

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA MYASTHENIA GRAVIS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Odborný konzultant: MUDr. Zdislava Vaničková, Mgr, Jana Uhrová

Hradec Králové 2022

Zdeňka Hrouzková

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D., za odborné vedení a konzultace a dále MUDr. Zdislavě Vaničkové a Mgr. Janě Uhrové za užitečné připomínky, ochotu spolupracovat a usměřování při psaní bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod	5
2	Myasthenia gravis.....	6
2.1	Popis onemocnění	6
2.2	Podstata onemocnění.....	6
2.2.1	Porucha nervosvalového přenosu	7
2.2.2	Acetylcholinové receptory	9
2.2.3	Svalově specifická tyrozinkináza.....	9
2.2.4	Protein titin.....	11
2.3	Formy myasthenia gravis	11
2.4	Centra péče o nemocné s myasthenia gravis	12
3	Postupy stanovení diagnózy myasthenia gravis	12
3.1	Klinické testy.....	13
3.2	Laboratorní testy	15
4	Cíle práce.....	16
5	Materiál a metodika	17
5.1	Stanovení autoprotilátek proti acetylcholinovým receptorům	17
5.1.1	Obsah soupravy.....	18
5.1.2	Pracovní postup.....	18
5.2	Stanovení autoprotilátek proti svalově specifické tyrozinkináze	19
5.2.1	Obsah soupravy.....	20
5.2.2	Pracovní postup.....	21
6	Výsledky.....	23
6.1	Soubor pacientů.....	23
6.2	Počet vyšetření protilátek proti acetylcholinovým receptorům a protilátek proti svalově specifické tyrozinkináze.....	24
6.3	Podíl pozitivních výsledků protilátek proti acetylcholinovým receptorům a protilátek proti svalově specifické tyrozinkináze.....	24
6.4	Srovnání sledovaných hodnot u pacientů s myasthenia gravis a u pacientů s jinými poruchami nervové soustavy	25
7	Diskuse	27
8	Závěr.....	29
9	Seznam zkratk.....	30
10	Použitá literatura	31
11	Elektronické zdroje	32

1 Úvod

Myasthenia gravis (MG) je onemocnění autoimunitní povahy. Jedná se o poruchu nervosvalového přenosu. MG je druhým nejčastějším neurologickým autoimunitním onemocněním. Toto onemocnění může vést až ke smrti, pokud jsou postiženy především dýchací svaly, a proto je nutná včasná diagnóza. Tato porucha je způsobena narušením komunikace mezi svalem u neurosvalové ploténky a nervem. A to jednak protilátkami proti acetylcholinovému receptoru (Ab-AChR), které tyto receptory blokuje, anebo protilátkami, které jsou namířené proti svalově specifické tyrozinkináze (Ab-MuSK) a ty napadají proteiny uvnitř svalových buněk a vedou k jejich destrukci (Web 1). Vzhledem k tomu, že tyto protilátky vznikají v thymu (brzlíku), je u všech nemocných indikována CT mediastina, která může prokázat zvětšený brzlík, případně thymom, což je nádor brzlíku (Zima 2013). Ab-AChR se dají prokázat u 80% pacientů s MG. V současné době se diagnóza MG opírá o sérové vyšetření Ab-AChR a v případě její hladiny nad 0,4 nmol/l se jedná o MG. U hladin Ab-AChR pod 0,4 nmol/l je nutno provést stanovení Ab-MuSK pro potvrzení nebo vyloučení MG (Web 2). MG se vyznačuje slabostí příčně pruhovaného svalstva. Při opakované námaze lidé s touto nemocí během dne postupně slábnou, a mají problém i při takové banální činnosti, jako je například krájení zeleniny (Web 1).

Cílem této práce je prezentovat význam stanovení vysoce specifických Ab-AChR a Ab-MuSK pro diagnostiku neurologického autoimunitního onemocnění MG pomocí zpracování statistických údajů o podílu jejich pozitivitu a o nárůstu počtu analýz výše uvedených protilátek za období let 2015 až 2021 na ÚLBDL VFN (Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice). A dále porovnat rozsahy analyzovaných hladin Ab-MuSK a Ab-AChR mezi skupinou pacientů s MG a skupinou pacientů s jinými poruchami nervové soustavy.

2 Myasthenia gravis

2.1 Popis onemocnění

Myasthenia gravis (MG) je dlouhodobé neuromuskulární onemocnění vedoucí k různě závažné svalové slabosti. Pro toto onemocnění jsou typické příznaky, které však mají různou intenzitu a často se mohou i zhoršovat po tělesné námaze nebo i během dne. Projevy MG se v prvních letech často stupňují, ale později v průběhu nemoci mají tendenci se ustálit. Nejčastěji bývají zasaženy svaly očí, obličeje a svaly polykací.

Typický a nejčastější příznak této nemoci je oslabení očních svalů. To se projevuje tak, že jedno nebo obě oční víčka jsou pokleslá a může se objevit i dvojité vidění, či neschopnost kontrolovat oční pohyby. Z očních svalů se však problém dále rozšiřuje na svaly obličeje a krku. Při delším rozhovoru si můžeme všimnout zhoršení výslovnosti, jazyk má tendenci dřevěnět. To souvisí i se zhoršením polykání až z neschopností sousto polknout a s možností vypadnutí sousta či vytékání tekutiny koutkem úst. Po delším kousání, například houževnatého kousku masa či zeleniny, dochází k oslabení žvýkacího svalstva. Po větší fyzické námaze se zvýší únavnost kosterního svalstva, slabost šíjových svalů, problémy se vzpřímeným držením hlavy, poruchy chůze a držení těla (Ambler 2011, Web 3).

Pokud dojde k postižení dýchacích svalů, zeslabení dýchání nebo až k úplné zástavě dechu mluvíme o Myastenické krizi (MK). Jedná se o velmi závažný a život ohrožující stav. Riziko vývoje MK je cca 20% v prvních dvou letech po propuknutí onemocnění, a to převážně u pacientů s přidruženými interními chorobami (chronická obstrukční plicní nemoc, ischemická choroba srdeční apod.), nad 60 let věku, při psychickém stresu a u pacientů s již prodělanou MK. MK může vzniknout velice rychle, během několika málo minut nebo pomalou progresí generalizované slabosti převážně dýchacích svalů (Piřha 2012).

U pacientů s touto nemocí také existuje zvýšené riziko vzniku dalších autoimunitních onemocnění. Jedná se především o systémový lupus erythematosus, hypothyroidní nebo revmatoidní artritidu (Web 3).

2.2 Podstata onemocnění

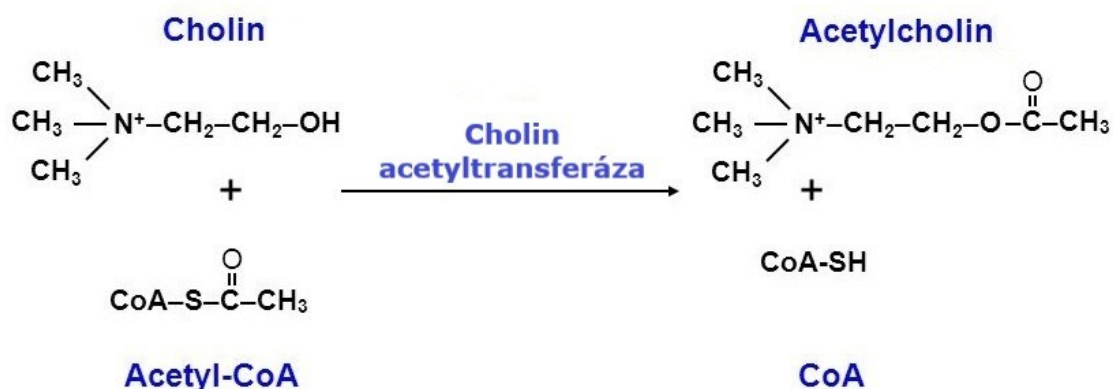
MG je autoimunitní onemocnění, které způsobuje poškození buněk těla vlastních, což je zprostředkováno autoprotilátkami. Tělo produkuje protilátky, které se nejčastěji zaměřují na nikotinové acetylcholinové receptory na povrchu svalových buněk (Ab-AchR). Protilátky

se naváží na receptory, tím je blokuje a signál ke svalové kontrakci nemůže být přijat. A tyto protilátky také aktivují dráhu komplementu, která vede k zánětu a k destrukci svalových buněk. A díky zánětu i destrukci svalových buněk je sníženo množství AchR na povrchu. Tělo může produkovat i jiný typ protilátek zaměřených proti svalové specifické tyrozinokináze (Ab-MuSK). Tyto protilátky napadají proteiny uvnitř svalových buněk a vedou též k destrukci buněk (Web 1).

2.2.1 Porucha nervosvalového přenosu

U MG jde o poruchu nervosvalového přenosu. Přenos informací z nervu na sval se děje na specializované chemické synapsi, zvané nervosvalová ploténka. Hlavním úkolem nervosvalové ploténky je přenos vzruchu z neuronu na vlákno kosterního svalu (Trojan 2003, Ambler 2010).

Za fyziologických podmínek dochází k přenosu vzruchu na neurosvalové ploténce následujícím způsobem. Vzruch, který přichází do nervového zakončení vyvolá exocytózu synaptických váčků a dojde k vyplavení mediátoru do synaptické štěrbině. Mediátorem je acetylcholin (ACh). ACh se tvoří v cytoplazmě presynaptických axonů enzymaticky z acetylkoenzymu A a cholinu (obrázek 1), a je uložen do synaptických váčků.

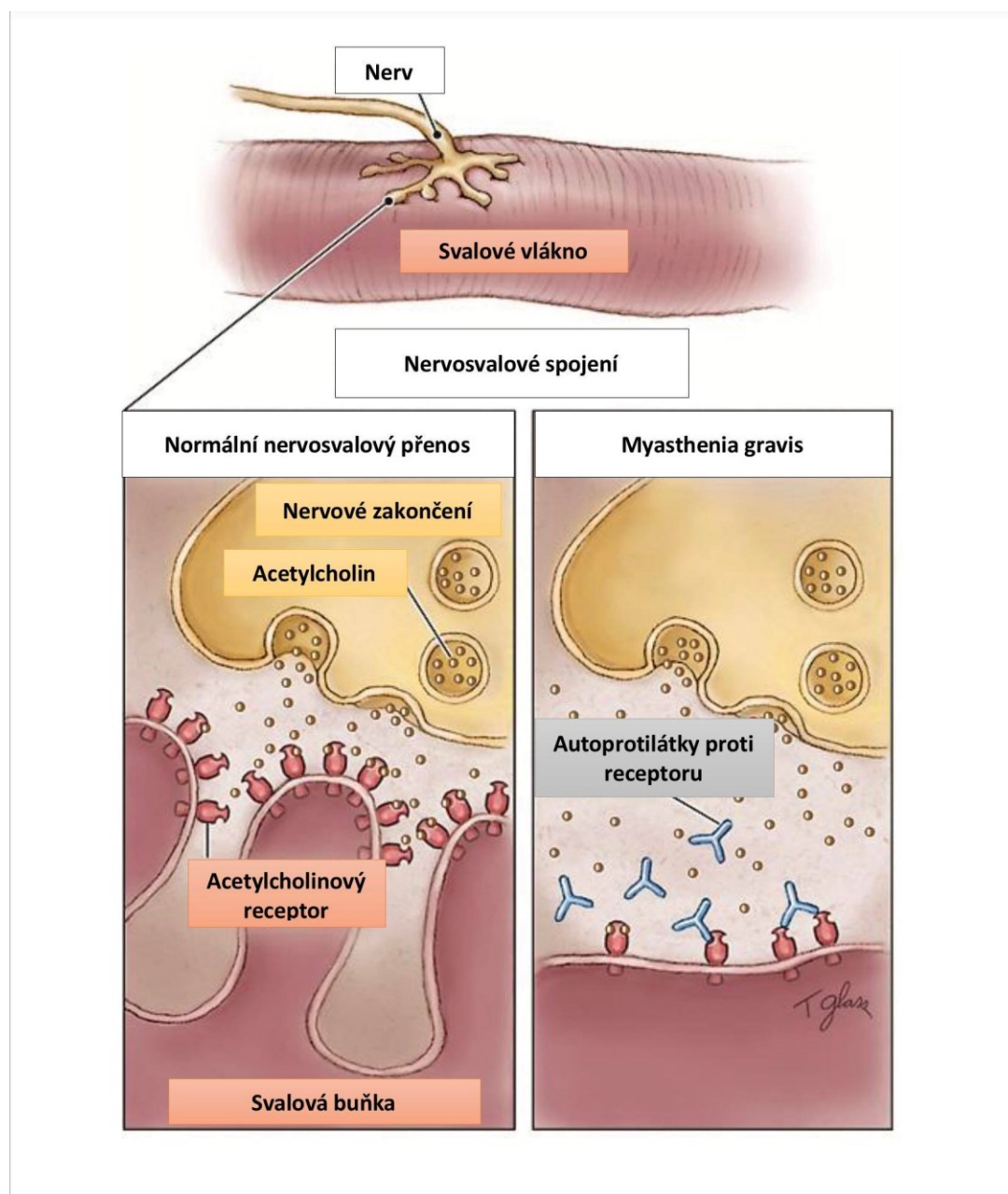


Obrázek 1: Chemická reakce vzniku acetylcholinu (volně dle Web 4)

Vzruch, který dosáhne nervového zakončení depolarizací otevře kalciový kanál, vápenaté kationty se dostanou dovnitř a uvolní několik tisíc molekul ACh, uložených ve váčcích v koncové části neuronu. Uvolněný ACh se naváže na nikotinové acetylcholinové receptory v postsynaptické membráně, tím receptory otevře a dojde k přenosu signálu pro

vznik akčního potenciálu. Akční potenciál je ve svalových buňkách jedním z prvních kroků vedoucích ke svalové kontrakci (Trojan 2003, Růžička a kol. 2019, Kittnar 2011). Po přenosu signálu je ACh rychle štěpen acetylcholinesterázou (AChE) na acetát a cholin.

U MG je nikotinový acetylcholinový receptor blokován autoprotilátkou, a tím pádem nemůže dojít k navázání ACh na tento receptor. Následně nedojde ani k přenosu signálu pro vznik akčního potenciálu a ke svalové kontrakci.



Obrázek 2: Normální nervosvalový přenos a nervosvalový přenos u MG (volně dle Web 5)

2.2.2 Acetylcholinové receptory

Existují dva druhy receptorů. Tak zvané nikotinové ACh-receptory a muskarinové ACh-receptory.

Muskarinové ACh-receptory mají nejméně 5 subtypů (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5) a patří mezi metabotropní receptory. Jsou vázány na G-proteiny a jejich prostřednictvím ovlivňují tvorbu druhých posílů. Váže se na ně alkaloid muskarin, který se vyskytuje i v muchomůrce červené (*Amanita muscaria*). Muskarin se váže podobně jako ACh na receptor, ale na rozdíl od ACh se neštěpí, a proto vyvolává trvalé podráždění svaloviny. Muskarinové ACh-receptory ovlivňují hladinu cAMP v postsynaptických buňkách (Koolman a Röhm 2012, Brandová 2012).

Nikotinové ACh-receptory patří mezi ionotropní receptory. Jsou to ligandy řízené iontové kanály. Tyto receptory jsou tvořeny z pěti samostatných, ale strukturně úzce příbuzných podjednotek. Na neuromuskulární ploténce se nachází uspořádání $\alpha\beta\gamma\alpha\delta$. ACh se váže na obě α -podjednotky. Při vazbě s ACh se iontový kanál otevře a dovolí iontům Na^+ difundovat do postsynaptické buňky, iontům K^+ naopak proudit ven. Nikotinové ACh-receptory reagují i na alkaloid nikotin obsažený v tabáku (Koolman a Röhm 2012, Brandová 2012).

2.2.3 Svalově specifická tyrozinkináza

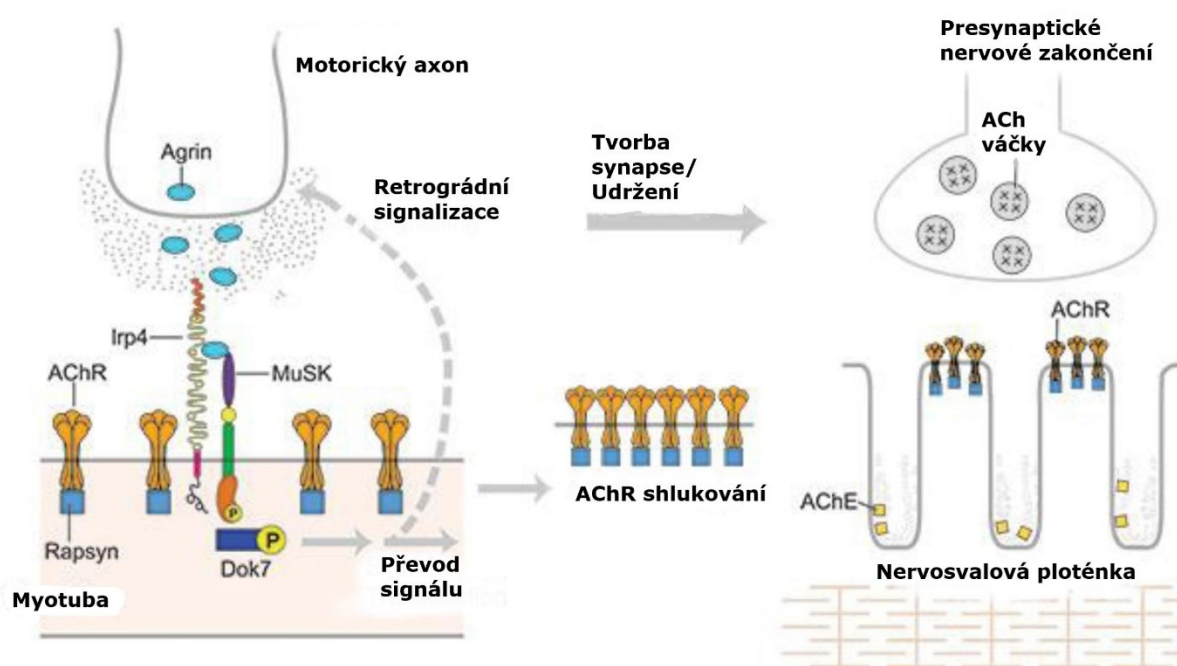
Pro dokonalé fungování nervosvalového přenosu se musí AChR silně zanořit do postsynaptické membrány. K tomu je potřeba celá řada proteinů. Velice důležitá je svalově specifická tyrozinkináza (MuSK) (Piřha 2012).

Molekulární struktura MuSK je docela komplikovaná. MuSK je 100 kD jednou membránou procházející receptor pro tyrozinkinázu s N-terminální doménou, která je extracelulárně následovaná krátkou transmembránovou doménou a C-terminální cytoplazmatickou doménou. Extracelulární doména MuSK je nutná proto, aby mohla spolupracovat s proteinem agrinem a lrp4. Má tři domény, které vypadají podobně jako imunoglobuliny (Ig), a dále je tam na cystein bohatá kadeřavá oblast. Cytoplazmatická doména nese kinázovou aktivitu a další signalizační složky molekuly, které vedou k rozvoji postsynaptického aparátu. První dvě extracelulární imunoglobulinově podobné domény, které jsou pevně seskupeny lineárně za sebou, hrají dvojí roli v aktivaci MuSK signalizace. Za prvé, Ig-1 je důležitá pro vazbu MuSK ligandu, to znamená s agrinem asociovaný lrp4. Za druhé,

on sám je součástí dimerizace dvou MuSK molekul. Dimerizace je důležitá k tomu, aby se MuSK mohl autofosforylovat. Autofosforylace spolu s vazbou Dok7 (docking protein 7) vede k plné aktivaci MuSK (Borges a Richman 2020).

MuSK byla rozpoznána jako membránový postsynaptický protein, který hraje hlavní roli ve vývoji neuromuskulárního spojení. Tato synapse se začíná tvořit, když se růstový vrchol axonu vyvíjejícího se motorického neuronu setká s vyvíjející se myotubou budoucího svalu a začne vylučovat agrin. Agrin je glykoprotein, který má doménu pro vázání bílkoviny lamininu, a je ukotvený k extracelulární matrix. AChR jsou zpočátku rozptýleny rovnoměrně podél myotube. Před příchodem axonu se AChR začnou shlukovat v centrální oblasti myotube. V okamžiku, kdy růstový vrchol axonu narazí na tuto oblast, začne se vylučovat agrin. Agrin způsobí, že AChR se budou více shlukovat v membráně postsynaptické koncové ploténky (obrázek 2) (Borges a Richman 2020).

Zjednodušeně by se dalo říct, že MuSK je aktivovaná agrinem, který způsobuje shlukování AChR. Agrin prostřednictvím MASC (myotube-associated specificity component) působí na MuSK. Dalším z aktivátorů MuSK je bílkovina Dok-7. A poslední z důležitých proteinů je rapsyn, který napomáhá při procesu shlukování AChR (Piřha 2012).



Obrázek 3: Tvorba neuromuskulárního spojení (volně dle Borges a Richman 2020)

2.2.4 Protein titin

Protein titin neboli konektin je obrovský protein elastického typu, který se nachází v sarkomeře v příčně pruhované svalovině. Díky své velké délce sahá od Z-disku až k myosinové oblasti uprostřed sarkomery. Titin je nejdelší protein v lidském těle. Jedná se o polypeptid, který je složen z 34 350 aminokyselin a jeho molekulární hmotnost je 3 700 kDa. Jeho délka je asi 1,2 mikrometru. Titin je lineární protein s modulární strukturou a obsahuje fibronektinové (Fn III) a imunoglobulinové (Ig) oblasti. Výroba titinu na ribozomu trvá 2–3 hodiny, zatímco výroba běžných bílkovin trvá několik minut. Titin má schopnost pracovat jako tzv. molekulární pružina a má tendenci sval stahovat a vyvinout pasivní odpor protahujícím se svalovému vláknu. Reaguje na to uvolněním svých stavebních jednotek, a to má za následek snížení jeho entropie a zvýšení odporu k roztažení svalu. Toto hraje velice důležitou roli při stahu svalu, kdy je nutné vyvinout sílu, ale zároveň zajistit oblast myosinu stále uprostřed sarkomery (Masná, 2018; Web 6). Při diferenciální diagnostice MG se protilátky proti tomuto proteinu stanovují jako další možnost jiného neurologického onemocnění (Gautel a kol. 1993).

2.3 Formy myasthenia gravis

MG se může rozvinout prakticky u kohokoliv, ale nejčastěji postihuje mladé ženy ve věku mezi 20-ti až 30-ti lety a starší muže ve věku od 60-ti let (Web 1). Jedná se o **adultní MG** (dospělého věku).

Během těhotenství se mohou Ab-AChR přenést z matky na plod přes placentu. Jedná se o **novorozeneckou MG**. U novorozenců se první příznaky projeví hned po porodu. Mezi typické příznaky patří slabý křik, slabost končetin a porucha sacího reflexu. Později může dojít i k dechové nedostatečnosti (Ambler 2011, Web 3).

Jednou z dalších forem je tzv. **kongenitální MG**. Tato MG je geneticky podmíněná. První příznaky se většinou objeví někdy mezi porodem a druhým rokem života. U této formy je hlavním příznakem především paréza očních svalů (Ambler 2011, Web 3).

Dále existuje forma tzv. **familiární infantilní MG**, která se projeví při porodu nebo později během kojeneckého období. Tato forma je charakteristická epizodami těžké dechové nedostatečnosti a je imunitně podmíněná (Ambler 2011, Web 3).

A poslední formou je **juvenilní (dětského věku) MG**, která je imunitně podmíněná. Většinou se projeví až v pubertě, výjimečně před 5. rokem života. Tato forma je

charakteristická abnormální únavou svalových funkcí. Nejprve jsou postiženy oční svaly: dvojité vidění, pokles jednoho očního víčka. Dále pak snížená mimika, pokles koutku úst, slabý hlas, poruchy polykání. Postupně pak dochází ke slabosti ostatního kosterního svalstva, především po námaze a ve večerních hodinách (Ambler 2011, Web 3).

2.4 Centra péče o nemocné s myasthenia gravis

Péče o nemocné z celé České republiky je soustředěna do Centra pro diagnostiku a léčbu MG se sídlem na Neurologické klinice 1. LF UK a VFN v Praze. Jedná se o největší pracoviště v České republice, které se specializuje na toto onemocnění. Toto centrum bylo založeno v roce 1991 Ministerstvem zdravotnictví a navázalo na původní práci již zesnulého MUDr. Jana Vejvalky. Sama neurologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze má s diagnostikou a léčbou MG více jak 50-ti leté zkušenosti (Web 7).

Centrum MG se zaměřuje na kompletní diagnostiku MG a další poruchy nervosvalového přenosu. Dále pak o pacienty s tímto onemocněním, kteří potřebují dlouhodobou péči. V současné době sleduje více než 1 800 nemocných (Web 7).

Centralizace na jednom pracovišti byla výhodná, dokonce i nutná pro terapeutickou a diagnostickou náročnost tohoto onemocnění. V posledních letech z důvodu výrazného nárůstu počtu sledovaných pacientů, a tedy především z kapacitních důvodů, už nebylo centrum v Praze schopné sledovat a vyšetřovat pacienty ze všech oblastí České republiky. Tam, kde to bylo možné, sledují a vyšetřují pacienty s MG nervosvalová centra (Web 7).

V minulosti byla prognóza onemocnění hodně nepříznivá. Dnes, díky moderním léčebným metodám mohou i mladé ženy založit rodinu a většina pacientů se může vrátit k původnímu povolání (Web 7).

3 Postupy stanovení diagnózy myasthenia gravis

Ke stanovení diagnózy MG je velice důležitá podrobná anamnéza, kterou provádí lékař na neurologickém oddělení. Neurologické vyšetření je důležité především k odlišení jiných nemocí, které však mají podobné příznaky jako MG. Pacienti přicházejí často s nevysvětlitelnou slabostí a unavitelností různých svalových skupin, které jsou však pro toto onemocnění typické. Je nutné zjistit, kdy se objevily první příznaky a za jakých okolností. Většina potíží se objevuje po fyzické zátěži, po nasazení nových léků, při chronickém stresu,

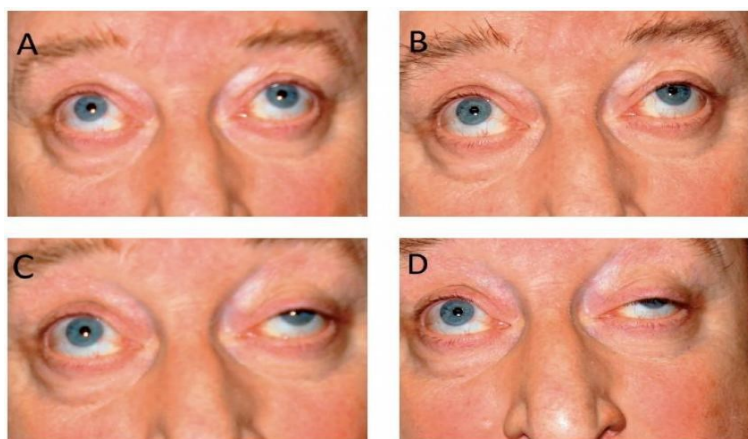
po operaci či infekci, nebo u žen po porodu apod. Pacienti nejvíce udávají problémy v odpoledních a večerních hodinách, což souvisí nejčastěji se zmíněnou fyzickou zátěží. Lékař během rozhovoru s pacientem může pozorovat typické příznaky této nemoci. Jedním z nich je kolísající pokles očních víček. Dále pak pokles koutku úst, pokles hlavy či poruchy artikulace, případně oslabená mimika může navodit pocit, že pacient trpí depresí (Piřha 2010, Piřha 2012).

3.1 Klinické testy

Na základě objektivního neurologického vyšetření, není možné stanovit diagnózu MG. Používají se tzv. zátěžové provokační testy, které mohou objasnit důvod pacientových problémů a mají poměrně vysokou specifitu a senzitivitu. Klinické testy se musejí provádět v místnosti s konstantní teplotou, a především v klidovém prostředí. Negativní nálezy při provedení těchto testů zpochybňují diagnózu MG, ale rozhodně ji nevyklučují (Piřha 2010, Piřha 2012).

Simpsonův test

Při vyšetření Simpsonovým testem pacient usilovně fixuje pohled vzhůru. Do 60 sekund dochází ke zdůraznění původně nenápadného poklesu očních víček. Alternativou může být usilovný pohled očí doleva nebo doprava, kdy je vidět oslabení *m. rectus bulbi medialis* (Piřha 2010, Piřha 2012).



Obrázek 4: Simpsonův test

A – usilovný pohled vzhůru, **B** – horní víčko v kontaktu s duhovkou po 10 s, **C** – víčko překrývá zornici o více než 50 % po 20 s, **D** – výrazná ptóza, víčko překrývá celou zornici po 30 s (Piřha 2012).

Gorelickův test

Pacientovi se zvedne oční víčko, které je více pokleslé a po pár vteřinách dojde k rychlému poklesu druhého očního víčka. Děje se to díky tzv. Heringovu pravidlu rovnoměrné inervace. Při oboustranném poklesu víček dochází ke zvýšení centrální inervace. Pasivním zdvižením více pokleslého víčka dojde ke snížené inervaci obou, a tím poklesu i druhého víčka (Piťha 2010, Piťha 2012).

„Ice pack“ test

V diagnostice MG je asi nejznámějším klinickým testem. Nad zavřené pokleslé víčko se přiloží kostka zabaleného ledu nebo mražený gel. Po 60 sekundách výrazná ptóza téměř ustoupí (Piťha 2010, Piťha 2012).



Obrázek 5: "Ice pack" test (Piťha 2010)

Coganův „lid twitch“ test

Pacient 20–30 sekund fixuje pohled dolů. Poté se pacient podívá přímo, kdy pozorujeme zlepšení ptózy, která se však vrací do původního stavu (Piťha 2010).

„Sleep“ test

Pacient zavře oči a po 3–5 minutách dochází ke zlepšení poklesu víček (Piťha 2010).

Seemanův test

Pacient počítá od 1 do 50, a sledujeme, zda se objeví porucha artikulace. Mohou být oslabené i svaly jazyka, což způsobuje šišlání (Piťha 2010, Piťha 2012).

Testování mimických svalů

Pacient se pokouší zapískat, špulit ústa nebo nafouknout tváře. Sílu žvýkacích svalů můžeme posoudit po opakovaném stisknutí čelistí (Piťha 2010, Piťha 2012).

Farmakologický reparační test (Syntostigminový test)

Předpokladem pro provedení tohoto testu je viditelná oboustranná nebo jednostranná ptóza. Při klasickém testu se aplikuje edrofonie (Tensilon). Tato látka u nás však není

dostupná. Alternativou je test s aplikací neostigminu (Syntostigmin). Přestože byly pozorovány nežádoucí účinky jen minimálně, používají se spíše testy zátěžové, které mají podobnou senzitivitu (Piřha 2010, Piřha 2012).

3.2 Laboratorní testy

Stanovení Ab-AChR a Ab-MuSK se provádí pomocí komerčních souprav obsahujících reagentie pro provedení vlastní analýzy. V první řadě se zjiřtují hladiny protilátek proti AChR, které jsou nejčastější příčinou nemoci MG. Stanovení Ab-MuSK se provádí pouze u pacientů s hladinami Ab-AChR pod 0,4 nmol/l.

Velkou zajímavostí u stanovení Ab-AChR je, že se používají AChR značené ^{125}I - α -bungarotoxinem. Bungarotoxin je vojensky významný živočiřný toxin. Je tvořený skupinou proteinů, nalezených v jedu asiřské krajty *Bungarus multicinctus*, jako účinná složka. Existuje pět odlišných forem tohoto toxinu, z nichž nejvýznamnější je α -bungarotoxin. Pro člověka je toxická dávka 2 až 5 mg. Uřtknutí hadem je v 50 % případů smrtelné, a to i při podání antiséra. Mechanismus toxického účinku spočívá v blokaci uvolňování acetylcholinu na nervosvalových plotěnkách a blokování nervosvalového přenosu (Patočka a kol. 2004).

Vezmeme-li v úvahu skutečnost, že Ab-MuSK můžou u pacientů s negativními hodnotami AChR způsobovat poruchy nervového svalstva, jejich stanovením můžeme eliminovat jako zdroj poruchy postsynaptického nervosvalového přenosu. Měření Ab-AChR a Ab-MuSK je užitečné pro doplnění diagnostického procesu MG.

4 Cíle práce

Cílem této práce bylo prezentovat význam stanovení vysoce specifických Ab-AChR a Ab-MuSK pro diagnostiku neurologického autoimunitního onemocnění MG pomocí zpracování statistických údajů o podílu jejich positivity a o nárůstu počtu analýz výše uvedených protilátek za období let 2015 až 2021 na ÚLBLD VFN.

Dalším cílem bylo porovnat rozsahy analyzovaných hladin Ab-MuSK a Ab-AChR mezi skupinou pacientů s MG a skupinou pacientů s jinými poruchami nervové soustavy.

5 Materiál a metodika

Na našem pracovišti stanovení Ab-AChR (RRA) provádíme již od roku 2000. V roce 2007 jsme zahájili stanovení Ab-MuSK (RIA), které jsme v roce 2015 nahradili stanovením ELISA soupravami.

5.1 Stanovení autoprotilátek proti acetylcholinovým receptorům

Pro stanovení Ab-AChR se používá souprava Acetylcholine Receptor Ab (ARAb) RRA firmy IBL International GmbH, Germany, která je určena pro in vitro kvantitativní stanovení autoprotilátek proti acetylcholinovým receptorům (Ab-AChR, ARAb) v lidském séru.

Jedná se o radioreceptorovou imunoanalýzu. Acetylcholinové receptory značené ^{125}I - α -bungarotoxinem jsou atakovány protilátkami proti AChR obsaženými v séru. Vzniklé ireversibilní imunokomplexy jsou precipitovány anti-lidským IgG. Po separaci supernatantu se měří radioaktivita sraženiny. Radioaktivita sedimentu je přímo úměrná koncentraci protilátek proti AChR v séru. Stanovení se provádí ze séra při použití standardních odběrových zkumavek. Vzorky séra mohou být skladovány při 2-8 °C po dobu 1 týdne. Při delším skladování je nutno uchovávat vzorky zmrazené při minus 20 °C (<-20 °C), nejlépe v alikvotech, maximálně 6 měsíců. Je třeba se vyvarovat opakovaného rozmrazování a zmrazování vzorků. Nezbytný objem vzorku pro jedno stanovení je 20 μl .

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- přesná mechanická pipeta 20 μl ,
- opakovací mechanické dávkovače: 100 – 200 – 1000 μl ,
- polyethylenové zkumavky s kónickým dnem 12x75 mm,
- stojánek na zkumavky,
- vibrační míchadlo (vortex),
- chlazená centrifuga (+ 4 °C, 2500 ot./min),
- vodní vývěva,
- gama-čítač Berthold LB 2111

Všechny reagenty v soupravě jsou stabilní do data expirace uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C. Souprava obsahuje reagenty na 100 zkumavek. Reagenty před vlastní analýzou musíme nechat vytemperovat na laboratorní teplotu. Zkumavky jsou pouze na jedno použití. Výsledky se vydávají v systému OpenLims,

v jednotkách nmol/l, na dvě desetinná místa. Přenos výsledků z imunoanalyzátoru do OpenLims je online.

Nedoporučuje se opakované zamrazování biologických vzorků a stanovení Ab-AChR v hemolytických a ikterických sérech. Referenční meze (normální hodnoty) analytu jsou 0,0 – 0,4 nmol/l. Vzorky s Ab-AChR >8 nmol/l reanalyzujeme po naředění vzorku. U vzorků s Ab-AChR <0,4 nmol/l se většinou pokračuje stanovením Ab-MuSK. Při efektu přetečení (žádný nebo nepatrný sediment) vzorek reanalyzujeme po naředění vzorku.

5.1.1 Obsah soupravy

Jednotlivé reagentie a chemikálie pro stanovení Ab-AChR jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Obsah soupravy Ab (ARAb) RRA firmy IBL International GmbH

REAGENCIE	POČET	PŘIDEJTE	SKLADOVÁNÍ
ARAB ¹²⁵ I-TRACE (TRACER LYO) - Receptory značené I ¹²⁵ - Přípravujeme 30 min před použitím	3 x 3 lahvičky - lyofilizáty	3,6 ml (BUF)	Po rozpuštění – 14 dnů při 2-8 °C <u>NEMRAZIT!!</u>
Standard: 0 nmol/l (CAL A) Standard: 0,2-0,5-1,2-3-8 nmol/l (CAL B-F)	1 x 1,5 ml (A) 5 x 0,2 ml (B-F)	-	2-8 °C do data expirace
IgG Antiserum (ANTISERUM)	2 x 22 ml	-	
CONTROL CO – Cutt-Off Control	1 x 0,2 ml	-	
CONTROL (+) – Positive Control	1 x 0,2 ml	-	
Buffer (BUF)	1 x 0,2 ml	-	
Wash Buffer (WASHBUF) - Promývací pufr	2x 110 ml	-	

5.1.2 Pracovní postup

Reagentie před vlastní analýzou musíme nechat vytemperovat na laboratorní teplotu a sérové vzorky rozmrazit při laboratorní teplotě, které poté opatrně promícháme.

1. Do zkumavek s kónickým dnem napipetujeme 20 µl vzorků, kalibrátorů (CAL A-F) a kontroly CO a +.
2. Do všech zkumavek napipetujeme 100 µl námi připraveného roztoku ARAB ¹²⁵I-TRACE.
3. Promícháme obsah zkumavek a inkubujeme 2 hodiny při laboratorní teplotě.
4. Přidáme 200 µl IgG Antisera (ANTISERUM).
5. Promícháme obsah zkumavek a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.
6. Přidáme 1 ml promývacího pufru (WASHBUF).

7. Promícháme obsah zkumavek na vortexu, centrifugujeme 15 minut, 2500 ot./min při +4°C a opatrně odsajeme supernatant.
8. Přidáme 1 ml promývacího pufru (WASHBUF).
9. Promícháme obsah zkumavek do homogenního stavu (vortex, 20 sekund), centrifugujeme 15 minut, 2500 ot./min při +4°C a opatrně odsajeme supernatant.
10. Provedeme měření s následným vyhodnocením na gama-čítači LB 2111.



Obrázek 6: Diagnostická souprava RRA a gama-čítač Berthold LB 2111

5.2 Stanovení autoprotilátek proti svalově specifické tyrozinkináze

Pro stanovení Ab-MuSK se používá souprava MuSK-Ab ELISA od firmy IBL International GmbH, Germany, která je určena pro *in vitro* kvalitativní i kvantitativní stanovení autoprotilátek proti svalově specifické tyrozinkináze v lidském séru. U nás na pracovišti stanovujeme Ab-MuSK jen kvantitativně za použití kalibrační závislosti.

Jedná se o ELISA metodu. Jamky mikrotitračních stripů jsou pokryty antigenem. Pacientské protilátky ze vzorku se vážou na povrch jamek pokrytý antigenem a jsou detekovány systémem amplifikujícím signál. Reakce se substrátem je katalyzována alkalickou fosfatázou navázanou na detekční protilátku. Intenzita zbarvení, která reakcí vzniká, je přímo úměrná koncentraci protilátek proti MuSK v séru. Stanovení se provádí ze séra při použití standardních odběrových zkumavek. Vzorky séra mohou být skladovány při 2-8 °C po dobu 1 týdne. Při delším skladování je nutno uchovávat vzorky zmrazené při minus 20 °C (<-20 °C), nejlépe v alikvotech, maximálně 6 měsíců. Je třeba se vyvarovat opakovaného rozmrazování a zmrazování vzorků. Nezbytný objem vzorku pro jedno stanovení je 10 µl.

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

- přesná mechanická pipeta 10 µl,

- opakovací mechanické dávkovače: 100 – 200 – 1000 μ l
- polyethylenové zkumavky 12x75 mm,
- stojánek na zkumavky,
- vibrační míchadlo (vortex),
- třepačka,
- 8-kanálová mikropipeta,
- promývačka na mikrotitrační stripy,
- deionizovaná voda, časovač,
- spektrofotometr SLT Spectra

Všechny reagensy v soupravě jsou stabilní do data expirace uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C. Souprava obsahuje reagensy na 96 stanovení. Reagensy před vlastní analýzou musíme nechat vytemperovat na laboratorní teplotu. Mikrotitrační destičky jsou pouze na jedno použití. Výsledky se vydávají v systému OpenLims, v jednotkách U/ml.

Nedoporučuje se opakované zamrazování biologických vzorků a stanovení Ab-MuSK v hemolytických, ikterických a lipemických sérech. Referenční meze (normální hodnoty) analytu jsou 0,0 – 0,4 U/ml.

5.2.1 Obsah soupravy

Jednotlivé reagensy a chemikálie pro stanovení Ab-MuSK jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Obsah soupravy MuSK-Ab ELISA od firmy IBL International GmbH

REAGENCIE	POČET	PŘIDEJTE	SKLADOVÁNÍ
Konjugovaný enzym (ENZCONJ CONC)	1 x 0,25 ml	těsně před použitím (ASSAYBUF) v poměru 1:101	po smíchání – 48h při 2-8 °C
IgG Antiserum (ANTISERUM)	1 x 13 ml	-	2-8 °C do data expirace
Standard: 0-0,4-2,5-5-12 U/ml (CAL A-E)	5 x 1,2 ml (A-E)	-	
CONTROL + CONTROL -	1 x 1,2 ml (+) 1 x 1,2 ml (-)	-	
Testovací pufr (ASSAYBUF) - Obsahuje fosfátový pufr - Používá se na ředění vzorků a konjugátu	1 x 120 ml	-	
Koncentrovaný promývací roztok (WASHBUF CONC)	1 x 100 ml	Deionizovanou vodu v poměru 1:10	Po smíchání – 8 týdnů při 2-8 °C
Substrát (PNPP SUBS) - Obsahuje p-nitrofenyl fosfát	1 x 13 ml	-	2-8 °C do data expirace
STOP roztok (PNPP STOP) - Obsahuje 1M NaOH, 0,25M EDTA	1x 15 ml	-	

Dále jsou součástí soupravy mikrotitrační stripy potažené purifikovaným rekombinantním MuSK proteinem tedy antigenem a lepicí fólie k zakrytí mikrotitrační destičky. Tyto fólie se používají proto, aby při třepání na třepačce nedošlo ke vzájemné kontaminaci.

5.2.2 Pracovní postup

Reagencie před vlastní analýzou musíme nechat vytemperovat na laboratorní teplotu a sérové vzorky rozmrazit při laboratorní teplotě, které poté opatrně promícháme.

1. Připravíme si promývací roztok (WASHBUF) v poměru 1:10 (50 ml WASHBUF CONC a 500 ml deionizované vody).
2. Do zkumavek si napipetujeme 1 ml testovacího pufru (ASSAYBUF) a k tomu 10 μ l séra a následně promícháme.
3. Do mikrotitračních stripů si napipetujeme 100 μ l takto připravených vzorků a dále 100 μ l standardů (CAL A-E) a 100 μ l CONTROL +/- . Kontroly a standardy pipetujeme v duplikátech.
4. Takto připravené mikrotitrační stripy přelepíme fólií a třepeme na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 60 minut.
5. Stripy 3x promyjeme připraveným promývacím roztokem na promývačce.
6. Napipetujeme 100 μ l ANTISÉRA, opět přikryjeme fólií a dáme třepat na třepačku při laboratorní teplotě na 60 minut.
7. Stripy 3x promyjeme připraveným promývacím roztokem na promývačce.
8. Přidáme 100 μ l konjugovaného enzymu, který jsme si připravili těsně před použitím v poměru 1:101 podle počtu vzorků. Zakryjeme fólií a dáme třepat na třepačku při laboratorní teplotě na 60 minut.
9. Stripy 3x promyjeme připraveným promývacím roztokem na promývačce.
10. Přidáme 100 μ l substrátu (PNPP SUBS) a necháme inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě.
11. Přidáme 100 μ l STOP roztoku (PNPP STOP) a do 60 minut změříme na spektrofotometru SLT Spectra při 450 nm.



Obrázek 7: Diagnostická souprava ELISA



Obrázek 8: Spektrofotometr SLT Spectra

6 Výsledky

Podíl pozitivních hladin Ab-MuSK a Ab-AChR jsme čerpali z naměřených hodnot protilátek na našem pracovišti za období od roku 2015 do roku 2021. Dále jsme porovnávali záchyt pozitivních hodnot uvedených protilátek mezi skupinou pacientů s MG a skupinou pacientů s jinými poruchami nervové soustavy.

6.1 Soubor pacientů

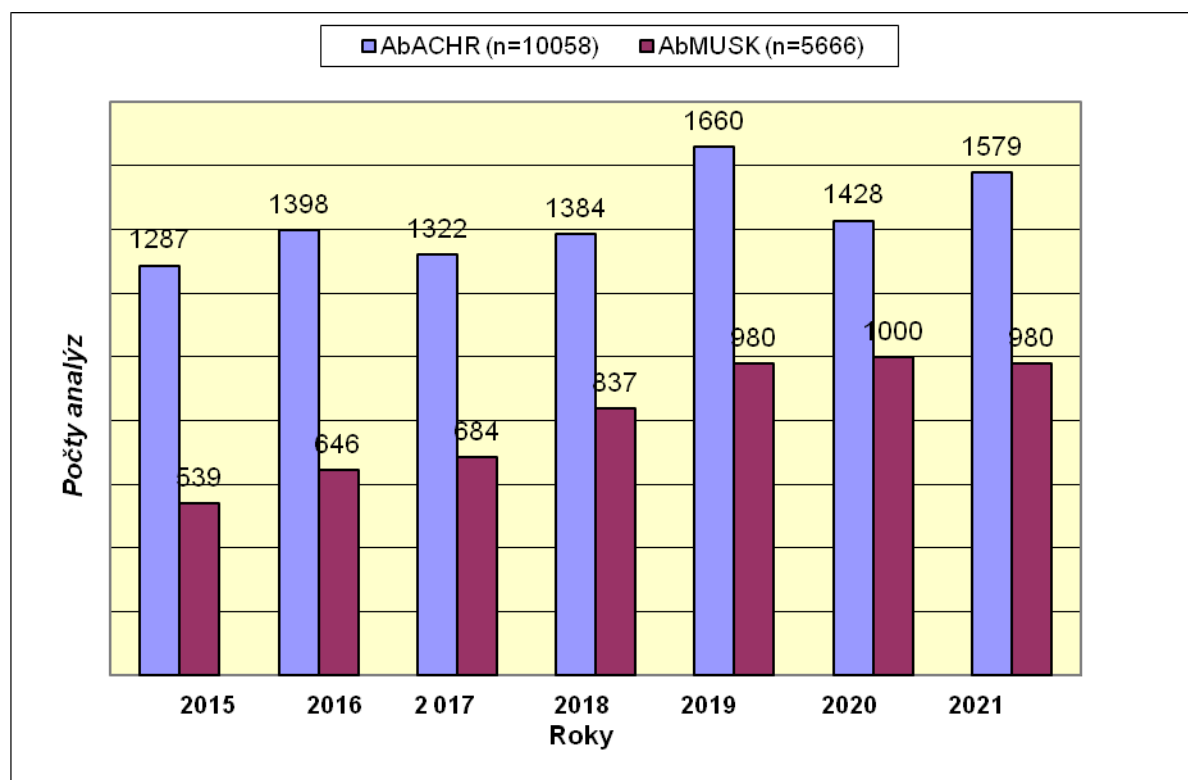
V tabulce 3 je rozdělení analyzovaných pacientů podle pohlaví a věku. Z tabulky vyplývá že největší rozdíl u analyzovaných pacientů podle pohlaví byl ve věku 20-49 let, kdy převažují ženy. Patrný rozdíl je i ve věku 50-69 let a ve věku 70-99 let je počet mužů a žen téměř srovnatelný. V našem souboru jsme se setkali i s dětskými pacienty. Z celkového počtu 10058 vyšetření bylo 43% mužů a 57% žen.

Tabulka 3: Soubor pacientů podle věku a pohlaví

Věk	Počty analyzovaných pacientů podle pohlaví	
	MUŽI	ŽENY
1-20	131	132
20-49	867	1840
50-69	1399	1735
70-99	1910	2044
Celkem	4307	5751

6.2 Počet vyšetření protilátek proti acetylcholinovým receptorům a protilátek proti svalové specifické tyrozinkináze

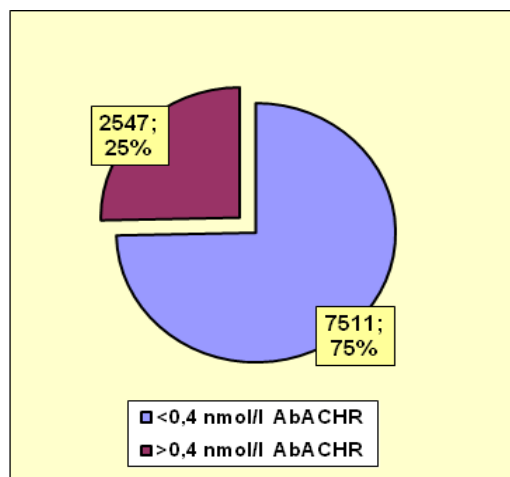
Na obrázku 9 jsou prezentovány celkové počty ročních analýz Ab-MuSK a Ab-AChR od roku 2015 do roku 2021 na našem pracovišti ÚLBLD VFN.



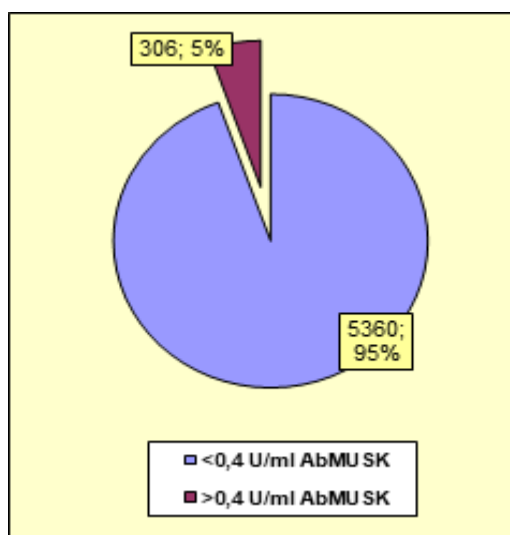
Obrázek 9: Počty analýz Ab-AChR a Ab-MuSK v letech 2015-2021

6.3 Podíl pozitivních výsledků protilátek proti acetylcholinovým receptorům a protilátek proti svalové specifické tyrozinkináze

Podíl počtu a procent pozitivních a negativních výsledků protilátek Ab-MuSK a Ab-AChR za období sedmi let uvádí obrázek 10 a 11. Pozitivní nálezy protilátek proti AChR představují 25% z celkového počtu 10058 analýz Ab-AChR. U protilátek proti MuSK není v porovnání s Ab-AChR tak výrazný záchyt pozitivity a činí pouze 5% z celkového počtu 5666 analýz Ab-MuSK.



Obrázek 10: Podíl pozitivních hodnot >0,4 nmol/l a fyziologických hodnot <0,4 nmol/l protilátek proti AChR v roce 2015-2021



Obrázek 11: Podíl pozitivních hodnot >0,4 U/mL a fyziologických hodnot <0,4 U/mL protilátek proti MuSK v roce 2015-2021

6.4 Srovnání sledovaných hodnot u pacientů s myasthenia gravis a u pacientů s jinými poruchami nervové soustavy

Porovnávali jsme rozsah naměřených hladin a počty Ab-AChR a Ab-MuSK mezi pacienty s MG a pacienty s jinými poruchami nervové soustavy. Skupiny byly vytvořeny podle diagnóz. V tabulce 4 jsou uvedeny rozsahy hladin a počet hodnot sledovaných protilátek. U skupiny pacientů s MG, kteří mají patologicky zvýšené protilátky proti AChR, je patrné, že hladiny Ab-AChR mohou dosahovat i hodnot nad 100 nmol/l a hodnoty Ab-MuSK se pohybují mezi 8-10 U/ml. U skupiny pacientů s jinými nervovými poruchami

v případě positivity vyjadřujeme pouze hodnotou >8, což stačí pro klinickou diagnózu. Přesná hodnota se stanovuje jen po dohodě s ordinujícím lékařem.

Tabulka 4: Přehled hladin a počtů Ab-AChR a Ab-MuSK mezi skupinou pacientů s myasthenií gravis a skupinou pacientů s jinými poruchami nervové soustavy

Rozsah měřených hladin [nmol/l] pro Ab-AChR [U/ml] pro Ab-MuSK	Počty hodnot Ab-AChR a Ab-MuSK			
	Myasthenia Gravis		Jiné poruchy nervové soustavy	
	Ab-AChR	Ab-MuSK	Ab-AChR	Ab-MuSK
Celkový počet vzorků	3200	1116	1119	688
0,0-0,4	1989	1084	929	672
0,4-3,0	259	9	47	6
3,0-8,0	358	9	49	5
8-10	25	4	0	0
10-20	103	0	0	0
20-50	91	0	0	0
50-100	29	0	0	0
>100	32	0	0	0
>8 (Ab-AChR) >12 (Ab-MuSK)	314*	10*	94*	5*

Poznámka: Hodnoty >8 (Ab-AChR) a >12 (Ab-MuSK) jsou nad nejvyšším kalibrátorem dané metody. U těchto vzorků se výsledek hladiny vydává ve formě >8 nmol/l pro Ab-AChR a >12 U/ml pro Ab-MuSK. Takto vyjádřený výsledek měření stačí k potvrzení MG.

7 Diskuse

Mezi lety 2015 a 2021 vzrostl počet stanovení Ab-AChR o téměř 23% a Ab-MuSK o 82%. Zájem o vyšetření těchto analytů tedy kontinuálně stoupá. U Ab-AChR je vzestup kontinuální, u Ab-MuSK jsme zaznamenali nárůst požadovaného objemu vyšetření mezi lety 2015 a 2019, dále je počet vyšetření setrvalý. Epidemie nemoci COVID-19 neměla na počet vyšetření mnou prověřovaných analytů vliv – nedošlo k poklesu počtu vyšetření. Přesný důvod celkového nárůstu počtu vyšetření se mi nepodařilo rozklíčovat. Může jít o organizační změny, kdy jiné laboratoře přestaly tato vyšetření nabízet a došlo tak k jejich centralizaci na našem pracovišti. Souběžně s tím je však pravděpodobné, že v duchu medicíny založené na důkazech ověřují lékaři i klinicky jasné případy MG, případně s rozvojem možností terapie monitorují své pacienty v průběhu léčby. Jistou roli, zvláště v případě Ab-MuSK hraje i rychlejší doba odezvy platná právě od roku 2015 (zkrácení doby od příjmu materiálu do výsledku na maximálně dva týdny).

Zpracováním výsledků analytů Ab-AChR a Ab-MuSK za období sedmi let jsme pozitivní protilátky proti AChR našli u 25% z celkového počtu analýz 10058. U protilátek proti MuSK záchyt positivity činil pouze 5% z celkového počtu analýz 5666. To je v souladu s již publikovanými daty (Lazaridis a Tzartos 2020). Autoři citovaného přehledného článku uvádějí pozitivitu Ab-AChR kolem 20%, přičemž záleží na senzitivitě a specificitě použité metody. Pro Ab-MuSK je pozitivita v rámci vyšetření na MG suspektních pacientů 6%, ale se značnými regionálními rozdíly. Například v Evropě přibývá positivity Ab-MuSK od severu k jihu (od 2% v severských zemích po až 10% v oblasti Středomoří). Japonská studie (Suzuki a kol. 2011) ukazuje na 2%-3% pozitivitu.

Porovnány byly výsledky vyšetření Ab-AChR a Ab-MuSK mezi pacienty s myasthenií gravis a pacienty s jinými poruchami nervové soustavy. U skupiny pacientů s MG je patrné, že hladiny Ab-AChR mohou dosahovat i hodnot nad 100 nmol/l. V praxi pro stanovení diagnózy stačí vyjádřit výsledek ve formátu >8 nmol/l. Přesná hodnota se stanovuje po dohodě s ordinujícím lékařem. Pro sledování progresu onemocnění i monitorování léčby (zvláště plazmaferézou léčených pacientů) je znalost přesných hodnot klíčová. U pacientů s MG podíl positivity Ab-AChR činí 38% z celkového počtu 3200 vyšetřených vzorků. Specificita metody je vysoká (až 99%), senzitivita kolísá od 50% pro oční formu do 85% pro generalizované poškození (Lazaridis a Tzartos 2020). U našich pacientů neznám podíl forem onemocnění, a proto nemohu podobné porovnání provést. U pacientů s jinými poruchami nervové soustavy bylo 17% pozitivních záchytů Ab-AChR z počtu 1119 vyšetřených.

Protilátky MuSK dosahují u pozitivních záchytů i hodnot nad 12 U/ml (kalibrační křivka pokrývá rozsah do 12 U/ml), ze strany kliniků ale nebyl žádný požadavek na další ředění vzorku a určení přesných hodnot. Pozitivita Ab-MuSK činí 3% z celkového počtu 1116 vyšetření. U skupiny s původními diagnózami ze skupiny s jinými poruchami nervové soustavy bylo prokázáno 2% pozitivních Ab-MuSK z počtu 688.

Protilátky Ab-AChR i Ab-MuSK se vyplatí využít i v diagnostice pacientů s ne zcela typickým klinickým průběhem MG, kteří k vyšetření přicházejí s jinou neurologickou diagnózou. Zvláště u Ab-MuSK je procentuální zastoupení pozitivního záchytu naprosto srovnatelné.

Často se také diskutuje tzv. dvojitá pozitivita Ab-AChR a Ab-MuSK. Na našem pracovišti provádíme tato vyšetření až na výjimky sekvenčně, nejprve stanovujeme Ab-AChR. V případě jejich positivity již Ab-MuSK nevyšetřujeme, z důvodu nízké očekávané dvojité positivity a také z ekonomických důvodů. Protilátky MuSK stanovujeme tedy jen u pacientů negativních na Ab-AChR. Z literatury vyplývá, že dvojitá pozitivita pravděpodobně není vzácná, v celoevropské studii se vyskytovala v 0,5-12,5% (Tsonis a kol. 2015).

8 Závěr

Mezi lety 2015 a 2021 vzrostl počet stanovení Ab-AChR o téměř 23% a Ab-MuSK o 82%. Zájem o vyšetření těchto analytů tedy kontinuálně stoupá.

Pozitivita analytů Ab-AChR a Ab-MuSK ve sledovaném časovém intervalu byla pro Ab-AChR 25% a u protilátek proti MuSK 5%, což je plně v souladu s již dříve publikovanými daty.

U pacientů s MG v našem souboru podíl positivity Ab-AChR činí 38% a Ab-MuSK je 3%. U skupiny s původními diagnózami ze skupiny s jinými poruchami nervové soustavy bylo prokázáno 2% pozitivních Ab-MuSK a 17% pozitivních Ab-AChR. Protilátky Ab-AChR i Ab-MuSK se vyplatí využít i v diagnostice pacientů, kteří k vyšetření přicházejí s jinou neurologickou diagnózou. Zvláště u Ab-MuSK je procentuální zastoupení pozitivního záchytu naprosto srovnatelné.

Je na zvážení, zda neprovádět vyšetření Ab-MuSK i u pacientů Ab-AChR pozitivních, protože podíl dvojitě pozitivních jedinců je pravděpodobně vyšší, než se dříve předpokládalo.

9 Seznam zkratek

MG – myasthenia gravis

Ab-AChR – protilátky proti acetylcholinovým receptorům

Ab-MuSK – protilátky proti svalově specifické tyrozinkináze

CT – počítačová tomografie (radiologická vyšetřovací metoda)

ÚLBLD – Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky

VFN – Všeobecná fakultní nemocnice

MK – myastenická krize

AChR – acetylcholinové receptory

ACh – acetylcholin

AChE – acetylcholinesteráza

cAMP – cyklický 3', 5'-adenosinmonofosfát

lrp4 – Low-density lipoprotein receptor-related protein 4

1.LF UK – 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

RRA – radioreceptorová imunoanalýza

RIA – radioimunoanalýza

ELISA –enzyme-linked immuno sorbent assay

10 Použitá literatura

AMBLER, Zdeněk. Neurofyziologie a elektrodiagnostika nervosvalového přenosu. *Neurologie pro praxi*. 2010, **11**(2), 81-84.

AMBLER, Zdeněk. *Základy neurologie*. 7. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-807-2627-073.

BORGES, Lucia S. a David P. RICHMAN. Muscle-Specific Kinase Myasthenia Gravis. *Frontiers in Immunology*. 2020, **11**(707). ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.00707

BRANDOVÁ, Daniela. *Myasthenia gravis a léčba pomocí inhibitorů acetylcholinesterázy*. Pardubice, 2012, s. 13, 15-17, Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.

GAUTEL, M et al. "Titin antibodies in myasthenia gravis: identification of a major immunogenic region of titin." *Neurology* vol. 43,8 (1993): 1581-1585. doi:10.1212/wnl.43.8.1581

KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011, s. 99-101. ISBN 978-80-247-3068-4.

KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 4. Praha: Grada, 2012, s. 364, 370, 402. ISBN 978-80-247-2977-0.

LAZARIDIS, Konstantinos a Socrates J. TZARTOS. Autoantibody Specificities in Myasthenia Gravis; Implications for Improved Diagnostics and Therapeutics. *Frontiers in Immunology*. 2020, **11**(212). ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.0021

MASNÁ, Eva. *Proteiny sarkomery*. Pardubice, 2018, s. 29-30. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.

PATOČKA, Jiří. Vojenská toxikologie. *Vojenská toxikologie*. Hradec Králové: Grada, 2004, s. 119. ISBN 9788024763538.

PIŤHA, Jiří. Praktické zkušenosti s klinickou diagnostikou myasthenia gravis. *Neurologie pro praxi*. 2010, **11**(2), 90-94.

PIŤHA, Jiří. Myasthenia gravis na prahu 3. tisíciletí. *Postgraduální medicína*. 2012, **14**(2), 189-200.

RŮŽIČKA, Evžen, Karel ŠONKA, Petr MARUSIČ a Robert RUSINA. *Neurologie*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2019, s. 433-437. ISBN 978-80-7553-681-5.

SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání*. 4. české vydání. Praha: Grada Publishing, 2016, s.60-61. ISBN 978-80-247-4271-7.

SUZUKI, Shigeaki et al. "Clinical and immunological differences between early and late-onset myasthenia gravis in Japan." *Journal of neuroimmunology* vol. 230,1-2 (2011): 148-152. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.10.023

TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003, s. 771. ISBN 80-247-0512-5.

TSONIS, A I et al. "MuSK autoantibodies in myasthenia gravis detected by cell based assay - A multinational study." *Journal of neuroimmunology* vol. 284 (2015): 10-17. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.04.015

ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-807-4920-622.

11 Elektronické zdroje

(Web 1) Myasthenia gravis - causes, symptoms, treatment, pathology. *Youtube.com* [online]. 2016, 12.12.2016 [cit. 2022-04-18].

Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=bYGxGdu9MsQ>

(Web 2) *Databáze laboratorních vyšetření* [online]. Poslední revize 2021 [cit. 2022-04-18].

Dostupné z: <https://laboratore.vfn.cz/vysetreni/detail.php?ID=180&pre=1&start=1>

(Web 3) *Myasthenia gravis způsobuje celkovou svalovou slabost. Jak se tento problém léčí?* [online]. Barbora Košňárová [cit. 2022-04-18].

Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/leky/myasthenia-gravis-priznaky-lecba/>

(Web 4) What is the synthetic pathway for acetylcholine? *Brain stuff* [online]. 2018 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://brainstuff.org/blog/what-is-the-synthetic-pathway-for-acetylcholine?fbclid=IwAR2rrUw7PRoEXi1KKXAVX9JjAVXrODmoxOtt-v1nHRZNO5GCCqi9NhmqOVM>

(Web 5) Myasthenia. *MYGRA-CZ* [online]. 2014 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://www.mygra.cz/cs/myasthenia-gravis.html>

(Web 6) Titin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Titin>

(Web 7) Centrum pro diagnostiku a léčbu myasthenia gravis. *Neurologická klinika - 1. lékařská fakulta UK a VFN* [online]. Praha, © 2022 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://neurologie.lf1.cuni.cz/1LFNK-199.html>