 0.01$ )
- Kod MuSK MG bolesnika je prisustvo intramiocelularne masne infiltracije mišića jezika bilo češće kod žena u odnosu na muškarce ( $p < 0.01$ )
- Prisustvo intramiocelularne masne infiltracije jezika kod bolesnika sa MuSK MG nije bilo u korelaciji sa uzrastom na početku bolesti, dužinom trajanja bolesti, težinom kliničke slike, primenom kortikosteroida niti vrednostima titra anti-MuSK At ( $p > 0.05$ )
- Registrovane su statistički značajno niže vrednosti FWHM kod bolesnika sa MuSK u odnosu na one sa AChR MG ( $p < 0.05$ )
- Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pojave patoloških testova autonomne disfunkcije između MuSK MG i AChR MG bolesnika ( $p > 0.05$ )

- Patološki testovi samo funkcije parasimpatikusa su bili češći kod starijih bolesnika isključivo u grupi MuSK MG pacijenata ( $p < 0.05$ )
- Više vrednosti ukupnog skora autonomne disfunkcije su zabeležene kod starijih bolesnika samo u okviru MuSK MG grupe ( $p < 0.05$ )
- HLA tipizacijom je utvrđena povezanost MuSK MG sa DRB1\*14, DRB1\*16 i DQB1\*05, kao i potpuno odsustvo DRB1\*13 alela ( $p < 0.05$ )
- Ciklosporin je značajno češće bio primenjen u terapiji MuSK MG u odnosu na AChR MG bolesnike ( $p < 0.01$ )
- Kod MuSK MG bolesnika, češća primena azatioprina je bila neophodna kod bolesnika koji nisu timektomisani u odnosu na timektomisane bolesnike ( $p < 0.05$ )
- Ishod bolesti je bio povoljan kod najvećeg broja i MuSK i AChR MG bolesnika ( $p > 0.05$ )
- Zabeležen je sličan ishod bolesti kod timektomisanih i netimektomisanih MuSK MG bolesnika ( $p > 0.05$ )
- Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti javljanja drugih autoimunih bolesti udruženo sa MG između bolesnika sa MuSK pozitivnom i AChR pozitivnom formom bolesti ( $p > 0.05$ ).

Zaključuje se da je MuSK pozitivna MG poseban klinički entitet koji se u značajnoj meri razlikuje od AChR pozitivne forme bolesti, kako u pogledu kliničke slike, patohistoloških promena timusa i odgovora na terapiju, tako i u odnosu na nalaz elektrofizioloških ispitivanja, MRS mišića jezika i HLA fenotipa. Detaljno i sveobuhvatno sagledavanje bolesnika sa MuSK MG omogućava bolje poznavanje ovog retkog, ali veoma ozbiljnog oboljenja, čime se smanjuje mogućnost da se ovo oboljenje previdi zbog velikog broja manifestacija potpuno atipičnih za MG, čime bi se direktno ugrozilo zdravlje i život naših bolesnika sa ovom formom bolesti.

## 7. LITERATURA

1. Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 2006;116:2843-54.
2. Vincent A, Lang B, Kleopa KA. Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron* 2006;52:123-38.
3. Simpson JA. Current concepts and history of the autoimmune nature of myasthenia gravis. In: Albuquerque EX, Eldefravi AT (eds). *Myasthenia gravis*. Chapman and Hall, London 1983; 3-41.
4. Simpson JA. Myasthenia gravis: a new hypothesis. *Scott Med J* 1960;5:419-436.
5. Patric J, Lindstrom JM. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 1973;180: 871.
6. Evoli A, Tonali PA, Padua L, et al. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain* 2003;126:2304-11.
7. Hoch W, McConville J, Helms S, et al. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001;7:365-8.
8. Sanders DB, El-Salem K, Massey JM, et al. Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology* 2003;60:1978-80.
9. Vincent A, Bowen J, Newsom-Davis J, et al. Seronegative generalised myasthenia gravis: clinical features, antibodies, and their targets. *Lancet Neurol* 2003;2:99-106.
10. Yeh JH, Chen WH, Chiu HC, et al. Low frequency of MuSK antibody in generalized seronegative myasthenia gravis among Chinese. *Neurology* 2004;62:2131-2.
11. Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, et al. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates and diagnostic value. *Neurology* 1976;26:1054-9.
12. Vincent A, Newsom DJ. Anti-acetylcholine receptor antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980;43:590-600.
13. Burges J, Vincent A, Molenaar PC, et al. Passive transfer of seronegative myasthenia gravis to mice. *Muscle Nerve* 1994;17:1393-400.
14. Mossman S, Vincent A, Newsom-Davis J. Myasthenia gravis without acetylcholine-receptor antibody: a distinct disease entity. *Lancet* 1986;1:116-9.
15. Higuchi O, Hamuo J, Motomura M, et al. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2011; 69:418-422.



16. Engel AG. The neuromuscular junction. In: Engel AG, Banker BQ, eds. *Myology*, NY: Mc Graw-Hill, 1986:209-253.
17. Kaminski HJ, Ruff RL. The myasthenic syndroms. In: Schultz, ed. *Mol Biol of Membr Trans Dis*, Pleunum Press, NY:1996:565-593.
18. Apostolski S. Myasthenia gravis. Etiopatogeneza stečene autoimune miastenije gravis. U Apostolski S, Lavrnić D, Đukić P (urednici). *Myasthenia gravis*. Vizartis Beograd 1998;27-44.
19. Unwin N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 1995;373:37-43.
20. Ruff RL. Ionic channels. In: *The biophysical basis for ion passage and channel gating*. Muscle and Nerve 1986;261:231-235.
21. Froehner SC. The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Cell Biol* 1991;114:1-7.
22. Appel ED, Roberts SL, Campbell KP, Merlie JP. Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophine associated glycoprotein complex. *Neuron* 1995;15:115-126.
23. Hopf C, Hoch W. Tyrosine phosphorylation of the muscle specific kinase is exclusively induced by acetylcholine receptor-aggregating agrin fragments. *Eur J Biochem* 1998;253:382-389.
24. Guy HR, Hucho F. The ion channel of nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Neurosci* 1987;10:318-322.
25. Sakmann B, Witzemann V, Brenner H. Developmental changes in acetylcholine receptor channel structure and function as a model for synaptic plasticity. *Fidia Res Found Neurosci Award Lectures* 1992;6:51-103.
26. Nelson S, Conti-Tronconi BM. Adult thymus expresses an embryonic nicotinic acetylcholine receptor-like protein. *J Neuroimmunol* 1990;29:81-92.
27. Kaminski HJ, Kusner LL, Block CH. Expression of acetylcholine receptor isoforms at extraocular muscle endplates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:345-351.
28. Land BR, Salpeter EE, Salpeter MM. Kinetic parameters for acetylcholine interaction in intact neuromuscular junction. *Proc Ntl Acad Sci USA* 1981;78:7200-7204.
29. Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton DL, et al. Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 1995;15:573-84.

30. Burden SJ. Building the vertebrate neuromuscular synapse. Review. *J Neurobiol* 2002;53:501-11.
31. Liyanage Y, Hoch W, Beeson D, Vincent A. The agrin/muscle specific kinase pathway: new targets for autoimmune and genetic disorders at the neuromuscular junction. Review. *Muscle Nerve* 2002;25:4-16.
32. Wallace BG, Qu Z, Huganir RL. Agrin induces phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 1991;6:869-78.
33. DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, et al. MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 1996;85:501-12.
34. Herbst R, Burden SJ. The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin mediated signaling. *EMBO J* 2000;19:67-77.
35. Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, et al. Lrp4 is a receptor for agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 2008;135:334–342.
36. Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L. LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 2008;60:285–297.
37. Linnoila J, Wang Y, Yao Y, Wang ZZ. A mammalian homolog of *Drosophila* tumorous imaginal discs, Tid1, mediates agrin signaling at the neuromuscular junction. *Neuron* 2008;60:625–641.
38. Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, Blanchard B, Lambergeon M, Krejci E, et al. MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2004;165:505–515.
39. Song Y, Balice-Gordon R. New dogs in the dogma: Lrp4 and Tid1 in neuromuscular synapse formation. *Neuron* 2008;60:526–528.
40. Strohlic L, Cartaud A, Cartaud J. The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: new partners, new functions. *Bioessays* 2005;27:1129–1135.
41. Kirchner T, Tzartos S, Hoppe F, et al. Pathogenesis of myasthenia gravis. Acetylcholine receptor-related antigenic determinants in tumor-free thymuses and thymic epithelial tumors. *Am J Pathol* 1988;130:268-280.
42. Apostolski S. Myasthenia gravis – korelacija kliničkog, elektrodijagnostičkog, imunološkog i histopatološkog aspekta. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 1981.
43. Bumbaširević V, Apostolski S, Gospavić J, Đukić P. Thymus histopathology in correlation with clinical type of myasthenia gravis. In: Jušić A (ed). *New Trends in*

- Neuromuscular Diseases and Electromyoneurography. Školska knjiga, Zagreb, 1989;13-21.
44. Lavrnjčić D. Kliničko-epidemiološka studija miastenije gravis. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 1995.
  45. Beghi E, Antozzi C, Batocchi AP, et al. Prognosis of myasthenia gravis: a multicenter follow-up study of 844 patients. *J Neurol Sci* 1991;106:213-220.
  46. Fuchs S, Schmidt-Hopfeld I, Tridente S, Tarrab-Hazdai R. Thymic lymphocytes bear a surface antigen which cross reacts with nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 1980;287:162-164.
  47. Wakkach A, Guyon T, Bruand C et al. Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells. Implications for myasthenia gravis. *J Immunol* 1996;157:3752-3760.
  48. Kao I, Drachman DB. Thymic muscle cells bear acetylcholine receptors: possible relation to myasthenia gravis. *Science* 1977;195:74-75.
  49. Apostolski S. Patogeneza stečene autoimune miastenije gravis. *Klinička i eksperimentalna neurologija* 1996;1:21-30.
  50. Fuji Y, Monden K, Nakahara H, et al. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: production of lymphocytes from thymus and thymoma. *Neurology* 1984;34:1182-1186.
  51. Kirchner T, Schalke B, Melms A, von Kugelgen T, Muller-Hermelink HK. Immunohistological patterns of non-neoplastic changes in the thymus in myasthenia gravis. *Virchows Arch Cell Pathol* 1986;52:237-257.
  52. Marx A, O'Connor R, Geuder KI, et al. Characterization of protein with an acetylcholine receptor epitope from myasthenia gravis-associated thymomas. *Lab Invest* 1990;62:279-286.
  53. Muller-Hermelink HK, Marx A, Geuder K, Kirchner T. The pathological basis of thymoma-associated myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1993;681:56-65.
  54. Ruff RL. Neuromuscular Junction Physiology and Pathophysiology. In: Kaminski, ed. *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. New Jersey: Humana Press Inc.
  55. Tzartos SJ, Seybold ME, Lindstrom JM. Specificities of antibodies to acetylcholine receptor in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:188-192.

56. Tzartos SJ, Cung MT, Demange P et al. The main immunogenic region (MIR) of the nicotinic acetylcholine receptor and the anti-MIR antibodies. *Mol Neurobiol* 1991;5:1-29.
57. Pumplin DB, Drachman DB. Myasthenic patients' IgG causes redistribution of acetylcholine receptors: freeze-fracture studies. *J Neurosci* 1983;3:576-584.
58. Drachman DB, Adams RN, Josifek LF, Pestronk A, Stanley EF. Antibody-mediated mechanisms of ACh receptor loss in myasthenia gravis: clinical relevance. *Ann NY Acad Sci* 1981;377:175-188.
59. Engel AG, Tsujihata MT, Lindstrom JM, Lennon VA. The motor end plate in myasthenia gravis and in experimental autoimmune myasthenia gravis. A quantitative ultrastructural study. *Ann N Y Acad Sci* 1976;274:60-79.
60. Lindstrom JM. Acetylcholine receptors and myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2000;23:453-477.
61. Lennon VA. Serologic profile of myasthenia gravis and distinction from the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 1997;48(5):S23-S27.
62. Howard FM Jr, Lennon VA, Finley J et al. Clinical correlations of antibodies that bind, block or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1987;505:526-538.
63. Vincent A, Leite MI, Farrugia ME, Jacob S, Viegas S, Shiraishi H, Benveniste O, Morgan BP, Hilton-Jones D, Newsom-Davis J, Beeson D, Willcox N. Myasthenia Gravis Seronegative for Acetylcholine Receptor Antibodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008;1132:84-92.
64. Kummer TT, Misgeld T, Sanes JR. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr Opin Neurobiol* 2006;16:74-82.
65. Jha S, Xu K, Maruta T, et al. Myasthenia gravis induced in mice by immunization with the recombinant extracellular domain of rat muscle-specific kinase (MuSK). *J Neuroimmunol* 2006;175:107-17.
66. Kong XC, Barzaghi P, Ruegg MA. Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle in vivo by RNA interference. *EMBO Rep* 2004;5:183-8.
67. Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, et al. Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 2006;116:1016-24.
68. Akaaboune M, Grady RM, Turney S, et al. Neurotransmitter receptor dynamics studied in vivo by reversible photo-unbinding of fluorescent ligands. *Neuron* 2002;34:865-76.

69. Yamanashi Y, Tezuka T, Yokoyama K. Activation of receptor protein–tyrosine kinases from the cytoplasmic compartment. *J. Biochem.* 2012;151:353–359.
70. Weatherbee S.D, Anderson KV, Niswander L.A. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 2006;133:4993–5000.
71. Wu H, Xiong WC, Mei L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 2010;137:1017–1033.
72. Luo ZG, Wang Q, Zhou JZ, Wang J, Luo Z, Liu M, He X, Wynshaw-Boris A, Xiong WC, Lu B, Mei L. Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron* 2002;35:489–505.
73. Korkut C, Budnik V. Wnts tune up the neuromuscular junction. *Nat Rev* 2009;10:627–634.
74. Stiegler AL, Burden SJ, Hubbard SR. Crystal structure of the agrin-responsive immunoglobulin-like domains 1 and 2 of the receptor tyrosine kinase MuSK. *J Mol Biol* 2006;364:424–433.
75. Stiegler AL, Burden SJ, Hubbard SR. Crystal structure of the Frizzled-like cysteine-rich domain of the receptor tyrosine kinase MuSK. *J Mol Biol* 2009;393:1–9.
76. Takamori M, Nakamura T, Motomura M. Antibodies against Wnt receptor of muscle-specific tyrosine kinase in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2013;254:183-6.
77. McConville J, Farrugia ME, Beeson D, Kishore U, Metcalfe R, Newsom-Davis J, Vincent A. Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2004;55:580–584.
78. Lindstrom J. Is “seronegative” MG explained by autoantibodies to MuSK? *Neurology* 2004;62:1920-1.
79. Shiraishi H, Motomura M, Yoshimura T, et al. Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2005;57:289-93.
80. Ohta K, Shigemoto K, Fujinami A, et al. Clinical and experimental features of MuSK antibody positive MG in Japan. *Eur J Neurol* 2007;14:1029-34.
81. Ohno K. Anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis block binding of collagen Q to MuSK. *Rinsho Shinkeigaku* 2012;52(11):1306-8.
82. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011;77:1819–1828.

83. Ghazanfari N, Fernandez KJ, Murata Y, et al. Muscle specific kinase; organizer of synaptic membrane domains. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:295–298.
84. Cole RN, Ghazanfari N, Ngo ST, et al. Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice. *J Physiol* 2010;17:3217–3229.
85. Niks EH, van Leeuwen Y, Leite MI, Dekker FW, Wintzen AR, Wirtz PW, et al. Clinical fluctuations in MuSK myasthenia gravis are related to antigen-specific IgG4 instead of IgG1. *J Neuroimmunol* 2008;195:151–156.
86. Farrugia ME, Bonifati DM, Clover L, Cossins J, Beeson D, Vincent A. Effect of sera from AChR-antibody negative myasthenia gravis patients on AChR and MuSK in cell cultures. *J Neuroimmunol* 2007;185:136–144.
87. Selcen D, Fukuda T, Shen XM, Engel AG. Are MuSK antibodies the primary cause of myasthenic symptoms? *Neurology* 2004;62:1945–1950.
88. Newsom-Davis J. The emerging diversity of neuromuscular junction disorders. *Acta Myologica* 2007; XXVI; 5-10.
89. Lavrnic D, Losen M, Vujic A, De Baets M, Hajdukovic Lj, Stojanovic V, Trikick R, Djukic P, Apostolski S. The fetures of myasthenia gravis with autoantibodies to MuSK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1099-1102.
90. Zhou L, McConville J, Chaudhry V, et al. Clinical comparison of muscle-specific tyrosine kinase (MuSK) antibody-positive and –negative myasthenic patients. *Muscle and Nerve* 2004;30:55-60.
91. Blaes F, Beeson D, Plested P, et al. IgG from “seronegative” myasthenia gravis patients binds to a muscle cell line, TE671, but not to human acetylcholine receptor. *Ann Neurol* 2000;47:504–510.
92. Bartoccioni E, Scuderi F, Minicuci GM, et al. Anti-Musk antibodies: correlation with myasthenia gravis severity. *Neurology* 2006;67:505–507.
93. Lauriola L, Ranelletti F, Maggiano N, et al. Thymus changes in anti-MuSK-positive and –negative myasthenia gravis. *Neurology* 2005;64:536-538.
94. Mesnard-Rouiller L, Bismuth J, Wakkach A, et al. Thymic myoid cells express high levels of muscle genes. *J Neuroimmunol* 2004;148:97–105.
95. Leite MI, Strobel P, Jones M, Micklem K, Moritz R, Gold R, et al. Fewer Thymic Changes in MuSK Antibody-Positive than in MuSK Antibody-Negative MG. *Ann Neurol* 2005;57:444–448.

96. Flores KG, Li J, Sempowski GD, et al. Analysis of the thymic perivascular space during aging. *J Clin Invest* 1999;104:1031–1039.
97. Plested CP, Tang T, Spreadbury I, et al. AChR phosphorylation and indirect inhibition of AChR function in seronegative MG. *Neurology* 2002;59:1682–1688.
98. Motomura M, Higuchi O. Progress of myasthenia gravis: discovery of Lrp4 antibodies. *Rinsho Shinkeigaku* 2012;52(11):1303-5.
99. Zhang W, et al. Agrin binds to the N-terminal region of Lrp4 protein and stimulates association between Lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (MuSK). *J Biol Chem* 2011;286:40624–40630.
100. Peng H.B, et al. Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol* 1999;145:911–921.
101. Cossins J, Belaya K, Zoltowska K, Konecny I, Maxwell S, Jacobson L, Leite MI, Waters P, Vincent A, Beeson D. The search for new antigenic targets in myasthenia gravis. *Ann N.Y. Acad Sci* 2012;1275:123–128.
102. Guyon T, Levasseur P, Truffault F, Cottin C, Gaud C, Berrih-Aknin S. Regulation of acetylcholine receptor alpha subunit variants in human myasthenia gravis. Quantification of steady-state levels of messenger RNA in muscle biopsy using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1994;94:16-24.
103. Mantegazza R, Oksenberg JR, Baggi F, et al. Increased incidence of certain TCR and HLA genes associated with myasthenia gravis in Italians. *J Autoimmun* 1990;3:431-440.
104. Compston DA, Vincent A, Newsom-Davis J et al. Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain* 1980;103:579-590.
105. Giraud M, Beaurain G, Yamamoto AM, et al. Linkage of HLA to myasthenia gravis and genetic heterogeneity depending on anti-titin antibodies. *Neurology* 2001;57:1555–60.
106. Aarli JA. Late onset myasthenia gravis. *Eur J Neurol* 1997;4:203-209.
107. Niks EH, Kuks JBM, Roep BO, et al. Strong association of MuSK antibody-positive myasthenia gravis and HLA-DR14-DQ5. *Neurology* 2006;66:1772-1774.
108. Giraud M, Vandiedonck C, Garchon HJ. Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 2008;1132:180–92.
109. Chen WH, Chiu HC, Hsieh RP. Association of HLA-Bw46DR9 combination with juvenile myasthenia in Chinese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56:382–85

110. Matsuki K, Juji T, Tokunaga K, et al. HLA antigens in Japanese patients with myasthenia gravis. *J Clin Invest* 1990;86:392–99.
111. Uono M. Clinical statistics of myasthenia gravis in Japan. *Int J Neurol* 1980;14:87–99.
112. Amdahl C, Alseth EH, Gilhus NE, Nakkestad HL, Skeie GO. Polygenic disease associations in thymomatous myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2007;64:1729–33.
113. Lavrnjic D, Nikolic A, De Baets M, et al. Familial occurrence of autoimmune myasthenia gravis with different antibody specificity. *Neurology* 2008;70:2011-2013.
114. Andersen JB, Engeland A, Owe JF, Gilhus NE. Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. *Eur J Neurol* 2010;17(12): 1445–1450.
115. Lavrnjic D, Basta I, Rakocevic-Stojanovic V, Stevic Z, Peric S, Nikolic A, Marjanovic I, Pekmezovic T. Epidemiological study of adult-onset myasthenia gravis in the area of Belgrade (Serbia) in the period 1979-2008. *Neuroepidemiology* 2013;40(3):190-4.
116. Christensen PB, Jensen TS, Tsiropoulos I et al. Incidence and prevalence of myasthenia gravis in western Denmark: 1975 to 1989. *Neurology* 1993;43:1779-1783.
117. Lee JY, Sung JJ, Cho JY, et al. MuSK antibodypositive, seronegative myasthenia gravis in Korea. *J Clin Neurosci* 2006;13:353–355.
118. Zhang X, Yang M, Xu J, et al. Clinical and serological study of myasthenia gravis in HuBei Province, China. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78: 386–390.
119. Stickler DE, Massey JM, Sanders DB. MuSK-antibody positive myasthenia gravis: clinical and electrodiagnostic patterns. *Clin. Neurophysiol* 2005;116:2065–2068.
120. Oh SJ, Hatanaka Y, Hemmi S, et al. Repetitive nerve stimulation of facial muscles in MuSK antibodypositive myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2006;33:500–504.
121. Grob D, Arsura EL, Brunner NG, Namba T. The course of myasthenia gravis and therapies affecting outcome. *Ann N Y Acad Sci* 1987;505:472-499.
122. Kaminski HJ, Maas E, Spiegel P, Ruff RL. Why are eye muscles frequently involved in myasthenia gravis? *Neurology* 1990;40:1663-1669.
123. Oosterhuis HJGH. The natural course of myasthenia gravis: a long-term follow-up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:1121-1127.



124. Farrugia ME. A limited epidemiological study of seropositive myasthenia gravis in Tayside. *Scottish Medical Journal* 2002;47 (6):132-135.
125. Nemoto Y, Kuwabara S, Misawa S, et al. Patterns and severity of neuromuscular transmission failure in seronegative myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:714–718.
126. Caress J, Hunt C, Batish S. Anti-MuSK Myasthenia Gravis Presenting With Purely Ocular Findings. *Arch Neurol* 2005;62:1002-1003.
127. Wolfe GI, Oh SJ. Clinical phenotype of muscle-specific tyrosine kinase-antibody-positive myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:71-75.
128. Kostera-Pruszczyk A, Kamińska A, Dutkiewicz M, Emeryk-Szajewska B, Strugalska-Cynowska MH, Vincent A, et al. MuSK-positive myasthenia gravis is rare in the Polish population. *Eur J Neurol* 2008;15: 720-724.
129. Oh SJ. Muscle-Specific Receptor Tyrosine Kinase Antibody Positive Myasthenia Gravis Current Status. *J Clin Neurol* 2009;5:53-64.
130. Farrugia ME, Robson MD, Clover L, Anslow P, Newsom-Davis J, Kennett R, et al. MRI and clinical studies of facial and bulbar involvement in MuSK antibody-associated myasthenia gravis. *Brain* 2006;129:1481-1492.
131. Spengos K, Vassilopoulou S, Papadimas G, Tsivqoulis G, Karandreas N, Zambelis T, et al. Dropped head syndrome as prominent clinical feature in MuSK-positive myasthenia gravis with thymus hyperplasia. *Neuromuscul Disord* 2008;18:175-177.
132. Padua L, Tonali P, Aprile I, Caliandro P, Bartoccioni E, Evoli A. Seronegative myasthenia gravis: comparison of neurophysiological picture in MuSK+ and MuSK- patients. *Eur J Neurol* 2006;13:273-276.
133. Pasnoor M, Wolfe G, Nations S, Trivedi J, Barohn RJ, Hervbelin L, et al. Clinical findings in MuSK-antibody positive myasthenia gravis. A U.S. Experience. *Muscle Nerve* 2010;41(3):370-4.
134. Béhin A, Mayer M, Kassis-Makhoul B, Jugie M, Espil-Taris C, Ferrer X, et al. Severe neonatal myasthenia due to maternal anti-MuSK antibodies. *Neuromuscul Disord* 2008;18:443-446.
135. Niks EH, Verrips A, Semmekrot BA, Prick MJ, Vincent A, van Tol MJ, et al. A transient neonatal myasthenic syndrome with anti-musk antibodies. *Neurology* 2008;70:1215-1216.

136. Hara K, Mashima T, Matsuda A, Tanaka K, Tomita M, Shiraishi H, et al. Vocal cord paralysis in myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies. *Neurology* 2007;68:621-622.
137. Díaz-Manera J, Rojas-García R, Gallardo E, Juárez C, Martínez-Domen A, Martínez-Ramírez S, et al. Antibodies to AChR, Musk and VGKC in a patient with myasthenia gravis and Morvan's syndrome. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3:405-410.
138. Kuwarbara S, Nemoto Y, Misawa S, Takahashi H, Kawaguchi N, Hattori T. Anti-MuSK positive myasthenia gravis: neuromuscular transmission failure in facial and limb muscles. *Acta Neurol Scand* 2007;115:126-128.
139. Nikolic A, Djukic P, Basta I, Hajdukovic Lj, Stojanovic VR, Stevic Z, Nikolic D, Bozic V, Lavrnic S, Lavrnic D. The predictive value of the presence of different antibodies and thymus pathology to the clinical outcome in patients with generalized myasthenia gravis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115(4):432-7.
140. Farrugia ME, Kennett RP, Hilton Jones D, Newsom Davis J, Vincent A. Quantitative EMG of facial muscles in myasthenia patients with MuSK antibody. *Clin Neurophysiol* 2007;118:269–277.
141. Cenacchi G, Papa V, Fanin M, Pegoraro E, Angelini C. Comparison of muscle ultrastructure in myasthenia gravis with anti-MuSK and anti-AChR antibodies. *J Neurol* 2011;258:746–752.
142. Hain B, Hanisch F, Deschauer M. Seronegative myasthenia with antibodies against muscle-specific tyrosin kinase. *Nervenartz* 2004;75:362–367.
143. Rostedt Punga A, Ahlqvist K, Bartoccioni E, et al. Neurophysiological and mitochondrial abnormalities in MuSK antibody seropositive myasthenia gravis compared to other immunological subtypes. *Clin Neurophysiol* 2006;117:1434–1443.
144. Benveniste O, Jacobson L, Farrugia ME, et al. MuSK antibody positive myasthenia gravis plasma modifies MURF-1 expression in C2C12 cultures and mouse muscles in vivo. *J Neuroimmunol* 2005;170:41–48.
145. Martignago S, Fanin M, Albertini E, et al. Muscle histopathology in myasthenia gravis with antibodies against MuSK and AChR. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009;35:103–110.
146. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704–1708.
147. Boneva N, Frenkian-Cuvelier M, Bidault J, et al. Major pathogenic effects of anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2006;177:119–131.

148. Okada K, Inoue A, Okada M, et al. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 2006;312:1802-5.
149. Beeson D, Higuchi O, Palace J, et al. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* 2006;313:1975-8.
150. Palace J, Lashley D, Newsom-Davis J, et al. Clinical features of the DOK7 neuromuscular junction synaptopathy. *Brain* 2007;130(6):1507-15.
151. Slater CR, Fawcett PR, Walls TJ, et al. Pre- and post-synaptic abnormalities associated with impaired neuromuscular transmission in a group of patients with "limb-girdle myasthenia". *Brain* 2006;129:2061-76.
152. Gilhus NE, Owe JF, Hoff JM, Romi F, Skeie GO, Aarli JA. Myasthenia Gravis: A Review of Available Treatment Approaches (Review). *Autoimmune Dis* 2011;2011:847393.
153. Osserman KE, Genkins G. Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience in over 1200 patients. *Mount Sinai J Med* 1971;38:497-536.
154. Jeretzki A 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keesey JC, Penn AS, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia gravis Foundation of America. (Review). *Neurology* 2000;55:16-23.
155. Hatanaka Y., Hemmi S, Morgan MB, et al. Nonresponsiveness to anticholinesterase agents in patients with MuSK-antibody-positiveMG. *Neurology* 2005;65:1508–1509.
156. Punga AR, Flink R, Askmark H, et al. Cholinergic neuromuscular hyperactivity in patients with myasthenia gravis seropositive for MuSK antibody. *Muscle Nerve* 2006;34:111–115.
157. Sanders DB, Howard JF, Massey JM. Seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1987;22:126.
158. Massey JM. Acquired myasthenia gravis (Review). *Neurol Clin* 1997;15:577-595.
159. Bertorini TE, Stalberg EV, Yuson CP, Engel WK. Single-fiber electromyography in neuromuscular disorders: correlation of muscle histochemistry, single-fiber electromyography, and clinical findings. *Muscle Nerve* 1994;17:345-353.
160. Sanders DB, Stalberg EV. AAEM minimonograph #25: singlefiber electromyography (Review). *Muscle Nerve* 1996;19:1069-1083.

161. Farrugia ME, Kennett RP, Newsom-Davis J, et al. Single-fiber electromyography in limb and facial muscles in muscle-specific kinase antibody and acetylcholine receptor antibody myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2006;33:568–570.
162. Griesman GE, Lennon VA. Detection of autoantibodies in myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. In: Rose NR, Conway DeMacario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds): *Manual of clinical and laboratory immunology*, 5th ed. ASM Press: Washington DC, 1997:983-988.
163. Sundevall AC, Lefvert AK, Olsson R. Anti-acetylcholine receptor antibodies in primary biliary cirrhosis. *Acta Med Scand* 1985;217:519-525.
164. Apostolski S. Imunološki dijagnostički testovi za stečenu autoimunu miasteniju gravis. U: Apostolski S, Lavrnjić D, Đukić P (urednici). *Myasthenia gravis*. Vizartis Beograd 1998;93-100.
165. Sano M, Lennon V. Enzyme immunoassay of anti-human acetylcholine receptor autoantibodies in patients with myasthenia gravis reveals correlation with striational autoantibodies. *Neurology* 1993;43:573-578.
166. Scuderi F, Marino M, Colonna L, et al. Anti-p110 autoantibodies identify a subtype of „seronegative“ myasthenia gravis with prominent oculobulbar involvement. *Lab Invest* 2002;82:1139-1146.
167. Palace J, Newsom-Davis J, Lecky B. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Myasthenia gravis study group. *Neurology* 1998;50:1778-83.
168. Cartaud A, et al. MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2007;165:505–515.
169. Deymeer F, et al. Clinical comparison of anti-MuSK versus anti-AChR-positive and seronegative myasthenia gravis. *Neurology* 2007;68:609–611.
170. Vincent A, Leite M.I. Neuromuscular junction autoimmune disease: muscle specific kinase antibodies and treatments for myasthenia gravis. *Curr Opin Neurol* 2005;18:519–525.
171. Hain B, et al. Successful treatment of MuSK antibody positive myasthenia gravis with rituximab. *Muscle Nerve* 2006;33:575–580.
172. Lin P, et al. High-dose cyclophosphamide in refractory myasthenia gravis with MuSK antibodies. *Muscle Nerve* 2006;33:433–435.
173. Drachman DB, et al. Treatment of refractory myasthenia: ‘rebooting’ with high-dose cyclophosphamide. *Ann Neurol* 2003;53:29–34.

174. Takahashi H, et al. High-dose intravenous immunoglobulin for the treatment of MuSK antibodypositive seronegative myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2006;247:239–241.
175. Guptill JT, Sanders DB, Evoli A. Anti-MuSK antibody myasthenia gravis: clinical findings and response to treatment in two large cohorts. *Muscle Nerve* 2011;44:36–40.
176. Schumacher ED, Roth J. Thymectomy bei einem fall von Morbus Basedowi mit Myasthenie mitt grenlgeb. *Med Chir Jena* 1912;25:746-765.
177. Viets HR. Thymectomy in Myasthenia gravis. *Br Med J (Clin Res)* 1950;1:139-147.
178. Harvey AM. Some preliminary observations on the clinical course of Myasthenia gravis before and after thymectomy. *Bull NY Acad Med* 1946;24:505-522.
179. Skeie GO, Apostolski S, Evoli A, Gilhus NE, Hart IK, Harms L, Hilton Jones D, et al. Guidelines for the treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol* 2006;13:691-699.
180. Wechsler A. Surgical management of Myasthenia gravis. In: Sabiston D, Spencer F (eds). *Surgery of the Chest*. Saunders, Philadelphia 1995;1100-1122.
181. Hilton-Jones D. When the patient fails to respond to treatment: myasthenia gravis. *Pract Neurol* 2007;7:405-411.
182. Guillermo GR, Tellez-Zenteno JF, Weder-Cisneros N, et al. Response of thymectomy: clinical et pathological characteristics among seronegative and seropositive myasthenia gravis patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 2004;109:217-221.
183. Stickler DE, Stickler LL. Single-fiber electromyography during menstrual exacerbation and ovulatory suppression in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2007;35:808–811.
184. Murai H, et al. Infantile onset myasthenia gravis with MuSK antibodies. *Neurology* 2006;67:174.
185. Ishii W, et al. Myasthenia gravis with anti-MuSK antibody, showing progressive muscular atrophy without blepharoptosis. *Intern Med* 2005;44:671–672.
186. Saka E, et al. Thymus changes in anti-MuSK-positive and -negativemyasthenia gravis. *Neurology* 2005;65:782–783.

187. Massey JM. Treatment of acquired myasthenia gravis. *Neurology* 1997;48(5):S46-S51.
188. Barohn RJ, McIntire D, Herbelin L, Wolfe GI, Nations S, Bryan W. Reliability testing of the quantitative myasthenia gravis score. *Ann NY Acad Sci* 1998;841:769-72.
189. Hajduković Lj, Lavrnić D, Vujić A, Apostolski S. Određivanje autoantitela na acetilholinski receptor – značaj za dijagnozu i terapiju miastenije gravis. *Jugoslav Med Biohem* 2004;23(3):128-129.
190. Sarrigiannis PG, Kennett RP, Read S, Farrugia ME. Single-fiber EMG with a concentric needle electrode: validation in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2006;33(1):61-5.
191. Stalberg E, Chu J, Bril V, et al. Automatic analysis of the EMG interference pattern. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1983;56:672-81.
192. Buchthal F. An introduction to electromyography. Gylendal, Copenhagen: Scan Univ Books, 1957.
193. Stål P, Marklund S, Thornell LE, De Paul R, Eriksson PO. Fibre composition of human intrinsic tongue muscles. *Cells Tissues Organs* 2003;173:147–61.
194. Naressi A, Couturier C, Devos JM, Janssen M, Mangeat C, de Beer R, et al. Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. *Magma* 2001;12:141–52.
195. Vanhamme L, van den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson* 1997;129:35–43.
196. Ewing D. Analysis of heart rate variability and other non-invasive tests with special reference to diabetes mellitus. In: Mathias C, Bannister R, editors. *Autonomic failure: A textbook of clinical disorders of the autonomic nervous system*. 3rd ed. Oxford University Press; 1992. p. 312–33.
197. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 1996;17(3):354-81.
198. Drew BJ, Califf RM, Funk M, Kaufman ES, Krucoff MW, Laks MM, et al. Practice standards for electrocardiographic monitoring in hospital settings: an American Heart Association scientific statement from the Councils on Cardiovascular

- Nursing, Clinical Cardiology, and Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the International Society of Computerized Electrocardiology and the American Association of Critical-Care Nurses. *Circulation* 2004;110(17):2721–46.
199. Lavrnjic D, Dakovic M, Peric S, Rakocevic-Stojanovic V, Basta I, Marjanovic I, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy of the intrinsic tongue muscles in patients with myasthenia gravis with different autoantibodies. *Journal of the Neurological Sciences* 2011;302:25–28.
  200. Palmisani MT, Evoli A, Batocchi AP, et al. Myasthenia gravis associated with thymoma: clinical characteristics and long-term outcome. *Eur Neurol* 1993;34:78-82.
  201. Suhail H, Subbiah V, Singh S, Behari M. Musk-antibody positive myasthenia gravis and their clinical features in North India. *Neurology* 2010;74(2):A91–A92.
  202. Witoonpanich R, Dejthevaporn C, Sriphrapradang A, Pulkes T. Electrophysiological and immunological study in myasthenia gravis: Diagnostic sensitivity and correlation. *Clinical Neurophysiology* 2011;122:1873–1877.
  203. Evoli A, et al. Clinical heterogeneity of seronegative myasthenia gravis. *Neuromusc Disord* 1996;6:155–161.
  204. Engel WK, McFarlin DE. Muscle lesions in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1966;135:68–78.
  205. Oosterhuis HJGH. *Myasthenia Gravis*. Groningen Neurological Press. Groningen. 1997, Chapter 7: 173–175.
  206. Servidei S, et al. Association of myasthenia gravis and mitochondrial myopathy: double trouble or pathogenically correlated diseases? (abstract) *Neuromusc Disord* 2006;16(1):152.
  207. Xu K, Jha S, Hoch W, Dryer SE. Delayed synapsing muscles are more severely affected in an experimental model of MuSK-induced myasthenia gravis. *Neuroscience* 2006;143:655– 659.
  208. Stal P, Eriksson PO, Schiaffino S, Butler-Browne GS, Thornell LE. Differences in myosin composition between human oro-facial, masticatory and limb muscles: enzyme-, immunohisto- and biochemical studies. *J Muscle Res Cell Motil* 1994;15:517–34.
  209. Goodmurphy CW, Ovalle WK. Morphological study of two human facial muscles: orbicularis oculi and corrugator supercilii. *Clin Anat* 1999;12:1–11.
  210. Mastaglia FL. Adverse effects of drugs on muscle. *Drugs* 1982;24:304–21.

211. Zouvelou V, Rentzos M, Toulas P, Evdokimidis I. MRI evidence of early muscle atrophy in MuSK positive myasthenia gravis. *J Neuroimaging* 2011;21(3):303-5.
212. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy related-ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004;117:399-412.
213. Gibson TC. The heart in myasthenia gravis. *Am Heart J* 1975;90(3):389-96.
214. Stoica E, Enulescu O. Deficiency of sympathetic nervous system function in myasthenia. *J Auton Nerv Syst* 1992;38(1):69-76.
215. Lechin F, van der Dijs B, Pardey-Maldonado B, John E, Jimenez V, Orozco B, et al. Enhancement of noradrenergic neural transmission: an effective therapy of myasthenia gravis: a report on 52 consecutive patients. *J Med* 2000;31(5-6):333-61.
216. Douchet MP, Quiring E, Bronner F, Vi-Fane R, Messier M, Chauvin M, et al. Paradoxal lowering of parasympathetic indices in myasthenic patients. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1999;92(6):711-7.
217. Balestra B, Moretti M, Longhi R, Mantegazza R, Clementi F, Gotti C. Antibodies against neuronal nicotinic receptor subtypes in neurological disorders. *J Neuroimmunol* 2000;102(1):89-97.
218. Vernino S, Cheshire WP, Lennon VA. Myasthenia gravis with autoimmune autonomic neuropathy. *Auton Neurosci* 2001;88(3):187-92.
219. Rakocevic G, Barohn R, McVey AL, Damjanov I, Morte PD, Vernino S, et al. Myasthenia gravis, thymoma, and intestinal pseudo-obstruction: a case report and review. *J Clin Neuromuscul Dis* 2003;5(2):93-5.
220. Vernino S, Lennon VA. Autoantibody profiles and neurological correlations of thymoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(21):7270-5.
221. Vernino S, et al. Characterization of ganglionic acetylcholine receptor autoantibodies. *J Neuroimmunol* 2008;197:63-69.
222. Vernino S, et al. Neuronal acetylcholine receptor autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2008;1132:124-128.
223. Anderson NE, et al. Intestinal pseudo-obstruction, myasthenia gravis, and thymoma. *Neurology* 1996;47:985-987.
224. Lennon V, et al. Immunization with neuronal nicotinic acetylcholine receptor induces neurological autoimmune disease. *J Clin Invest* 2003;111:907-913.



225. Miglis MG, Racela R, Kaufmann H. Seropositive myasthenia and autoimmune autonomic ganglionopathy: Cross reactivity or subclinical disease? *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2011;164:87–88.
226. Pavlovic S, Stevic Z, Milovanovic B, Milicic B, Rakocevic-Stojanovic V, Lavrnic D, et al. Impairment of cardiac autonomic control in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11(3):272–6.
227. Rakocevic-Stojanovic V, Milovanovic B, Ivic N, Ille T, Marjanovic I, Stevic Z, et al. Cardiac autonomic nervous system in patients with myotonic dystrophy type 1. *Acta Myol* 2007;26:112–4.
228. Gunal DI, Afsar N, Tanridag T, Aktan S. Autonomic dysfunction in multiple sclerosis: correlation with disease-related parameters. *Eur Neurol* 2002;48(1):1–5.
229. Buob A, Winter H, Kindermann M, Becker G, Möller JC, Oertel WH, et al. Parasympathetic but not sympathetic cardiac dysfunction at early stages of Parkinson's disease. *Clin Res Cardiol* 2010;99(11):701-6.
230. Peric S, Rakocevic Stojanovic V, Nisic T, et al. Cardiac autonomic control in patients with myasthenia gravis and thymoma. *Journal of the Neurological Sciences* 2011;307:30–33.
231. Bartoccioni E, Scuderi F, Augugliaro A, Chiatamone Ranieri S, Sauchelli D, Alboino P, et al. HLA class II allele analysis in musk positive myasthenia gravis suggests a role for DQ5. *Neurology* 2009;13;72(2):195-7.
232. Evoli A, Lindstrom J. Myasthenia gravis with antibodies to MuSK. Another step toward solving mystery? *Neurology* 2011;77:1783-1784.
233. Rostedt Punga A, Stålberg E. Acetylcholinesterase inhibitors in myasthenia gravis: to be or not to be? *Muscle Nerve* 2009;39:724–728.
234. Evoli A, Bianchi M, Riso R, et al. Response to Therapy in Myasthenia Gravis with Anti-MuSK Antibodies. *Ann NY Acad Sci* 2008;1132:76–83.

## SPISAK SKRAĆENICA

MG	Stečena autoimuna miastenija gravis
AChR	Nikotinski acetilholinski receptor
Anti-AChR At	Anti-acetilholin receptor antitela
Anti-MuSK At	Anti-mišićno specifična tirozin kinazna antitela
Lrp4	engl. <i>Low density lipoprotein receptor related protein 4</i>
Anti-Lrp4 At	engl. <i>Anti-low density lipoprotein receptor related protein 4</i> antitela
NMS	Neuromišićna spojnica
ACh	Acetil-holin
SNARE proteini	Solubilni vezujući faktor N-etilmaleimid senzitivnih fuzionih proteina
SNAP-25	Sinaptozom-udruženi protein od 25 kD
EPSP	Ekscitatorni postsinaptički potencijal
AChE	Acetil-holin esteraza
TRS	Test repetitivne stimulacije nerva
MIR	Glavni imunogeni region
MuSK	Mišić specifična tirozin kinaza
LFH	Limfocitarna hiperplazija
CD4+	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
PH	Patohistološki
Ig	Imunoglobulin
SNMG	Seronegativna miastenija gravis
CRD	Cisteinom bogat region
EAMG	Eksperimentalna autoimuna miastenija gravis
LEMS	Lambert-Eaton miastenični sindrom
HLA	Humani leukocitni antigen
MHC	Glavni histokompatibilni kompleks
SAD	Sjedinjene Američke države
SFEMG	Elektromiografija pojedinačnog mišićnog vlakna
m.EDC	lat. <i>Musculus extensor digitorum communis</i>
MR	Magnetna rezonanca

EMG	Elektromiografija
m.OO	lat. <i>Musculus orbicularis oculi</i>
MURF-1	engl. <i>Muscle ring finger protein 1</i>
mRNK	Informaciona ribonukleinska kiselina
MGFA	engl. <i>Myasthenia gravis Foundation of America</i>
CMAP	Zbirni akcioni potencijal mišića
RIA	Radioimunoesej
ELISA	engl. <i>Enzyme linked immunoassay</i>
TIP	Terapijske izmene plazme
IVIg	Intravenski imunoglobulini
KCS	Klinički Centar Srbije
QMGs	Kvantitativni miastenija gravis skor
MM	Minimalne manifestacije
MUP	Potencijali motornih jedinica
TA analiza	Analiza obrt-amplituda
m.ADM	lat. <i>Musculus abductor digiti minimi</i>
MCD	Srednja konsektivna razlika
MRS	Magnetna spektroskopija
FWHM	Puna širina na polovini maksimuma, engl. <i>Full width at half maximum</i>
ANS	Autonomni nervni sistem
BRS	Osetljivost barorefleksa
CI	Srčani indeks
TPRI	Ukupni indeks perifernog otpora
MIPI	Srednji interpotencijalni interval
MSD	Srednja sortirana razlika

**PRILOG 1.****KVANTITATIVNI MIASTENIJA GRAVIS SKOR (OMGS)**

	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Dupla slika</b>	Bez dvoslike >61 sec	11-60 sec	1-10 sec	Spontana dvoslika
<b>Ptoza</b>	Bez ptoze > 61 sec	11-60 sec	1-10 sec	Spontana ptoza
<b>Mimični mišići</b>	Normalno zatvaranje očiju	Potpuno zatvaranje očiju, moguć blaži otpor ispitivaču	Potpuno zatvaranje očiju, ali nemoguć otpor ispitivaču	Bellov fenomen
<b>Gutanje (pola čaše vode)</b>	Normalno gutanje	Lako zagrcnjavanje (poput pročišćavanja grla)	Zagrcnjavanje uz vraćanje tečnosti na nos	Nemogućnost gutanja
<b>Brojanje 1-50</b>	Uredan govor	Dizartrija između broja 30-49	Dizartrija između broja 10 i 29	Dizartrija pre broja 9
<b>Abdukcija desne ruke</b>	Moguća 240 sec	90-239 sec	10-89 sec	0-9 sec
<b>Abdukcija leve ruke</b>	Moguća 240 sec	90-239 sec	10-89 sec	0-9 sec
<b>Vitalni kapacitet</b>	Jednak ili veći od 80%	65-79%	50-64%	Ispod 50%
<b>Stisak desne šake (muškarci/žene)</b>	Više ili jednako od M: 45 / Ž:30 kg	M: 15-44 kg / Ž: 10-29kg	M: 5-14 kg / Ž: 5-9 kg	0-4 kg za oba pola
<b>Stisak leve šake (muškarci/žene)</b>	Veće ili jednako od M: 35 / Ž: 25 kg	M: 15-34 kg/ Ž: 10-24 kg	M: 5-14 kg/ Ž: 5-9 kg	0-4 kg za oba pola
<b>Odizanje glave od podloge</b>	Više od 120 sec	30-119 sec	1-29 sec	0 sec
<b>Elevacija desne noge od postelje</b>	Više od 100 sec	31-99 sec	1-30 sec	0 sec
<b>Elevacija leve noge od postelje</b>	Više od 100 sec	31-99 sec	1-30 sec	0 sec

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Dr Ana Nikolić je rođena 1974.godine u Beogradu. Medicinski fakultet u Beogradu je završila 2000.god. sa prosečnom ocenom 9.40. Specijalistički ispit iz neurologije položila je 2005.god. sa odličnom ocenom. Od marta 2002. god. zaposlena je na Neurološkoj klinici Kliničkog Centra Srbije u Beogradu na odeljenju za neuromišićne bolesti i oboljenja kičmene moždine i u elektromioneurografskom kabinetu.

Magistarsku tezu pod nazivom „Odnos prisustva antitela na acetil-holinški receptor i patologije timusa kod generalizovane miastenije gravis“ odbranila je 2009. god. pod mentorstvom Prof.dr Dragane Lavrnić. Obavila je šestomesečnu edukaciju iz oblasti elektromioneurografije u Univerzitetškoj bolnici u Upsali, Švedska tokom 2007/08.god. U okviru EFNS programa je boravila 6 nedelja na odeljenju neurologije Univerzitetške bolnice u Ferari, Italija 2004. god. Autor je ili koautor preko 100 stručnih radova, od kojih je 26 radova publikovano u celini u međunarodnim i domaćim časopisima, a ostali radovi su štampani kao izvodi u publikacijama inostranih i domaćih Kongresa. Član je Srpskog lekarskog društva, Lekarske komore grada Beograda, Evropske federacije neuroloških društava, Svetskog udruženja neurologa, Društva neurofiziologa Srbije, Društva za periferni nervni sistem Srbije i Udruženja mladih neurologa Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а др Ана Николић

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом  
КИМИЈА, ЕЛЕКТРОХИМИЈА И ИМУНОЛОГИЈА СПЕЦИФИЧНОГ  
СТЕБЕНЕ АУТОИМУНЕ МИЈАСТЕНИЈЕ БРАЊА УЛОДЕРНЕ ЈА АНТИГЕНА  
РЕБНА МИЈЕ - СПЕЦИФИЧНОГ ДИФЕРЕНЦИЈА

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

Потпис докторанда

У Београду, 02.09.2013.

Ана Николић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ANA NIKOČIĆ

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм NEUROLOGIJA

Наслов рада УЛИТИК, ЕЛЕКТРОФИЗИЈА, РАДОБЕТЕЛИЈЕ И ИМУНОЛОГИЈЕ У ПСИХИЈАТРИЈИ  
УТИТИКЕ АУТОИМУНЕ СИСТЕМНЕ БРАИНС УОРОВЕРМС ЈА АНТИТЕЉМА  
ПРЕМА МЛТ-ПРЕЦИТИМОС ПУБЕР ИМАЗ

Ментор PROF. DR. DRAGAN LAURMIĆ

Потписани DR ANA NIKOČIĆ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 02.09.2013

ANA NIKOČIĆ

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: КИМИЈА, ЕЛЕКТРОХИМИЈА, РИТМОВЕТИЈА И ИМУНОЛОГИЈА ПРЕИНСУЛИНСКОГ ДИЈАБЕТА АУТОРИМОРФНЕ МАТРИЦЕ БРАЊИ ВОДОВОДНЕ ЈА АРТЕИЈА ПРМА МИТО-ПРЕЦИРЕНЦИ ПЛОЊИ КИМАЗ

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 02.09.2013.

А. Чичић