

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. lékařská fakulta

**MECHANIZMY SVALOVÉHO ZÁNĚTU A JEJICH
KLINICKÉ PROJEVY U NEMOCNÝCH
POLYMYOZITIDOU A DERMATOMYOZITIDOU**

Dizertační práce

Jana Tomasová Studýnková

Postgraduální doktorské studium biomedicíny v oboru

Imunologie

Praha 2006

OBSAH

PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY.....	4
ÚVOD.....	4
CYKLOOXYGENÁZA-1, CYKLOOXYGENÁZA-2 A 5-LIPOXYGENÁZA U PM/DM.....	6
CHEMOKINY, CYTOKINY A JEJICH RECEPTORY U IZM.....	9
KLINICKÝ PRŮBĚH A PROGNÓZA PACIENTŮ S IZM.....	15
VYŠETŘENÍ MAGNETICKOU REZONANCÍ U NEMOCNÝCH S IZM.....	17
LÉČBA IZM.....	18
LITERATURA.....	22
HYPOTÉZY.....	27
CÍLE PROJEKTU.....	28
TEZE DIZERTACE.....	30
KAPITOLA 1.....	31
<i>Expresce cyclooxygenázy-1, cyclooxygenázy-2 a 5-lipoxygenázy v zánětlivé svalové u pacientů s dermatomyozitidou a polymyozitidou.....</i>	<i>31</i>
KAPITOLA 2.....	35
<i>Imunohistologická analýza svalů nemocných s polymyozitidou a dermatomyozitidou.....</i>	<i>35</i>
KAPITOLA 3.....	39
<i>Úloha vyšetření MRI při sledování a hodnocení pacientů s polymyozitidou a dermatomyozitidou.....</i>	<i>39</i>
KAPITOLA 4.....	44
<i>Cyclosporin A versus methotrexát v léčbě polymyozitidy a dermatomyozitidy.....</i>	<i>44</i>
SOUHRN ZÁVĚRŮ DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	46
SEZNAM PŘÍLOH.....	51
PŘÍLOHY.....	52

PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

Úvod.

Idiopatické zánětlivé myopatie (IZM) je heterogenní skupina získaných onemocnění s různým průběhem a prognózou způsobená nehnisavým zánětem příčně pruhovaného svalstva. Klinicky jsou charakterizovány především proximální svalovou slabostí. Na základě specifických klinických, histopatologických, imunologických a demografických rysů je možno IZM rozdělit do tří základních podskupin dermatomyozitida (DM), polymyozitida (PM) a myozitida s inkluzními tělísky (IBM) (1, 2, 3).

Etiologie těchto nemocí je neznámá a odtud také pramení obtíže s jejich léčbou. Existují důkazy pro imunitní patogenезi PM a DM a v menší míře i pro IBM, které zahrnují častou asociaci se specifickými autoprotilátkami, příležitostnou kombinaci s jinými systémovými chorobami pojiva, zánětlivé infiltráty v postižených svalech, systémové příznaky a konečně, ačkoli variabilně, odpověď na imunosupresivní léčbu (1, 2, 3).

Celou situaci v hledání patogenetických souvislostí znesnadňuje právě heterogenita onemocnění, která se projevuje i v odlišném klinickém průběhu, závažnosti onemocnění a rovněž odpovědi na léčbu.

Incidence onemocnění IZM se uvádí kolem 2,18- 7,5 případů na milion obyvatel a rok. V posledních letech se zdá, že případů onemocnění přibývá, ať už reálně, nebo z důvodů zlepšené diagnostiky. V dospělosti jsou onemocněním 2,5x častěji postiženy ženy než muži, v dětství je tento poměr vyrovnán - 1:1. Incidence je rozdílná v různých zeměpisných oblastech i mezi jednotlivými rasami. PM a DM se objevuje ve všech věkových skupinách, u dospělých nejčastěji ve čtvrté až šesté dekádě života u mužů, naproti tomu u žen se PM, DM vyskytují rovnoměrně ve všech věkových kategoriích. V případě DM dětského věku se pak nejčastěji projevuje ve věkové kategorii 5 – 14 let. (1, 2, 3, 4).

Základním a společným histopatologickým kritériem IZM je infiltrace svalové tkáně zánětlivými buňkami (1, 2, 3, 4). Tento zánět je často velmi fokální a heterogenní. To znamená, že u jednoho pacienta obvykle nejsou zánětem postiženy všechny svaly stejným způsobem a ve stejnou dobu. Klinickým projevem svalového zánětu je svalová slabost, ale přesná příčina svalové slabosti není známa. Existují totiž také případy, kdy svalová slabost přetrvává, ačkoliv již nenacházíme známky infiltrace zánětlivými buňkami. Výrazným rysem, pravděpodobně i podmiňujícím klinické projevy onemocnění, je edém ve svalové tkáni. Na jeho vzniku se podílejí především buňky zánětlivého infiltrátu, ale je pravděpodobné, že aktivní účast v patogenezi mají i buňky svalové (4).

Mezi jednotlivými typy IZM existují určité odlišnosti, klinicky hlavně v přítomnosti kožních změn u dermatomyozitidy (DM), v histopatologickém obrazu pak v charakteru zánětlivého infiltrátu a i spektru asociovaných autoprotilátek přítomných v séru pacientů. Toto naznačuje odlišný patogenetický mechanismus vzniku zánětu u jednotlivých typů IZM.

Dermatomyozitida je v zásadě mikroangiopatie postihující kromě svalů také kůži. DM je v porovnání s ostatními typy IZM více protilátkově zprostředkované onemocnění, začínající v intramuskulárních cévách. Onemocnění je charakterizované depozicemi útočných složek komplementu – „membrane attack complement“ (MAC) ve svalových cévách, které způsobí poškození endomysialních kapilár. Cévní stěna reaguje hyperplazií intimy, na kterou často nasedají fibrinové tromby a způsobují tak mikrotrombotizaci. Později dochází k ischemické degeneraci svalových vláken a perifascikulárně lokalizované atrofii. Zánětlivý lymfocytární infiltrát je u DM lokalizován perivaskulárně a v interfascikulárních septech (2).

V případě polymyozitidy jednak nejsou přítomny kožní projevy onemocnění, a také patogeneze PM je odlišná, zprostředkovaná více buněčně. Pro PM specifickou histopatologickou změnou je zvýšená infiltrace mononukleárními buňkami, převážně T lymfocyty, v endomysiu. A dále pak jejich typická invaze do non-nekrotických svalových vláken (5). Poškození

svalových buněk je pravděpodobně zprostředkováno působením perforinu a dalších enzymů z cytotoxických CD8 pozitivních buněk (5).

V zánětlivém infiltrátu u PM převládají CD8+ T lymfocyty, které jsou pravděpodobně klonálně expandované a které napadají svalová vlákna exprimující antigeny MHC třídy I, zatímco u DM se obvykle nachází směs CD4+, CD8+ T lymfocytů, makrofágů a B lymfocytů (2, 6, 7).

Zánětlivý infiltrát u IBM je podobný PM, ale ve svalových vláknech se nacházejí inkluzní tělíska. Není vyloučeno, že zánětlivý infiltrát je zde sekundární k těmto změnám (6, 7).

Imunopatologický proces je pak dále potencován zvýšenou expresí adhezivních molekul VCAM (vascular-cell adhesion molecule), ICAM (intercellular adhesion molecule), různých chemokinů, cytokinů (zejména TNFalfa, IL-1) a jejich receptorů a dále snížení apoptózy svalových buněk (6, 8, 9, 10).

Velká část svalových buněk u myozitidy exprimuje v cytoplazmě i na svém povrchu řadu molekul, které nejsou detekovatelné ve zdravém svalu. Častým projevem u DM i PM je aberantní exprese molekul MHC-třídy I i II na povrchu svalových vláken, dokonce i při absenci zánětlivého infiltrátu (1, 5, 9, 11).

Expresa těchto molekul je pravděpodobně indukována lokální sekrecí cytokinů, svědčí zřejmě o aktivní účasti svalových buněk na patogenezi onemocnění a nabízí možné vysvětlení přetrvávajících klinických příznaků i při nepřítomnosti zánětlivého infiltrátu (11). Myší model myozitidy s expresí lidského HLA I na svalových buňkách však ukazuje na možnou primární úlohu tohoto děje v indukci svalového zánětu (12).

Cyklooxygenáza-1, cyklooxygenáza-2 a 5-lipoxygenáza u PM/DM

Jak již bylo zmíněno v předchozí části, přesný mechanismus vzniku klinických projevů u DM a PM – svalové slabosti není zcela objasněn. Svalová slabost je ve většině případů provázena přítomností edému ve svalové tkáni, ale co tvorbu tohoto edému spouští a dále udržuje, není dosud

známo. Není přesně popsán ani mechanismus, který přivádí zánětlivé buňky do svalové tkáně, ani mechanismus, který je v tkáni udržuje. K vytvoření a přetrvávání edému v zánětlivě změněné tkáni jistě přispívají mechanismy regulující tonus cév - vasodilataci a vaskulární permeabilitu (13). Důležitými látkami v regulaci těchto mechanismů jsou produkty enzymů cyclooxygenáz (COX) a lipoxygenáz (LOX) - eikosanoidy. Již dobře popsán je efekt jednoho typu eikosanoidů - prostaglandinů (PG), zejména PGE₂ a PGF₂, na cévní tonus a permeabilitu cévní stěny, a rovněž je znám efekt některých leukotrienů (např. LTB₄) na atrakci zánětlivých buněk k místu zánětu, jejich adhezi na cévní stěnu, a tedy tvorby edému.

Eikosanoidy jsou produktem enzymů cyklooxygenáz a lipoxygenáz. Enzymy COX a LOX katalyzují klíčový krok konverze kyseliny arachidonové (AA) na eikosanoidy - zejména prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny (13). Signálem k uvolnění kyseliny arachidonové je porušení buněčné membrány pomocí aktivity lipáz jako je třeba fosfolipáza A₂ (13, 14, 15). Kyselina arachidonová může být dále po uvolnění dvojvrstvy fosfolipidů buněčné membrány metabolizována vnitřní cyklooxygenázovou a peroxidázovou aktivitou cyklooxygenáz na prostaglandin-H₂ (PGH₂), přímý substrát pro syntézu celé řady dalších buněčně specifických prostanoidů - prostaglandinů a tromboxanů (Tx), nebo naopak pomocí lipoxygenáz konvertována na leukotrieny nebo lipoxiny (13, 14, 15, 16, 17). Eikosanoidy jsou látky typické účinkem již v malých koncentracích a jsou velmi nestabilní in vivo. Obvykle jsou rychle enzymaticky odbourávány hned po jejich produkci. Z tohoto důvodu se předpokládá, že účinkují pouze lokálně v místě jejich produkce (18). Zajímavé je, že malé, či velké koncentrace prostanoidů mohou mít zcela opačné účinky např. na tonus cév, na vasokonstrikci a vasodilataci (18).

Prostaglandiny, tromboxany a leukotrieny mají kritickou úlohu v mnoha biologických procesech od regulace funkce imunitního systému a hemodynamiky, po indukci bolesti a horečky. Je tedy zřejmě jisté, že tyto produkty cyklooxygenáz a lipoxygenáz jsou velmi důležitými součástmi zánětlivé kaskády. Ovšem jejich přesná role v patofyziologii zánětu u

systemových onemocnění pojiva, mezi které PM a DM patří, nebyla dosud dostatečně prostudována.

A proto je důvodné předpokládat, že mají důležitou roli i při zánětlivých reakcích, zejména při tvorbě edému ve svalové tkáni, u idiopatických zánětlivých myopatií (13, 18, 19, 20, 21).

Existují dvě hlavní izoformy enzymu cyklooxygenázy - COX-typu 1 (COX-1) a COX-typu 2 (COX-2), které se liší zejména způsobem jejich exprese. V posledních letech se diskutovala i pravděpodobná existence cyklooxygenázy 3 – COX-typu 3 (splice varianta COX-1 mRNA, ponechávající si intron 1), která se zřejmě podílí na mechanismu účinku léků obsahující acetaminofen – paracetamol, nicméně její role v zánětu je zcela nejasná (20, 22).

Cyklooxygenáza-1 je exprimována za fyziologických podmínek v mnoha různých tkáních, a je konstitutivní tzv. "house keeping" enzym, který se podílí na vzniku mnoha prostanoidů udržujících buněčnou homeostázu. Zatímco indukce exprese COX-2 je obvykle spojena s různými patofyziologickými situacemi, ve většině tkání ke konstitutivní expresi COX-2 nedochází a COX-2 je exprimována pouze po indukci mitogeny a prozánětlivými stimuly, jako jsou např. cytokiny, růstové faktory, onkogeny, ale také samotná kyselina arachidonová. Přestože je tedy COX-2 známa jako typický zánětlivý produkt a jako inducibilní izoforma cyklooxygenáz, i COX-2 má některé konstitutivní funkce (13, 15, 23, 24).

Je známo několik typu lipoxygenáz – 5, 12 a 15-LOX. Produkty 5-LOX mají chemotaktické a některé další účinky na buňky imunitního systému, zejména polymorfonukleární leukocyty. Prvním krokem metabolismu kyseliny arachidonové cestou 5-LOX je tvorba 5-hydroperoxy-6-trans-8, 11, 14-cis-eicosatetraenové kyseliny (5-HPETE), která je pak dále konvertována na leukotrien A₄ – přímý substrát pro tvorbu dalších leukotrienů. 5-LOX je exprimována převážně na lymfocytech, ale může být produkována i mnoha dalšími buňkami jako jsou například neutrofilové, monocyty, makrofágy, žírné buňky, keratinocyty a fibroblasty v plicích, slezině, mozku, srdci a kůži (13, 16, 17, 25).

Přesná úloha COX, LOX a jejich produktů v zánětlivém procesu zůstává však stále neznámá. Stejně jako podíl jednotlivých typů COX izoform (COX-1 nebo COX-2) na zánětlivé odpovědi organismu (18, 20). Jak již bylo zmíněno výše, předpokládá se, že prostanoidy přispívají pomocí regulace cévního tonu a permeability k tvorbě edému, který je klasickým rysem akutního zánětu. Prostanoidy mají dále vliv na buňky imunitního systému, modifikují jejich funkci v zánětlivé kaskádě. Například PGE₂, hlavní produkt enzymu COX, indukuje nezralé thymocyty a B-lymfocyty k diferenciaci (18, 26). Rovněž byl prokázán účinek PGE₂ na inhibici apoptózy a zvýšení exprese molekuly Bcl-2 u zhoubného nádoru tlustého střeva u lidí (27). U IZM je také dobře známo paradoxní chybění apoptózy zánětlivých buněk, a nelze vyloučit možný podíl COX na tomto ději. Leukotrieny, hlavně leukotrien B₄, má silné chemotaktické účinky na imunitní buňky (28).

Chemokiny, cytokiny a jejich receptory u IZM

V současné době stále nevíme, co je vyvolávající příčinou zvýšeného přísunu zánětlivých buněk a jejich setrvávání ve svalové tkáni pacientů s IZM a ani dobře neznáme mechanismy, které přesun buněk umožní a zprostředkovávají.

Obecně se předpokládá, že chemotaktické cytokiny o malé molekulové hmotnosti, nebo chemokiny, hrají klíčovou roli v iniciaci a progresi zánětlivých autoimunitních onemocnění. V poslední době se u některých těchto onemocnění s autoimunitní patogenezi, jako je např. roztroušená skleróza, ale i revmatoidní artritida a dalších systémových onemocnění, hovoří o významném účinku chemokinů v mechanismech přesunu a aktivace imunitních buněk (29).

Detailní charakteristika chemotaktických mechanismů a způsob jejich účinku u těchto onemocnění zatím nejsou dostatečně popsány. Bližší znalost těchto mechanismů a identifikace jednotlivých molekul, které se na těchto procesech účastní, by dala do budoucna šanci na nalezení lepších diagnostických a prognostických možností, a zejména možnost cílenější a úspěšnější terapie IZM a dalších zánětlivých autoimunitních onemocnění.

Chemokiny. V době, kdy se objevily první zmínky o chemokinech, byly definovány jako cytokiny s chemotaktickou aktivitou. Dnes ale existuje stále více důkazů o tom, že se chemokiny významně zúčastňují i dalších procesů s chemotaxí i přímo nesouvisejících, jako jsou exprese adhezivních molekul, exocytóza, hematopoeza, angiogeneze a organogeneze či inhibice apoptózy. Vedle chemotaktické aktivity mají chemokiny rovněž mitogenní a aktivační vlastnosti na řadu typů buněk. Za patologických podmínek jsou tedy chemokiny jedním z významných faktorů podílejících na progresi zánětu (30, 31).

Funkce chemokinů je zprostředkována kontaktem solubilní molekuly chemokinu a molekuly jejího receptoru na membráně cílových buněk. Exprese chemokinových receptorů je pravděpodobně jedním z hlavních regulačních elementů, na kterém závisí složení zánětlivého infiltrátu a případný patologický stav (30).

Již před rokem 1993 byly chemokiny rozděleny do dvou kategorií CXC (alfa) a CC (beta) na základě přítomnosti či nepřítomnosti aminokyseliny mezi prvními dvěma ze čtyř konzervovaných cysteinů na specifických pozicích v blízkosti NH₂-konce.

Dnes jsou známy další dvě skupiny chemokinů. C chemokiny (gama), které obsahují pouze dva cysteiny. Do této skupiny patří lymfotaktin IL-16 (chemotaxe CD 4 buněk) (32, 33). CX₃C chemokiny (delta), které obsahují mezi dvojicí cysteinů 3 aminokyseliny a patří sem fraktalkin (neurotaktin) (30, 31, 32, 33, 34, 35).

CXC (alfa) chemokiny jsou spojeny zejména s neutrofily a T buňkami zprostředkovaným akutním zánětem, CC chemokiny jsou zapojeny hlavně v chronickém zánětu (31, 32, 33, 34, 35).

Pro chemokiny byly dosud identifikovány 4 typy receptorů (CC, CXC, C, CX₃C). Znalost, která ze skupiny chemokinů je schopna vázat který typ receptoru, je důležitá zejména pro potenciální možnost nalezení specifických antagonistů.

Chemokiny mohou být produkovány celou řadou typů buněk imunitní i neimunitní povahy: leukocyty, makrofágy, chondrocyty, osteoblasty, trombocyty, fibroblasty, endoteliálními buňkami a epitelovými buňkami. Jsou produkovány zejména aktivovanými buňkami (30, 31, 32).

Jejich sekrece je indukována prozánětlivými cytokiny, jako jsou IL-1, IL-2, TNF α , INF γ a β a bakteriálními produkty- lipopolysacharidy. Naopak inhibice sekrece chemokinů je způsobena zánět tlumícími cytokiny -TGF β , IL-4 a IL-10. Efekt jednotlivých cytokinů závisí ale také na typu buněk a chemokinu.

Chemokiny a jejich receptory u IZM. Zánět u dermatomyozitidy a polymyozitidy je značně fokální a heterogenní. Důvod, proč jsou zánětlivé buňky přitahovány zrovna do těchto míst, není znám. Z hlediska patogeneze zánětu u IZM - mechanismu atrakce zánětlivých buněk do místa zánětu se ukazuje, že důležitým chemotaktickým mechanismem by mohla být interakce interferon inducible proteinu of 10kDa (IP-10) a monokine induced by IFN- γ (MIG) s chemokinovým CXC receptorem 3 (CXCR3), jejichž zvýšená exprese byla již prokázána u jiných onemocnění s autoimunitní patogenezi (29, 36). Jejich přesná úloha, ani místa jejich exprese a účinku u IZM, dosud nebyly zcela objasněny.

IP-10 byl identifikován jako produkt genu indukovaném INF γ , který je přítomen v místě akumulace lymfocytů při pozdním typu přecitlivělosti na kůži. Exprese IP-10 je spojena s mnoha Th1 zprostředkovanými typy zánětlivých onemocnění, jako jsou například psoriáza, ateroskleróza, či autoimunitními onemocněními jako jsou revmatoidní artritida, roztroušená skleróza. U těchto nemocí tkáňová exprese IP-10 koreluje s infiltrací T buňkami, což jistě naznačuje roli systému IP-10/CXCR3 v jejich patogenezi. Dále vyšší sérové hladiny IP-10 byly popsány i u nemocných s aktivní formou roztroušené sklerózy, a byly také nalezeny u nemocných se SLE, kde korelovaly s pozitivitou anti-DNA protilátek a hladinou komplementu (36).

Zdrojem IP-10 mohou být různé typy buněk, většinou po stimulaci interferonem-gama. Potvrzena byla např. významná role při tvorbě aterosklerotických lézí a jeho produkce endotelovými buňkami, makrofágy a buňkami hladkého svalstva. Hlavními induktory produkce v tomto směru byly IL-1 α , TNF- α a CD40 ligand (37).

Cílovými buňkami pro působení IP-10 jsou monocyty, T lymfocyty, NK buňky a endoteliální buňky (36, 38, 39).

Předpokládá se, že u nemocných s myozitidami zřejmě hraje IP-10 několik různých rolí. Jednak se může účastnit chemoatrakce zánětlivých buněk do svalové tkáně a podílet se tak na zánětlivé infiltraci. Takový mechanismus byl u zánětlivých myopatií prokázán již pro chemokiny monocyte chemoattractant protein (MCP-1) a macrophage inflammatory protein-1 alfa (MIP-1 α) (40, 41). Avšak role IP-10 by mohla také spočívat ve vazbě na CXCR3 receptory na svalových buňkách, což by mohlo vést k aktivaci těchto buněk a následné stimulaci exprese normálně se nevyskytujících povrchových molekul či produkci mediátorů podílejících se na rozvoji zánětu.

MIG je INF γ indukovaný CXC chemokin, byl popsán několik let později než IP-10, jako chemokin, který atrahuje tumor infiltrující T-lymfocyty. Receptor pro MIG je stejně jako u IP-10 CXCR3 (36). Selektivita právě pro tento receptor naznačuje, že MIG a IP-10 se podílejí na tvorbě T lymfocytárního infiltrátu pozorovaného při autoimunitních zánětlivých lézích, pozdním typu přecitlivělosti, některých virových infekcích a tumorů (31, 33, 34).

CXC receptor 3. Klasicky popsaná exprese *CXCR3* je markerem pro T lymfocyty a to především pro ty, které mají vlastnosti Th1 buněk. U revmatoidní artritidy jsou tento receptor a jeho ligandy obviňovány z převažující synoviální infiltrace Th1 pozitivními T lymfocyty (36). Nicméně, *CXCR3* byl nalezen již i na dalších typech buněk, vždy však s neobjasněnou otázkou významu této exprese. Tak např. *CXCR3* exprimují i některé subtypy B buněk a NK buněk, reaktivní astrocyty, Purkyňovy buňky, arteriální endotelie a buňky hladkého svalstva v mozku u nemocných

s roztroušenou sklerózou a u ischemických infarktů (42). Byla popsána exprese na endotelových buňkách a také na subpopulaci dendritických buněk (43). Exprese CXCR3 na endoteliích byla potvrzena i v normálním cévním systému a ve zvýšené míře i u pacientů s různými chorobami, včetně těch s glomerulonefritidou (44). V tomto případě byla CXCR3 exprese nalezena i na mesangiálních buňkách u několika forem zánětlivé glomerulopatie a dána do souvislosti s proliferací mesangiálních buněk (44).

Produkce a role $IFN-\beta$ u IZM.

Interferony α a β byli poprvé identifikováni jako cytokiny s antivirovou aktivitou a typicky jsou produkovány virem infikovanými buňkami.

Induktorem produkce $IFN-\beta$ tedy může být virová, ale případně i jiná, infekce. Exprese $IFN-\beta$ v zánětlivě změněných svalech by tedy mohla naznačovat jednu z etiologických možností vzniku myozitid a být tak odrazem snahy imunitního systému zlikvidovat potenciálního virového etiologického činitele. Produkce $IFN-\beta$ byla v poslední době spojena také s jeho tvorbou v buňkách imunitního systému a po stimulaci různými rozpustnými mediátory, jako jsou IL-1, $TNF-\alpha$ či IL-2 (45).

Vedle antivirového efektu byla již popsána celá řada účinků $IFN-\beta$ na buňky imunitního systému i další buňky (46). $IFN-\beta$ inhibuje proliferaci T lymfocytů a redukuje produkci $IFN-\gamma$ s příslušnými důsledky na osud imunitní odpovědi. Tlumí také migraci lymfocytů, indukuje expresi $TGF-\beta$ a jeho receptoru typu II, snižuje produkci tkáňových metaloproteináz, inhibuje i schopnost T lymfocytů indukovat produkci IL-1 a $TNF-\alpha$ (47, 48, 49, 50).

$IFN-\beta$ produkováný stromálními buňkami také indukuje obranu T buněk před apoptózou pomocí hyperexprese Bcl- X_L , což bylo označeno jako základní mechanismus perzistence T lymfocytů v místech chronického zánětu (51). Nelze vyloučit, že tento mechanismus operuje i v případě T lymfocytů u PM a DM. Dosah může být i na další buňky, včetně svalových. U PM a DM je popisována nepřítomnost apoptózy, která může být způsobena právě vlivem stromálních buněk a jimi secernovaných mediátorů,

včetně IFN- β . Ten je schopen podporovat přežívání buněk vazbou na IFN receptor, která vede k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (52). Vzhledem k tomu, že IFN- β byl dán do souvislosti s přežíváním myelomových buněk nebo buněk Burkittova lymfomu, hypoteticky by se mohlo jednat i o faktor, který se podílí na známé zvýšené frekvenci neoplastických onemocnění u PM a DM.

Jiný významný podíl IFN- β v patogenezi IZM by mohl spočívat v podpoře exprese HLA molekul I. třídy. Jak již bylo popsáno výše je dobře známo, že tyto molekuly jsou silně exprimovány na svalových buňkách pacientů s myozitidami (5). O pravděpodobné patogenetické roli jejich hyperexpresi svědčí již výše zmíněný nedávno popsáný myší model myozitidy, která se vyvine při indukované transgenní hyperexpresi HLA molekul I. třídy, a je v mnoha směrech podobná lidské polymyozitidě, včetně výskytu anti-Jo-1 autoprotilátek (12).

Další společnou okolností týkající se IFN- β a myozitid je produkce TGF- β . TGF- β se nachází ve zvýšené míře ve vzorcích nemocných s myozitidami a je jednak obviňován z indukce produkce fibrózní tkáně u DM (53), jednak i v patogenezi chronické zánětlivé infiltrace a akumulace extracelulární matrix (54). IFN- β indukuje expresi TGF- β 1 a zároveň i TGF- β 1 receptoru typu II, což ještě zesiluje jejich vzájemnou interakci (49).

IFN- β byl již terapeuticky použit při léčbě myozitidy s inkluzními tělísky. Lék byl sice tolerován, nebyly však zjištěny významné rozdíly v klinickém stavu (55). Myozitida s inkluzními tělísky je však klinicky a zřejmě i patogeneticky jiné onemocnění než běžná idiopatická PM a DM a role různých cytokinů a dalších mediátorů u těchto dvou onemocnění se zdá být dosti rozdílná.

Avšak existuje i zpráva o možném nepříznivém vlivu IFN- β popisující indukci polymyozitidy při léčbě IFN- β , který byl použit v terapii chronické hepatitidy C (56), případně v nedávné době popsáný případ rabdomyolýzy během léčení IFN- β (57).

IZM jsou často asociovány s malignitou, některým dalším autoimunitním onemocněním (lupus erythematosus, revmatoidní artritidou, overlap

syndromem, nebo smíšeným onemocněním pojiva). Často také dochází k asociaci IZM s retrovirovým onemocněním.

Dalším z diskutovaných možných mechanismů prospěšného efektu interferonu-beta (IFN- β) u těchto onemocnění je právě ovlivnění produkce chemokinů a jejich receptorů (58).

Klinický průběh a prognóza pacientů s IZM

Základním klinickým projevem u pacientů s IZM je svalová slabost. Tato svalová slabost postihuje s výjimkou IBM zejména proximální svalstvo končetin a svaly trupu. V průběhu měsíců až let trvání nemoci postupně dochází ke svalové atrofii, která však nemusí být patrná vzhledem k tomu, že svalová tkáň je často nahrazována tukovou a pojivovou tkání. Před objevením se svalové slabosti pacienti většinou udávají období několika týdnů febrilií, artralgií až artritid, Raynaudova fenoménu, poklesu hmotnosti a nechutenství, v tomto období mohou být svaly citlivé, až bolestivé, tyto příznaky však nacházíme u méně než 50% pacientů. První zasaženou a obvykle nejvíce postiženou oblastí bývají svaly stehna, a proto obvykle, i s ohledem na co nejmenší invazivitu výkonu, zde dochází k bioptickému odběru (1, 2, 3). Zhruba u 20% pacientů dochází k zasažení svalů esofagu.

Dermatomyozitida bývá navíc provázena typickými kožními změnami - heliotropní exantém (otok a červenofialové zbarvení kolem očí), Gottronovy známky (tmavě červená, vystouplá, nesvědící vyrážka na extenzorové straně ruky a nad drobnými klouby), „ruce mechanika“ (zhrubění kůže, ragády na radiální straně druhého až třetího prstu ruky) (1, 2).

Další příznaky u IZM zahrnují kloubní postižení (artralgie až artritidy), dysfagie způsobená postižením jícnu, plicní postižení- nejčastěji dušnost při slabosti dýchacích svalů, ale může to být i difúzní alveolitida progredující až do intersticiální plicní fibrózy. Méně často vidíme kardiální příznaky, manifestují se především na EKG (převodní poruchy), dále zřídka pak i myokarditida.

Idiopatické zánětlivé myopatie jsou také spojeny s vyšším výskytem malignit. Je popisováno, že maligní onemocnění se vyskytuje asi v 15-20%

případů, častěji u DM. Lokalizace nádorů jsou různé, snad o něco častější jsou karcinom ovarii a prsu u žen, a karcinom plic u mužů (1, 2).

Hodnocení a klasifikace onemocnění. Současná koncepce idiopatických zánětlivých myopatií zahrnuje poměrně heterogenní skupinu onemocnění s různým průběhem a různou prognózou (4). Nízká incidence a absence validizovaných kritérií, sledujících aktivitu a zlepšení nemoci, bránila v minulosti provádění klinických studií. V tomto smyslu se situace v poslední době změnila, protože po značném úsilí byla skupina IMACS (International Myositis Assessment and Clinical Studies) schopna podat návrh na kritéria hodnotící aktivitu a poškození při PM/DM a také navrhla několik definicí zlepšení během klinických studií (59, 60).

Prognóza pacienta je ovlivněna nejen typem a závažností onemocnění, ale také řadou dalších faktorů, mezi které patří i délka období, které uplyne do stanovení diagnózy a počátku léčby. Stanovení diagnózy se zdá být poměrně jednoduché, pokud jsou jasně splněna diagnostická kritéria (1, 2), avšak klinická zkušenost ukazuje, že odlišení od některých nezáánětlivých myopatií může být v některých případech velmi svízelné. Rovněž určení aktivity a rozsahu onemocnění není jednoznačnou záležitostí. Ke zhodnocení aktivity a závažnosti nemoci se používá měření svalové síly, svalové funkce a svalové hmoty (61). Zejména u středně a mírně postižených nemocných se s výhodou využívají výkonové testy (61). Všechny tyto testy jsou však zatíženy větší či menší subjektivní chybou posuzovatele.

Tradičním laboratorním ukazatelem aktivity jsou hladina kreatinkinázy (CK) nebo myoglobinu. Protože však existují i inhibitory CK a korelace CK s aktivitou není vždy jednoznačná, nelze se vždy na tento ukazatel spolehnout. Tyto skutečnosti vedou k hledání nových postupů k precizaci diagnózy a k hledání alternativních a přesnějších ukazatelů aktivity procesu.

Velmi důležitým vyšetřením na jehož základě dochází i ke stanovení diagnózy je histopatologické vyšetření vzorku svalové tkáně. Vyšetřují se jednak fixované parafinové vzorky svalové tkáně na elektronové mikroskopu (ultrastruktura svalových buněk), pomocí světelné mikroskopie (barvení

vzorku hematoxylin a eosin). A dále probíhají vyšetření zmrazených vzorků svalové tkáně pro histochemická vyšetření-důkaz jednotlivých enzymů, charakteristika sv. vláken (ATP, kyselá fosfatáza, nespecifická esteráza, sukcinyldehydrogenáza, dependentní diaforáza, alfa-glycerofosfodehydrogenáza, alkalická fosfatáza), imunohistochemická vyšetření (průkaz cytokinů, receptorů infiltrujících buněk).

Na základě těchto vyšetření se hodnotí nekrózy a regenerace svalových vláken, rozdíly v průměru svalových vláken, atypie četnosti, velikosti, uložení jader, vakuolární přeměna svalových vláken, změny v pruhování svalových vláken, vazivová přeměna v perimysiu a endomysiu, zánětlivé změny (charakter zánětlivého infiltrátu a některé další změny např. fokální kapilární deplece, perivaskulární atrofie. Histologické vyšetření svalového vzorku je stále nezbytným předpokladem pro stanovení diagnózy IZM.

Vyšetření magnetickou rezonancí u nemocných s IZM

V současné době nejsou k dispozici vyšetřovací metody, které by byly schopny dostatečně spolehlivě hodnotit stav postižené svalové tkáně, klinický stav, průběh a reakci na terapii u pacientů s IZM.

Jednou ze slibných vyšetřovacích možností se zdá být vizualizace stavu svalové tkáně pomocí zobrazení magnetickou rezonancí (MRI) (62). V souvislosti s využíváním této metody u nemocných s IZM existuje však řada dosud nevyřešených otázek, jako jsou senzitivita a specifita metody, časové longitudinální změny nebo vztah mezi kvalitativními změnami ve svalu a intenzitou MRI signálu.

Vyšetření magnetickou rezonancí (MRI) rozpoznává změny v měkkých tkáních, a proto je používáno na vyšetřování svalů i u nemocných s IZM. MRI rozpoznává přítomnost edému ve svalové tkáni a proto pomocí MRI lze odlišit svalovou tkáň postiženou zánětem od tkáně nepostižené. Toto je důležité zejména protože jak již bylo zmíněno výše postižení svalové tkáně u nemocných je velmi heterogenní a fokální (63, 64, 65, 66, 67).

Nejpřesnější obraz zánětu poskytují T2-vážený obraz s potlačením tuku (T2W/FS) a metoda Short Tau Inversion Recovery (STIR) sequence with long time to echo- (TE). Tyto dvě techniky jsou používány, protože tuk přítomný ve svalové tkáni může ztěžovat interpretace výsledků MRI. Obě sekvence mají vždy v podstatě shodný nález. Oblasti zánětem postižených-edematózních svalů na MRI vykazují hyperintenzivní signál, zatímco méně postižené, či nepostižené svaly mají signál nízký na T2 vážených obrazech. T1 vážené obrazy, kde tuk dává vysoký signál a svaly (postižené i nepostižené) mají signál střední intenzity, jsou při vyšetřování IZM používány pouze k detekci tukové degenerace svalové tkáně při chronickém postižení (68, 69).

Léčba IZM

Terapie IZM je pro jejich heterogenitu a nedostatečnou znalost přesných etiopatogenetických mechanismů jejich vzniku značně komplikovaná. V současné době nejlepší výsledky terapeutických postupů jsou u dermatomyzitidy, ať už se jedná o léčbu kortikosteroidy, intravenózními imunoglobuliny (IVIg), nebo imunosupresivy. Na druhou stranu nejhůře na terapii odpovídají pacienti s IBM. Polymyozitida je velmi řídké onemocnění, a proto je velmi obtížné provádět klinické studie na velkých skupinách pacientů. Přesto se zdá, že odpověď na léčbu je PM velmi variabilní.

Trvalým problémem při léčbě IZM zůstává stále odlišení PM od jiných typů myopatií (IBM, nekrotizující myopatie, dystrofické procesy atd.), kde může být rovněž přítomen sekundární zánětlivý infiltrát. Budoucnost v léčbě IZM se zatím zdá být nadějná s ohledem na nové terapeutické cíle směřující k T buněčné aktivaci, cytokinům, chemokinům a adhezivním molekulám.

Přehled současných terapeutických možností u IZM.

Glukokortikoidy. Tradičně jsou v léčbě PM a DM používány vysoké dávky glukokortikoidů. IBM obvykle na glukokortikoidy neodpovídá. Byla navržena různá léčebná schémata (70). Nekonrovaná studie ukázala, že nižší dávky glukokortikoidů (pod 0,5 mg/kg) mohou vést k podobnému

zlepšení svalového onemocnění, jako při použití vysokých dávek. V takové skupině nemocných bylo pozorováno menší množství zlomenin obratlů z důvodu glukokortikoidy indukované osteoporózy ve srovnání se skupinou pacientů léčených vyššími dávkami (71).

Protože se však jednalo o nerandomizované a retrospektivní pozorování a současně byly použity různé imunosupresivní léky, bude nutné toto pozorování teprve potvrdit.

Imunosupresivní léky. Klinická zkušenost ukazuje, že přidání imunosupresivních léků je zapotřebí u většiny pacientů s IZM. Jsou k dispozici údaje, které ukazují, že prognóza je horší, pokud je podání účinné léčby opožděno, a proto by měla být situace dlouhé a nedostatečně tlumené aktivity nemoci omezena na co nejkratší dobu.

Nejčastěji podávaným imunosupresivním lékem u IZM je *methotrexát*. Dalším lékem používaným při neúspěchu léčby methotrexátem je *azathioprin*.

Tříměsíční, dvojitě slepá, prospektivní klinická studie neprokázala signifikantní rozdíly mezi pacienty užívajícími azathioprin a glukokortikoidy ve srovnání s těmi, kteří měli samotný prednison. Otevřené pokračování této léčby však ukázalo, že pacienti s kombinovanou terapií již od počátku měli lepší funkční schopnosti a vyžadovali méně prednisonu při hodnocení po jednom a třech letech (72).

Další prospektivní randomizovaná, otevřená, zkřížená studie srovnávala dva agresivní přístupy u nemocných s refrakterní myozitidou. Pacienti byli randomizováni buď do skupiny s methotrexátem v kombinaci s azathioprinem nebo do skupiny s vysokou dávkou intravenózního methotrexátu, který byl podáván každé dva týdny po dobu 6 měsíců. V obou skupinách došlo ke zlepšení u některých nemocných, ale celková analýza ukázala trend ve prospěch těch pacientů, kteří dostávali nejdříve kombinovanou terapii (73).

V několika otevřených, retrospektivních klinických hodnoceních byl použit také *cyklosporin A*. Byl zde popsán dobrý efekt na intersticiální plicní onemocnění, které se vyskytlo v kombinaci s PM/DM. V této práci je dále

uvedena otevřená, randomizovaná, prospektivní studie ve které se prokázalo, že jak léčba cyklosporinem, tak methotrexátem v kombinaci s glukokortikoidy vedla ke zlepšení stavu, s lehkým trendem ve prospěch methotrexátu u některých parametrů (viz příloha 4).

U 8 pacientů s rezistentní polymyozitidou a přítomností protilátek signalizujících špatnou prognózu vedl *takrolimus* (FK506) ke zlepšení funkčních schopností a extramuskulárních příznaků. Zdá se, že je také účinný u intersticiálního plicního onemocnění v rámci antisyntetázového syndromu. Situace však není jednoznačná, protože byl v nedávné době popsán případ myozitidy asociované s léčbou takrolimem (74).

Smíšené výsledky u PM/DM mělo použití *cyklofosfamidu*. Naše vlastní klinické zkušenosti buď s i.v. pulzním podáním cyklofosfamidu nebo denním perorálním podáváním byly u několika pacientů celkem pozitivní. V nedávné době byl popsán významný klinický účinek cyklofosfamidu, bez průkazu závažné toxicity u pacientů s těžkou a refrakterní juvenilní dermatomyozitidou (75). Někteří z pacientů byly také celkem úspěšně léčeni *chlorambucilem*, *fludarabinem*, či *mykofenolátem mofetilu* (76, 77, 78, 79).

Dále se k léčení IZM využívá použití *intravenózních imunoglobulinů (IVIg) a plasmaferézy*.

Biologická léčba. Řada pozorování v poslední době, týkajících se imunologických změn ve svalch nemocných s IZM, stimulovala zájem o biologickou léčbu těchto onemocnění. Byla již nalezena celá řada imunologicky relevantních molekul v zánětlivých infiltrátech a ve svalových kapilárách, např. $TNF\alpha$, IL1, adhezní molekuly a mnohé další, což svědčí o aktivní roli těchto buněk a mediátorů v tvorbě zánětu u PM/DM. Co se zdá být velmi důležité je fakt, že u myozitidy mohou být samotné svalové buňky buňkami prezentujícími antigen a zdrojem různých cytokinů, chemokinů, adhezních, kostimulačních, apoptotických a antiapoptotických molekul, jako jsou $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, IL-10, IL-15, $IFN\gamma$, $TGF-\beta$, MCP-1, IP-10, ICAM-1, LFA-3, CTLA4, CD28, BB-1, ICOSL, CD40, TNFR a celá řada dalších (4, 80). Pro budoucí terapii by mohly být významné také molekuly, které jsou aberantně exprimovány přímo v myozitických svalových buňkách, spíše než

v imunitních buňkách, protože takováto léčba by mohla být specificky cílena do postižené tkáně. Takovými kandidáty jsou např. molekuly, které se účastní antigenní prezentace a kostimulace.

Dosud použité léky biologické léky u IZM jsou léky *antiTNF* (monoklonální protilátka anti TNF, či TNF receptor vázaný na Fc-část imunoglobulinové molekuly).

Důvody pro inhibici TNF u myozitidy jsou následující: zvýšená exprese TNF α ve svalové tkáni u DM/PM, zvýšené sérové hladiny TNF α , a známé účinky TNF α na svalový metabolismus – urychlený katabolismus, kontraktilní dysfunkce a porucha myogeneze (81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88). Dále pak byla použita léčba *anti-C5* (monoklonální protilátka eculimubab, namířená proti C5 složce komplementu) (89), *rituximab* (monoklonální protilátka proti CD20) (90).

INF- β . U IBM byly provedeny dvě randomizované pilotní studie s interferonem beta 1a (β INF1a). Léčba byla dobře tolerovaná, včetně vysokých dávek, ale nebyly zjištěny významné rozdíly ve změně svalové síly a svalové hmoty mezi placebem a skupinou s β INF1a po 6 měsících (55). Důvodů pro použití β INF1 je několik a zahrnují inhibici proliferace T buněk, snížení aktivity T lymfocytů, inhibici INF γ , IL-12, IL-1, TNF α , redukci prezentace antigenu u B lymfocytů, inhibici některých adhezních molekul a chemokinů. Na druhou stranu by jistým problémem mohla být schopnost INF β zvyšovat expresi molekul MHC-I, nebo jeho schopnost udržovat paměťové T lymfocyty.

Zatím stále spíše experimentální léčbou IZM je *transplantace autologních kmenových buněk*.

K dispozici jsou pouze minimální informace o použití transplantace autologních kmenových buněk (ASCT) u idiopatických zánětlivých myopatií. Byly popsány 2 úspěšné popisy případů u anti-Jo-1 pozitivní myozitidy (91).

LITERATURA

1. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (First of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:344- 347.
2. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (Second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403 - 407.
3. Dalakas M: Polymyositis, dermatomyositis, and inclusion body myositis. *N Engl J Med* 1991;325:1487-98.
4. Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 2003;362:971-82.
5. Nagaraju K. Update on immunopathogenesis in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:461-8.
6. Lundberg I, Kratz AK, Alexanderson H, Patarroyo M. Decreased expression of interleukin-1alpha, interleukin-1beta, and cell adhesion molecules in muscle tissue following corticosteroid treatment in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):336-48.
7. Hohlfeld R, Engel AG, Goebels N, Behrens L. Cellular immune mechanisms in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:520-6.
8. Messner RP: Pathogenesis of Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Diseases of Skeletal Muscle*. Edited by Wortmann RL. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000,111-128.
9. Englund P, Lindroos E, Nennesmo I, Klareskog L, Lundberg IE: Skeletal muscle fibers express major histocompatibility complex class II antigens independently of inflammatory infiltrates in inflammatory myopathies. *Am J Pathol* 2001; 159:1263-73.
10. Nyberg P, Wikman AL, Nennesmo I, Lundberg I: Increased expression of interleukin 1alpha and MHC class I in muscle tissue of patients with chronic, inactive polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol* 2000; 27:940-8.
11. Inukai A, Kuru S, Liang Y, et al. Expression of HLA-DR and its enhancing molecules in muscle fibers in polymyositis. *Muscle Nerve* 2000;23:385-92.
12. Nagaraju K, Raben N, Loeffler L, et al. Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):9209-14.
13. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294:1871-5.
14. Smith WL, Garavito RM, De Witt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthase (cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271:33157-60.
15. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299:125-140.
16. Silverman ES, Drazen JM. The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111:525-36.
17. Samuelsson B. The discovery of the leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S2-6.
18. Parker CW. Leukotrienes and prostaglandins in the immune system. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1986; 16:113-34.
19. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108:15-23.

20. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001;107:1491-5.
21. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12:1063-73.
22. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos, KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99,13926-13931.
23. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheum* 1997;24:S15-19.
24. Pablos JL, Santiago B, Carreira PE, Galindo M, Gomez-Reino JJ. Cyclooxygenase-1 and -2 are expressed by human T cells. *Clin Exp Immunol* 1999;115:86-90.
25. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 1990;323:645-55.
26. Rocca B, Spain LM, Pure E, Langenbach R, Patrono C, FitzGerald GA. Distinct roles of prostaglandin H synthases 1 and 2 in T-cell development. *J Clin Invest* 1999;103:1469-77.
27. Sheng H, Shao J, Morow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression prostaglandin E₂ in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-6.
28. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 1997; 367:620-4.
29. Szekanecz Z, Szucs G, Szanto S, Koch AE. Chemokines in rheumatic diseases. *Curr Drug Targets*. 2006;7(1):91-102.
30. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-28.
31. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: An update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675-705.
32. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55: 97-179.
33. Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999;19:1-47.
34. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998;19:568-74.
35. Wells TNC, Power CHA, Proudfoot AEI. Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:376-80.
36. Narumi S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Konishi K. Serum levels of IFN-inducible protein-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2000;12:1561-5.
37. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999;104:1041-50.
38. Melder M, Exeni A, Reinders ME, et al. Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during cardiac allograft rejection. *Circulation* 2001;104:2558-64.
39. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function and expression in activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:963-9.

40. Confalonieri P, Bernasconi P, Megna P, Galbiati S, Cornelio F, Mantegazza R. Increased expression of beta-chemokines in muscle of patients with inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:164-169.
41. Adams EM, Kirkley J, Eidelman G, Dohlman J, Plotz PH. The predominance of beta (CC) chemokine transcripts in idiopathic inflammatory muscle diseases. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997;109(3):275-85.
42. Goldberg SH, van der Meer P, Hesselgesser J, et al. CXCR3 expression in human central nervous system diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:127-38.
43. Garcia-Lopez MA, Sanchez-Madrid F, Rodriguez-Frade JM, et al. CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest* 2001;81:409-18.
44. Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F et al. Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2518-26.
45. Doly J, Civas A, Navarro S, Uze G. Type I interferons: expression and signalization. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:1109-21.
46. Young VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. Mechanisms of action. *Neurology* 1998;51:682-9.
47. Jungo F, Dayer JM, Modoux C, Hyka N, Burger D. IFN-beta inhibits the ability of T lymphocytes to induce TNF-alpha and IL-1beta production in monocytes upon direct cell-cell contact. *Cytokine* 2001;14:272-82.
48. Lee GC, Song BH, Lee CH. Increase in the expression of human leukocyte antigen class I in human fibroblasts by soluble factors secreted from human cytomegalovirus-infected cells. *Mol Cells* 2001;11:392-8.
49. Ossege LM, Sindern E, Patzold T, Malin J-P. Immunomodulatory effects of interferon-beta-1b in vivo: induction of expression of transforming growth factor-beta1 and its receptor type II. *J Neuroimmunol* 1998;91:73-81.
50. Stuve O, Chabot S, Jung SS, Williams G, Yong VW. Chemokine-enhanced migration of human peripheral blood mononuclear cells is antagonized by interferon beta-1b through an effect on matrix metalloproteinase-9. *J Neuroimmunol* 1997;80:38-46.
51. Pilling D, Akbar AN, Girdlestone J, et al. Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis. *Eur J Immunol* 1999;29:1041-1050.
52. Yang CH, Murti A, Pfeffer SR, Basu L, Kim JG, Pfeffer LM. IFNs alpha/beta promotes cell survival by activating NF-kB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13631-6.
53. Confalonieri P, Bernasconi P, Cornelio F, Mantegazza R. Transforming growth factor-beta 1 in polymyositis and dermatomyositis correlates with fibrosis but not with mononuclear cell infiltrate. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:479-84.
54. Amemiya K, Semino-Mora C, Granger RP, Dalakas MC. Downregulation of TGF-beta1 mRNA and protein in the muscles of patients with inflammatory myopathies after treatment with high-dose intravenous immunoglobulin. *Clin Immunol* 2000;94:99-104.
55. Tawil R, Griggs R, Jackson C, et al. Randomized pilot trial of beta IFNβ1a (Avonex) in patients with inclusion body myositis. *Neurology* 2001;57:1566-1570.
56. Iguchi H, Kishi M, Fujioka T, Wakata N, Kinoshita M. Polymyositis after interferon beta treatment of chronic hepatitis type C. *Rinsho Shinkeigaku* 1996;36:22-4.
57. Lunemann JD, Kassim N, Zschenderlein R, Zipp F, Schwarzenberger B. Rhabdomyolysis during interferon-beta 1a treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:274.

58. Iarlori C, Reale M, Lugaresi A, et al. RANTES production and expression is reduced in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon-beta-1b. *J Neuroimmunol* 2000;107:100-7.
59. Isenberg, D.A, Allen E, Farewell V et al. International consensus outcome measures for patients with idiopathic inflammatory myopathies. Development and initial validation of myositis activity and damage indices in patients with adult onset disease. *Rheumatology (Oxford)* 2004;41:49-54.
60. Rider LG, Giannini EH, Brunner HI et al. International consensus on preliminary definitions of improvement in adult and juvenile myositis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2281-90.
61. Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR et al. 119th ENMC International Workshop: Trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2004;14:337-45.
62. Fleckenstein JL. Re: Cost-effectiveness of MR imaging in evaluating polymyositis. *AJR* 1996; 167:531-2.
63. Studynkova JT, Kuchen S, Jeisy E, et al. The expression of cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in inflammatory muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol.* 2004,22(4):395-402.
64. Lampa J, Nennesmo I, Einarsdottir H, Lundberg I. MRI guided muscle biopsy confirmed polymyositis diagnosis in a patient with interstitial lung disease. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(4):423-6.
65. Pitt AM, Fleckenstein JL, Greenlee RG Jr, Burns DK, Bryan WW, Haller R. MRI-guided biopsy in inflammatory myopathy: initial results. *Magn Reson Imaging.* 1993,11(8):1093-9.
66. Vencovský J, Jarošová K, Charvát F: The use of magnetic resonance imaging in diagnostics and evaluation of the activity in patients with idiopathic inflammatory myopathies (In Czech). *Ces Revmatol* 1997, 5:163-8
67. Fujino H, Kobayashi T, Goto I, Onitsuka H. Magnetic resonance imaging of the muscles in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Muscle Nerve.* 1991;14(8):716-20.
68. Yosipovitch G, Beniaminov O, Rousso I, David M. STIR magnetic resonance imaging: a noninvasive method for detection and follow-up of dermatomyositis. *Arch Dermatol.* 1999;135(6):721-3.
69. Adams EM, Chow CK, Premkumar A, Plotz PH. The idiopathic inflammatory myopathies: spectrum of MR imaging findings. *Radiographics.* 1995,15(3):563-74.
70. Oddis CV. Idiopathic inflammatory myopathies: a treatment update. *Curr Rheumatol Rep* 2003;5:431-6.
71. Nzeusseu A, Brion F, Lefebvre C, Knoop P, Devogelaer JP, Houssiau FA. Functional outcome of myositis patients: can a low-dose glucocorticoid treatment regimen achieve good functional results? *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:441-6.
72. Bunch TW, Worthington JW, Combs JJ, Ilstrup DM, Engel AG. Azathioprine with prednisone for polymyositis. *Ann Intern Med* 1980;92:365-9.
73. Villaba L, Hicks JE, Adams EM, Sherman JB, Gourley MF, Leff RL, et al. Treatment of refractory myositis. *Arthritis Rheum* 1998;41:392-9.
74. Orlandi V, Campieri C, Mosconi G et al. Tacrolimus-associated myositis: a case report in a renal transplant patient. *Transplant Proc* 2004;36:708-10.
75. Riley P, Maillard SM, Wedderburn LR, Woo P, Murray KJ, Pilkington CA. Intravenous cyclophosphamide pulse therapy in juvenile dermatomyositis. A review of efficacy and safety. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:491-6.

76. Chaudhry V, Cornblath DR, Griffin JW, O'Brien R, Drachman DB. Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases. *Neurology* 2001;56:94-6.
77. Gelber AC, Nousari HC, Wigley FM. Mycophenolate mofetil in the treatment of severe skin manifestations of dermatomyositis: a series of 4 cases. *J Rheumatol* 2000;27:1542-5.
78. Tausche AK, Meurer M. Mycophenolate mofetil for dermatomyositis. *Dermatology* 2001;202:341-3.
79. Majithia V, Sanders S, Harisdangkul V. Mycophenolate mofetil: a safe and promising therapy for adult inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 2003;48:3623 (abstrakt SY12).
80. Nagaraju K. Immunological capabilities of skeletal muscle cells. *Acta Physiol Scand* 2001;171:215-23.
81. Li YP, Reid MB. Effect of tumor necrosis factor $-\alpha$ on skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:483-7.
82. Hengstman GJD, van den Hoogen FH, Barrera P et al. Successful treatment of dermatomyositis and polymyositis with anti-tumor-necrosis-factor- α : preliminary observation. *Eur Neurol* 2002;50:10-15.
83. Labioche I, Liozon E, Weschler B, Loustaud-Ratti V, Soria P, Vidal E. Refractory polymyositis responding to infliximab: extended follow-up. *Rheumatology* 2004;43:531-2.
84. Roddy E, Courtney PA, Morris A. Non-Hodgkin's lymphoma in a patient with refractory dermatomyositis which had been treated with infliximab. *Rheumatology* 2002;41:1194-5.
85. Grundtman CM, Dastmalchi M, Alexanderson H et al. Potentially harmful effects of infliximab treatment in patients with idiopathic myopathies. *Ann Rheum Dis* 2004;63(Suppl.1):67(abstrakt OP0033).
86. Musial J, Undas A, Celinska-Lowenhoff M. Polymyositis associated with infliximab treatment for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2003;42:1566-8.
87. Saadeh CK. Etanercept is effective in the treatment of polymyositis/dermatomyositis which is refractory to conventional therapy including steroid and other disease modifying agents. *Arthritis Rheum* 2000;43:S193 (abstrakt 757).
88. Sprott H, Glatzel M, Michel BA. Treatment of myositis with etanercept (Enbrel), a recombinant human soluble fusion protein of TNF- α type II receptor and IgG1. *Rheumatology* 2004;43:524-6.
89. Takada K, Bookbinder S, Furie R et al. A pilot study of eculizumab in patients with dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2002;46(Suppl):S489 (abstrakt 1300).
90. Levine TD. A pilot study of rituximab therapy for refractory dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2002;46(Suppl):S488 (abstrakt 1299).
91. Bingham S, Griffiths B, McGonagle D, Snowden JA, Morgan G, Emery P. Autologous stem cell transplantation for rapidly progressive Jo-1 positive polymyositis with long-term follow-up. *Br J Haematol* 2001;113:840-1.

HYPOTÉZY

V první části našeho projektu jsme se věnovali histopatologickým procesům v zánětem změněné svalové tkáni a úlohou některých vybraných imunokompetentních molekul. Hypotéza týkající se této části byla formulována takto:

Hypotéza 1.: Pro vznik tkáňového zánětu je nutná přítomnost mediátorů způsobující atrakci buněk imunitního systému do zánětlivé svalové tkáně, jejich extravazaci a dále jejich setrvávání v místě zánětu. Enzymy COX a LOX se podílejí na regulaci cévního tonu a permeability, a dále i na chemotaxi imunokompetentních buněk. Rovněž byly popsány účinky některých typu chemokinů, cytokinů a jejich receptorů na patogenezi IZM. Existuje předpoklad, že se tyto enzymy a mediátory podílejí i na patogenezi zánětu u dermatomyozitidy a polymyozitidy.

V druhé části jsme se zabývali spíše klinickými projevy tohoto tkáňového zánětu. Zejména pak možnostem jejich sledování a hodnocení klinického stavu a průběhu onemocnění pacienta.

Hypotéza 2.: Hlavním projevem dermatomyozitidy a polymyozitidy je edém zánětem postižené svalové tkáně, vyšetření MRI je metodou zobrazující edém tkání, a proto by vyšetření svalů nemocných DM nebo PM pomocí MRI mělo být dobrým korelátem klinického stavu a průběhu choroby.

CÍLE PROJEKTU

Společným cílem celého projektu bylo pokusit se zmapovat mechanismy vedoucí k zánětlivé infiltraci svalů, edému svalové tkáně a k tkáňovému poškození, a následně ke klinickým projevům onemocnění u nemocných s PM a DM.

V první části bylo naším cílem zjistit podíl některých vybraných molekul na imunopatologických pochodech, které vyvolávají klinické, laboratorní a místní projevy nemoci.

V rámci jednotlivých studií jsme pomoci:

- a) diferencovaného histologického hodnocení svalových biopsií odebraných z magnetickou rezonancí odlišené postižené a nepostižené tkáně stejné svalové oblasti (stehenní svaly) a hodnocení biopsií provedených v odstupu u nemocných, kteří dosáhli jistého stupně klinického a laboratorního zlepšení choroby,
- b) imunohistologického vyšetření postižené tkáně a zánětlivého infiltrátu, především se zřetelem k mechanismům, které vedou k průniku zánětlivých buněk do svalové tkáně přes endoteliální buňky a k mechanismům, které vedou k atrakci mononukleárních buněk do intermysiálního a endomysiálního prostoru (exprese aktivačních a adhezivních molekul na endoteliálních buňkách, exprese chemokinů a chemokinových receptorů na tkáňových a infiltrujících buňkách),
- c) porovnáním tkáňové distribuce (povrch svalových vláken, endoteliální buňky, zánětlivý infiltrát endo- či perimysiální) jednotlivých sledovaných molekul u obou typů onemocnění, tj. PM a DM, především se zaměřením na DM,
- d) *in situ* hybridizace s použitím specifických sond- COX-1, -2, a 5-LOX k posouzení produkce mRNA pro tyto molekuly ve svalové tkáni nemocných s PM/DM,

- e) korelace obrazu MRI svalů, klinických a laboratorních parametrů a histologického nálezu-infiltrátu zánětlivými buňkami u nemocných s PM/DM,

zjišťovali podíl jednotlivých vybraných imunologicky relevantních mediátorů na patogenezi zánětlivého procesu u polymyozitidy (PM) a dermatomyozitidy (DM).

V druhé části tohoto projektu jsme sledovali vliv těchto zánětlivých mechanismů na klinický průběh onemocnění a odpověď na terapii takto nemocných pacientů. Zároveň jsme se snažili zjistit relevanci jednotlivých klinických a laboratorních parametrů a vyšetřovacích metod z hlediska jejich podílu na klinické aktivitě onemocnění u pacientů s PM a DM a zajímali jsme se, zda existuje předpovědní hodnota těchto parametrů na počátku sledování pro klinickou aktivitu onemocnění v době kontrolní biopsie po léčbě, a to pomocí:

- a) diferencovaného hodnocení nálezů MRI postižených svalů před a po terapii, po poklesu klinické aktivity o 30%,
- b) evaluace klinického stavu pacientů před a po terapii,
- c) sledováním terapeutického efektu jednotlivých léků.

TEZE DIZERTACE

KAPITOLA 1

(Příloha 1)

Expresce cyklooxygenázy-1, cyklooxygenázy-2 a 5-lipoxygenázy v zánětlivé svalové u pacientů s dermatomyozitidou a polymyozitidou.

Cíl. Cílem práce bylo popsat expresi cyklooxygenázy-1 (COX-1), cyklooxygenázy-2 (COX-2) and 5-lipoxygenázy (5-LOX) ve svalové tkáni nemocných s idiopatickými zánětlivými myopatiemi – dermatomyozitidou a polymyozitidou, a dále zjistit, zda existují rozdíly v expresi mezi svalem na MRI postiženým a svalem , který se zdá na MRI nepostižený.

Metodika. Vzorky svalové tkáně 7 pacientů s dermatomyozitidou (DM) a 4 pacientů s polymyozitidou (PM) byly odebrány pomocí jehlové biopsie ze svalů na MRI postižených a nepostižených. Pomocí *in situ* hybridizace s využitím antisense mRNA práb jsme detekovali mRNA pro COX-1, COX-2 and 5-LOX. Expresce mRNA ve svalových vzorcích byla hodnocena semikvantitativně pomocí 5-ti bodové stupnice.

Výsledky. Expresce COX-1, COX-2, a 5-LOX mRNA byla detekována ve všech sledovaných vzorcích na svalových buňkách, buňkách zánětlivého infiltrátu i na cévách. Expresi COX-1 mRNA jsme našli převážně na buňkách zánětlivého infiltrátu a cévách a tato expresce byla vyšší v MRI postižených svalech ve srovnání se svaly MRI nepostiženými (průměrná intenzita expresce byla $3,22 \pm 0,67$ vs. $2,0 \pm 0,87$; $p=0,0006$). Expresce COX-2 mRNA byla přítomna zejména na zánětlivých buňkách a cévách a byla vyšší v MRI postižených svalech ($3,5 \pm 0,8$ v postižených svalech; $1,9 \pm 1,1$; $p=0,003$ v nepostižených svalech) rovněž expresce COX-2 mRNA na svalových buňkách ($2,1 \pm 1,0$ vs. $1,3 \pm 1,0$; $p=0,021$). Na rozdíl od expresce 5-

LOX mRNA , která byla detekována především na svalových buňkách MRI postižených svalů a s menší intenzitou na svalových buňkách MRI nepostižených svalů ($3,22 \pm 0,7$ vs. $1,67 \pm 0,7$; $p=0,0007$).

Tab 1. Expresce COX-1, COX-2, a 5-LOX mRNA v MRI postižené svalové tkáni u nemocných s IZM (*in-situ* hybridizace s použitím specifických riboprób).

Pacient č.	Intenzita zánětlivého infiltrátu	COX-1 mRNA		COX-2 mRNA		5-LOX mRNA	
		Svalové buňky	Cévy a zánětlivé buňky	Svalové buňky	Cévy a zánětlivé buňky	Svalové buňky	Cévy a zánětlivé buňky
1	+++	0	+++	NA	NA	+++	+
2	+++	0	+++	+++	++++	++++	+++
3	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
4	+++	0	+++	0	+++	++	0
5	++++	0	++++	++	++++	++++	++++
6	+++	0	+++	0	++	+++	+++
7	++++	0	++++	++	++++	+++	+++
8	+++	0	++	++	+++	++	0
9	+++	0	++++	0	++	+	++
10	++++	0	++++	++	++++	++++	++++
11	+++	0	+++	+++	++++	+++	++
Průměr	3,27±0,40	0,18±0,33	3,27±0,53	1,70±1,02	3,30±0,70	2,91±0,68	2,18±1,11
			1,73±1,57		2,50±1,05		2,55±0,99

Tab 2. Expresse COX-1, COX-2, a 5-LOX mRNA v MRI nepostíženě svalové tkáni a v tkáni odebrané po terapii nemocných s IZM (*in-situ* hybridizace s použitím specifických riboprób).

Pacient č.	Intenzita zánětlivého infiltrátu	COX-1 mRNA		COX-2 mRNA		5-LOX mRNA	
		<i>Svalové buňky</i>	<i>Cévy a zánětlivé buňky</i>	<i>Svalové buňky</i>	<i>Cévy a zánětlivé buňky</i>	<i>Svalové buňky</i>	<i>Cévy a zánětlivé buňky</i>
1	++	+	++	++	++	+	+++
2	++	+	+	++	++	++	+
3	++	+	+	+++	+	+++	++
4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
5	+++	0	++	+	+++	++	+++
6	++	+	+++	0	++	+	+++
7	+++	0	+++	++	+++	++	+++
8	++	0	+	0	+	+	+
9	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
10	+++	+	+++	+	+++	+	+++
11	+++	0	++	+	0	++	++
průměr	2,44±0,49	0,56±0,49	2,00±0,67	1,33±0,81	1,89±0,81	1,67±0,59	2,33±0,74
		1,28±0,81		1,61±0,88		2,00±0,67	
Po terapii							
2	++	0	+	++	++	++	0
5	++	0	+	+	0	+	+
průměr	2,00±0,00	0,00±0,00	1,00±0,00	1,50±0,50	1,00±1,00	1,50±0,50	0,50±0,50
		0,50±0,50		1,25±0,75		1,00±0,50	

Poznámka:

Hodnocení exprese: 0 žádná, + mírná, ++ střední, +++ velká, ++++ vysoce pozitivní. NP - nebylo provedeno

Závěr. V této studii byla poprvé detekována exprese mRNA COX-1, COX-2, a 5-LOX na svalových vzorcích u pacientů s DM/PM. Tato exprese byla zvýšena v zánětem postižených svalových tkáních v porovnání s tkáněmi nepostíženými rozlišenými pomocí MRI. Expresse byla rovněž vyšší i v porovnání s tkáněmi odebranými po terapii, což naznačuje roli COX-1,

COX-2, a 5-LOX a jejich produktů v patogenezi onemocnění IZM. Jedním z možných mechanismů jejich účinku je vliv na tvorbu a udržování edému v zánětem změněné svalové tkáni.

KAPITOLA 2

(Příloha 2)

Imunohistologická analýza svalů nemocných s polymyozitidou a dermatomyozitidou.

Exprese vybraných chemokinů, jejich receptorů, a cytokinů v postižených a nepostižených svalech rozeznáných pomocí obrazu magnetické rezonance.

Cíl. Cílem této studie bylo zjistit podíl vybraných imunologicky relevantních mediátorů na patogenezi chronického zánětu u polymyozitidy (PM) a dermatomyozitidy (DM). Pozornost jsme zaměřili především na chemokinový CXC receptor 3 a jeho ligandy IP-10 a MIG. Protože není dobře jasné, které cytokiny vyvolávají zvýšenou expresi HLA molekul I. a II. třídy na svalových buňkách nemocných s IZM, sledovali jsme také produkci IFN- β , který je znám jako mocný induktor exprese HLA I molekul, a má i jiné imunomodulační vlastnosti.

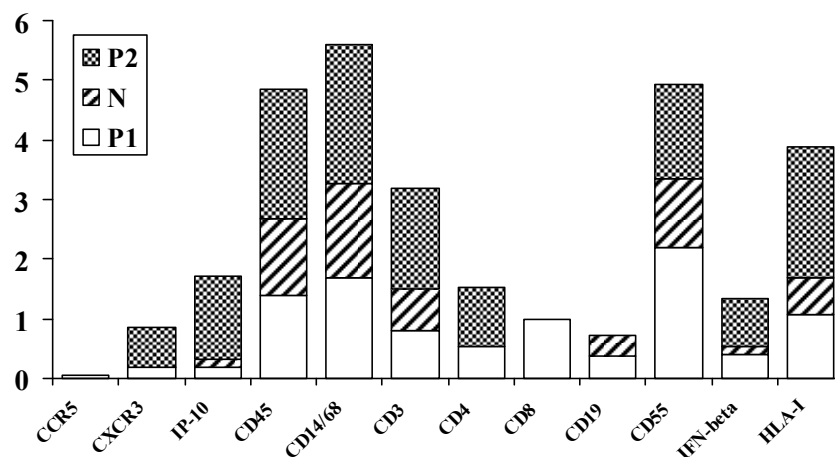
Metody. Bioptickou jehlou byly odebrány vzorky svalové tkáně 18 pacientů s diagnózou IZM z postižených a nepostižených míst stehenních svalů. Lokalizace biopsie byla zjištěna magnetickou rezonancí s potlačením tuku. Imunohistologické barvení bylo zaměřeno především na chemokiny IP-10 a MIG, chemokinový CXC receptor 3, chemokinový CC receptor 5, HLA molekuly I. třídy a na INF- β . Další zkoumané molekuly byly: CCR5 – chemokinový CC receptor 5; CD45 – „leucocyte common antigen“, přítomný na různých buňkách zánětlivého infiltrátu, včetně T a B lymfocytů, NK buněk, monocytů, makrofágů a granulocytů; CD14 – povrchová molekula přítomná na monocytech a makrofázích; CD3, CD4, CD8 – povrchové antigeny T lymfocytů; CD19 – povrchový protein B buněk; CD31 – „platelet endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1), přítomný

především na endoteliálních buňkách; CD55 – „decay accelerating factor“ (DAF), použitý zde k označení fibroblastoidních buněk. Jako kontrolní byly použity irelevantní myší IgG1, IgG2a a IgG2b a řezy byly rovněž inkubovány pouze se sekundární protilátkou. Intenzita infiltrátu a přítomnost jednotlivých molekul byly ohodnoceny semikvantitativně.

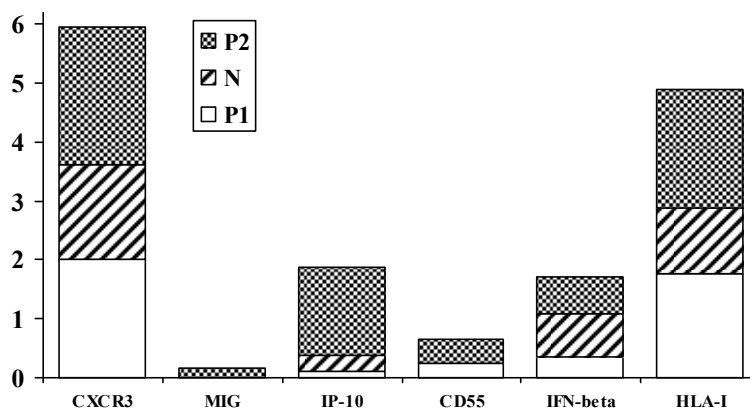
Výsledky. Bylo vyšetřeno 18 nemocných, 10 s DM, 5 s PM a 3 s paraneoplastickou DM. V 9 případech byl získán paralelní vzorek z postižené i nepostižené tkáně. Buněčná infiltrace byla nalezena v obou vzorcích. Rozdíl v intenzitě byl těsně za hranicí statistické významnosti ($2,44 \pm 1,01$ u postižených svalů a $1,89 \pm 0,6$ u svalů nepostižených; $p=0,051$). Expresí CXCR3 byla prokazována ve svalových buňkách; IP-10 a IFN- β především v intersticiu, ale také ve svalových a infiltrujících buňkách, a HLA I. třídy na svalových a endoteliálních buňkách. Nebyly nalezeny statistické rozdíly mezi biopsiemi z postižených a nepostižených lokalizací. (viz grafy)

Grafy. Srovnání průměrné četnosti exprese jednotlivých sledovaných molekul mezi vzorky z postiženého (P1) a nepostiženého (N) svalu a rovněž i ze svalu bioptovaného po intervalu léčby (P2). Uvedeny jsou vždy jen molekuly, které vykazovaly v dané lokalizaci alespoň v jednom vzorku nenulovou expresi.

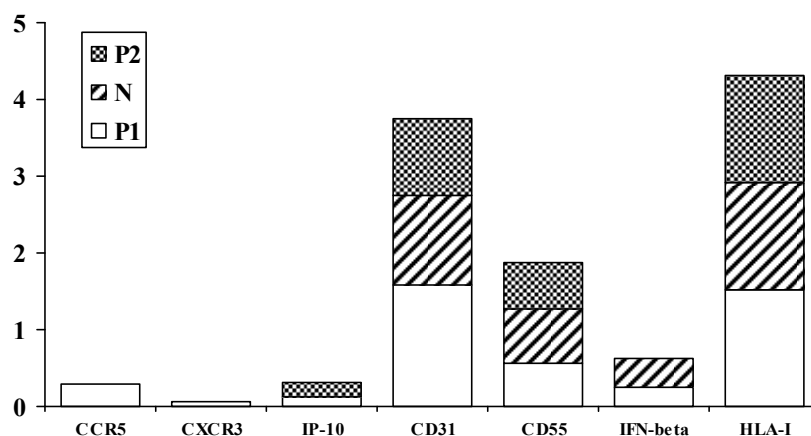
Graf 1. Expresí jednotlivých sledovaných molekul v buňkách infiltrátu.



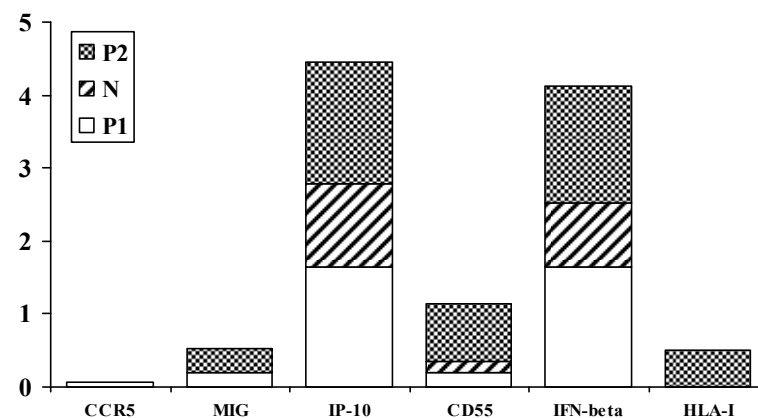
Graf 2. Expze jednotlivých sledovaných molekul ve svalových buňkách.



Graf 3. Expze jednotlivých sledovaných molekul v cévách



Graf 4. Expze jednotlivých sledovaných molekul v intersticiu.



Závěr. Expres systému IP-10 - CXCR3 ve svalových vzorcích svědčí pro významnou účast v patogenezi onemocnění. Současná nepřítomnost CCR5 na infiltrujících buňkách ukazuje na malé zastoupení Th1 buněk a přisuzuje reakci mezi IP-10 a CXCR3 roli spíše v aktivaci svalových buněk, které pak exprimují aktivační molekuly a produkují cytokiny. Častá exprese IFN- β může aktivovat myocyty k hyperexpresi HLA molekul I. třídy.

KAPITOLA 3

(Příloha 3)

Úloha vyšetření MRI při sledování a hodnocení pacientů s polymyozitidou a dermatomyozitidou.

Cíle práce. Hlavním cílem práce bylo zjistit, jakou relevanci má vyšetření MRI a některé další klinické a laboratorních parametry z hlediska jejich podílu na klinické aktivitě onemocnění u pacientů s PM a DM. Hledali jsme souvislost mezi edémem svalové tkáně na MRI a zánětlivým infiltrátem ve svalových vzorcích. A sledovali jsme, zda je pokles počtu zánětlivých buněk ve svalových vzorcích odebraných cílenou biopsií (dle MRI) po terapii asociován se zlepšením nálezu MRI a s poklesem celkové klinické aktivity. Poslední otázkou bylo zda existuje předpovědní hodnota těchto parametrů na počátku sledování pro klinickou aktivitu onemocnění v době kontrolní biopsie po léčbě.

Metodika. Short tau inversion recovery (STIR) MRI byla použita k rozlišení postižené a nepostižené tkáně. MRI byla hodnocena pomocí 10 cm vizuálně analogové škály (VAS) z hlediska intenzity postižení (IMRI), rozsahu postižení (EMRI), celkového postižení (TMRI) dvěma hodnotiteli.

Svalové vzorky byly odebrány pomocí jehlové biopsie pod kontrolou CT z míst MRI rozlišených jako postižených a z míst nepostižených. Intenzita zánětlivého infiltrátu byla hodnocena na HE obarvených vzorcích semikvantitativně pomocí 5 bodové stupnice. S časovým odstupem byla provedena ještě další biopsie v době, kdy došlo ke klinickému zlepšení stavu pacienta. Globální klinická aktivita onemocnění (GA) a svalová aktivita byly hodnoceny semikvantitativně pomocí VAS.

Výsledky. U 29 pacientů s polymyozitidou (PM) a dermatomyozitidou (DM) bylo provedeno vyšetření MRI stehenních svalů, svalová biopsie z MRI

postižených a nepostižených svalů, podrobné klinické a laboratorní vyšetření. Párové vzorky postižených a nepostižených svalů byly získány v 17 případech. V šesti případech bylo možné porovnávat vzorky získané před a po terapii.

Při prvním vyšetření před léčbou byla intenzita obrazu asociována zejména globální klinickou aktivitou (GA) a aktivitou svalovou. Pouze průměrná intenzita MRI (IMRI) signifikantně poklesla u 10 pacientů při srovnání MRI před a po terapii.

Průměrná intenzita infiltrace zánětlivými buňkami u pacientů PM/DM byla $2,5 \pm 0,7$ u MRI-postižených svalů a $1,7 \pm 0,6$ u MRI-nepostižených svalů ($p < 0,001$); u pacientů s DM ($n=12$) to bylo v MRI-postižených svalech $2,5 \pm 0,8$ a $1,8 \pm 0,6$ v MRI-nepostižených tkáních ($p=0,012$); u pacientů s PM ($n=5$) $2,6 \pm 0,6$ MRI-postižené svaly a $1,6 \pm 0,6$ MRI-nepostižené svaly ($p=0,108$).

Průměrná intenzita infiltrace zánětlivými buňkami v MRI-postižených svalech v průběhu prvního vyšetření šesti pacientů, u kterých byla provedena i druhá biopsie po terapii byla $2,2 \pm 0,8$, a nedošlo k signifikantnímu poklesu po terapii ($2,0 \pm 0,9$) přestože u nich bylo dokumentováno zlepšení klinického stavu. (viz tab.)

Závěr. Globální klinický stav a aktivita svalů pacientů hodnocené pomocí VAS nejlépe korelovaly s intenzitou MRI svalů.

Pokud byla biopsie cílená na základě MRI rozlišení postižených a nepostižených svalů, v takto odebraných MRI-postižených vzorcích jsme detekovali signifikantně více zánětlivých buněk než ve vzorcích odebraných z MRI-nepostižených částí.

Intenzita edému na MRI signifikantně poklesla při druhém vyšetření po léčbě, ačkoliv toto zlepšení na MRI nebylo provázeno poklesem počtu zánětlivých buněk ve svalových vzorcích odebraných po léčbě. Tyto výsledky naznačují, že neinvazivní vyšetření MRI by mohlo být lepším

parametrem k hodnocení klinického stavu a účinku léčby u pacientů s PM/DM než histologické hodnocení vzorků svalové tkáně.

Tab. Detailní charakteristika jednotlivých měření.

Pacient č.	1-IMRI	1-EMRI	1-TMRI	2-IMRI	2-EMRI	2-TMRI	1-GA	2-GA	1-VAS-M	2-VAS-M	1-CPK	2-CPK	Histologie MRI- postižený	Histologie MRI- nepostižený	Histologie po terapii
1	9,2	5,1	7,8	2	2,8	1,8	4,9	2,3	2,2	1	42,9	1,27	1	1	1
2	6,8	9,2	6,7	4,2	5,5	4,8	5,1	ND	3	ND	7,9	ND	2	1	ND
3	4,8	1,4	3,9	1	7	0,4	3,2	2	2,9	1,8	31,5	1,03	2	1	2
4	4,1	8,2	4,6	ND	ND	ND	2,2	ND	1,2	ND	0,37	ND	2	ND	ND
5	3	6,6	3	3,5	6,1	3,9	1	1,1	1,5	1,5	0,59	1,09	2	ND	3
6	2,7	3,2	3,3	ND	ND	ND	2,1	ND	1,3	ND	5,73	ND	2	1	ND
7	4,5	5	4	ND	ND	ND	2	ND	2,8	ND	4,07	ND	2	2	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,5	ND	2,5	ND	120	ND	2	ND	ND
9	7,9	5,2	6,5	ND	ND	ND	2,1	ND	2,2	ND	11,44	ND	2	2	ND
10	6	8	6,4	ND	ND	ND	1,7	ND	2,2	ND	23	ND	3	3	ND
11	6,9	7,5	7,9	ND	ND	ND	3	ND	4,2	ND	18,37	ND	1	ND	ND
12	4,4	6,1	5	ND	ND	ND	3	ND	1	ND	4,13	ND	4	2	ND
13	NA	NA	NA	6,4	8,6	6,9	0,2	1,1	1,3	5,5	7,01	0,63	3	2	ND
14	3,9	6,8	4,2	1	2,1	1	3,5	2,4	2,9	1,5	29	0,41	3	2	2
15	2,1	8,1	6,3	ND	ND	ND	2,8	2	1,2	ND	52	0,58	2	1	ND
16	4	5,1	4,5	1,5	4,3	1,7	1,1	0,7	2,1	ND	61,9	0,96	2	ND	1
17	9	8,2	8,9	ND	ND	ND	3,2	ND	3,5	ND	105,27	ND	3	2	ND

18	6,8	7,7	7,3	ND	ND	ND	3		3,1	ND	1,63	ND	2	ND	ND
19	6,5	0,7	1,2	4	0,3	1,1	1,7	1,2	0,9	0,2	0,47	0,29	ND	ND	2
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,5	ND	5,3	ND	97,24	ND	2	ND	ND
21	ND	ND	ND	3	5	2,3	2,6	1,3	5,4	3	7,76	1,78	2	ND	ND
22	3,1	3,1	2,8	4,5	7,1	5,2	2,4	ND	0,1	ND	1,2	ND	2	1	ND
23	4,6	3,7	3,8	ND	ND	ND	2,2	ND	1,6	ND	0,86	ND	ND	ND	ND
24	1,8	3,3	1,5	2,3	4,2	2,2	2,3	1,5	0,7	0,6	0,81	0,39	3	2	ND
25	3,6	4,2	4,2	3,4	3,2	3,2	0,7	0	2,9	2,6	6,66	2,55	3	2	3
26	8,6	8	8,5	ND	ND	ND	1,1	ND	1	ND	15,02	ND	3	ND	ND
27	NA	NA	NA	ND	ND	ND	1,9	ND	2	ND	0,35	ND	3	2	ND
28	5,9	4,5	5,4	ND	ND	ND	2,5	ND	2,1	ND	17,75	ND	1	ND	ND
29	8,4	10	6,5	ND	ND	ND	4,5	ND	3,4	ND	4,32	1,00	3	2	ND

Poznámka:

1-IMRI – intenzita MRI v průběhu prvního vyšetření; 1-EMRI- rozsah postižení MRI v průběhu prvního vyšetření; 1-TMRI – totální MRI v průběhu prvního vyšetření.
2-IMRI – intenzita MRI v průběhu druhého vyšetření; 2-EMRI- rozsah postižení MRI v průběhu druhého vyšetření; 2-TMRI – totální MRI v průběhu druhého vyšetření.
1-GA – globální klinická aktivita v průběhu prvního vyšetření; 2-GA – globální klinická aktivita v průběhu druhého vyšetření.
1-VAS-M - klinická aktivita svalová v průběhu prvního vyšetření; 2-VAS-M - klinická aktivita svalová v průběhu druhého vyšetření.
1-CPK – hladina CK v průběhu prvního vyšetření; 2- CPK – hladina CK v průběhu druhého vyšetření.
Histologie – intenzita zánětlivého infiltrátu ve svalech MRI-postižených, MRI-nepostižených a svalech po terapii
ND – nebylo provedeno; NA - nebylo dostupné k vyšetření v rámci studie

GA a VAS-M a MRI bylo hodnoceno pomocí 10cm VAS, MRI hodnoceno zvlášť pro IMRI, EMRI, TMRI.
Hladina CK byla měřena s použitím komerčního kitu (Boehringer Mannheim, Germany), horní hranice normy 2,84 nkat/l.

Intenzita zánětlivého infiltrátu byla hodnocena na vzorcích barvených hematoxylin-eosinem (H-E) a hodnocena semikvantitativně pomocí 5-bodové stupnice (+ - +++)

KAPITOLA 4

(Příloha 4)

Cyclosporin A versus methotrexát v léčbě polymyozitidy a dermatomyozitidy.

Cíl. Cílem této studie bylo zjistit jaká je účinnost a tolerance léčby cyclosporinem A nebo methotrexátem v kombinaci s kortikosteroidy u pacientů s těžkou aktivní polymyozitidou či dermatomyozitidou.

Metodika: Do této studie bylo zařazeno třicet šest pacientů (20 s DM, 16 s PM). Pacienti byli randomizováni do skupin s methotrexátem MTX (n=17) a Cyclosporinem A (n=19). U všech pacientů byl proveden svalový test-muscle endurance and functional test (MEFT), podrobné klinické vyšetření (CA), hodnocení stavu pacientem (GPA), vyšetření MRI, byla stanovena hladina kreatinkinázy CK, myoglobinu, IL-1Ra a autoprotilátek na počátku studie a v 1., 3. a 6. měsíci léčby.

Výsledky. V obou sledovaných skupinách došlo ke zlepšení sledovaných parametrů (MEFT, CA, GPA i MRI). Pacienti léčení MTX vykazovali statisticky nevýznamně lepší odpověď než pacienti léčení CyA. Hladiny CK ve skupině MTX signifikantně poklesly v 1., 3. and 6. měsíci léčby, ve skupině CyA byl sledován signifikantní pokles pouze v 6. měsíci. Sérové hladiny IL-1Ra signifikantně poklesly ve skupině pacientů léčených CyA již po dvou týdnech, zatímco ve skupině MTX až po 3 měsících. Byla zjištěna korelace mezi jednotlivými klinickými parametry (MEFT, CA and GPA), ale žádný z těchto parametrů nekoreloval s hladinami CK nebo IL-1Ra.

Závěr. Léčba pacientů pomocí methotrexátu nebo cyclosporinu s kortikosteroidy byla v obou případech provázena zlepšením klinických i

laboratorních parametrů. Změny hladin CK a IL-1Ra v této studii nebyly spojeny se zlepšením klinických parametrů nemoci.

SOUHRN ZÁVĚRŮ DIZERTAČNÍ PRÁCE

Dermatomyozitida a polymyozitida jsou závažná onemocnění, jejichž etiologie a patogeneze není dosud objasněna. Jedná se o skupinu onemocnění vyznačující se velkou heterogenitou, která se projevuje odlišnostmi jednak v histopatologickém ale i v klinickém obraze u jednotlivých typů onemocnění. Lepší pochopení patogeneze a identifikace prognostických faktorů jednotlivých typů onemocnění by mohlo umožnit zlepšení diagnostiky, odhadu prognózy a cílenější a úspěšnější terapii.

Přestože se zdá být stanovení diagnózy, pokud jsou jasně splněna diagnostická kritéria, poměrně jednoduché a jednoznačné, klinická zkušenost ukazuje, že odlišení od některých nezápětlivých myopatií může být v některých případech velmi svízelné. Rovněž určení aktivity, rozsahu a prognózy onemocnění není jednoznačnou a zcela dořešenou záležitostí. Všechny v současné době dostupné vyšetřovací metody a postupy se ukazují jako ne zcela vyhovující a odpovídající skutečnému stavu onemocnění. Tyto skutečnosti vedou k hledání stále nových postupů k precizaci diagnózy a k hledání alternativních a přesnějších ukazatelů aktivity procesu.

Náš projekt zabývající se studiem dermatomyozitidy a polymyozitidy byl rozdělen do dvou hlavních částí.

Cílem první části bylo pokusit se zmapovat mechanismy vedoucí k zánětlivé infiltraci svalů, k tkáňovému poškození a následně ke klinickým projevům onemocnění u nemocných s PM a DM. Naší snahou bylo popsat histopatologické procesy a úlohu některých vybraných imunokompetentních molekul v zánětem změněné svalové tkáni.

V druhé části projektu jsme sledovali vliv těchto zánětlivých mechanismů na klinický průběh onemocnění a odpověď na terapii takto nemocných pacientů a zjišťovali relevanci jednotlivých klinických a laboratorních parametrů, zvláště pak obrazu MRI, z hlediska jejich podílu na klinické aktivitě onemocnění u pacientů s PM a DM. A konečně jsme se zajímali, zda existuje

předpovědní hodnota těchto parametrů na počátku sledování pro klinickou aktivitu onemocnění v době kontrolní biopsie po léčbě.

Ve studii sledování exprese cyklooxygenáz-1 a 2 a 5 lipoxygenázy ve svalové tkáni u IZM byla poprvé detekována exprese mRNA pro enzymy COX-1, COX-2 a 5-LOX na svalových vzorcích u pacientů s dermatomyozitidou a polymyozitidou. Tato exprese byla zvýšena v zánětem postižených svalových tkáních v porovnání s tkáněmi nepostíženými rozlišenými pomocí MRI, a zároveň byla vyšší i v porovnání tkáněmi odebranými po terapii, což naznačuje roli COX-1, COX-2, a 5-LOX a jejich produktů v patogenezi zánětu a tvorbě edému ve svalové tkáni u nemocných s DM/PM. Jejich přesný účinek však zůstává nejasný. Prostaglandiny - produkty COX se mohou podílet na formaci edému v zánětem změněné svalové tkáni pomocí regulace cévního tonu.

Některé eikosanoidy se mohou i účastnit procesů ovlivnění buněk imunitního systému pomocí svých chemotaktických účinků nebo stimulace adherence leukocytů na cévní stěnu.

Dalším z možných mechanismů do kterých by mohly COX, LOX a jejich produkty zasahovat, je nepřítomnost programové buněčné smrti - apoptózy, která by odstraňovala buňky zánětlivého infiltrátu. Eikosanoidy zasahují do regulace apoptózy inhibující molekuly Bcl-2. Produkty LOX - leukotrieny LTB₄ a LTD₄ a produkty COX-2 - prostaglandin PGE₂ zvyšují expresi molekuly Bcl-2.

Dále je stále třeba objasnit, co je důvodem zvýšené produkce COX a LOX v zánětlivé tkáni, a co tento zánět udržuje. Hlavní zdrojem eikosanoidů jsou makrofágy v zánětlivém infiltrátu, ale předpokládá se, že k této produkci u IZM přispívají i buňky endoteliální a svalové. Důkazem proto by mohla být i námi pozorovaná diskrepance mezi velikostí zánětlivého infiltrátu a expresí COX-2 mRNA a zvýšenou expresí 5-LOX mRNA na svalových buňkách MRI rozlišených postižených svalů. Nicméně tento rozdíl může být způsoben i různou intenzitou exprese COX mRNA a produkcí příslušného proteinu spojenou s vyšším zastoupením makrofágů v zánětlivém infiltrátu.

V další studii jsme pomocí histochemického zobrazení vybraných imunologicky relevantních zánětlivých mediátorů a povrchových molekul (cytokinů, chemokinů a jejich receptorů) prokázali, že svalové vzorky pacientů s DM a PM zvýšeně exprimují CXC chemokin IP-10 a jeho příslušný receptor CXCR3. Přítomnost systému IP-10 - CXCR3 ve svalových tkáních svědčí pro jeho významnou účast v patogenezi onemocnění. Vzhledem k současné nepřítomnosti CCR5 na infiltrujících buňkách, která ukazuje na malé zastoupení Th1 buněk, přisuzujeme reakci mezi IP-10 a CXCR3 roli spíše v aktivaci svalových buněk a rýsuje se tak především jejich role, která spíše než v přímé chemotaxi pravděpodobně spočívá v potenciální stimulaci a aktivaci buněk svalových. Tyto svalové buňky zvýšeně exprimují molekuly HLA I. třídy. Tato hyperexprese může být vyvolána např. i IFN- β , jehož značná pozitivita v různých lokalizacích ve většině odebraných vzorků byla určitým překvapením. Zdá se, že jak buňky infiltrátu, tak svalové buňky a v menší míře i endotelie, jsou schopny produkovat IFN- β . IFN- β byl prokázán ve většině vzorků, ale četnost jeho exprese nebyla významně rozdílná mezi jednotlivými biopsiemi z hlediska lokalizace či časové posloupnosti. Častá exprese by mohla naznačovat jednu z etiologických možností vzniku myozitid a být tak odrazem snahy imunitního systému zlikvidovat potenciálního virového etiologického činitele. Nicméně, produkce IFN- β byla v poslední době asociována také s jeho tvorbou v buňkách imunitního systému a po stimulaci různými rozpustnými mediátory, jako jsou IL-1, TNF- α či IL-2.

Druhá část našeho projektu se věnovala spíše klinickým projevům svalového zánětu a jeho terapii.

Vzhledem ke stále ne zcela vyhovujícím diagnostickým metodám a i metodám používaným k hodnocení klinického stavu a průběhu choroby u pacientů s IZM, jsme se pokusili vyhodnotit přínos vyšetření pacientů metodou MRI ve snaze nalézt metodu lépe zobrazující a popisující stav pacientů.

Přestože má vyšetření svalů pomocí MRI řadu výhod, jde o neinvazivní, časově poměrně nenáročné vyšetření, které může být snadno opakováno. Stále se vyšetření MRI při vyšetřování pacientů s IZM dosud využívá spíše jako pomocné a doplňující vyšetření, většinou pouze k diagnostickým účelům před cílenou svalovou biopsií k upřesnění místa odběru, vzhledem k heterogenitě a okrskovosti zánětem postižené tkáně.

Hlavním cílem naší práce bylo zjistit, jakou relevanci má vyšetření MRI a některé další klinické a laboratorní parametry z hlediska jejich podílu na klinické aktivitě a prognóze onemocnění, což by umožnilo větší využívání této metody v klinické praxi u pacientů s PM a DM.

V rámci naší studie jsme zjistili, že globální klinický stav a aktivita svalů pacientů hodnocené pomocí VAS nejlépe korelovaly s intenzitou MRI svalů. Pokud byla provedena biopsie cílená na základě MRI rozlišení postižených a nepostižených svalů detekovali jsme v takto odebraných MRI-postižených vzorcích signifikantně více zánětlivých buněk než ve vzorcích odebraných z MRI-nepostižených částí. Intenzita edému na MRI signifikantně poklesla při druhém vyšetření po léčbě, ačkoliv toto zlepšení na MRI nebylo provázeno poklesem počtu zánětlivých buněk ve svalových vzorcích odebraných po léčbě. Tyto výsledky naznačují, že neinvazivní vyšetření MRI by mohlo být užitečným a lepším parametrem k hodnocení klinického stavu a účinku léčby u pacientů s PM/DM než histologické hodnocení vzorků svalové tkáně.

V terapii IZM je stále k dispozici poměrně málo přístupů, které by měly podklad v kontrolovaných studiích. Příčinou je malá frekvence těchto nemocí a nedostatek nástrojů k objektivnímu a srovnatelnému hodnocení léčby.

Cílem naší terapeutické studie bylo zjistit, jaká je účinnost a tolerance léčby cyclosporinem A nebo methotrexátem v kombinaci s kortikosteroidy u pacientů s těžkou, aktivní polymyozitidou či dermatomyozitidou.

V této studii jsme hodnotili jaký je účinek methotrexátu (MTX), nebo cyklosporinu A (CyA) přidaných k léčbě kortikosteroidy u pacientů s těžkou

aktivní polymyozitidou a dermatomyozitidou. Léčba pacientů pomocí methotrexátu nebo cyclosporinu A s kortikosteroidy byla v obou případech provázena zlepšením klinických i laboratorních parametrů. Naše výsledky prokázaly, že oba léčebné postupy byly v terapii PM/DM účinné, a že nebyl mezi oběma léky signifikantní rozdíl v jejich účinku.

Změny hladin CK a IL-1Ra v této studii nebyly spojeny se zlepšením klinických parametrů nemoci. Pacienti léčení MTX vykazovali statisticky nevýznamně lepší odpověď v některých parametrech, jako byl pokles CK, než pacienti léčení CyA, což naznačuje, že MTX by mohl být lepším lékem pro léčbu PM/DM než CyA.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1:

Tomasová Studýnková J, Kuchen S, Jeisy E, Schedel J, Charvát F, Jarošová K, Sprott H, Matucci-Cerinic M, Gay RE, Michel BA, Pavelka K, Vencovský J and Gay S. The expression of cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in inflammatory muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis. Clin Exp Rheumatol 2004;22(4):395-402.

Příloha 2:

Tomasová Studýnková J, Niederlová J, Jarošová K, Charvát F, Lacman J, Cimburek Z, Vencovský J. Imunohistologická analýza svalů nemocných s polymyozitidou a dermatomyozitidou. Expres chemokinů, jejich receptorů a cytokinů v postižených a nepostižených svalech rozeznávaných pomocí magnetické rezonance. Rheumatologia 2002;3:107-16.

Příloha 3:

Vencovský J., Jarošová K., S. Macháček, Studýnková J, Kafková J., Bartůňková J., Němcová D., Charvát F.. Cyclosporin A versus methotrexate in the treatment of polymyositis and dermatomyositis. Scand J Rheumatol 2000;29:95-10.

Příloha 4:

Tomasová Studýnková J, Charvát F, Jarošová K, Vencovský J. The role of MRI in the assessment of polymyositis and dermatomyositis. V recenzním řízení časopisu Rheumatology.

PŘÍLOHY