

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Imunopatogenetické mechanismy u myasthenia gravis a vliv
thymektomie**

Thymectomy and immune mechanisms in patients with myasthenia gravis

MUDr. Michala Jakubíková

Praha 2016

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.

Školící pracoviště: Neurologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Školitel: prof. MUDr. Soňa Nevšímalová, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT.....	6
KLÍČOVÁ SLOVA	7
1. ÚVOD	8
1.1. Definice MG.....	8
1.2. Imunopatogeneze myasthenia gravis.....	8
1.2.1. Thymus a MG	8
1.2.2. Autoprotilátky	8
1.2.3. Imunopatogenetická klasifikace MG	9
1.2.4. Účast jednotlivých subpopulací lymfocytů na imunopatogenezi MG	9
1.3. Klinická symptomatika MG	10
1.4. Diagnostika MG a hodnocení neurologického nálezu	10
1.5. Terapie myasthenia gravis.....	11
1.5.1. Farmakoterapie myasthenia gravis.....	11
1.5.2. Chirurgická terapie myasthenia gravis – thymektomie.....	11
2. CÍLE PRÁCE	12
3. ZÁKLADNÍ HYPOTÉZY	12
4. PACIENTI A METODY.....	13
4.1. Soubor thymektomovaných pacientů	13
4.2. Rozdělení pacientů do skupin dle přítomnosti thymomu a dle předoperační terapie	13
4.3. Laboratorní metody	14
4.4. Statistické metody	14
4.5. Posuzování klinického stavu	14
4.6. Kazuistika pacienta s generalizovanou formou MG s koexistencí dalších autoimunitních onemocnění	14
5. VÝSLEDKY	16
5.1. Klinická charakteristika a neurologické výsledky pacientů po thymektomii ve skupinách nonthymomatózní MG a thymomatózní MG	16
5.1.1. Klinické charakteristiky sledované populace.....	16

5.1.2. Neurologické výsledky	17
5.2. Longitudinální sledování vývoje lymfocytárních subpopulací, specifických protilátek a intracelulárních cytokinů v periferní krvi u definovaných skupin pacientů s generalizovanou MG po thymektomii	20
5.2.1. Treg (CD4+CD25+).....	20
5.2.2. Celkový absolutní počet lymfocytů	21
5.2.3. CD4 lymfocyty.....	21
5.2.4. CD8 lymfocyty.....	21
5.2.5. CD19 lymfocyty.....	21
5.2.6. Protilátky proti acetylcholinovým receptorům (antiAChR).....	22
5.2.7. Cytokiny TNF- α , IL-17, IFN- γ	22
5.2.8. Výskyt protilátek ScMAb u thymomatózních pacientů	22
5.3. Objasnění společného mechanismu imunopatogeneze čtyř autoimunitních chorob (myasthenia gravis, Castlemanova nemoc, pemphigus vulgaris a antifosfolipidový syndrom) u jednoho pacienta.....	22
6. DISKUZE	24
6.1. Diskuze cíle č. 1	24
6.2. Diskuze cíle č. 2	25
6.3. Diskuze cíle č. 3	26
7. ZÁVĚR.....	27
8. CITOVANÁ LITERATURA	28
SOUHRN PRACÍ AUTORKY	32

ABSTRAKT

Úvod: Myasthenia gravis (MG) je autoimunitní onemocnění, v jehož důsledku dochází k poruše nervosvalového přenosu a u kterého je thymus považován za patogenní orgán. Dřívější představy o tom, že MG je pouze receptorová nemoc, jsou již překonány. Dochází k imunopatologickým změnám jak v oblasti cílových struktur [specifických receptorů pro acetylcholin (AChR), svalově specifickou tyrosinkinázu (MuSK) a nízkodenzitnímu lipoproteinu 4 (Lrp4)], thymu, ale i periferních lymfoidních orgánů. Prvotní poznatky o poruše humorální imunity s rozhodující rolí patologických autoprotilátek byly korigovány nálezem imunitní dysregulace na úrovni T lymfocytů. Podle dnešních znalostí se při rozvoji a udržování MG účastní autoimunitního zánětu téměř všechny typy buněk s imunitní funkcí: pomocné CD4+ T lymfocyty, cytotoxické CD8+ T lymfocyty, regulační CD4+CD25+ T lymfocyty, Th17 lymfocyty, B lymfocyty i plazmatické buňky. Dominující roli v imunopatologických dějích má u mladších pacientů thymus, u nemocných starších se uplatňují i extrathymické mechanismy. V důsledku toho, thymektomie (TE) je všeobecně přijímaná jako součást léčby u MG. Dosud ale neexistují nepochybná data ověřená prospektivní kontrolovanou studií, která by prokazovala efekt této léčebné alternativy. Rovněž není jasný přesný mechanismus, kterým TE zmírňuje příznaky MG. Thymom je považován za špatný prognostický faktor MG, protože sebou většinou nese těžší průběh MG nebo snížení schopnosti reagovat na léčbu. Každopádně stále zůstávají otázky v mnoha oblastech, pokud jde o terapeutickou roli TE u nonthymomatózní MG.

Cíle práce: 1. definovat a komparativně zhodnotit skupiny nonthymomatózních a thymomatózních pacientů léčených TE v letech 2010-2013 s cílem nalézt klinické ukazatele budoucí odpovědávosti na tuto léčbu; 2. longitudinálně sledovat vývoj lymfocytárních subpopulací, specifických protilátek a produkci intracelulárních cytokinů v periferní krvi u myastenických pacientů před a po TE se současným vyhodnocováním jejich kvantitativního myastenického skóre (QMGS) a postintervenčního statu; 3. objasnit společný imunopatogenetický mechanismus několika autoimunitních chorob u jednoho pacienta, následného klinického průběhu těchto onemocnění a manažmentu jejich léčby;

Pacienti a metody : Vyhodnocovali jsme neurologické výsledky po TE u pacientů s thymomem a bez thymomu a následného vlivu TE s nebo bez souběžné imunoterapie na různé lymfocytární subpopulace T a B lymfocytů se zaměřením na CD4+CD25+ regulační T buňky v definovaných časových intervalech (před TE; 1 měsíc, 6 měsíců, 12 měsíců a 24 měsíců po TE) u sledovaných skupin pacientů : A) pacientů s generalizovanou nonthymomatózní MG léčených pyridostigminem (bez imunosupresivní léčby); B) pacientů s generalizovanou nonthymomatózní MG léčených kortikosteroidy; C) pacientů s generalizovanou nonthymomatózní MG léčených kombinovanou imunosupresí (kortikosteroidy a azathioprin); D) pacientů s generalizovanou MG s histologicky prokázaným thymomem a léčených kombinovanou imunosupresí (kortikosteroidy a azathioprin).

Výsledky : Celkem bylo zahrnuto 62 pacientů s generalizovanou MG, kteří podstoupili TE. Thymom byl histologicky potvrzen u 16 pacientů. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v dosažení kompletní stabilní remise (KSR) 24 měsíců po TE (24% nonthymomatózních a 25% thymomatózních pacientů) nebo počtu relapsů ($p = 0,843$) mezi thymomatózní a nonthymomatózní skupinou během pooperačního sledování, a rovněž jsme mezi nimi nepozorovali významný rozdíl v poklesu QMGS po operaci ($p = 0,757$). Zjistili jsme, že doba trvání generalizované MG před operací u nonthymomatózních pacientů neovlivňuje terapeutický efekt operace ($p = 0,64$).

TE u pacientů užívajících souběžně nějakou formu imunoterapie byla spojena se statisticky významně zvýšeným procentuálním podílem CD4+CD25+ Treg lymfocytů ($p < 0.001$) a sníženou autoreaktivitou T buněk (pokles CD4+, $p = 0.038$; nárůst CD8+, $p = 0.009$). Dokázali jsme, že předoperační terapie kortikosteroidy je dobrým prediktivním ukazatelem pozitivního efektu thymektomie [největší pokles QMGS a % podílu CD4+, největší vzestup % podílu Treg a CD8+ a vysoký podíl pacientů (38%), kteří

dosáhli statu KSR v rámci nonthymomatózní skupiny]. Nonthymomatózní skupina, která podstoupila TE a byla léčená jenom pyridostigminem bez doprovodné imunoterapie nevykazovala žádné významné zvýšení Treg buněk nebo jakékoliv jiné statisticky významné změny v dalších subpopulacích lymfocytů (CD4+, CD8+, CD19), jakož i jejich postintervenční status po 24 měsících sledování byl nejhorší ze všech sledovaných skupin MG pacientů. Potvrdili jsme hypotézu, že seronegativní pacienti profitují z TE stejně jako seropositivní, jejich terapeutické výstupy a laboratorní parametry jsou ve všech sledovaných obdobích podobné ($p = 0,368$) a že výskyt antistriatálních protilátek v krvi je indikátorem přítomnosti thymomu ($p < 0.001$). Prokázali jsme, že čtyři klinicky heterogenní jednotky na autoimunitním podkladě (MG, Castlemanova nemoc, pemphigus vulgaris, antifosfolipidový syndrom) mají společné imunopatogenetické pozadí tkvící v molekule interleukínu 6, co nám umožnilo hledat společnou a strategicky cílenou terapii.

Závěr: Thymomatózní a nonthymomatózní skupina profituje z thymektomie stejně. Přesný mechanismus, kterým TE zmírňuje příznaky myasthenia gravis není přesně znám. Byly zjištěny zvýšené hladiny cirkulujících CD4+CD25+ regulačních T buněk u klinicky stabilních MG thymektomovaných pacientů užívajících buď kortikosteroidy nebo kombinovanou imunosupresivní léčbu. Na základě těchto výsledků samotná TE bez konkomitantní imunoterapie není dostačující pro zvýšení počtu cirkulujících CD4+CD25+ regulačních T buněk a k nastolení kompletní stabilní remise.

ABSTRACT

Myasthenia Gravis (MG) is an autoimmune disease affecting neuromuscular transmission, in which the thymus is considered pathogenic organ. Earlier ideas suggesting that MG is only the receptors disease have been proven wrong. There are immunopathological changes in both target structures [specific receptors for acetylcholine (AChR) muscle-specific tyrosine kinase (MuSK) and low-density lipoprotein 4 (Lrp4)], the thymus, as well as in peripheral lymphoid organs. Initial findings of the humoral immunity defect with the decisive role of the pathologic autoantibodies, were corrected with findings of the immune dysregulation at the level of T lymphocytes. According to today's knowledge, the development and maintenance of MG involves almost all cell types of immune function in the autoimmune inflammation: helper CD4+ T lymphocytes, cytotoxic CD8+ T lymphocytes, regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes, Th17 lymphocytes, B lymphocytes and plasma cells. Thymus plays a dominant immunopathogenetic role in younger patients with MG, while extrathymic mechanisms are applied in older patients. As a result of that, the thymectomy (TE) is generally accepted as part of treatment for MG. However, there is still no data verified by a prospective controlled study, which would demonstrate a useful result of this treatment alternative. Furthermore, the mechanism by which the TE relieves the symptoms of MG is not exactly clear. Thymoma is considered a bad prognostic factor of MG because it generally carries more severe development of MG or it decreases the ability to respond to the treatment. In any case, there are still many questions regarding the therapeutic role of TE in non-thymomatous MG. Objectives of this work: 1. to define and comparatively evaluate the groups of non-thymomatous and thymomatous patients receiving TE in years 2010-2013 in order to find indicators of future clinical responsiveness to this treatment; 2. longitudinally monitor the development of lymphocyte subpopulations, specific antibodies and the production of intracellular cytokines in peripheral blood in myasthenic patients before and after TE with simultaneous evaluation of their quantitative myasthenic score (QMGS) and post-intervention status; 3. to elucidate a common immunopathogenic mechanism of several autoimmune diseases in one patient, the subsequent clinical course of these diseases, as well as the management of treatment;

Patients and methods: We evaluated neurological outcomes after TE of patients with thymoma and without thymoma and the consequent impact of TE with or without concomitant immunotherapy on

different lymphocyte subpopulations of T and B lymphocytes with the focus on CD4+CD25+ regulatory T cells at defined time intervals (before TE; 1 month, 6 months, 12 months and 24 months after TE) in the studied groups of patients: A) patients with generalized non-thymomatous MG treated with pyridostigmine (without immunosuppressive therapy); B) patients with generalized non-thymomatous MG treated with corticosteroids; C) in patients with generalized non-thymomatous MG treated with combined immunosuppression (corticosteroids and azathioprine); D) patients with generalized MG with histologically confirmed thymoma, treated with combined immunosuppression (corticosteroids and azathioprine).

Results: We have included 62 patients with generalized MG who underwent TE. Thymoma was histologically confirmed in 16 patients. There were no significant differences in achieving complete stable remission (KSR) 24 months after TE (24% non-thymomatous and 25% thymomatous patients) or the number of relapse ($p = 0.843$) between thymomatous and non-thymomatous group during postoperative follow-up, and we also observed there is no significant difference in decrease in QMGs after surgery ($p = 0.757$). We have found out that the duration of generalized MG preoperatively in non-thymomatous patient does not affect the therapeutic effect of the surgery ($p = 0.64$). TE in patients receiving concurrently some form of immunotherapy was associated with a statistically significant higher percentage of CD4+CD25+ Treg cells ($p < 0.001$) and reduced self-reactivity of T cells (decrease in CD4+, $p = 0.038$; increase in CD8+, $p = 0.009$). We demonstrated that preoperative corticosteroid therapy is a good predictive indicator of the positive effect of thymectomy [the biggest decrease in QMGs and percentage of CD4+, the largest increase in percentage of Tregs and CD8+, and a high proportion of patients (38%), which reached the KSR status within non-thymomatous group]. Non-thymomatous group that underwent TE and was treated only with pyridostigmine and without immunotherapy, showed no significant increase of Treg cells or any statistically significant changes in other subpopulations of lymphocytes (CD4+, CD8+, CD19) and besides that, their post-intervention status after 24 month observation was the worst of all monitored groups of MG patients. We confirmed the hypothesis that seronegative patients benefit from the TE as well as seropositive patients, their therapeutic outcomes and laboratory parameters are all similar in the observed periods ($p = 0.368$), and that anti-striatal antibodies in the blood are an indicator of the presence of thymoma ($p < 0.001$). We have demonstrated that four clinically heterogeneous units on the autoimmune basis (MG, Castleman's disease, pemphigus vulgaris, antiphospholipid syndrome) have a common immunopathogenic background inherent in the molecule interleukin-6, that allowed us to search for common and strategically targeted therapy.

Conclusion: Thymomatous and non-thymomatous group profit equally from thymectomy. The exact mechanism by which TE relieves symptoms of MG is not exactly known. Increased levels of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells has been found in clinically stable thymectomized MG patients using corticosteroids or combined immunosuppressive therapy. Based on these results, alone TE without concomitant immunotherapy is not sufficient enough to increase the number of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells and the establishment of stable complete remission.

KLÍČOVÁ SLOVA

Myasthenia gravis, thymektomie, thymom, regulační CD4+CD25+ T lymfocyty, kortikosteroidy, pyridostigmin, kombinovaná imunopresivní léčba, QMG skóre, kompletní stabilní remise

1. ÚVOD

1.1. Definice MG

Myasthenia gravis (MG) je onemocnění nervosvalového přenosu, charakterizované kolísavou slabostí a unavitelností příčně pruhovaných svalů (očních, bulbárních, pletencových, šíjových a dýchacích) bez poruchy reflexů a citlivosti nebo dalších neurologických funkcí.

MG je autoimunitní onemocnění, kde několik typů autoprotilátek pod vlivem buněčných imunitních mechanismů interferuje se strukturami nervosvalového spojení, které mohou vést k poruše jeho funkce (Berrih-Aknin a Le Panse, 2014). Na imunopatogenezi MG se předpokládá účast imunitního orgánu thymu, který je zřejmě za autoagresi přímo odpovědný. U myastheniků je časté zvětšení až přímo nádorové postižení tohoto orgánu. V 10-15% případů je MG asociována s thymomem. Tento nálezný výsledek není podmínkou vzniku choroby.

1.2. Imunopatogeneze myasthenia gravis

1.2.1. Thymus a MG

Histopatologické změny thymu týkající se MG lze v principu rozdělit do tří kategorií : 1) folikulární hyperplazie thymu (65-75% případů); 2) tuková atrofie (involuce) thymu (10-20% případů); 3) thymom (asi 10% případů). Zásadní je odlišovat mezi nonthymomatózní (bez přítomnosti nádoru thymu – thymomu) a thymomatózní (paraneoplastickou) formou MG.

a) Nonthymomatózní autoimunitní forma MG

U mladších pacientů s protilátkami proti acetylcholinovému receptoru (AChR), dochází v thymu k indukci exprese AChR, která následuje po jeho uvolnění z thymických myoidních buněk. Myoidní buňky jsou u MG zdrojem antigenních epitopů, které jsou v kontextu s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) II.třídy rozpoznávány T buněčnými receptory autoreaktivních CD4+ T lymfocytů jako cizorodé. V součinnosti se zánětlivými cytokiny dochází k aktivaci dalších autoreaktivních T lymfocytů, ale i B lymfocytů, které se vymknou kontrole T regulujících lymfocytů. To způsobí jak v thymu, tak i na periférii stimulaci specifických B lymfocytů, které produkují protilátky proti AChR. Morfologickým důsledkem je tvorba germinativních center na rozhraní dřene a kůry brzlíku s tzv.folikulární hyperplazií (Marx et al., 1997).

b) Thymomatózní paraneoplastická forma MG

Nádory brzlíku - thymomy, vznikají z epiteliální komponenty thymu s převahou epiteliální nebo lymfoidní složky. Jsou buď benigní, ohraničené nebo maligní – pak jde o invazivní thymomy. Asi 10-15% pacientů má MG asociovanou s thymomem (MGAT) (Špalek, 2009), 1/3 z nich tvoří maligní thymomy s invazivním růstem. Imunopatogeneze MGAT je heterogenní, uplatňují se jak centrální imunitní mechanismy (thymus, thymom), tak periferní extrathymické mechanismy.

Pro thymomy je typická výrazná morfologická variabilita, dělí se dle doporučení Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) do 5 skupin: typ A (medulární), AB (smíšený), B1 či B2 (kortikální), B3 (dobře diferencovaný thymický karcinóm) (Suster a Moran, 2006).

1.2.2. Autoprotilátky

Patologické autoprotilátky jsou v cca 80% případů namířené proti nikotinovému AChR na postsynaptické membráně nervosvalové ploténky (**AChR+ MG**) nebo v 5-10% proti svalově specifické tyrozin-kináze

(MuSK, **MuSK+ MG**). V roce 2011 byly u japonských myasteniků objeveny nové autoprotilátky proti receptoru, který je spojený s nízko denzitním lipoproteinem (low-density lipoprotein 4; **Lrp4**), následně byly referovány i v Německu a USA (Motomura a Narita Masuda, 2013). Existují i tzv. **séronegativní formy** onemocnění, kde běžně dostupnými metodami neprokážeme v séru žádné známé protilátky asociované s MG. U této formy se velmi pravděpodobně jedná o velmi nízké titry výše uvedených cirkulujících autoprotilátek (tzv. nízkoafinitní protilátky), které nejsou detekovatelné dostupnými metodami. U většiny pacientů s nálezem thymomu se nacházejí **protilátky antistriální (ScMAb)**, které způsobují postižení svalových vláken s mikroskopickým nálezem lymforhagií.

1.2.3. Imunopatogenetická klasifikace MG

V současné době se rozlišuje 6 samostatných typů MG, které se odlišují imunopatogeneticky (autoprotilátky; patologie thymu), klinickými charakteristikami a rozdílnou reakcí na léčbu (Špalek, 2009; Meriggioli a Sanders, 2009).

- a) Séropozitivní MG (SPMG) s časnou manifestací
- b) SPMG s pozdní manifestací
- c) MG asociována s thymomem (MGAT)
- d) SNMG s protilátkami proti MuSK
- e) SNMG s protilátkami proti Lrp4
- f) Séronegativní MG (SNMG)

1.2.4. Účast jednotlivých subpopulací lymfocytů na imunopatogenezi MG

1.2.4.1. T lymfocyty – buněčná odpověď specifické imunity

AChR-reaktivní CD4+ T buněčné klony, které se nacházejí v thymu a periferní krvi, hrají důležitou roli v patogenezi MG tím, že pomáhají B lymfocytům produkovat anti-AChR protilátky (Lindstrom et al., 1988; Harcourt et al., 1988). AChR-specifické CD4+ T buňky jsou přítomny v krvi pacientů s MG, ale jsou obzvláště bohaté na brzlíku, což podporuje myšlenku, že k autosenzibilizaci T buněk dochází v thymu (Melms et al., 1988). Thymektomie a specifická terapie monoklonálními protilátkami proti CD4+ T lymfocytům zlepšuje klinické příznaky u tohoto modelu, což dokazuje, že CD4+ T buňky mohou být zapojeny v iniciaci humorální autoimunitní odpovědi u MG (Ahlberg et al., 1994).

Z hlediska periferních mechanismů autotolerance je velmi důležitou skupinou CD4+ T-lymfocytů subpopulace regulačních buněk, které jsou charakterizovány molekulami CD4, CD25 a Foxp3 (forkhead box P3, transkripční faktor). CD4+CD25+ (T regulační lymfocyty, Treg) mají nejdůležitější roli v udržování autotolerance a potlačení rozvoje autoimunity (Beissert et al., 2006).

Aricha et al. pozorovali, že se v periferní krvi u myastenických potkanů nachází významně nižší počet Treg v porovnání se zdravými kontrolami a že Treg buňky od zdravých dárců mohou suprimovat EAMG u hlodavců (Aricha et al., 2005). Rovněž Treg buňky od myastenických potkanů jsou méně účinné než Treg buňky od zdravých kontrol (Gertel et al., 2013). Pacienti s MG mají funkční deficit thymických Treg buněk (Balandina et al., 2005) Množství Treg buněk dle některých autorů dramaticky narůstá po thymektomii a koreluje se zlepšením klinických příznaků (Sun et al., 2004). Také kortikoidy vedou k zlepšení funkční aktivity Treg buněk.

T lymfocyty, které exprimují na svém povrchu molekulu CD8 a antigen rozpoznávají v kontextu molekul MHC I. třídy, představují tzv. cytotoxické CD8+ T lymfocyty. Jejich role v imunopatogenezi MG není zcela jasná. Mají spíše regulující funkci. CD8+ T buněčná deplece zvyšuje vnímavost myši k EAMG (Zhang et al., 1996). Lisak et al ukázali, že deplece CD8+ T buněk z krevních mononukleárních

buněk u pacientů s MG vedla ke zvýšené produkci autoprotilátek, což znamená, že autologní CD8+ T buňky vykazují určitou regulační kontrolu nad anti-AChR CD4+ T buňkami u MG (Lisak et al., 1983).

1.2.4.2. B lymfocyty a plazmatické buňky – humorální odpověď specifické imunity

Základními markery B-lymfocytů jsou molekuly CD19 a CD20 (Abbas a Lichtman, 2005). Zvýšený počet B buněk se nalézá v thymu u folikulární hyperplasie při SPMG s časným začátkem a to hlavně u žen (Berrih-Aknin et al., 2013). Kromě toho, u pacientů s MG se prokázaly důkazy o klonální expanzi B lymfocytů ve srovnání s kontrolami (Vrolix et al., 2014).

1.2.4.3. Cytokiny IL-17, IFN- γ , TNF- α a IL-6

Interleukin 17 je tvořen paměťovými aktivovanými CD4+ T lymfocyty a pravděpodobně patří k časným iniciátorům zánětlivých reakcí závislých na T buňkách. Ukazuje se, že rovnováha mezi T pomocnými buňkami (Th1, Th2, Th17 a Treg) je při rozvoji EAMG narušena tím, že dochází ke kolísání hladiny IL-17, která při progresi onemocnění stoupá (Mu et al., 2009). Chronický zánět přítomný v thymech pacientů s MG, který zahrnuje řadu cytokinů, jako je TNF- α , IL-17 a IFN- γ zřetelně přispívá ke snížení počtu Treg buněk a dysregulaci jejich imunosupresivní aktivity. V mechanismu této chronické imunitní aktivace hrají výše popisované cytokiny ústřední roli (Berrih-Aknin a Le Panse, 2014).

Sekrece IL-6 je odpovědí na sekreci TNF- α a IL-1. Je produktem aktivovaných T lymfocytů, pro B lymfocyty je hlavním růstovým faktorem v závěrečných fázích jejich diferenciaci. Některé studie ukázaly, že IL-6 se podílí na rozvoji MG (Cohen-Kaminski et al., 1993, Endo et al., 2005), což je v souladu s jeho činností jako promotoru B buněčné diferenciaci a proliferace, a následné indukci tvorby plazmatických buněk a protilátek (Takatsu, 1997).

1.3. Klinická symptomatika MG

Anamnéza a klinický obraz zahrnuje slabost a unavitelnost příčně pruhovaného svalstva rozličné a často měnlivé lokalizace. Typická je proměnlivost a kolísání v čase. Fluktuace je závislá na denním rytmu, fyzické zátěži, stresu, většinou se zvýrazní v odpoledních a večerních hodinách, ale může se objevit i ráno. Začátek nemoci bývá nenápadný, plíživý, často demaskován infekční chorobou. Rozvoj onemocnění až do myasthenické krize, kdy selhávají svaly bránice a pomocné respirační svaly, vede k nutnosti umělé plicní ventilace (UPV) s řadou následných život ohrožujících komplikací. Kolem 20% nemocných trpí fokální formou, nejčastěji tzv. okulární myastenii (Meriggioli a Sanders, 2009) se slabostí extraokulárních svalů s projevy ptózy a/nebo diplopie. Pokud nedojde ke generalizaci do dvou let, lze mluvit o čistě oční formě myastenie (OMG). V případě progresu svalové slabosti na další svalové skupiny (mimo extraokulárních svalů) již mluvíme o generalizované formě MG.

1.4. Diagnostika MG a hodnocení neurologického nálezu

Vzhledem ke klinické heterogenitě a většímu množství alterovaných svalů v různé míře postižených byla klinická klasifikace obtížná. Proto bylo vypracováno podle Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA, Americká nadace pro MG) kvantifikované myasthenické skóre (QMGS) k hodnocení neurologického nálezu u pacientů s MG (Jaretzki et al., 2000). První klasifikace MG dle Ossermana z roku 1958 (Osserman et al., 1958) byla postupně upravována a v roce 2000 vypracovala MGFA další škály. Klasifikace dle MGFA je vytvořena na podkladě postižení očních svalů a ostatních svalových skupin s vyjádřením stupně jejich oslabení (Jaretzki et al., 2000).

Potvrzení diagnózy spočívá v provedení elektrodiagnostických testů [repetitivní stimulace motorického nervu (RSMN), single-fiber elektromyografie (SF EMG)], vyšetření autoprotilátek (proti AChR, proti MuSK) v akreditované laboratoři. U jisté diagnózy MG je nutné provést CT mediastina k vyloučení thymomu.

1.5. Terapie myasthenia gravis

1.5.1. Farmakoterapie myasthenia gravis

Inhibitory cholinesterázy : Symptomatickou terapií, inhibitory acetylcholinesterázy (IACHe), modulujeme nervosvalový přenos reverzibilní inhibicí acetylcholinesterázy (AChE), která hydrolyzuje acetylcholine (ACh) na nervosvalové ploténce. To vede k prolongaci aktivity ACh v synaptické šterbině a ke zvýšenému množství acetylcholinu.

Kortikosteroidy: Jedná se o perorální imunomodulační léčbu prednisonem, prednisolonem nebo metylprednisolonem. Pozitivní efekt má minimálně u 70% pacientů, kdy lze dosáhnout většinou v kombinaci s IACHe klinické remise. Zlepšení nastává během prvních 6-8 týdnů léčby. Významným problémem dlouhodobé léčby je steroidní myopatie, která je závislá na kumulativní dávce.

Imunosupresiva: Azathioprin je velmi vhodným imunosupresivem zejména v případě potřeby dlouhodobější medikamentózní léčby, umožňující snížení dávek kortikosteroidů kvůli komplementárnímu efektu obou typů medikamentů (Palace et al., 1998). Mykofenolát mofetil (MMF) potlačuje produkci protilátek a buněčnou imunitu a to zvýšením lymfocytární apoptózy, redukcí sekrece TNF- α a zvýšením exprese IL-10. Cca 5-8 % pacientů je refrakterních na konvenční terapeutické postupy. U těchto nemocných dochází k trvalé prezentaci klinických příznaků a častým myastenickým krizím. V těchto případech je zkoušena terapie cyclosporinem A, tacrolimem (FK506), nověji experimentální biologickou léčbou (rituximab, eculizumab) nebo imunoabsorbci. V krajních případech je možné použít vysokodávkovanou imunoablaci s podporou kmenových buněk (Drachman et al., 2008) anebo allogení transplantaci kostní dřeně (Strober et al., 2009).

IVIG nebo PF jsou doporučeny v těžkých případech MG k navození klinické remise nebo přípravě k thymektomii.

1.5.2. Chirurgická terapie myasthenia gravis – thymektomie

Chirurgická léčba MG spočívá v odstranění thymu – thymektomii (TE) nebo jeho nádoru – exstirpaci thymomu. Přístup je buď klasický z parciální nebo totální sternotomie nebo miniinvazivní – thorakoskopický. Nález thymomu je indikací k TE vždy po stabilizaci myastenické symptomatiky, pokud není závažná interní kontraindikace. U pacientů bez thymomu, s nonthymomatózní autoimunitní formou MG, se do 60. roku věku doporučuje provést TE jako postup zvyšující pravděpodobnost navození remise nebo zlepšení klinického stavu (Pit'ha et al., 2012). TE není indikována u okulární formy MG a generalizované MG s protilátkami proti MuSK.

2. CÍLE PRÁCE

1. podrobně definovat skupinu pacientů s myasthenia gravis, kteří byli v Centru pro diagnostiku a léčbu myasthenia gravis Neurologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze operačně léčeni thymektomií v letech 2010-2013 a komparativně zhodnotit skupiny nonthymomatózních a thymomatózních pacientů s cílem nalézt klinické ukazatele budoucí odpovědávosti na tuto léčbu

2. longitudinálně sledovat vývoj jednotlivých lymfocytárních subpopulací, specifických protilátek a produkci intracelulárních cytokinů v periferní krvi u čtyř skupin myastenických pacientů před a po thymektomii (1 měsíc, 6 měsíců a 12 měsíců) se současným vyhodnocováním jejich QMGS v těchto časových intervalech a následně i MGFA postintervenčního statu 24 měsíců po thymektomii :

A) pacientů s generalizovanou nonthymomatózní MG léčených pyridostigminem (bez imunosupresivní léčby)

B) pacientů s generalizovanou nonthymomatózní MG léčených kortikosteroidy

C) pacientů s generalizovanou nonthymomatózní MG léčených kombinovanou imunosupresí (kortikosteroidy a azathioprin)

D) pacientů s generalizovanou MG s histologicky prokázaným thymomem a léčených kombinovanou imunosupresí (kortikosteroidy a azathioprin)

3. pokusit se objasnit společný imunopatogenetický mechanismus zcela raritního postupného výskytu několika autoimunitních chorob (myasthenia gravis, Castlemanova nemoc, pemphigus vulgaris a antifosfolipidový syndrom) u jednoho pacienta, následného klinického průběhu těchto onemocnění a manažmentu jejich léčby

K hodnocení těchto cílů bylo použito komparativní a longitudinální studie.

3. ZÁKLADNÍ HYPOTÉZY

Hypotézy u cíle č. 1 :

A. Pacienti s thymomem mají horší pooperační průběh myastenických příznaků po thymektomii než pacienti bez thymomu.

B. Předoperační terapie kortikosteroidy je dobrým prediktivním ukazatelem pozitivního efektu thymektomie.

C. Doba trvání generalizované myasthenia gravis před operací u nonthymomatózních pacientů výrazně ovlivňuje terapeutický efekt operace.

D. Seropozitivní a seronegativní pacienti profitují z thymektomie stejně.

Hypotézy u cíle č. 2 :

E. Po thymektomii u nonthymomatózních pacientů léčených současně nějakou formou imunoterapie (imunomodulační nebo imunosupresivní léčby) stoupá množství Treg buněk, které souvisí se zlepšením myastenických příznaků.

F. Po thymektomii a současně probíhající imunoterapii dochází ke snížené autoreaktivitě T-buněk.

G. Výskyt protilátek ScMAb v krvi je indikátorem přítomnosti thymomu.

Hypotézy u cíle č. 3 :

H. Čtyři klinicky heterogenní jednotky na autoimunitním podkladě (myasthenia gravis, Castlemanova nemoc, pemphigus vulgaris, antifosfolipidový syndrom) mají společné imunopatogenetické pozadí, které umožňuje hledat společnou a strategicky cílenou terapii.

4. PACIENTI A METODY

4.1. Soubor thymektomovaných pacientů

Projekt trval 4 roky a celkem bylo zařazeno 62 pacientů s generalizovanou MG, kteří podstoupili transsternální thymektomii. Jednalo se o pacienty dispenzarizované v Centru pro diagnostiku a léčbu myasthenia gravis 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Všichni měli jasné klinické a elektrofyzilogické důkazy o MG. Nejednalo se jenom o seropozitivní pacienty, do souboru sledovaných pacientů byli zařazeni i tzv. dvojitě seronegativní pacienti s negativitou protilátek jak proti AChR, tak proti MuSK. Histopatologické vyšetření vzorků thymu bylo provedeno u všech operovaných pacientů. Thymomy byly histologicky klasifikovány podle WHO jako typ A (dřeňové), AB (smíšené), B1 nebo B2 (kortikální), B3 (dobře diferencovaný thymický karcinóm). Pacienti s nálezem pokročilého stadia thymomu podstoupili adjuvantní radiační terapii. Kritéria pro zařazení do souboru byly následující: (1) nástup generalizované MG během posledních 7 let; (2) věk od 17 do 60 roků pro nonthymomatózní pacienty MG (bez omezení pro thymomatózní pacienty s MG); (3) pacienti s generalizovanou formou MG stupně II-IV dle klasifikace MGFA. Kritéria pro vyloučení ze souboru sledovaných pacientů byly (1) izolovaná oční forma MG bez projevů celkové slabosti (stupeň I dle klasifikace MGFA); (2) klinický stupeň třídy V (vyžadující intubaci); (3) těhotenství nebo kojení; (4) pozitivní protilátky anti-MuSK. Kontrolní soubor pacientů byl určen ke srovnání předoperačních hladin T regulačních lymfocytů. Pozůstával ze zdravých a věkově příbuzných subjektů bez přítomnosti autoimunitního onemocnění a bez užívání jakékoliv imunomodulační nebo imunosupresivní terapie. Informovaný souhlas s výzkumným projektem byl schválen Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a byl podepsán všemi zúčastněnými pacienty.

4.2. Rozdělení pacientů do skupin dle přítomnosti thymomu a dle předoperační terapie

Thymektomovaní pacienti byli rozděleni do dvou hlavních skupin, a to buď pacienti s generalizovanou nonthymomatózní autoimunitní MG nebo pacienti s generalizovanou thymomatózní paraneoplastickou MG. U pacientů s thymomem byla předoperačně zahájená terapie kombinovanou imunosupresí – tj. kombinací kortikoidů a azathioprinu, proto se tato skupina posuzovala jako jeden celek; *skupina Thymoma (n=16)*. Předoperační terapie nonthymomatózních pacientů s histopatologickým průkazem folikulární hyperplazie nebo atrofie thymu se výrazně lišila, proto byli rozděleni do tří podskupin: (a) léčení jenom inhibitory AChE (pyridostigminem), bez imunosupresivní nebo imunomodulační terapie; *skupina NonThymoma 0, n=12* (b) léčení kortikoidy; *skupina NonThymoma KS, n=13* (c) léčení kombinovanou imunosupresí, tj. kortikoidy a azathioprinem; *skupina NonThymoma KS+AZA, n=21*. Všichni pacienti zařazení do skupiny *NonThymoma KS* a do skupiny *NonThymoma KS+AZA* užívali medikaci více než 6 měsíců před tím, než podstoupili thymektomii a dávky kortikoidů u těchto dvou skupin na začátku terapie byly přibližně stejné.

4.3. Laboratorní metody

Analýza lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů byla provedena pomocí průtokové cytometrie, analýza protilátek proti acetylcholinovým receptorům pomocí radioreceptorové analýzy (RRA) a antistriatálních protilátek nepřímou imunofluorescencí (NIF).

4.4. Statistické metody

K modelování vývoje jednotlivých lymfocytárních subpopulací, autoprotilátek a intracelulárních cytokinů byl použit lineární smíšený model s náhodným efektem pacienta. Testování významnosti pevných efektů se provedlo pomocí testu poměrem věrohodností (likelihood ratio test). U proměnných s více rovinami (např. 4 skupiny pacientů nebo období PRE/1M/6M/12M) sa k nalezení úrovní se statisticky významnými rozdíly použila metoda mnohonásobného srovnávání.

Při zkoumání vztahů mezi jednotlivými charakteristikami pacientů byly použity dvouvýběrové t-testy, Fisherův exaktní test o nezávislosti v kontingenčních tabulkách a univariální lineární smíšené modely. Testy byly vždy provedené na hladině 0,05. Statistická analýza byla provedená v software R (R Core Team (2014), R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

4.5. Posuzování klinického stavu

Každý ze sledovaných pacientů, který podstoupil thymektomii, byl v daných časových intervalech (před TE, 1 měsíc, 6 měsíců, 12 měsíců a 24 měsíců po TE) objektivně neurologicky vyšetřen specialistou z myastenického centra. V těchto časových intervalech se při posuzování klinického stavu pacienta měřilo QMGS a 24 měsíců po TE byl současně vyhodnocován jejich MGFA postintervenční status. Kompletní stabilní remise (KSR) byla definována tak, že pacient neměl žádné subjektivní potíže ani symptomy MG alespoň jeden rok a současně nedostával žádnou terapii (inhibitory AChE, kortikosteroidy, imunosupresiva) alespoň jeden rok. Status “zlepšení” v projektu znamenal pokles 5 a více bodů v QMGS. Status “zhoršení” byl definován jako vzestup 5 a více bodů v QMGS. Status “žádná změna” v projektu znamenal, že u pacienta nedošlo k markantním změnám v klinickém stavu a QMGS po sledování zůstalo stejné.

4.6. Kazuistika pacienta s generalizovanou formou MG s koexistencí dalších autoimunitních onemocnění

U 35 letého pacienta s negativní rodinnou i osobní anamnézou postupně vznikla kolísající, následně trvalá diplopie, ptóza na pravém oku, slabost a zvýšená unavitelnost horních končetin, posléze dysartrie a dysfagie. Šest měsíců před vznikem neurologických obtíží se u pacienta začaly objevovat nápadné kožní a slizniční eroze charakteru mukozitidy až lichenoidního zánětu (na jazyku, bukání sliznici, glans penis). Pro progredující neurologickou symptomatologii byl hospitalizován na neurologickém oddělení a objektivně neurologicky mu byl diagnostikován generalizovaný myastenický syndrom stupně IIIb dle MGFA. Všechny výsledky pomocných vyšetřovacích metod svědčily pro diagnózu seropozitivní MG. CT mediastina neprokazovalo přítomnost thymomu, magnetická resonance (MRI) mozku byla normální. Terapeuticky byl zaznamenán efekt neostigminu. Vzhledem k neurčitým bolestem v podbříšku a palpačně hmatné tuhé rezistenci pacient podstoupil CT břicha, kde byl překvapivě popsán objemný solidní tumorózní útvar na rozhraní mezogastria a hypogastria, velikosti 12x7x10cm. Chirurgická intervence břišního tumoru byla odložena až po stabilizaci neurologického stavu. Vzhledem k potřebě vyloučení jiné malignity event. i metastatického postižení bylo provedeno vyšetření celotělovou pozitronovou emisní tomografií (PET), kde nebyla nalezena žádná jiná metastatická ložiska. Byla

nasazena léčba inhibitory AChE (pyridostigmin v dávce 4x 60mg), imunosupresivy (azathioprin 100mg/den) a kortikosteroidy (které byly postupně navyšovány do cílové dávky 60 mg/denně). Ke stabilizaci myastenické symptomatiky došlo po 4 měsících léčby a následně byla provedena transsternální thymektomie s disekcí předního mediastinálního tuku a současně explorativní laparotomie s pokusem o odstranění břišního tumoru s peroperační biopsií. Břišní tumor se nedařilo vyreparovat od ilických žil, byl pevně fixován do retroperitonea, vlastní tumor byl velmi cévnatý a nebylo možné ho chirurgicky odstranit. Histologicky byla z thymu prokázána folikulární hyperplazie, thymom nebyl nalezen. Vzorokly z retroperitonea byly popsány jako solitární forma smíšeného typu Castlemanovy nemoci. Protilátky proti human immunodeficiency viru (HIV-1 a HIV-2) byly negativní.

Nové komplikace nastaly 18 měsíců od stanovení diagnózy generalizované MG, kdy akutně vznikla pravostranná hemiparéza. Na MRI mozku byla nalezena ischemie v oblasti capsula interna vlevo.

Bylo provedeno komplexní cévní vyšetření včetně trombofilních mutací a byly nalezeny pozitivní protilátky proti kardioplipinům IgG a IgM a současně pozitivita proti „single strand” DNA (anti ssDNA++), test na „double strand” DNA (ds DNA) byl negativní. U nemocného bylo klinicky i laboratorně potvrzeno podezření na antifosfolipidový syndrom a zahájená antikoagulační léčba nízkomolekulárním heparinem v terapeutické dávce. Rozsáhlé mukokutánní léze v koexistenci s hypervaskulárním tumorem retroperitonea byly diagnostikovány jako paraneoplastický pemphigus. Vzhledem k výše uvedné komorbiditě a suspektní souvislosti s B buněčnou patologií, byla po konzultaci s hematologym zahájená biologická terapie rituximabem (Mabthera) v iniciální dávce 375mg/m². Rituximab byl celkem podán 8-krát v pulzech 700 mg na 1 dávku. Došlo k další recidivě ischemické cévní mozkové příhody a to 1 měsíc po ukončení biologické terapie. U pacienta perzistoval těžký neurologický deficit s globální afázií a těžkou pravostrannou hemiparézou se spasticitou. Léčba kortikosteroidy a imunosupresivy pomohla ke kontrole příznaků MG, nepodařilo se ale zlepšit symptomy Castlemanovy nemoci a pemphigus vulgaris. Pacient zemřel na těžkou sepsi s multiorgánovým selháním ve věku 37 let.

5. VÝSLEDKY

5.1. Klinická charakteristika a neurologické výsledky pacientů po thymektomii ve skupinách nonthymomatózní MG a thymomatózní MG

5.1.1. Klinické charakteristiky sledované populace

Tab. 1 Klinické charakteristiky 62 pacientů s MG, kteří podstoupili thymektomii

	NONTHYMOMA	THYMOMA	
N	46 (74%)	16 (26%)	
ŽENY n (%)	34 (74%)	7 (43,7%)	
TRVÁNÍ NEMOCI PŘED THYMEKTOMIÍ (průměr a rozsah v měsících) ^{a)}	17 (3-84)	8 (4-20)	
VĚK V DOBĚ THYMEKTOMIE (průměr a rozsah v letech)	34,2(17-60)	55(22-72)	
ACHR POZITIVNÍ PROTILÁTKOVÝ STATUS	36 (78%)	16 (100%)	
Klasifikace MG dle MGFA před thymektomií	II a(%)	16 (34.7%)	6 (37.5%)
	II b(%)	11 (24%)	6 (37.5%)
	III a(%)	4 (8.6%)	0 (0%)
	III b(%)	14 (30%)	4 (25%)
	IV a(%)	0 (0%)	0 (0%)
	IV b(%)	1 (2%)	0 (0%)
KORTIKOSTEROIDY	34 (74%)	16 (100%)	
AZATHIOPRIN	21 (46%)	16 (100%)	
JEN PYRIDOSTIGMÍN	12 (26%)	0 (0%)	
POČET RELAPSU od 6.měsíce do 24.měsíce sledování	10 (21.7%)	3 (18.7%)	
PROGRESE INVALIDITY (na základě QMGS) od 6.měsíce do 24.měsíce sledování	5 (10.8%)	1 (6.25%)	
ASOCIOVANÉ AUTOIMUNITNÍ NEMOCI	12 ^{b)} (26%)	2 ^{c)} (12.5%)	
KOMPLIKACE SPOJENÉ S THYMEKTOMIÍ	1 ^{d)} (2.1%)	1 ^{e)} (6.25%)	

- a) od generalizace MG do thymektomie
- b) 7 pacientů s autoimunitním onemocněním štítné žlázy, 1 pacient s asthma bronchiale, 1 pacient s roztroušenou sklerózou, 1 pacient s vaskulitidou, 1 pacient s revmatoidní artritidou, 1 pacient s ankylozující spondylitidou HLA-B27+
- c) 1 pacient s ulcerózní kolitidou, 1 pacient s autoimunitním onemocněním štítné žlázy
- d) 1 pacient s postoperační infekcí v ráně
- e) 1 pacient s postoperačním hemoperikardem

5.1.2. Neurologické výsledky

Zlepšení celkového QMG skóre bylo zaznamenáno u 89% pacientů s nonthymomatózní MG a u 94% pacientů s thymomatózní MG a to 1 rok po TE.

V našem souboru po TE jsme našli signifikantní vliv některých proměnných na změny neurologického stavu po operaci. Muži měli nižší QMGs po 1 roce sledování (-2,48, interval spolehlivosti [CI = -3,97, -0,99], $p = 0,001$) než ženy. Terapeutický výsledek měřen na základě QMGs po 1 roce sledování u nonthymomatózních pacientů byl nejlepší u pacientů léčených kortikosteroidy. Jejich QMGs se snížilo o 2,27 bodu ($p = 0,015$) ve srovnání s nonthymomatózními pacienty léčenými kombinovanou imunosupresí, u kterých se průměrná hodnota snížila o 2,22 bodů ($p = 0,044$). Terapeutický výsledek u pacientů s thymomem byl 1 rok po TE významně lepší o 1,75 bodu ($p = 0,005$). I když rozdíly v QMGs mezi jednotlivými sledovanými skupinami jsou minimální, můžeme konstatovat, že u těchto tří sledovaných skupin (*NonThymoma KS*, *NonThymoma KS+AZA*, *Thymoma*) došlo k statisticky signifikantnímu poklesu QMGs. U skupiny léčené jenom inhibitory AChE, nebyl popsán statisticky signifikantní pokles v QMGs po 1 roce sledování.

Kompletní stabilní remise (KSR) bylo dosaženo 24 měsíců po TE u 24% nonthymomatózních a 25% thymomatózních pacientů (Tab. 2). Míra relapsů byla v nonthymomatózní skupině 21,7% ve srovnání s 18,7% v thymomatózní skupině. Nebyl žádný významný rozdíl v počtu relapsů mezi těmito dvěma skupinami ($p = 0,843$) a rovněž jsme mezi nimi nepozorovali významný rozdíl v poklesu QMGs po operaci ($p = 0,757$). Dosažení stavu „kompletní stabilní remise“ anebo stavu „zlepšení“ bylo velmi podobné u obou skupin (Tab. 2), z čeho pro nás vyplývá, že TE u těchto dvou skupin má podobný účinek po 2 letech sledování klinického stavu pacientů od operace. Proto můžeme tvrdit, že **hypotéza A u cíle č.1, že „Pacienti s thymomem mají horší pooperační průběh myastenických příznaků po thymektomii než pacienti bez thymomu“ se nepotvrdila.**

Při bližším zkoumání nonthymomatózní skupiny jsme dospěli k závěru, že KSR bylo dosaženo 2 roky po sledování u 38% pacientů, kteří dostávali kortikosteroidy a u 24% pacientů, kteří dostávali kombinovanou imunosupresivní terapii. Pouze 8% nonthymomatózních pacientů po thymektomii léčených jenom pyridostigminem dosáhlo stavu KSR. Zlepšení myastenického stavu bylo zaznamenáno u 48% nonthymomatózních pacientů po 2 letech TE obecně, nejlepší výsledky byly získány ve skupině léčené kombinovanou imunosupresivní léčbou (57%) a poté ve skupině léčené kortikosteroidy (46%; Tab. 2). Míra relapsů byla 21,7% a pouze 5 pacientů mělo progresi invalidity s vyšším QMGs (více než 5 bodů), takže jejich stav byl hodnocen jako „zhoršení“ a 3 z nich patřili ke skupině léčených pyridostigminem (Tab. 2).

Hypotéza B u cíle č. 1 se potvrdila, protože předoperační terapie kortikosteroidy je dobrým prediktivním ukazatelem pozitivního efektu thymektomie (největší pokles v QMGs po 1 roce sledování, vysoký podíl pacientů, kteří dosáhli stavu KSR).

Zjistili jsme, že mezi předoperačním trváním onemocnění MG u nonthymomatózních pacientů a odpovědí na TE (terapeutický výsledek byl měřen dle QMGs, $p = 0,64$) není žádný významný vztah. Rovněž ani u pacientů s relapsy nebo progresí QMGs po TE, jsme nepozorovali významný vztah mezi

předoperačním trváním onemocnění a počtem relapsů ($p = 0,177$), nebo progresí QMGS ($p = 0,243$). Proto můžeme tvrdit, že **hypotéza C u cíle č. 1, že „Doba trvání generalizované myasthenia gravis před operací u nonthymomatózních pacientů výrazně ovlivňuje terapeutický efekt operace“ se nepotvrdila.**

Většina pacientů z nonthymomatózní skupiny bylo séropozitivních (76%), 10 pacientů bylo dvojitě séronegativních (anti-ACHR -, anti-MUSK -). Všichni thymomatózní pacienti byli séropozitivní. Když jsme porovnávali nonthymomatózní séropozitivní a séronegativní skupinu, pozorovali jsme, že séronegativní pacienti byli většinou muži ($p = 0,001$) a měli kratší trvání nemoci (průměrně 10 měsíců, $p = 0,04$). Tyto dvě skupiny nevykazovaly rozdíly v jiných kritériích, a jejich reakce na TE byly velmi podobné ($p = 0,368$, Tab. 2). Proto můžeme tvrdit, že **hypotéza D u cíle č. 1, že „Séropozitivní a séronegativní pacienti profitují z thymektomie stejně“ se potvrdila.**

Tab. 2 Neurologické výsledky 24 měsíců po TE v jednotlivých sledovaných skupinách

	NONTHYMOMA				THYMOMA		
	Terapie před provedením TE			AChR protilátkový status			
všichni (n=46)	JENOM PYRIDOSTIGMIN (n=12)	PYRIDOSTIGMIN+ KS (n=13)	PYRIDOSTIGMIN +KS+AZA (n=21)	séropozitivní (n=36)	séronegativní (n=10)	všichni séropozitivní (n=16)	
Kompletní stabilní remise	11 (24%)	1 (8%)	5 (38%)	5 (24%)	8 (22%)	3 (30%)	4 (25%)
Zlepšení	22 (48%)	4 (33%)	6 (46%)	12 (57%)	17 (47%)	5 (50%)	7 (44%)
Beze změny	8 (17%)	4 (33%)	2 (15%)	2 (9%)	7 (20%)	1 (10%)	4 (25%)
Zhoršení	5 (11%)	3 (25%)	0	2 (9%)	4 (11%)	1 (10%)	1 (6%)

5.2. Longitudinální sledování vývoje lymfocytárních subpopulací, specifických protilátek a intracelulárních cytokinů v periferní krvi u definovaných skupin pacientů s generalizovanou MG po thymektomii

5.2.1. Treg (CD4+CD25+)

Zkoumali jsme dynamické změny CD4+CD25+ T buněk z periferní krve u thymomatózních a nonthymomatózních pacientů s MG před a po thymektomii.

Předoperační průměrné hodnoty v % CD4+CD25+ T buněk se významně nelišily mezi všemi sledovanými pacienty s MG a zdravých kontrolami ($p > 0,05$) a rovněž se významně nelišily mezi pacienty s thymomem a bez thymomu ($p=0,361$). Také jsme nepozorovali významné rozdíly, pokud jde o věk ($p = 0,887$) nebo pohlaví sledovaných pacientů ($p=0,316$). Nebyl žádný vztah mezi dobou trvání onemocnění MG a hladinou CD4+CD25+ T buněk v % ($p = 0,177$).

Během prvního roku po operaci, došlo k výraznému zvýšení podílu buněk Treg (2,72%, $p < 0,001$) u nonthymomatózních pacientů léčených kortikosteroidy a výraznému nárůstu (1,75%, $p = 0,008$) u pacientů léčených kombinovanou imunosupresivní terapií. **První část hypotézy E u cíle č. 2 o vzrůstu procentuálního podílu Treg buněk mezi lymfocyty u nonthymomatózních pacientů s konkomitantní imunoterapií rok po thymektomii se potvrdila.**

Žádná významná změna nebyla pozorována u pacientů, kteří dostávali pouze pyridostigmin. U thymomatózní skupiny bylo pozorováno významné zvýšení Treg buněk (2,9%, $p < 0,001$) při porovnání % hladin Treg před operací a 1 rok po ní. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v % Treg buněk mezi skupinou nonthymomatózních séropozitivních a séronegativních pacientů nebo mezi skupinou nonthymomatózních a thymomatózních MG pacientů .

5.2.1.1. Vztah QMGS a Treg buněk u nonthymomatózních pacientů

Prokázali jsme, že v čase po operaci signifikantně stoupají Treg buňky u nonthymomatózních pacientů léčených nějakou formou imunoterapie a zlepšují se myastenické příznaky (klesá QMGS). Otázkou je, jak spolu souvisí hodnoty Treg buněk a QMG skóre, když předpokládáme, že se stoupající hodnotou Treg buněk bude klesat QMGS. Tuto druhou část hypotézy D u cíle č. 2 jsme se snažili ověřit ve čtyřech různých variantách.

Vypočetli jsme průměrnou hodnotu Treg a průměrnou hodnotu QMGS u každého nonthymomatózního pacienta léčeného nějakou formou imunoterapie ze všech časových období. Tím jsme získali nezávislá data a vztah mezi QMGS a Treg jsme modelovali pomocí univariálního lineárního modelu s QMGS jako závislou proměnnou. Odhad parametru modelu, který vyjadřuje sklon závislosti mezi QMGS a Treg a za hypotézy klesajícího QMGS s rostoucím Treg má být záporný a statisticky významný. V našem případě je ale kladný a není statisticky významný. Předpokládali jsme, že vyšší podíl Treg buněk bude spojen s nižším QMGS a to hlavně u nonthymomatózních pacientů léčených nějakou formou imunoterapie (skupina *NonThymoma KS* a skupina *NonThymoma KS+AZA*). Nicméně, přímý vztah mezi těmito proměnnými nebyl potvrzen ($p = 0,289$). I když jsme vzali do úvahy všechny thymektomované pacienty s MG (nonthymomatózní a thymomatózní), tak se nám rovněž

nepovedlo tento přímý vztah prokázat a výsledky byly velmi podobné ($p = 0,265$). Z toho vyplývá, že **druhá část hypotézy E u cíle č.2 se nepotvrdila a to, že sice po thymektomii u nonthymomatózních pacientů léčených současně nějakou formou imunoterapie stoupá množství Treg buněk, ale dle našich zjištění to přímo nesouvisí se zlepšením myastenických příznaků.**

5.2.2. Celkový absolutní počet lymfocytů

Počet lymfocytů statisticky významně klesá v období před operací a 1 rok po ní u všech sledovaných skupin pacientů, kromě skupiny nonthymomatózních pacientů léčených pyridostigminem. U pacientů bez thymomu léčených kortikosteroidy došlo k významnému poklesu celkového počtu lymfocytů 1 rok po operaci o 1,18 ($p=0,006$) ve srovnání s předoperačními absolutními hodnotami lymfocytů. U nonthymomatózních pacientů léčených kombinovanou IS došlo k signifikantnímu poklesu 6 měsíců po operaci o 0,57 ($p=0,001$). A u pacientů s thymomem jsme pozorovali rovněž signifikantní pokles absolutní hodnoty počtu lymfocytů 1 rok po operaci o 1,43 ($p<0,001$).

5.2.3. CD4 lymfocyty

Procentuální zastoupení buněk CD4+ mezi lymfocyty klesá ve skupině léčené kortikosteroidy a to v 6.měsíci po thymektomii, kde vykazuje signifikantní pokles o 6,12% oproti předoperačním hodnotám ($p=0,038$). V jiných časových obdobích a skupinách jsme nezaznamenali signifikantní výsledky.

5.2.4. CD8 lymfocyty

Procentuální zastoupení buněk CD8 mezi lymfocyty vykazuje signifikantní nárůst po provedení thymektomie. Konkrétně, u nonthymomatózních pacientů léčených kortikoidy došlo 6 měsíců po operaci k signifikantnímu nárůstu o 4,015% ($p=0,04$), u pacientů léčených kombinovanou IS terapií došlo rok po operaci k nárůstu o 3,84% ($p=0,009$) a u pacientů léčených jenom pyridostigminem nedošlo k žádným signifikantním změnám v % podíle CD8 lymfocytů. U thymomatózních pacientů byl zaznamenán signifikantní nárůst o 8,05% CD8 buněk v období před operací a 1 rok po ní ($p=0,001$).

Hypotéza F u cíle č.2, že po thymektomii a současně probíhající imunoterapii dochází ke snížené autoreaktivitě T-buněk se potvrdila, což je v souladu s poklesem CD4 + buněk a nárůstem CD8+ buněk.

5.2.5. CD19 lymfocyty

Procentuální zastoupení buněk CD19 po operaci významně klesá. Během prvního roku po operaci byl zaznamenán statisticky významný pokles (o 4,26%) CD19 buněk u nonthymomatózních pacientů léčených kortikosteroidy ($p = 0,011$), ale u pacientů léčených kombinovanou IS terapií nebo čistě pyridostigminem nedošlo k žádným signifikantním změnám v % podíle CD19 buněk. U thymomatózních pacientů byl zaznamenán signifikantní pokles o 4,39% CD19 buněk v období před operací a 1rok po ní ($p<0,001$).

5.2.6. Protilátky proti acetylcholinovým receptorům (antiAChR)

Množství protilátek se v čase od provedení TE významně nemění a nejsou patrné statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami pacientů s MG. Vedlejším nálezem jsou výrazné výkyvy v průměrných hodnotách těchto autoprotilátek.

5.2.7. Cytokiny TNF- α , IL-17, IFN- γ

V hladině těchto cytokinů nedochází k významnějším změnám ani v jedné ze sledovaných skupin v daných časových intervalech po thymektomii.

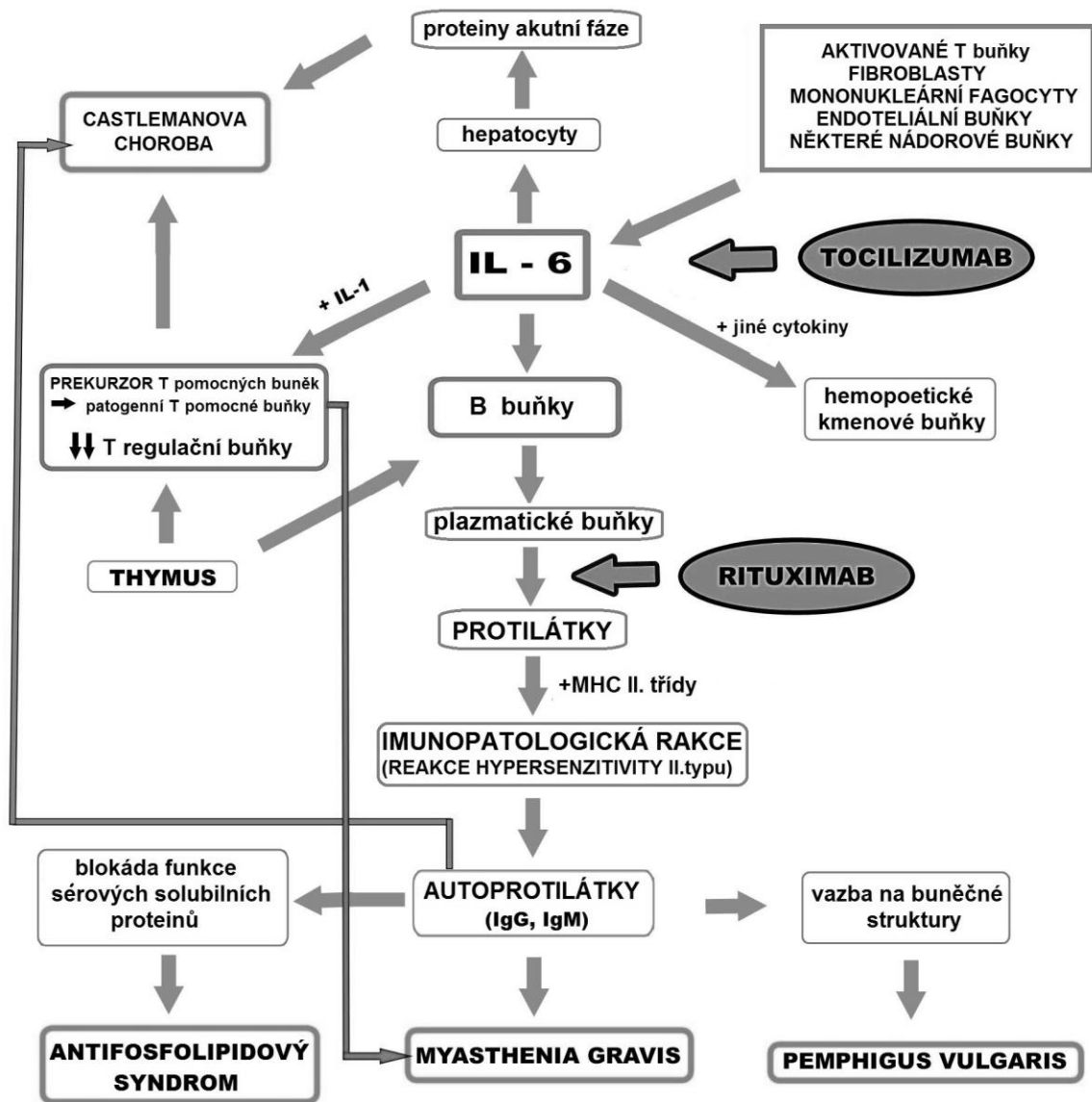
5.2.8. Výskyt protilátek ScMAb u thymomatózních pacientů

Stanovenou hypotézu F, že „Výskyt protilátek ScMAb v krvi je indikátorem přítomnosti thymomu.“ jsme testovali pomocí Fisherova exaktního testu o nezávislosti v kontingenční tabulce mezi proměnnou *thymoma* (kategorická proměnná s kategoriemi 0 = nemá thymom a 1 = má thymom) a proměnnou *ScMAb* (kategorická proměnná s kategoriemi negat. a pozit.). Tento test zamítnul nulovou hypotézu o nezávislosti těchto proměnných s p-hodnotou < 0,001 a tedy **můžeme tvrdit, že výskyt ScMAb a přítomnost thymomu spolu souvisí a hypotéza G u cíle č. 2 je správná.** Z hodnot v kontingenční tabulce je zřejmé, že mezi thymomatózními pacienty převažují subjekty s pozitivními protilátkami ScMAb, zatímco u nonthymomatózní skupiny výrazně převažují pacienti s negativními protilátkami ScMAb.

5.3. **Objasnění společného mechanismu imunopatogeneze čtyř autoimunitních chorob (myasthenia gravis, Castlemanova nemoc, pemphigus vulgaris a antifosfolipidový syndrom) u jednoho pacienta**

U námi popisovaného případu pravděpodobně nejde jen o koincenci zdánlivě nesouvisejících klinických jednotek, ale o koexistenci se společným imunopatogenetickým pozadím a to zejména na úrovni B buněčných mechanismů. Základní spojitost nacházíme v molekule IL-6, která jednak stimuluje T a B buňky a současně stimuluje sekreci imunoglobulinů a indukuje syntézu proteinů akutní fáze (Obr. 1).

Můžeme konstatovat, že **hypotéza H u cíle č.3 , že „Tyto čtyři klinicky heterogenní jednotky na autoimunitním podkladě mají pravděpodobně společné imunopatogenetické pozadí, které umožňuje hledat společnou strategicky cílenou terapii“ se potvrdila.**



Obr. 1 Schématické znázornění centrální role molekuly IL-6 v imunopatogenezi všech 4 autoimunitních jednotek a očekávaný terapeutický efekt rituximabu a tocilizumabu (upraveno podle Jakubíková et al., 2013)

6. DISKUZE

6.1. Diskuze cíle č. 1

Vztah mezi MG a thymem je znám již několik desítek let. Thymom se vyskytuje přibližně u 10-15% pacientů s MG a jejich klinické projevy jsou často odlišné od nonthymomatózních pacientů s MG. Tendence nástupu MG s thymomy bývá pozdější a postihuje spíše mužské pohlaví (Hoosterhuis, 1989). Naše výsledky tyto údaje podporují; thymomatózní pacienti s MG v našem souboru byli v průměru o 20 let starší než nonthymomatózní pacienti a muži byli častěji postiženi thymomem ve srovnání se skupinou bez thymomu. Přítomnost thymomu u MG je obvykle spojena se špatnou prognózou (Tellez-Zenteno et al., 2001; Budde et al., 2001) a terapeutická odpověď po TE je obvykle méně příznivá než u pacientů s nonthymomatózní MG. Další studie uvádí nižší množství remisí a zvýšenou mortalitu u pacientů s thymomatózní MG (Jaretzki et al., 1988). V případě komparativní analýzy nonthymomatózních a thymomatózních pacientů v našem souboru musíme konstatovat, že u našich pacientů nebyly žádné významné rozdíly mezi nonthymomatózní a thymomatózní skupinou týkající se předoperační závažnosti MG. (Tab. 1). Podobně jako Kim et al (Kim et al., 2007) jsme zjistili, že neurologické výsledky po TE byly velmi podobné v těchto dvou skupinách pacientů s MG. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v klinické remisi nebo počtu relapsů mezi thymomatózní a nonthymomatózní skupinou během pooperačního sledování. Kromě toho rozdíly mezi výsledky QMGS 1 rok po TE u thymomatózní a nonthymomatózní skupiny nebyly statisticky významné a tendence zlepšování jejich klinického stavu byly téměř stejné (Tab. 2). Tyto zjištění by mohla být z části vysvětlena i kratší předoperační dobou trvání onemocnění MG u pacientů s thymomy, kteří tedy podstoupili TE dříve, než pacienti bez thymomu. V naší studii, pacienti s thymomatózní MG podstoupili TE do 8 měsíců po stanovení diagnózy generalizované MG, zatímco pacienti s generalizovanou MG, kteří thymom neměli, podstoupili TE v průměru 17 měsíců po stanovení diagnózy. I přes tento rozpor jsme nepozorovali významný vztah mezi trváním onemocnění nonthymomatózní MG před TE a terapeutickou reakcí na TE (měřeno dle QMGS, $p = 0,64$). Někteří autoři uvádějí, že benefit TE je větší a promptnější, pokud je operace provedena co nejdříve po stanovení diagnózy generalizace MG (Monden et al., 1984; Kim et al., 2007). Rovněž tvrdí, že nonthymomatózní pacienti dosáhli lepších výsledků, pokud TE byla provedena v podobném časovém intervalu od stanovení diagnózy, než u thymomatózních pacientů. Průměrná doba myastenických příznaků od stanovení diagnózy generalizované MG až po provedení operace byla sice více než dvakrát vyšší u našich nonthymomatózních pacientů ve srovnání s thymomatózní MG skupinou, ale neurologické výsledky byly podobné. Nicméně, rozšířený názor, že brzká TE u nonthymomatózních MG pacientů má vliv na nastolení rychlosti pooperačního zlepšení až dosažení kompletní stabilní remise, nebyl ověřen v našem souboru; trvání onemocnění před TE nemělo vliv na neurologický výsledek. Tento závěr potvrzuje i fakt, že nonthymomatózní MG pacienti s relapsy onemocnění nebo progresí QMGS po TE nebyli ovlivněni dobou trvání onemocnění před TE ($p = 0,177$ a $p = 0,243$, v tomto pořadí), takže jí nelze považovat za užitečný prognostický faktor.

Když se zaměříme čistě na nonthymomatózní skupinu námi sledovaných pacientů (s podskupinami *NonThymoma 0*, *NonThymoma KS* a *NonThymoma KS+AZA*), tak můžeme konstatovat, že celkem 72% z nich mělo dobrou klinickou odezvu, která byla vyhodnocovaná 24 měsíců po operaci (kompletní stabilní remise a zlepšení stavu), což je výsledek podobný jiným souborům thymektomovaných pacientů (Guillermo et al., 2004; Hatton et al., 1989; Busch et al., 1996; Frist et al., 1991). Většina nonthymomatózních MG pacientů v našem souboru, kteří

dosáhli KSR, bylo léčených konkomitantní imunosupresivní terapií (91%) a současně podobné výsledky byly dosaženy u pacientů, kteří dosáhli statu zlepšení (82% z nich dostávalo buď kortikosteroidy nebo kombinovanou IS terapii). Skupina nonthymomatózních MG pacientů léčených před operací pouze pyridostigminem tvořila jen 9% všech případů KSR a 18% všech případů ze skupiny zlepšení stavu. Tato pozorování naznačují, že samostatná léčba thymektomií bez souběžné imunosupresivní nebo imunomodulační léčby nestačí k dosažení statu KSR dva roky po začátku sledování u nonthymomatózních MG pacientů.

Po odstranění thymu dochází ke zlepšování myastenické symptomatiky i u dvojité séronegativních pacientů (antiAChR -, antiMuSK -) (Mantegazza et al., 2003; Guillermo et al., 2004). V našem souboru séronegativních pacientů byla jejich reakce na TE podobná jako u séropozitivních nonthymomatózních nebo thymomatózních pacientů; také jsme zjistili, že nejsou přítomné žádné významné rozdíly v množství Treg, CD4, CD8 nebo CD19 lymfocytů v porovnání se séropozitivními pacienty v jednotlivých časových intervalech po operaci. Jediným rozdílem byla kratší doba trvání onemocnění a převaha mužského pohlaví mezi séronegativními pacienty.

6.2. Diskuze cíle č. 2

Treg buňky hrají hlavní roli v regulaci imunitní odpovědi a u autoimunitních onemocnění (Walker, 2013). Snížená činnost nebo snížený počet těchto buněk může vést pacienty k větší pravděpodobnosti vzniku autoimunitních nemocí (Sakaguchi et al., 2008). Již dříve bylo publikováno snížení počtu cirkulujících CD4+CD25+ buněk u autoimunitního diabetu (Kukreja et al., 2002) a také zjištěno, že funkční aktivita cirkulujících CD4+CD25+ T buněk u pacientů s roztroušenou sklerózou ve srovnání s Treg buňkami od zdravých kontrol byla snížena (Viglietta et al., 2004). Podobně Treg buňky od myastenických potkanů u EAMG jsou méně účinné než Treg buňky od zdravých kontrol (Gertel-Lapter et al., 2013). Nicméně v našem projektu nebyly detekované žádné významné rozdíly mezi předoperační hladinou CD4+CD25+ T lymfocytů u pacientů s MG oproti zdravým kontrolám, což je podobné zjištění jako u dvou předchozích studií (Balandina et al., 2005, Huang et al., 2003). Po TE jsme pozorovali statisticky významné procentuální zvýšení Treg buněk u všech sledovaných skupin s výjimkou těch, kteří byli léčeni pouze pyridostigminem; nejvyšší hladiny byly pozorovány u nonthymomatózních pacientů léčených kortikosteroidy. Zda je tento jev pouhým důsledkem TE, není zcela jasné. Každopádně můžeme konstatovat, že největší pokles v QMGs po roce sledování od TE, největší zvýšení % Treg a CD8 lymfocytů a současně největší podíl v dosažení KSR po 2 letech sledování bylo pozorováno u nonthymomatózních pacientů, kteří užívali předoperačně kortikosteroidy. Různé studie opakovaně prokázaly, že kortikosteroidy vedou ke zlepšení funkce Treg např. u pacientů s dg. SLE nebo MG (Suarez et al., 2006; Luther et al., 2009).

Při výzkumu účinků různých imunosupresiv na Treg buněčnou proliferaci a funkci bylo zjištěno, že rapamycin má překvapivě pozitivní vliv na počet Treg buněk (Zhang et al., 2010). Na základě našich výsledků můžeme předpokládat, že předoperační terapie kortikosteroidy je dobrým prediktivním ukazatelem pozitivního efektu thymektomie; nicméně je zapotřebí větší klinické studie s delším trváním, aby se ještě důkladněji posoudil účinek imunosupresivních léků na Treg buňky a ještě více objasnil možný vztah mezi Treg buňkami a TE (Berrih-Aknin, 2014).

V našem projektu jsme jednoznačně potvrdili hypotézu, že podíl Treg buněk mezi lymfocyty se zvyšuje v závislosti na čase po provedení TE u MG pacientů, kteří užívají současně nějaký druh imunoterapie (kortikosteroidy nebo kombinovanou imunosupresi). Skutečnost, že u nonthymomatózních pacientů léčených jenom pyridostigminem TE nevedla ke statisticky

významným změnám v počtu CD4+CD25+ T buněk naznačuje, že TE není hlavní příčinou změn v jiných sledovaných skupinách, kde k elevaci Treg po operaci došlo (*NonThymoma KS*, *NonThymoma KS+AZA*, *Thymoma*). Vzhledem k faktu, že MG je v současnosti asi nejlépe jasně definované autoimunitní onemocnění, pokusili jsme se korelovat frekvence cirkulujících CD4+CD25+ T buněk s aktivitou klinického onemocnění po TE u pacientů s MG. Zjistili jsme, že thymektomovaní MG pacienti měli významně vyšší podíl CD4+CD25+ T buněk ve srovnání s nethymektomovanými MG pacienty před operací a u zdravých kontrol ($p < 0,001$). Souběžně s nárůstem Treg buněk jsme pozorovali i lepší neurologické výsledky měřené podle QMGs, ale nebyli jsme schopni prokázat přímý vztah mezi vzestupem Treg buněk a snížením QMGs. Dle našeho názoru se zdá velmi pravděpodobné, že zlepšení symptomů MG nenásleduje bezprostředně po zvýšení podílu Treg buněk.

V našem projektu jsme ukázali, že podíl CD4+ T buněk výrazně poklesl po TE jen ve skupině pacientů léčených kortikosteroidy ($p = 0,038$), zatímco se podíl CD8+ T-buněk výrazně zvýšil po TE ve všech skupinách pacientů s výjimkou těch léčených pouze pyridostigminem. Tyto nálezy podporují hypotézu, že klinické zlepšení po TE a současně probíhající imunoterapii může být v souvislosti se sníženou autoreaktivitou T buněk, což je v souladu s poklesem CD4+ buněk a nárůstem CD8+ buněk.

Zvýšený počet B lymfocytů se nachází v brzlíku u mladších pacientů s časným nástupem MG (Berrih-Aknin et al., 2013). Kromě toho, u pacientů s MG se prokázaly důkazy o klonální expanzi B lymfocytů ve srovnání s kontrolami (Vrolix et al., 2014). V naší studii došlo ke statisticky významnému poklesu podílu CD19 buněk (markerů B lymfocytů) u nonthymomatózních pacientů léčených kortikosteroidy a výsledky u thymomatózních MG pacientů také ukázaly výrazný pokles CD19 buněk oproti hladinám před TE a 1 rok po ní ($p < 0,001$).

Při zkoumání výskytu antistriálních protilátek u pacientů s thymomem a bez něho jsme dospěli k závěru, že výskyt protilátek ScMab v krvi může být indikátorem přítomnosti thymomu. Někteří autoři dokonce tvrdí, že ScMab a CT mediastina vykazují podobnou senzitivitu pro přítomnost thymomu u MG, na druhou stranu absence těchto protilátek thymom vylučuje (Romí et al., 2000). Rovněž dle jejich pozorování je přítomnost ScMab spojena s mnohem závažnějším průběhem MG a proto by tyto protilátky mohly být použity jako prognostické markery u myastenických pacientů.

V našem projektu jsme se pokusili vyhodnotit rovněž hladiny cytokinů (IL-17, TNF- α a IFN- γ), které se dle nejnovějších poznatků aktivně podílejí na imunopatogenezi MG. Jejich hladiny v různých časových intervalech po TE však nevykazovaly žádné statisticky signifikantní změny ani v jedné ze sledovaných skupin.

U protilátek proti AChR také nedošlo ke statisticky významným rozdílům mezi sledovanými skupinami pacientů s MG a vedlejším nálezem byly výrazné výkyvy v průměrných hodnotách těchto autoprotiátek. Tyto nálezy v podstatě potvrzují několik let známý fakt, že z klinického hlediska titry anti-AChR protilátek jsou mezi pacienty značně variabilní a jejich hodnoty nekorelují s klinickou závažností MG (Berrih et al., 1984; Špalek, 2008).

6.3. Diskuze cíle č. 3

Je velmi pravděpodobné, že asociace mezi CN, MG, pemphigus vulgaris a antifosfolipidovým syndromem v naší kazuistice sdílí společné imunopatogenetické pozadí a to hlavně na úrovni B buněčných mechanismů a molekuly IL-6 (Obr. 1). Byla vyslovena hypotéza, že chronická stimulace B buněčných klonů, může mít za následek projevy mnoha autoimunitních onemocnění

a podobně i lymfoproliferativní poruchy jako je CN (De Marchi et al., 2004). Naše kazuistika rovněž poskytuje důkazy na podporu tohoto tvrzení. MG je často spojena s jinými autoimunitními onemocněními. V literatuře jsme identifikovali 5 podobných případů se současným výskytem MG a CN (Epson, 1973; Pasaoglu et al., 1994; Day et al., 2003; Chorzelski et al., 1999; Yadav a Lesic, 2010). Je více než 30 popsáných asociací paraneoplastického pemphigu s CN (Canepelle et al., 2000; Fujimoto et al. 2002; Menenakos et al. 2007), ale kombinace všech 3 klinických jednotek s antifosfolipidovým syndromem je jedinečná a dříve popsána nebyla.

Lepší porozumění role HHV-8 a IL-6 u CN poskytly možnosti pro nové terapeutické strategie. Rituximab, anti-CD20 monoklonální protilátka, je terapeuticky cílená na CD20+ B lymfocyty, které jsou významnou součástí imunopatogeneze těchto nemocí (CN a MG). Vzhledem k přítomnosti antigenu CD20 na lymfoidních buňkách u HHV-8 pozitivních pacientů asociovaných s CN (Du et al., 2001) se zdálo být logické, abychom se pokusili rituximab použít v léčbě pacienta se současným výskytem CN a MG. Kromě toho existují mnohé důkazy, že léčba rituximabem je u pacientů s MG prospěšná (Lebrun et al., 2009; Zebardast et al., 2010). Klinický dopad léčby monoklonální protilátkou proti IL-6 – tocilizumabem- je u těchto onemocnění neznámý. Jeden experimentální model prokázal, že léčba anti-IL-6 protilátkami potlačuje probíhající EAMG přes mechanismy, které zahrnují Th1, Th17 a B buněčnou inhibici (Aricha et al., 2011).

7. ZÁVĚR

V posledních letech jsme svědky velkého pokroku v poznání imunopatologických dějů u autoimunitních chorob. U řady z nich nacházíme společné imunopatogenetické mechanismy, které vedou k poruše funkce či k destrukci cílové tkáně. Tuto skutečnost dokumentuje i klinická praxe, jako např. námi prezentovaná kazuistika. Zánětlivé prostředí v cílovém orgánu mění funkci a plasticitu CD4+ buněk, což vede k poškození funkce Treg lymfocytů. Tento mechanismus je typický pro celou řadu autoimunitních onemocnění. Nové možnosti biologické terapie, zaměřené na konkrétní cílový antigen, dávají nové naděje pacientům s refrakterními formami jednotlivých autoimunitních onemocnění.

Hodnotili jsme vliv přítomnosti thymomu na dopad TE u pacientů s MG na základě porovnání pooperačních neurologických výsledků mezi thymomatózními a nonthymomatózními pacienty. Závěrem lze konstatovat, že thymomatózní a nonthymomatózní skupina profituje z thymektomie stejně. Částečně to může být vysvětleno kratším předoperačním trváním generalizované MG u skupiny pacientů s thymomem a rovněž proto, že všichni thymomatózní pacienti užívali kombinovanou imunosupresi, která dle našich zjištění pozitivně ovlivňuje pooperační průběh jak klinické symptomatiky tak imunitních parametrů (zvýšení Treg a CD8+ lymfocytů). Dále jsme se zaměřili na skupinu nonthymomatózních pacientů, kdy jsme vyhodnocovali vliv TE na vybrané subpopulace lymfocytů a neurologické výsledky v různých časových intervalech po operaci v souvislosti s přítomností nebo nepřítomností konkomitantní imunoterapie. Byly zjištěny zvýšené hladiny cirkulujících CD4+CD25+ regulačních T lymfocytů u klinicky stabilních MG thymektomovaných pacientů užívajících buď kortikosteroidy nebo kombinovanou imunosupresivní léčbu. Tato pozorování ukazují, že zvýšení procentuálního podílu CD4+CD25+ T buněk mezi lymfocyty u MG může být ve vztahu ke stabilitě onemocnění, kde po TE při současné imunoterapii dochází k rozšíření podílu CD4+CD25+ T buněk mezi lymfocyty. Nemůžeme přesně určit zda pozorovaná asociace mezi TE, zvýšeným procentuálním

zastoupením CD4+CD25+ T buněk a dobrým terapeutickým výsledkem byla díky benefitu samotné TE nebo v důsledku současně užívané imunoterapie. Ale vzhledem k faktu, že nonthymomatózní skupina, která podstoupila TE a byla léčená jenom pyridostigminem bez doprovodné imunoterapie nevykazuje žádné významné zvýšení Treg buněk nebo jakékoliv jiné statisticky významné změny v dalších subpopulacích lymfocytů (CD4, CD8, CD19), jakož i jejich postintervenční status po 2 letech sledování byl nejhorší ze všech sledovaných skupin MG pacientů můžeme konstatovat, že samotná TE bez konkomitantní imunoterapie nestačí ke zvýšení počtu cirkulujících Treg buněk a k navození kompletní stabilní remise. Další pooperační zlepšování myastenické symptomatiky může trvat měsíce nebo roky, takže je velmi obtížné odlišit účinky TE od účinků imunosupresivních léků, které jsou často užívány současně a kontinuálně po celou dobu sledování.

8. CITOVANÁ LITERATURA

1. Abbas A, Lichtman A. Cellular and Molecular Immunology, Elsevier Saunders 2005.
2. Ahlberg R, Yi Q, Pirskanen R, Matell G, Swerup C, Rieber EP et al. Treatment of myasthenia gravis with anti-CD4 antibody: improvement correlates to decreased T-cell autoreactivity. *Neurology* 1994;44:1732-1737.
3. Aricha R, Feferman T, Fuchs S, Souroijon MC. Ex vivo regulatory T cells modelate experimental myasthenia gravis. *J Immunol.* 2005;175:7898-7904.
4. Aricha R, Mizrachi K, Fuchs S, Souroujon MC. Blocking of IL-6 suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun* 2011; 36(2):135-141.
5. Balandina A, Lécart S, Dartevelle P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005;105:735-741.
6. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol.* 2006;126:15-24.
7. Berrih S, Morel E, Gaud C, Raimond F, Le Brigand H, Bach JF. Anti-AChR antibodies, thymic histology, and T cell subsets in myasthenia gravis. *Neurology* 1984;34:66-71.
8. Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: a comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun.* 2014;52:90-100.
9. Berrih-Aknin S, Ragheb S, Le Panse R, Lisak RP. Ectopic germinal centers, BAFF and anti-B-cell therapy in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev* 2013;12:885-893.
10. Berrih-Aknin S. Myasthenia Gravis: paradox versus paradigm in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2014; 52:1-28.
11. Budde JM, Morris CD, Gal AA, Mansour KA, Miller JI Jr. Predictors of outcome in thymectomy for myasthenia gravis. *Ann Thorac Surg* 2001;72:197-202.
12. Busch C, Machens A, Pichlmeier U, Emskotter T, Izbicki J. Long-term outcome and quality of life after thymectomy for myasthenia gravis. *Annals Surg* 1996;224:225-232.
13. Caneppele S, Picart N, Bayle-Lebey P, Paul J-L, Irsutti M, Oksman F, et al. Paraneoplastic pemphigus associated with Castleman's tumour. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25:219-221.

14. Chorzelski T, Hashimoto T, Maciejewska B, Amagai M, Anhalt GJ, Jablonska S. Paraneoplastic pemphigus associated with Castleman disease, myasthenia gravis and bronchiolitis obliterans. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41:393-400.
15. Cohen-Kaminski S, Delattre RM, Devergne O, Klingel-Schmitt I, Emilie D, Galanaud P et al. High IL-6 gene expression and production by cultured human thymic epithelial cells from patients with myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 681:97-99.
16. Day JR, Bew D, Ali M, Dina R, Smith PL. Castleman disease associated with myasthenia gravis. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:1648-1650.
17. De Marchi G, De Vita S, Fabris M, Scott CA, Ferraccioli G. Systemic connective tissue disease complicated by Castleman's disease: report of a case and review of the literature. *Haematologica* 2004; 89:ECR03.
18. Drachman DB, Adams RN, Hu R, Jones RJ, Brodsky RA.. Rebooting the immune system with high-dose cyclophosphamide for treatment of refractory myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:305-314.
19. Du QM, Liu H, Diss CT, Ye H, Hamouni AR, Dupin N, et al. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infects monotypic (IgM lambda) but polyclonal naive B cells in Castleman disease and associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 2001; 97:2130-2136.
20. Endo S, Hasegawa T, Sato Y, Otani S, Saito N, Tetsuka K et al. Inhibition of IL-6 overproduction by steroid treatment before transsternal thymectomy for myasthenia gravis: does it help stabilize perioperative condition? *Eur J Neurol* 2005; 12:768-773.
21. Epton HE. Extrathoracic angiofollicular lymphoid hyperplasia with coincidental myasthenia gravis. *Cancer* 1973; 21:241-245.
22. Frist W, Thirumalai S, Doehring C. Thymectomy for the myasthenia gravis patient: factors influencing outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:406-411.
23. Fujimoto W, Kanehiro A, Kuwamoto-Hara K, Saitoh M, Nakakita T, Amagai M, et al. Paraneoplastic pemphigus associated with Castleman disease and asymptomatic bronchiolitis obliterans. *Eur J Dermatol.* 2002; 12(4):355-9.
24. Gertel-Lapter S, Mizrahi K, Berrih-Aknin S, Fuchs S, Souroujon MC. Impairment of regulatory T cells in myasthenia gravis: studies in an experimental model. *Autoimmun Rev* 2013;12:894-903.
25. Guillermo GR, Téllez-Zenteno JF, Weder-Cisneros N, Mimenza A, Estañol B, Remes-Troche JM, et al. Response of thymectomy: clinical and pathological characteristics among seronegative and seropositive myasthenia gravis patients. *Acta Neurol Scand* 2004;109:217-221.
26. Harcourt GC, Sommer N, Rothbard J, Willcox HN, Newsom-Davis J. A juxta-membrane epitope on the human acetylcholine receptor recognized by T cells in myasthenia gravis. *J Clin Invest* 1988;82:1295-1300.
27. Hatton PD, Diehl JT, Daly BD, Rheinlander HF, Johnson H, Schrader JB, et al. Transsternal radical thymectomy for myasthenia gravis: a 15-year review. *Ann Thorac Surg* 1989;47:838-840.
28. Hoosterhuis H. The natural course of myasthenia gravis: a long term follow-up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:1121-1127.
29. Huang Y, Pirskanen R, Ciscombe R, Link H, Lefvert AK. Circulating CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;998:318-319.
30. Jakubíková M, Piřha J, Latta J, Ehler E, Schutzner J. Myasthenia gravis, Castleman

- disease, pemphigus, and anti-phospholipid syndrome. *Muscle Nerve*. 2013;47(3):447-51.
31. Jaretzki A 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keesey JC, Penn AS et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology* 2000;55(1):16-23.
 32. Jaretzki A 3rd, Penn AS, Younger DS, Wolff M, Olarte MR, Lovelace RE, et al. "Maximal" thymectomy for myasthenia gravis: Results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988;95:747-757.
 33. Kim HK, Park MS, Choi YS, Kim K, Shim YM, Han J, et al. Neurologic outcomes of thymectomy in myasthenia gravis: comparative analysis of the effect of thymoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134:601-607.
 34. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al. Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109:131-140.
 35. Lebrun C, Bourg V, Tieulie N, Thomas P. Successful treatment of refractory generalized myasthenia gravis with rituximab. *Eur J Neurol* 2009; 16(2): 246-250.
 36. Lindstrom J, Shelton D, Fujii Y. Myasthenia gravis. *Adv Immunol* 1988;42:233-284.
 37. Lisak RP, Laramore C, Zweiman B, Moskovitz A. In vitro synthesis of antibodies to acetylcholine receptor by peripheral blood mononuclear cells of patients with myasthenia gravis. *Neurology* 1983;33:604-608.
 38. Luther C, Adamopoulou E, Stoeckle C, Brucklacher-Waldert V, Rosenkranz D, Stoltze L, et al. Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients. *J Immunol* 2009;183:841-848.
 39. Mantegazza R, Baggi F, Bernasconi P, Antozzi C, Confalonieri P, Novellino L, et al. Video-assisted thoracoscopic extended thymectomy and extended transsternal thymectomy (T-3b) in non-thymomatous myasthenia gravis patients: remission after 6 years of follow-up. *J Neurol Sci* 2003;212:31-36.
 40. Marx A, Wilisch A, Schultz A, Gattenlöhner S, Nenninger R, Müller-Hermelink HK. Pathogenesis of myasthenia gravis. *Virchows Arch*. 1997; 430: 355-364.
 41. Melms A, Schalke BCG, Kirchner T, Müller-Hermelink HK, Albert E, Wekerle H. Thymus in myasthenia gravis: isolation of T-lymphocyte lines specific for the nicotinic acetylcholine receptor from thymuses of myasthenic patients. *J Clin Invest* 1988;81:902-908.
 42. Menenakos C, Braumann C, Hartmann J, Jacobi CA. Retroperitoneal Castleman's tumor and paraneoplastic pemphigus: report of a case and review of the literature. *World Journal of Surgical Oncology* 2007; 5:45.
 43. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurology*.2009;8:475-490.
 44. Monden Y, Nakahara K, Kagotani K, Fujii Y, Nanjo S, Masaoka A, et al. Effects of preoperative duration of symptoms on patients with myasthenia gravis. *Ann Thorac Surg* 1984;38:287-291.
 45. Motomura M, Narita Masuda T. Autoantibodies in myasthenia gravis. *Brain Nerve* 2013;65(4):433-439.
 46. Mu L, Sun B, Kong Q, Wang J, Wang G, Zhang S et al. Disequilibrium of T helper type 1,2 and 17 cells and regulatory T cells during the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Immunology*. 2009;128 Suppl:826-836.

47. Osserman KE, Kornfeld P, Cohen E, Genkins G, Mendelow H, Goldberg H, Windsley H, Kaplan LI. Studies in myasthenia gravis; review of two hundred eighty-two cases at the Mount Sinai Hospital, New York City. *AMA Arch Intern Med* 1958;102(1):72-81.
48. Palace J, Newsom-Davis J, Lecky B. A randomized double-blind trial of prednisone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. *Neurology* 1998;50:1778-1783.
49. Pasaoglu I, Dogan R, Topcu M, Gungen Y. Multicentric angiofollicular lymph-node hyperplasia associated with myasthenia gravis. *Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 42:253-256.
50. Piřha J, Bednařik J, Zapletalová O, Schützner J, Zámečník J, Ambler Z et al. Klinický standard pro diagnostiku a léčbu myasthenia gravis.. In Suchý M, Bednařik J. a kol. . *Klinické doporučené postupy v neurologii*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012. s. 46–76.
51. Romi F, Skeie GO, Aarli JA, Gilhus NE. The severity of myasthenia gravis correlates with the serum concentration of titin and ryanodine receptor antibodies. *Arch Neurol* 2000;57:1596- 1600.
52. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-787.
53. Špalek P. Myasténia gravis - autoimunitné spektrum a imunopatogenetická klasifikácia. *Neurologia*. 2009;4:25-30.
54. Špalek P. Myasténia gravis. *Cesk Slov Neurol N* 2008; 71/104:7-24.
55. Strober J, Cowan MJ, Horn BN. Allogenic hematopoietic cell transplantation for refractory myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2009;66:659-661.
56. Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1512-1517.
57. Sun Y, Qiao J, Lu CZ, Zhao CB, Zhu XM, Xiao BG. Increase of circulating CD4+CD25+ T cells in myasthenia gravis patients with stability and thymectomy. *Clin Immunol*. 2004;112:284-289.
58. Suster S, Moran CA. Thymoma classification: current status and future trends. *Am J Clin Pathol* 2006;125:542-554
59. Takatsu K. Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 215:121-133.
60. Tellez-Zenteno JF, Remes-Troche JM, Garcia-Ramos G, Estanol B, Garduno-Espinoza J. Prognostic factors of thymectomy in patients with myasthenia gravis: a cohort of 132 patients. *Eur Neurol* 2001;46:171-177.
61. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199:971-979.
62. Vrolix K, Fraussen J, Losen M, Stevens J, Lazaridis K, Molenaar PC et al. Clonal heterogeneity of thymic B cells from early-onset myasthenia gravis patients with antibodies against the acetylcholine receptor. *J Autoimmun* 2014;52:101-112.
63. Walker LS. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun* 2013;45:49-57.
64. Yadav S, Lesic C. Extra thoracic Castleman disease associated with myasthenia gravis. *Indian J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 26(4):275-276.
65. Zebardast N, Patwa HS, Novella SP, Goldstein JM. Rituximab in the management of

- refractory myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2010; 41(3): 375-378.
66. Zhang C, J. Shan, L. Feng, J. Lu, Z. Xiao, L. Luo, et al. The effects of immunosuppressive drugs on CD4(+) CD25(+) regulatory T cells: a systematic review of clinical and basic research. *J Evid Based Med* 2010;3:117-129.
67. Zhang GX, Xiao BG, Bakhiet M, van der Meide P, Wigzell H, Link H, et al. Both CD4+ and CD8+ T cells are essential to induce experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Exp Med* 1996;184:349-356.

SOUHRN PRACÍ AUTORKY

a) s IF

Jakubíková M, Piřha J, Marečková H, Týblová M, Nováková I, Schutzner J. Two-year outcome of thymectomy with or without immunosuppressive treatment in nonthymomatous myasthenia gravis and its effect on regulatory T cells. *J Neurol Sci.* 2015; 358(1-2):101-106. IF= 2.474

Stergiou C, Lazaridis K, Zouvelou V, Tzartos J, Mantegazza R, Antozzi C, Andreetta F, Evoli A, Deymeer F, Saruhan-Direskeneli G, Durmus H, Brenner T, Vaknin A, Berrih-Aknin S, Behin A, Sharshar T, De Baets M, Losen M, Martinez-Martinez P, Kleopa KA, Zamba-Papanicolaou E, Kyriakides T, Kostera-Pruszczyk A, Szczudlik P, Szyluk B, Lavrnic D, Basta I, Peric S, Tallaksen C, Maniaol A, Gilhus NE, Casasnovas Pons C, Pitha J, **Jakubíková M**, Hanisch F, Bogomolovas J, Labeit D, Labeit S, Tzartos SJ. Titin antibodies in “seronegative” myasthenia gravis — A new role for an old antigen. *J Neuroimmunol.* 2016; 292:108-115. IF= 2.467

Jakubíková M., Piřha J. Současný pohled na imunopatogenezi myasthenia gravis. *Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(6):649-654. IF= 0.17

Tsonis AI, Zisimopoulou P, Lazaridis K, Tzartos J, Matsigkou E, Zouvelou V, Mantegazza R, Antozzi C, Andreetta F, Evoli A, Deymeer F, Saruhan-Direskeneli G, Durmus H, Brenner T, Vaknin A, Berrih-Aknin S, Behin A, Sharshar T, De Baets M, Losen M, Martinez-Martinez P, Kleopa KA, Zamba-Papanicolaou E, Kyriakides T, Kostera-Pruszczyk A, Szczudlik P, Szyluk B, Lavrnic D, Basta I, Peric S, Tallaksen C, Maniaol A, Casasnovas Pons C, Pitha J, **Jakubíková M**, Hanisch F, Tzartos SJ. MuSK autoantibodies in myasthenia gravis detected by cell based assay--A multinational study. *J Neuroimmunol.* 2015; 284:10-17. IF= 2.467

Jakubíková M, Piřha J, Latta J, Ehler E, Schutzner J. Myasthenia gravis, Castleman disease, pemphigus, and anti-phospholipid syndrome. *Muscle Nerve.* 2013; 47(3):447-451. IF= 2.311

Adamovičová M., Fabriciová K., **Jakubíková M.**, Příhodová I., Klement P., Sýkora P., Dusl M., Abicht A., Zeman J., Seeman P., Honzík T.. Kongenitální myastenie jako příčina respiračního selhání u dvou kojenců a batolete – kazuistiky. *Cesk Slov Neurol N*, 2012, sv. 75, s. 757–762. IF= 0.366

Jakubíková M., Příhodová I., Barna M., Štulík J., Vaněk P., Beneš V., Nevšimalová S. Spinální komplikace u genetických syndromů - kazuistiky. *Cesk Slov Neurol N* 2011; 74/107(4): 482-485. IF= 0.279

b) monografie

Jakubíková M., Seeman P. Kongenitální myastenické syndromy. In: Piřha J. a kol. Myasthenia gravis a ostatní poruchy nervosvalového přenosu. Praha: Maxdorf Jessenius; 2010. p. 319-41.

c) bez IF

Burgetová A., Vanečková M., **Jakubíková M.**, Seidl Z. Mycotic spondylitis caused by Cladosporium Cladosporides: A Case Report. *J Neurol Res* 2013; 3(2):78-80.

Jakubíková M. Kongenitální myastenické syndromy a myasthenie dětského věku. *Neurologie pro praxi* 2010; 11(2): 100-103.