

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Neurovědy



MUDr. Michala Jakubíková

Imunopatogenetické mechanismy u myasthenia gravis a vliv thymektomie

Thymectomy and immune mechanisms in patients with myasthenia gravis

Disertační závěrečná práce

Školitel: Prof. MUDr. Soňa Nevšimalová, DrSc.

Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd 1.LF UK a VFN v Praze

Praha 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.1.2016

MUDr. Michala Jakubíková

PODĚKOVÁNÍ

V úvodu své práce bych ráda poděkovala mé školitelce paní Prof. MUDr. Soni Nevšímalové, DrSc. za laskavé odborné vedení po celou dobu mého postgraduálního studia, schopnost podnítit můj zájem o vědeckou práci a za neustálou pozitivní motivaci v ní dále pokračovat.

Velké poděkování patří celému kolektivu Centra pro diagnostiku a terapii myasthenia gravis pod vedením MUDr. Jiřího Piřhy, který podporoval mojí publikační a přednáškovou aktivitu na poli myasthenie a byl vždy ochotný konzultovat jakýkoliv klinický případ pacienta s myasthenií gravis nebo poradit s jakýmkoliv odborným problémem ve vztahu k této nemoci.

Dále chci poděkovat As. MUDr. Heleně Posové, CSc. za uvedení do imunologické problematiky myasthenia gravis a hlavně za spolupráci při vyhodnocování imunologických parametrů.

Za komplexní statistické zpracování dat patří poděkování paní Mgr. Janě Timkové, PhD. z MFF UK.

Velmi děkuji panu prof. MUDr. Evženu Růžičkovi, DrSc. za vytvoření podmínek pro dokončení mé práce.

A ráda bych na tomto místě poděkovala také pacientům s myasthenia gravis, bez jejichž souhlasu a spolupráce by nebylo možno tento výzkum uskutečnit.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy v rámci projektu č. 351011/2011 s názvem “Klinická, laboratorní a socioekonomická analýza u pacientů s myasthenia gravis v České republice”. Dále byla podpořena výzkumným programem PRVOUK- P26/LF1/4 a Specifickým vysokoškolským výzkumem č. 254260020.

OBSAH

PROHLÁŠENÍ.....	1
PODĚKOVÁNÍ.....	2
OBSAH	3
ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT	8
KLÍČOVÁ SLOVA.....	10
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	11
1. ÚVOD.....	15
1.1. Definice a epidemiologie MG	15
1.2. Imunopatogeneze myasthenia gravis.....	16
1.2.1. Thymus a MG.....	16
1.2.2. Autoprotilátky	19
1.2.3. Imunopatogenetická klasifikace MG.....	22
1.2.4. Účast jednotlivých subpopulací lymfocytů na imunopatogenezi MG	24
1.2.5. Asociace MG s jinými autoimunitními chorobami	30
1.3. Klinická symptomatika MG	30
1.4. Diagnostika MG a hodnocení neurologického nálezu.....	32
1.4.1. Hodnocení neurologického nálezu	32
1.4.2. Elektrofyziologické vyšetření – elektromyografie (EMG)	35
1.4.3. Vyšetření autoprotilátek	35
1.4.4. Radiodiagnostika	36
1.4.5. Diagnostická kritéria MG.....	36
1.5. Terapie myasthenia gravis	38
1.5.1. Farmakoterapie myasthenia gravis.....	38
1.5.2. Chirurgická terapie myasthenia gravis – thymektomie.....	42
1.5.3. MGFA postintervenční status.....	43
2. CÍLE PRÁCE	45
3. ZÁKLADNÍ HYPOTÉZY.....	46

4.	PACIENTI A METODY	47
4.1.	Soubor thymektomovaných pacientů	47
4.2.	Rozdělení pacientů do skupin dle přítomnosti thymomu a dle předoperační terapie	47
4.3.	Laboratorní metody	49
4.3.1.	Průtoková cytometrie	49
4.3.2.	Reagencie	50
4.3.3.	Přístrojové vybavení a ostatní pomůcky	52
4.4.	Statistické metody	52
4.5.	Posuzování klinického stavu	53
4.6.	Kazuistika pacienta s generalizovanou formou MG s koexistencí dalších autoimunitních onemocnění	53
5.	VÝSLEDKY	57
5.1.	Klinická charakteristika a neurologické výsledky pacientů po thymektomii ve skupinách nonthymomatózní MG a thymomatózní MG	57
5.1.1.	Klinické charakteristiky sledované populace	57
5.1.2.	Neurologické výsledky	59
5.1.3.	Komparativní zhodnocení klinických a laboratorních charakteristik séropozitivních a séronegativních myastenických pacientů po thymektomii	64
5.2.	Histologické nálezy thymu a jejich vztah k věku	64
5.3.	Longitudinální sledování vývoje lymfocytárních subpopulací, specifických protilátek a intracelulárních cytokinů v periferní krvi u definovaných skupin pacientů s generalizovanou MG po thymektomii	65
5.3.1.	Treg (CD4+CD25+)	65
5.3.2.	Celkový absolutní počet lymfocytů	74
5.3.3.	CD4 lymfocyty	75
5.3.4.	CD8 lymfocyty	76
5.3.5.	CD19 lymfocyty	78
5.3.6.	Protilátky proti acetylcholinovým receptorům (antiAChR)	79
5.3.7.	Cytokiny TNF- α , IL-17, IFN- γ	79
5.3.8.	Výskyt protilátek ScMAb u thymomatózních pacientů	81
5.4.	Objasnění společného mechanismu imunopatogeneze čtyř autoimunitních chorob (myasthenia gravis, Castlemanova nemoc, pemphigus vulgaris a antifosfolipidový syndrom) u jednoho pacienta	82

6.	DISKUZE	85
6.1.	Diskuze cíle č. 1.....	85
6.2.	Diskuze cíle č. 2.....	88
6.3.	Diskuze cíle č. 3.....	92
7.	ZÁVĚR	94
8.	CITOVANÁ LITERATURA	96
	PŘÍLOHA č.1 – IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM	110
	PŘÍLOHA č. 2 – SOUHRN PRACÍ AUTORKY	111

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 autoprotílátok 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 odpovědi na tuto léčbu; 2. longitudinálně sledovat vývoj lymfocytárních subpopulací, specifických protílátok a produkci intracelulárních cytokinů v periferní krvi u myastenických pacientů před a po TE se současným vyhodnocováním jejich kvantitativního myastenického skóre (QMGS) a postintervenčního statusu; 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 antistriatických 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 immunopathogenic 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 imunosupresivní léčba, QMG skóre, kompletní stabilní remise

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAN – American Academy of Neurology; Americká neurologická akademie

Ab – antibodies; protilátky

ACh - acetylcholín

AChR – acetylcholinový receptor

AIRE- autoimunitní regulátor

APC buňky – antigen presenting cells; antigen prezentující buňky

APLA – antifosfolipidový syndrom

APRIL – proliferaci indukující ligand B-lymfocytů

BAFF - B-cell activating factor; aktivační faktor B lymfocytů

BCR - B-cell receptor; povrchový receptor na B-lymfocytech

BFA – brefeldin A

CD – cluster of differentiation

CMAP – compound muscle action potential; sumační akční potenciál

CN – Castlemanova nemoc

CT – computer tomography

DM I. typu – diabetes mellitus I. typu

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EAMG – experimentální autoimunitní myasthenia gravis

EMG - elektromyografie

EOMG - early onset myasthenia gravis; myasthenia gravis s časným začátkem

FCM – flow cytometry; průtoková cytometrie

FH - folikulární hyperplasie

Foxp3 - forkhead box P3; transkripční factor

FR – farmakologická remise

FVC – forsírovaná vitální kapacita

g- gram

GMG - generalizovaná myasthenia gravis

HHV-8 – human herpesvirus 8; lidský herpesvirus 8

HIV – human immunodeficiency virus; virus lidské imunodeficiency

HLA-B27+ - Human Leukocyte Antigen B27; lidský leukocytární antigen B27

i.v.- intravenózní

IACHe - inhibitory acetylcholinesterázy

IFN- γ – interferon-gamma

Ig – immunoglobulín

IL – interleukin

IO – kalcium ionofor

IS – imunosupresiva

IVIG – intravenózní immunoglobulin

KSR – kompletní stabilní remise

LDK - levá dolní končetina

LEMS – Lambert-Eatonův myastenický syndrom

LHK - levá horní končetina

LOMG - late onset myasthenia gravis; myasthenia gravis s pozdním začátkem

Lrp4 - low-density lipoprotein 4; nízkodenzitní lipoprotein 4

m. – musculus

m2 – metr čtvereční

mg – milligram

MG – myasthenia gravis

MGAT – myasthenia gravis asociovaná s thymomem

MGFA - Myasthenia Gravis Foundation of America; Americká nadace pro myasthenia gravis

MHC - major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex

MM – minimální manifestace

MMF - mykofenolát mofetil

MRI – magnetická resonance

MuSK - muscle-specific tyrosine kinase; svalově specifická tyrozin kináza

n.- nervus

NIF – nepřímá imunofluorescence

NK buňky – natural killers; přirození zabíječi

OMG – okulární myasthenia gravis

PBS – Phosphate Buffered Saline

PDK - pravá dolní končetina

PET – pozitronová emisní tomografie

PF – plazmaferéza

PHA – fytohemaglutinin

PHK - pravá horní končetina

PMA – forbol myristát acetát

POEMS – syndrom polyneuropatie, organomegalie, endokrinopatie, monoklonální gamapatie a kožních změn

QMGS - kvantitativní skóre myasthenia gravis

RA – revmatoidní artritida

RIA – radioimunoanalýza

RRA – radioreceptorová analýza

RS – roztroušená skleróza

RSMN - repetitivní stimulace motorického nervu

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

SCID – severe combined immunodeficiency; těžká kombinovaná imunodeficience

ScMAb – antistriatické protilátky

SF EMG – single fiber elektromyografie

SLE – systémový lupus erythematosus

SNMG – seronegativní myasthenia gravis

SPMG – seropositivní myasthenia gravis

t.hm.- tělesné hmotnosti

Tc lymfocyty – cytotoxic T-lymphocytes; cytotoxické T-lymfocyty

TCR – T-cell receptor; povrchový receptor na T-lymfocytech

TE – thymektomie

Th lymfocyty – helper T-lymphocytes; pomocné T-lymfocyty

TNF- α – tumor nekrotizující faktor - alfa

TPMT - thiopurin-S-methyltransferáza

Treg lymfocyty – regulační T-lymfocyty

UPV – umělá plicní ventilace

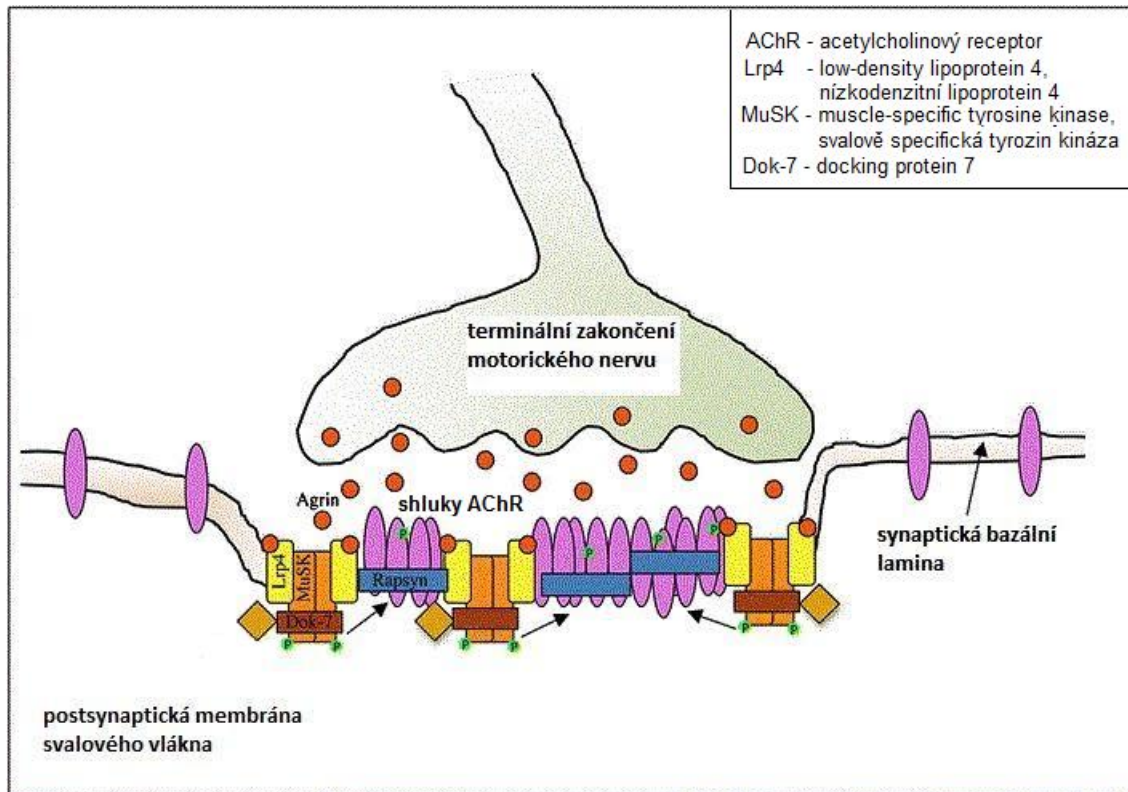
WHO – World Health Organisation; Světová zdravotnická organizace

1. ÚVOD

1.1. Definice a epidemiologie 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). *Obr. 1*



Obr. 1 Diferenciace a maturace na postsynaptické membráně svalového vlákna

Jedná se o heterogenní onemocnění po stránce klinické i imunopatologické. V poslední době jsme svědky významného pokroku v objasnění imunopatologických dějů vedoucích k destrukci nervosvalové ploténky. Na experimentálním modelu nemoci jsou dokumentovány klíčové poruchy molekulárních mechanismů, které se podílejí na rozvoji onemocnění. Jako velmi důležité se ukazuje i

genetické pozadí choroby, které podmiňuje imunopatologickou heterogenitu choroby. 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 nález však není podmínkou vzniku choroby.

MG patří mezi vzácnější choroby, její incidence a prevalence má však stoupající trend. Roční incidence MG se v našich podmínkách pohybuje kolem 21 případů na 1 milión populace. Prevalence MG se pohybuje od 80 do 200 pacientů s MG na 1 milión populace. Incidence a prevalence je dle všeobecné shody ve skutečnosti vyšší vzhledem k tomu, že onemocnění je ve skutečnosti poddiagnostikováno. Při výskytu v mladším věku jsou častěji postiženy ženy (asi 2:1), v starším věku se poměr obrací v neprospěch mužů (také 2:1). U žen vrcholí výskyt choroby ve 2.-3.deceniu, u mužů v 6.deceniu (Grob et al., 2008). Asi u 10% pacientů vzniká MG v dětském věku před 15.rokem života.

Klinicky se MG dělí na generalizovanou MG (cca v 80%) a fokální, nejčastěji tzv. okulární formu. Choroba se může vyvíjet plíživě, či může probíhat fulminantně s rizikem vývoje do myastenické krize.

1.2. Imunopatogeneze myasthenia gravis

Imunopatogeneze onemocnění je komplexní. Autoimunitní nemoci mají některé společné vlastnosti, z čehož vyplývá, že k jejich rozvoji vedou společné patogenní mechanismy. Predisponující jsou faktory genetické, epigenetické, hormonální, nedostatek vitamínu D a možné spouštěcí faktory (infekce, chronický stres), které interagují s imunitním systémem. MG je autoprotilátkami zprostředkovaná nemoc, kde kromě patologie thymu hraje, dle poznatků z poslední doby, podstatnou roli i dysregulace pomocných a regulačních T lymfocytů (Berrih-Aknin a Le Panse, 2014). Příčina a mechanismus vzniku autoagresivní reakce u MG podobně jako u jiných autoimunitních onemocnění není úplně objasněna.

1.2.1. Thymus a MG

Thymus je lymfoepiteliální orgán, jehož hlavní úlohou je maturace T lymfocytů (tzv. thymopoeza), t.j. selekce buněk, které vytvoří repertoár zralých T buněk, a zároveň delecce lymfocytů, které reagují s autoantigeny (Marx et al., 1997). Histopatologické změny thymu týkající se MG lze v principu rozdělit do tří kategorií : 1) folikulární hyperplasie thymu (65-75% případů); 2) tuková atrofie (involute)

thymu (10-20% případů); 3) thymom (asi 10% případů). Atrofie thymu u pacientů s MG se morfologicky neliší od atrofických změn thymu u stejně starých osob bez MG, a proto možný imunopatogenetický vztah atrofie thymu je u MG nejasný. Naopak funkční dopad folikulární hyperplazie thymu při imunopatogenezi MG byl v poslední době v podstatní míře objasněn.

Zásadní je odlišovat mezi nonthymomatózní (bez přítomnosti nádoru thymu – thymomu) a thymomatózní (paraneoplastickou) formou MG. U nethymomatózní formy MG se jedná z histopatologického hlediska buď o folikulární hyperplazii nebo atrofii thymu.

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. Dochází k novotvorbě drobných arteriol, jež napomáhají zvýšené atrakci lymfocytů do lymfoidních orgánů. Morfologickým důsledkem je tvorba germinativních center na rozhraní dřene a kůry brzlíku s tzv.folikulární hyperplazií (Marx et al., 1997). V nich jsou nahromaděny autoreaktivní T a B lymfocyty, hlavně fenotypy CD4+/CD8- a CD4-/CD8+. Dřeňové epiteliální struktury obsahují nezralé formy svalových buněk (myoidní buňky), na kterých jsou lokalizovány AChR (Kaminski a Ruff, 1999). Předpokládá se, že autoagresivní reakce proti AChR může být iniciována přímo v thymu a že germinální centra jsou evidentně místo, kde dochází k protilátkové odpovědi B lymfocytů proti AChR (Kuks, 1992). Celá řada studií prokázala v hyperplastickém thymu navíc další důležité procesy, které odrážejí intenzivní aktivaci imunitního systému. V hyperplastickém thymu jsou na rozdíl od kontrolních thymů přítomny buňky produkující zánětlivé cytokiny jako IL-12, IFN γ , IL-1 a IL-6 (Emilie et al., 1991). Tento nález folikulární hyperplazie je patrný zejména u nemocných mladšího věku (do 45-50 let) s tzv. seropozitivní formou AChR+ MG. Až u 50% seronegativních pacientů, kteří nemají autoprotiilátky proti AChR, se v thymu nalézají změny popisované jako „thymitis like“ infiltráty, což jsou podobné změny jako u folikulární hyperplazie thymu seropozitivních pacientů s MG, jen počet germinativních center je výrazně nižší (Lauriola et al.,

2005). U starších pacientů je zřetelná atrofie (involute) thymu, v imunopatogenezi se účastní extrathymické mechanismy.

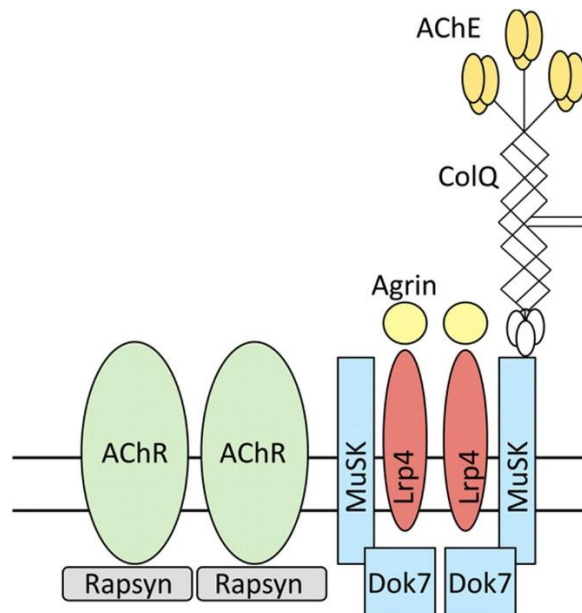
b) Thymomatózní paraneoplastická forma MG

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. Paraneoplastická MGAT začíná v thymomu vývojem abnormálních netolerogenních T lymfocytů vůči AChR, které se následně exportují od periferních imunitních orgánů (lymfatické uzliny, slezina, kostní dřeň a často i normální thymus mimo thymomu). Tady dochází k aktivaci T lymfocytů, k interakcím s B lymfocyty a nakonec k produkci autoantilátka proti AChR (Ströbel et al., 2009). To také vysvětluje fakt, proč po odstranění thymomu i s reziduální tkání thymu nedochází k poklesu titru protilátek proti AChR (Špalek et al., 2010). Thymomy u pacientů s MG mají bohaté zastoupení autoreaktivních T lymfocytů s reaktivitou proti α a ϵ podjednotce AChR (Nenninger et al., 1998). Všechny thymomy u pacientů s MG také vyplavují zralé naivní T lymfocyty do periferie a zejména autoreaktivním CD4+ T lymfocytům se přičítá významná role v patogenezi MGAT (Ströbel et al., 2002). Proto při léčbě MGAT má kromě thymektomie velmi rozhodující význam imunosupresivní léčba. Autoimunitní regulátor (AIRE) je transkripční faktor, který je produkován subpopulací medulárních epiteliálních buněk thymu a je nevyhnutný pro expresi tkáňově specifických antigenů, takže se považuje za klíčový faktor v centrální toleranci thymu. U většiny MGAT byly nalezeny hrubé defekty v expresi AIRE (Marx et al., 2010), nicméně byly také pozorovány u thymomů, které nebyly spojeny s MG, což naznačuje, že samotný nedostatek AIRE nevede k rozvoji MG.

Pro thymomy je typická výrazná morfologická variabilita, jedná se o epiteliální tumory, které se na základě morfologie a atypií nádorových epiteliálních buněk a na základě stupně přítomnosti nenádorových lymfocytů dělí 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.



Obr. 2 Autoprotilátky u MG

V důsledku aktivace autoreaktivních B lymfocytů dochází k produkci **protilátek proti AChR**, které se zpočátku vážou na dva sousední receptory a následně blokují a destrukují AChR tzv. membrány atakujícím komplexem. Aktivuje se komplement, oxid dusíku a zánětlivé cytokíny. Dochází k internalizaci AChR, vyhlazení junkčních záhybů, redukci AChR a následné blokadě nervosvalového přenosu. Pokud není zničení AChR kompenzováno jeho zvýšenou syntézou, důsledkem je snížení funkčních AChR na postsynaptické membráně, což vede k manifestaci myastenických příznaků (Engel a Fumagalli, 1982). Autoprotilátky proti AChR jsou polyklonální a hlavně z podskupin IgG1 a IgG3

(komplement aktivující). Z klinického hlediska titry protilátek jsou mezi pacienty značně variabilní a jejich hodnoty nekorelují s klinickou závažností MG. U pacientů léčených imunopresivou mohou být protilátky proti AChR falešně negativní nebo se jejich hladina může snížit. Po plazmaferéze rovněž dochází k snížení hladiny protilátek spolu s klinickým zlepšením (Dau, 1980). Protilátky proti AChR jsou často nalezeny i u pacientů s dlouhodobou klinickou remisí (Limburg et al., 1983).

Pacienti s thymomem mají ve většině případů pozitivní protilátky proti AChR (Špalek, 2002). Naopak falešně pozitivní protilátky proti AChR můžeme nalézt u pacientů s thymomem bez MG, přičemž jejich nález nijak nepredikuje vznik MG (Seybold a Lindstrom, 1981). Je popisován výskyt protilátek proti AChR i u jiných autoimunitních chorob.

Imunopatologický vliv autoprottilátek je zřejmý u 80 - 85 % nemocných. Tato forma choroby se označuje jako **seropozitivní AChR+ MG**. U 40% tzv. séronegativních pacientů byly nalezeny **protilátky proti MuSK**, což je povrchový transmembránový receptorický protein, který je součástí membrány svalového vlákna a má podstatnou roli pro zabudování AChR do postsynaptické membrány nervosvalové ploténky, tzv. clustering (shlukování) AChR (Conti-Fine et al., 2009). Hoch a spol. v roce 2001 zjistili, že část pacientů se séronegativní formou MG má autoprottilátky proti MuSK, hlavně třídy IgG4 (Hoch et al., 2001). Autoprottilátky jsou namířeny proti extracelulární části MuSK a způsobují inhibici aktivace MuSK indukované agrínem, tzn. poruchu agregace, clusteringu AChR a následně postsynaptické selhání neuromuskulární transmise. U pacientů s protilátkami proti MuSK je thymus většinou atrofický. Nejnovějším objevem na poli výzkumu autoprottilátek u MG jsou již zmiňované **anti-Lrp4 protilátky**, které patří hlavně do podtříd IgG1 a IgG2. Lrp4 je členem rodiny strukturně příbuzných transmembránových proteinů, které vykonávají různé funkce ve vývoji nervosvalového spojení, včetně signální transdukce a receptorem zprostředkované endocytózy. Lrp4 je specificky exprimován v dobře diferencovaných myotubulech a je soustředěn na nervosvalové ploténce (Weatherbee et al., 2006). Extracelulární doména molekuly Lrp4, která slouží jako funkční receptor, je v interakci s agrínem a tato vazba aktivuje MuSK, což vede k tvorbě většiny agregátů obsahujících AChR v funkční oblasti plazmatické membrány (Pevzner et al., 2012). Lrp4 a MuSK mohou tvořit komplex i v nepřítomnosti ligandu agrinu, nicméně agrin prostřednictvím vazby na Lrp4 zvyšuje interakci mezi Lrp4 a MuSK (Gomez a Burden, 2011, Zhang et al., 2008). Velká mezinárodní studie (Zisimopoulou et al., 2014) odhalila, že podíl těchto autoprottilátek u tzv. dvojité séronegativních pacientů (anti-AChR negat., anti-MuSK negat.) tvoří až 19% z celkového počtu. U většiny pacientů s nálezem thymomu se nacházejí **protilátky antistriální (ScMAb)**, které způsobují

postižení svalových vláken s mikroskopickým nálezem lymforhagií. Tyto protilátky reagují s epitopy na svalových bílkovinách titinu, ryanodinového receptoru, kortaktinu a dalších, a dle některých autorů mohou korelovat se závažností myasthenia gravis (Romi et al., 2005).

Klasifikace MG zahrnuje jednak povahu protilátek, věk nástupu onemocnění a zapojení thymu (Tabulka 1). MG je prototyp autoimunitního onemocnění s přítomností receptorově specifických protilátek.

Tab. 1 Klinicko-patologická charakteristika autoprottilátek u MG

	AChR	MuSK	Lrp4
Věk manifestace	EOMG: F > M (9:1!) LOMG: F = M	EOMG: F > M	EOMG: F < M
Stupeň postižení	OMG + GMG	hlavně těžší formy	střední
Patologie thymu	FH (65 %) Thymom 10 – 20 %	FH < 10 %	FH: 30 %
Korelace titru Ab se stupněm postižení	ne	Ano	?
Odpověď na IChE	dobrá	Variabilní	dobrá
Odpověď na IS	dobrá	velmi dobrá	dobrá
Odpověď na TE	Dobrá u EOMG	Není	?

Ab: protilátky, AChR: acetylcholinový receptor, IChE: inhibitory acetylcholinesterázy, IS: imunosupresiva, TE: thymektomie, MuSK: svalově specifická tyrozin kináza, Lrp4: nízkodenzitní lipoprotein 4, EOMG: early onset, LOMG: late onset, OMG: okulární MG, GMG: generalizovaná MG, FH: folikulární hyperplazie

Od těchto nálezů (imunopatogeneze; typ protilátek; morfologický nález v oblasti mediastina) se odvíjí i imunopatogenetická klasifikace MG.

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

Je to nejlépe prozkoumaný fenotyp onemocnění. Je charakterizován výskytem protilátek proti AChR a folikulární hyperplázií thymu. Vyskytuje se u pacientů do 45 let věku, častěji u žen. Může se jednat o čistě okulární formy MG nebo formy generalizované. Velmi dobře reaguje na léčbu, zejména thymektomií. Rozvoj a udržování autoimunitního zánětu je u této formy MG vázán na thymus, kde jsou přítomna germinativní centra, v nichž dochází ke stimulaci autoreaktivních T a B lymfocytů, které se transformují v plazmatické buňky. Ty produkují protilátky proti AChR na postsynaptické membráně nervosvalové ploténky.

b) SPMG s pozdní manifestací

Tato forma je asociovaná s makroskopickým a histopatologickým nálezem involvovaného, atrofického thymu a vzniká ve věku nad 45 let. Je 2-krát častější jako SPMG asociovaná s hyperplázií thymu. V atrofických thymech se jen zřídka zjišťují ojedinělé germinativní centra a proto dle některých autorů je thymektomie u těchto pacientů obvykle neúčinná (Newsom-Davis, 2007; Sommer et al., 2008). Předpokládá se účast periférních (extrathymických) autoimunitních mechanismů v imunopatogenezi SPMG se vznikem ve vyšším věku.

c) MG asociovaná s thymomem (MGAT)

Thymomy mají při vzniku MGAT přímý patogenní význam, proto se tato forma označuje jako paraneoplastická MG (Rothstein et al., 2005). Přibližně 10-15% pacientů s MG má thymom. Většina pacientů má přítomné protilátky proti AChR (MGAT proto patří v naprosté většině případů k séropozitivním formám MG) a nikdy nemají protilátky proti MuSK. Většina pacientů má v séru

přítomné ScMAb. Pacienti s thymomem se kromě MG mohou manifestovat širokým spektrem většího počtu autoimunitních nemocí, nejčastěji autoimunitní onemocnění štítné žlázy, revmatoidní artritida, z autoimunitních neurologických chorob se v této asociaci vyskytují polymyositida, získaná neuromyotonie, Morvanův syndrom, Lambert-Eatonův myastenický syndrom (LEMS), chorea, limbická encefalitida, stiff-person syndrom, senzomotorické neuropatie. Paraneoplastická autoimunitní onemocnění se většinou manifestují jako první a vedou k určení diagnózy thymomu (nejčastěji MG, která vede k dg. thymomu až u 90-95% pacientů s MGAT), protože thymom často ani při větších rozměrech nezpůsobí klinicky manifestní lokální příznaky (Tormoehlen a Pascuzzi, 2008). Někdy je problematické odlišit, zda jde o pravý paraneoplastický syndrom nebo náhodnou koincidence dvou onemocnění. Výskyt thymomu a klasických onkoneurálních protilátek svědčí pro paraneoplastickou etiologii (Vernino a Lennon, 2003). Klinický obraz MGAT je podobný jako při ostatních formách MG s výjimkou toho, že lokalizovaná okulární forma se v asociaci s thymomem vyskytuje vzácně. Podle některých autorů je intenzita klinických projevů a prognóza při MGAT závažnější než u nethymomatózních forem MG (Papatestas et al., 1987, Romi et al., 2003).

d) SNMG s protilátkami proti MuSK

U těchto nemocných nebývají prokázány protilátky proti AChR, není přítomen thymom a nejsou prokazatelné u okulární formy onemocnění. Tito nemocní mají těžší formy onemocnění a jsou častěji refrakterní ke klasické léčbě než jiné formy generalizované MG. Klinicky je dominantní postižení bulbárního svalstva, častější recidivy a větší tendence k manifestaci myastenické krize. Histologické nálezy thymu nevykazují známky folikulární hyperplazie ani jiné patologické nálezy, v patogenezi se uplatňují extrathymické mechanismy (Leite et al., 2005). Existuje i experimentální model onemocnění a popsán pasivní přenos z krve matky na novorozence (Shigemotto et al., 2008, Behin et al., 2008). Pacienti se SNMG a autoprotiátkami proti MuSK tvoří přibližně 7% z celkového počtu pacientů s MG, ženy jsou 4x častěji postižené než muži (Wolfe et al., 2007). Existují 3 klinické typy: 1.typ - generalizovaná MG s výraznou okulobulbární slabostí, častá je atrofie jazyka, pletencové a končetinové svalstvo je postiženo méně výrazně; 2.typ - generalizovaná MG s dominantním postižením šíjového, ramenného a respiračního svalstva; 3.typ - klinický obraz je identický se SPMG.

e) SNMG s protilátkami proti Lrp4

Nejnovější imunopatologická jednotka, protilátky byly objeveny v r. 2011 (Higuchi et al., 2011). Klinický fenotyp těchto pacientů bohužel zatím není dobře definován. Je popsán velmi dobrý terapeutický efekt pyridostigminu, což může být společný rys u anti-Lrp4 pozitivních pacientů, i když to musí být potvrzeno ve velkých sériích. Zajímavé bylo zjištění, že po thymektomii byla na brzlíku detekována folikulární hyperplazie.

f) Séronegativní MG (SNMG)

Nepřítomnost jakýchkoliv protilátek při klinických známkách MG (buď čistě okulární nebo generalizovanou formou onemocnění) s typickým elektrofyziologickým nálezem svědčí pro tento typ MG. U těchto tzv. trojitě séronegativních pacientů (anti-AChR negat., anti-MuSK negat., anti-Lrp4 negat.) se předpokládá výskyt nízkoafinitních protilátek proti AChR, které nejsou detekovatelné současnými vyšetřovacími metodami (Leite et al., 2008). U těchto nemocných byly prokázány patologické nálezy thymu – folikulární hyperplazie s germinativními centry a infiltrovanými B buňkami, podobně jako u SPMG (Hayashi et al., 2007). Léčebná plazmaferéza, imunosupresivní terapie a často i thymektomie přináší zlepšení klinického stavu, což svědčí pro autoimunitní etiologii této skupiny MG. U některých pacientů se dokonce vyskytují nízkoafinitní protilátky proti AChR aktivované komplementem (Leite et al., 2008).

1.2.4. Účast jednotlivých subpopulací lymfocytů na imunopatogenezi MG

1.2.4.1. T lymfocyty – buněčná odpověď specifické imunity

T lymfocyty získávají svojí konečnou morfológico-funkční podobu v thymu, kde jsou vybaveny T buněčným receptorem. Představují heterogenní populaci a na základě rozdílného antigenového receptoru (TCR) se dělí na subpopulaci s $\alpha\beta$ (95%) a s $\gamma\delta$ (5%) receptorem.

$\alpha\beta$ T lymfocyty se dále dělí na tři základní populace – pomocné (tzv. helpery, Th), cytotoxické (Tc) a přirozeně regulační (Treg). Nejvýznamnější je ich rozlišování na podkladě tzv. CD-znaků. Celou populaci $\alpha\beta$ T lymfocytů charakterizují znaky CD2 a CD3; jejich Th subpopulaci ještě navíc charakterizuje znak CD4, cytotoxické T lymfocyty CD8 a Treg CD25. Vzájemný poměr Th a Tc lymfocytů je geneticky regulovaný a za fyziologických okolností se v periferní krvi u zdravého člověka pohybuje přibližně v poměru 1,5:1.

Pomocné CD4⁺ T lymfocyty stimulují svými působky proliferaci specifických T lymfocytů, B lymfocytů (které se diferencují v buňky produkující protilátky), CD8⁺ buněk a přirozených zabíječů (natural killers) – NK buněk. Antigen je těmto buňkám prezentován ve spojení s molekulou MHC II. třídy. Podle cytokinové produkce rozeznáváme Th1 a Th2 subpopulaci pomocných T lymfocytů, které mají odlišné funkce (Yates et al., 2000). V posledních letech byly rozpoznány i funkce Th3 a Th17 buněk a v souvislosti s rozvojem autoimunity i Treg bunky (Kolls a Linden, 2004). Th1 buňky produkují prozánětlivé cytokíny, především interferon gamma (IFN- γ) a interleukin-2 (IL-2), které aktivují antigen prezentující buňky (APC) a facilitují další imunitní odpověď (Romagnanni, 1999). Th1 buňky dále produkují tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) a různé další cytokiny, které působí jako růstové a diferenciacní faktory pro B lymfocyty s následnou tvorbou imunoglobulinů. Th2 subpopulace produkuje protizánětlivé interleukiny IL-4, IL-5 a IL-13, které snižují aktivitu Th1 buněk. Současně však prostřednictvím IL-4 a IL-10 stimulují protilátkovou odpověď aktivací B buněk.

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). Studie, které využívají model buněčného přenosu u experimentální autoimunitní myasthenia gravis (EAMG), ukazují stěžejní roli AChR specifických CD4⁺ T buněk na rozvoj EAMG. 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). Po transplantaci fragmentů thymu nebo směsi lymfocytů od pacientů s MG produkují myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (severe combined immunodeficiency, SCID) protilátky proti lidským AChR a manifestuje se u nich myastenická slabost. Tyto nálezy prokazují, že autoreaktivní CD4⁺ T buňky jsou nezbytně nutné pro produkci patogenních protilátek proti AChR (Wang, 1999).

Dnes jsou ve vztahu k autoimunitě také zmiňovány buňky s označením Th17, charakterizované produkcí interleukinu 17. Je to nezávislá linie CD4⁺ buněk. Jejich role spočívá v autoimunitní patologii zprostředkované T buňkami a komplement fixujícími protilátkami v případech, kdy je potlačena funkce Th1 buněk (Damsker et al., 2010).

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). Termín "regulační T buňky" popisuje řadu T buněk, které mají imunosupresivní funkce (supresorické T buňky). Snížení buněčné aktivity Treg je popisována u pacientů s různými autoimunitními onemocněními (Sakaguchi et al., 2008). Tak např. funkční aktivita cirkulujících CD4+CD25+ T buněk byla u pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) nižší ve srovnání se zdravými kontrolami (Viglietta et al., 2004). Jejich mechanismus účinku ochrany organismu před T lymfocyty zprostředkovanými autoimunitními nemocemi je buď přímý inhibiční účinek na B lymfocyty nebo nepřímo přes inhibici diferenciací T pomocných lymfocytů (Bystry et al., 2001; Shevach, 2002)

Vzhledem k faktu, že CD4+CD25+ regulační T buňky jsou thymického původu a hrají důležitou roli při rozvoji autoimunitních onemocnění, je zajímavé zkoumat jejich role v patogenezi MG. 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 lymfocyty jsou zapojeny do zastavení destruktivního účinku zánětlivé odpovědi a udržení vlastní imunotolerance; 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 autoprotiláttek, 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

B lymfocyty se u člověka vyvíjejí v časných embryonálních stádiích z fetální jaterní tkáně, později je zdrojem kostní dřeň. Zralý B lymfocyt exprimuje povrchový B buněčný receptor (BCR).

Základními markery jsou molekuly CD19 a CD20 (Abbas a Lichtman, 2005).

B lymfocyty stimulované antigenem se za vhodných podmínek (především spolupráce s pomocnými Th lymfocyty) pomnoží a diferencují se v konečné stadium, které představuje plazmatická buňka (plazmocyt). Plazmatická buňka secernuje imunoglobuliny extracelulárně a je hlavním producentem protilátek v lidském organismu. Plazmatické buňky již neexprimují typické B lymfocytární markery CD19 a CD20, ale naopak exprimují molekuly CD38 a CD138 (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). Poměrně typický nález, který svědčí pro účast humorálních mechanismů v imunopatogenezi MG, je výskyt germinálních center v thymu. Zvýšené hladiny estrogenu nebo prolaktinu pravděpodobně umožňují autoreaktivním B buňkám vyhnout se mechanismům tolerance, hromadit se a v dostatečném počtu způsobit autoimunitní onemocnění. Senzibilizované autoreaktivní B lymfocyty produkují protilátky zejména proti AChR. Wang et al zjistili, že u pokusných hlodavců s EAMG se buňky secernující autoprottilátky nacházejí v lymfatických uzlinách, slezině a thymu a přednostně jsou produkovány proti nativnímu AChR a to hlavně α -podjednotce (Wang et al., 1993). Kromě toho, u pacientů s MG se prokázaly důkazy o klonální expanzi B lymfocytů ve srovnání s kontrolami (Vrolix et al., 2014). Aktivační faktory B lymfocytů [APRIL (proliferaci indukující ligand B lymfocytů) a BAFF (B-cell activating factor)] jsou TNF-like chemokiny, které podporují přežití a diferenciaci B buněk. Zvýšené sérové hladiny BAFF a APRIL můžeme najít u několika typů autoimunitních onemocnění - systémový lupus erythematoses (SLE), diabetes mellitus 1. typu (DM I. typu), RS, ale i u MG (Kim et al., 2008). Inhibitory BAFF nebo BAFF/APRIL byly již úspěšně použity u myšího modelu několika autoimunitních nemocí (Davidson, 2010).

Bylo prokázáno, že belimumab, monoklonální protilátka, která neutralizuje BAFF, je účinná v léčbě SLE a a rovněž již byla za tímto účelem schválena (Berrih-Aknin et al., 2013). Fáze II klinické studie ověřující bezpečnost a klinický efekt u MG v současné době probíhá.

V souvislosti s lymfocytárními subpopulacemi je ve vztahu k autoimunitním nemocem zmiňován ještě antigen CD5. Tento antigen je exprimován na subpopulaci B lymfocytů (s dominující produkcí interleukinu IL-10) a dále na T lymfocytech. U EAMG se ukázalo, že exprese CD5+ lymfocytů byla

výrazně vyšší než u control (Lee et al., 1999), ale na druhou stranu nebyly podány přesvědčivé důkazy o závislosti mezi hladinou CD5+ buněk a produkcí protilátek proti AChR u MG (Araga et al., 1995).

1.2.4.3. Cytokiny

Leukocyty a jiné typy buněk produkují solubilní proteiny nebo glykoproteiny, nazývané cytokiny, které slouží jako chemické nástroje komunikace mezi buňkami. Jsou to proteiny imunitního systému, které modifikují biologickou odpověď. Cytokiny koordinují spolupráci přirozené a specifické imunity a rovněž imunity humorální a buněčné. Pro potřeby této práce byly vybrány cytokiny s nejjednoznačnějším vztahem k autoimunitnímu procesu, byť z výše uvedeného vyplývá, že každý cytokin svým zapojením může určitou roli v autoimunitním zánětu sehrát.

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. Z toho vyplývá, že nerovnováha jednotlivých subpopulací pomocných T lymfocytů hraje u EAMG významnou roli a že patogenetické mechanismy související s produkcí IL-17 mohou představovat potenciální terapeutické cíle (Mu et al., 2009).

U pacientů s MG byly prokázány zvýšené hladiny IL-17 (Roche et al., 2011) a rovněž u paraneoplastické formy MG byla popsána zvýšená frekvence výskytu IL-17 produkujících CD4+ T lymfocytů, která dokonce korelovala s hladinami protilátek proti AChR (Wang et al., 2012). Zvýšená produkce IL-17 byla také popsána u folikulární hyperplasie při SPMG (Cordiglieri et al., 2014). Podle nejnovějších poznatků IL-17 produkující CD4+ T lymfocyty přispívají ke ztrátě tolerance B lymfocytů u EAMG (Schaffert et al., 2015).

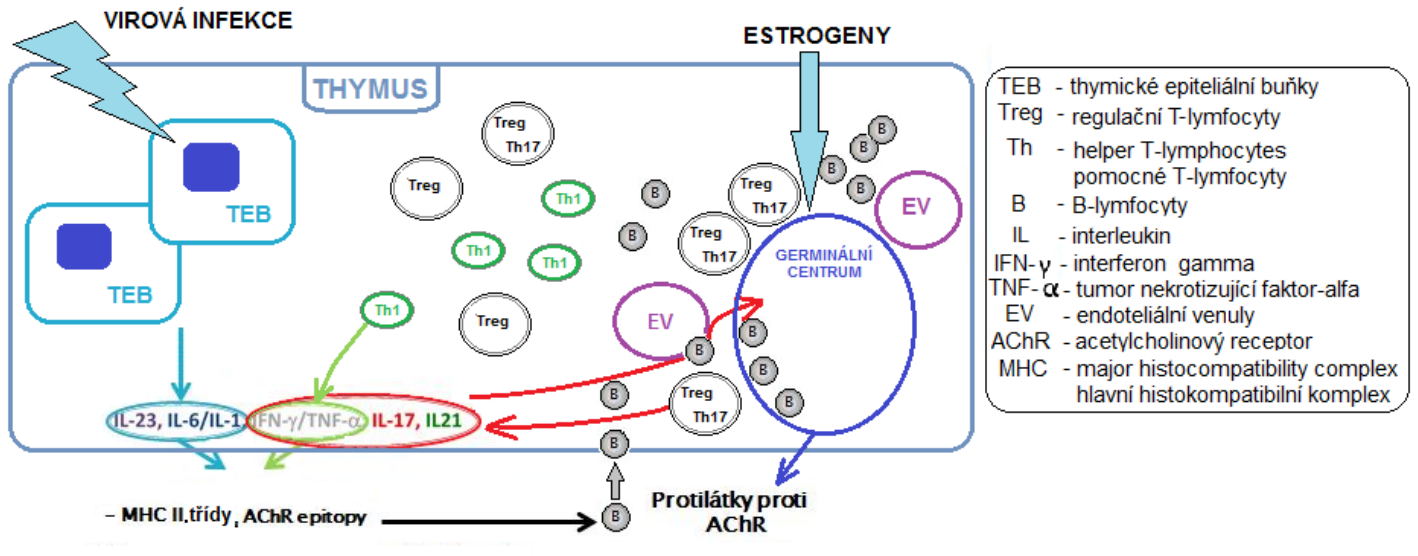
Chronický zánět přítomný v thymech pacientů s MG, který zahrnuje řadu cytokinů, jako je TNF- α , IL-17 a IFN- γ zřetelně přispívá ke snížení počtu Treg buněk a dysregulaci jejich imunopresivní

aktivity. V mechanismu této chronické imunitní aktivace hrají výše popisované cytokiny ústřední roli (Berrih-Aknin a Le Panse, 2014).

TNF- α je produkován stimulovanými monocyty/makrofágy, T lymfocyty a B lymfocyty, NK buňkami, a dalšími buněčnými subpopulacemi. TNF- α je silná prozánětlivá molekula a klíčová signální molekula v imunitní odpovědi, která je indukována po infekci nebo po poranění. TNF- α hraje klíčovou roli u imunoregulačních poruch pozorovaných u MG. Argumenty podporující tento závěr jsou, že hladina TNF- α je významně zvýšená nejen v celém thymu ale i v séru pacientů s MG a že i pacienti s lehčími formami onemocnění mají vysoké hladiny TNF- α , co naznačuje, že u pacientů s MG je chronický nadbytek TNF- α (Gradolatto et al., 2014). TNF- α snižuje funkci Treg buněk. Anti-TNF- α léčba je úspěšná u mnoha experimentálních modelů autoimunitních chorob včetně EAMG a současně obnovuje supresivní funkce Treg (Valencia et al., 2006).

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. Podporuje tak tvorbu protilátek (je také růstovým faktorem pro plasmocyty). 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). Již dříve bylo prokázáno, že léčba protilátkou anti-IL-6 potlačuje probíhající MG u krys (Aricha et al., 2011). Je zajímavé, že IL6- / IL6- myši jsou rezistentní k indukci EAMG (Deng et al., 2002). Uznání role IL-6 v imunopatogenezi některých autoimunitních onemocnění vedlo k použití monoklonální protilátky proti lidskému IL-6 receptoru (tocilizumabu) pro léčbu revmatoidní artritidy, juvenilní idiopatické artritidy a Castlemanovy nemoci. Klinické účinky této léčby u pacientů s MG nejsou známy, zatím nebyl použit v klinických studiích. Jeden experimentální model prokázal, že léčba anti-IL-6 protilátkou potlačuje probíhající EAMG prostřednictvím mechanismů, které zahrnují inhibici Th1, Th17 buněk a posléze i B buněk (Aricha et al., 2011).

Schématické znázornění účasti jednotlivých imunitních komponent na imunopatogenezi MG je na obr.3.



Obr.3 Účast thymu, subpopulací lymfocytů a intracelulárních cytokinů na imunopatogenezi MG (upraveno podle Berrih-Aknin a Le Panse, 2014)

1.2.5. Asociace MG s jinými autoimunitními chorobami

Je popsána řada autoimunitních chorob, které se vyskytují společně s MG a byl to i jeden z časných nepřímých důkazů o autoimunitní etiologii MG. Až 15-20% pacientů s MG má přidružené jedno nebo i více autoimunitních onemocnění (Špalek et al., 2004) např. tyreopatie, revmatoidní artritidu (RA), SLE, asthma bronchiale, dále polymyositidu, RS a jiné, vzácnější autoimunitními choroby nervového systému (např. neuromyelitis optica, neuromyotonie). Asociace MG s těmito onemocněními může způsobovat značné diagnostické rozpaky a vyžaduje důsledný terapeutický manažment. V našem myastenickém centru jsme popsali kazuistiku pacienta s výskytem myasthenia gravis, Castlemanovy choroby, pemphigus vulgaris a antifosfolipidového syndromu a rovněž jsme objasnili pravděpodobné imunopatogenetické pozadí koexistence těchto čtyř klinických jednotek (Jakubíková et al., 2013; viz. kap. 3.5).

1.3. Klinická symptomatika MG

Anamnéza a klinický obraz zahrnuje slabost a unavitelnost příčně pruhovaného svalstva rozličné a často měnlivé lokalizace. Neurologické vyšetření nevykazuje poruchy reflexů, citlivosti či jiné konkrétní neurogenní či myogenní postižení. Anamnestické údaje a výše uvedený klinický obraz, který nelze vysvětlit jinou příčinou, např. metabolickou poruchou, iontovou dysbalancí, endokrinopatií,

hematologickým nebo nádorovým onemocněním, je vysoce suspektní z MG. 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. Nejčastější příčinou manifestace či zhoršení MG jsou respirační infekce, stres, podání rizikových léků, očkování nebo operační zátěž. U žen může dojít ke zhoršení v souvislosti s těhotenstvím, nejčastěji v puerperiu nebo i v souvislosti s menstruací. Základním projevem choroby je svalová slabost a snadná unavitelnost po silovém výkonu. Slabost může být omezena na několik svalových skupin, zvláště okohybných (ptosa, diplopie), dále svalů žvýkacích nebo polykacích. Může být však lehce progresivní průběh s postižením dalších svalových skupin včetně svalů končetinových a dýchacích. 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. Mortalita souvisí spíše s komplikacemi u polymorbidních pacientů, morbidita má nesporně narůstající tendenci, což přináší závažné socioekonomické problémy.

Z prvotních iniciálních příznaků je významná okohybná (průměrně u 62% nemocných) a orofaryngeální symptomatika (17%), zejména slabost maseterů. Méně často se vyskytuje iniciální symptomatika proximální končetinové slabosti, především na HK (10%) nebo projevy celkové generalizované únavy (jen 3%).

Kolem 20% nemocných trpí fokální formou, nejčastěji tzv. okulární myastenii (Meriggioli a Sanders, 2009) se slabostí extraokulárních svalů s projevy ptózy a/nebo diplopie. Tyto svaly mají větší množství nervosvalových plotének s malým počtem svalových vláken v jedné motorické jednotce, co vysvětluje jejich snadnější unavitelnost. Časté je asymetrické postižení vícečetných extraokulárních svalů. 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. Faciobulbární slabost může být až život ohrožující vzhledem k riziku aspirace. Klinické příznaky se projevují dysfagií, dysarthrií charakteru rinolalie, slabostí šíjového svalstva (přepadávání hlavy - dropped head syndrome) a myasthenickou hypomimií. Facies myasthenica, popisována jako charakteristický symptom myastenie, je relativně vzácným příznakem, kdy pozorujeme hypomimii s asymetrickou pseudoparézou nervus facialis (Meriggioli a Sanders, 2009). Progrese oslabení faciobulbárního svalstva hrozí rozvojem myasthenické krize. Klesá-li

forsírovaná vitální kapacita (FVC) pod 1000ml, je vývoj myastenické krize pravděpodobný, zejména v situaci, kdy vážně možnost odkašlání hlenů. V naprosté většině případů je myastenická krize vyvrcholením progresu generalizované svalové slabosti, respirační selhání ale může být i prvním příznakem onemocnění (Alshekhlee et al., 2009). Slabost paží, prstů nebo proximálních svalů dolních končetin bývá iniciálním příznakem zejména u mladších pacientů. Vzácně se můžeme setkat s tzv. „limb girdle” myastenii (Rodolico et al., 2002).

Z hlediska průběhu onemocnění lze u MG pozorovat několik charakteristických vzorců. Kolem 20% pacientů dosáhne během prvních 2 let trvání choroby tzv. kompletní stabilní remise bez nutnosti další farmakologické léčby. Jedná se hlavně o pacienty SPMG s časnou manifestací po provedení thymektomie s nálezem folikulární hyperplazie thymu. U další skupiny pacientů lze dosáhnout klinické remise s nutností farmakologické léčby, ale s přítomností sporadických exacerbací. U části nemocných zůstává trvalé klinické residuum se závislostí na trvalé medikaci a zbytek pacientů je refrakterních ke klasické léčbě s častými exacerbacemi a vysokým rizikem myastenické krize. Ve skupině refrakterních pacientů je vysoké zastoupení nemocných s thymomem a protilátkami proti MuSK.

1.4. Diagnostika MG a hodnocení neurologického nálezu

1.4.1. Hodnocení neurologického nálezu

Heterogenní charakter nemoci komplikuje diagnostické procesy, ale zejména terapeutické možnosti. Diagnostika se opírá o důkladnou anamnézu, klinické neurologické vyšetření, které v případě neprokázání centrální nebo periferní léze nutno doplnit myologickým vyšetřením, které spočívá zejména v demaskování latentní svalové slabosti a to provedením statických či dynamických svalových testů. Speciální provokační nebo reparační testy jsou prvním krokem ke stanovení diagnózy MG, zejména pokud se jedná o onemocnění s typickou prezentací. Zátěžové a provokační testy mají za cíl manifestovat subklinickou svalovou slabost. Velmi citlivým se ukazuje např. Simpsonův test, kdy dochází k akcentaci oslabení extraokulárních svalů při usilovném pohledu vzhůru, či Gorelickův test, u kterého pasivním zdvižením více pokleslého víčka dojde k manifestaci ptózy na druhém oku. “Ice pack” test spočívá v tom, že na zavřené ptotické víčko přiložíme kostku zabaleného ledu a po minutě pozorujeme zlepšení ptózy. U Coganova “lid twitch” testu pacient 30 sekund fixuje pohled dolů a následně rychle cílí pohled přímo. Dojde ke zlepšení ptózy, která se ale následně vrací do původního

stavu. Seemanův test je založen na zvýraznění poruchy artikulace při hlasitém počítání.

Farmakologický reparační test s podáním neostigminu by měl vést u pacientů s MG k výraznému zlepšení jak subjektivní slabosti, tak objektivního neurologického nálezu. Klinické testy se provádějí v klidném prostředí s konstantní teplotou. 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 myastenické skóre (QMGS) k hodnocení neurologického nálezu u pacientů s MG (Jaretzki et al., 2000).

Tab. 2 Kvantitativní skóre myasthenia gravis (QMGS) dle MGFA

Stupeň	0	1	2	3
Dvojité vidění při pohledu do strany (sek.)	61	11-60	1-10	Spontánně
Ptóza (pohled vzhůru) sek.	61	11-60	1-10	Spontánně
Mimické svaly (musculus orbicularis oculi)	Normální síla při zavírání očí	Úplně zavře, určitá slabost, schopen odporu	Úplně zavře, není schopen odporu	Nezavře úplně
Polykání (1 dcl vody)	Normální	Minimální kašel	Těžký kašel, zaskakování, nosní regurgitace	Neschopen polknout
Hlasitá řeč (počítá do 50 (začátek dysartrie)	Žádná	30-49	10-29	do 9
Rozpažení PHK (90 st., vsedě), sek.	240	90-239	10-89	0-9
Rozpažení LHK (90 st., vsedě), sek.	240	90-239	10-89	0-9
FVC, % tabelované hodnoty	80 a více	65-79	50-64	Pod 50
Stisk PHK (kg) muž žena	45 a více 30 a více	15-44 10-29	5-14 5-9	0-4 0-4
Stisk PHK (kg) muž žena	45 a více 30 a více	15-44 10-29	5-14 5-9	0-4 0-4
Stisk LHK (kg) Muž Žena	45 a více 30 a více	15-44 10-29	5-14 5-9	0-4 0-4
Zvedání hlavy vleže (45 st.), sek.	120	30-119	1-29	0
PDK elevace vleže (45 st.), sek.	100	31-99	1-30	0
LDK elevace vleže (45 st.), sek.	100	31-99	1-30	0

(minimum 0, maximum 39 bodů)

Legenda:

FVC „Forced vital capacity“ – usilovná vitální kapacita

LDK Levá dolní končetina

LHK Levá horní končetina

MGFA Myasthenia Gravis Foundation of America

PDK Pravá dolní končetina

PHK Pravá horní končetina

QMGS Kvantitativní skóre myasthenia gravis

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).

Tab. 3 Klasifikace MG dle MGFA

Stupeň	Popis		
I	Oslabení očních svalů, možné oslabení uzávěru víčka, nevyskytuje se oslabení jiných svalů		
II	Oslabení očních svalů jakékoliv intenzity, lehké oslabení ostatních svalů	IIa	Převaha oslabení svalů končetin a axiálních
		IIb	Převaha oslabení bulbárních a/nebo respiračních svalů
III	Oslabení očních svalů jakékoliv intenzity, střední oslabení ostatních svalů	IIIa	Převaha oslabení svalů končetin a axiálních
		IIIb	Převaha oslabení svalů bulbárních a/nebo respiračních
IV	Oslabení očních svalů jakékoliv intenzity, těžké oslabení ostatních svalů	IVa	Převaha oslabení svalů končetin a axiálních
		IVb	Převaha oslabení svalů bulbárních a/nebo respiračních
V	Intubace pro myastenickou krizi		

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.

1.4.2. Elektrofyzilogické vyšetření – elektromyografie (EMG)

Elektrofyzilogické vyšetření je třeba provést vždy v případě negativního nálezu protilátek, ale doporučuje se ho provést i při každém podezření na MG. U generalizované MG se doporučuje začít nízkofrekvenční RSMN 2-3 Hz, vyšetřit alespoň 2, při nejednoznačném nálezu 3 svaly/nervy.

Senzitivita u generalizované formy MG je 70-80%. Nejvýběžnější je vyšetření proximálních svalů a je výhodné, když jde o sval klinicky oslabený (např. musculus anconeus, trapezius, deltoideus).

Patologický je dekrement nad 10%, pokud je konstantní, reprodukovatelný a s charakteristickým vzorcem. Při pozitivním nálezu dekrementu je vhodné provést izometrickou kontrakci a zhodnotit postaktivační facilitaci. Při negativním klidovém dekrementu je možno použít déletrvajíc (1 min.) izometrickou kontrakci k event. průkazu postaktivační exhausce.

Při negativním nálezu repetitivní stimulace je nutné doplnit SF EMG. U okulární nebo faciobulbární formy MG je vhodné začít vyšetřením SF EMG z m. orbicularis oculi nebo z m. frontalis a při negativním nálezu doplnit SF EMG u m. extensor digitorum communis; při negativním nálezu doplnit RSMN mimických svalů/n.facialis. Zjištěné abnormality je nutné vždy hodnotit v korelaci s klinickým obrazem a výsledky dalších paraklinických testů.

1.4.3. Vyšetření autoprotilátek

Mezi rutinní vyšetření patří stanovení protilátek proti AChR (Ab-AChR), protilátek proti MuSK (Ab-MuSK) a antistriatálních protilátek (ScMAb). V České republice se zatím anti-Lrp4 protilátky standardně nevyšetřují. Ab-AChR a Ab-MuSK jsou natolik specifické pro diagnózu MG, že je vhodné jejich vyšetření řadit jako první krok v diagnostickém schématu. V praxi se provádí vyšetření Ab-AChR radioimunoanalýzou (RIA). Princip spočívá v precipitaci svalového AChR, který je označen navázaným α -bungarotoxínem (specifický cholinergní antagonist). Zdrojem AChR jsou lidské svaly nebo kultury lidských myofibril. Protilátky buď soutěží o vazebná místa acetylcholinu (ACh) nebo alostericky inhibují značený α -bungarotoxín na AChR (Vincent, 2008). Vyšetření Ab-MuSK je kvůli

odlišnému fenotypu onemocnění důležité nejen z hlediska diagnostického, ale i terapeutického, protože tito pacienti neprofitují z thymektomie, zato se musí časně nasadit adekvátní imunosupresivní terapie. ScMAb se v 80% vyskytují v asociaci s thymomem, mohou přetrvávat i po chirurgickém odstranění thymomu (Romi et al., 2005).

1.4.4. Radiodiagnostika

U jisté diagnózy MG je nutné provést CT mediastina k vyloučení thymomu. Thymom se většinou zobrazuje jako solidní kulovitý stín retrosternálně, často se propagující laterálně, někdy může být kalcifikovaný. Metastázy thymomu jsou nejčastější na perikardu a pleuře. CT dokáže odlišit invazivní a neinvazivní thymom. Po chirurgické exstirpaci thymomu je nutné provádět kontrolní CT mediastina k vyloučení časných nebo pozdních recidiv thymomu. Ve sporných případech může situaci objasnit pozitronová emisní tomografie (PET). U mladších pacientů s MG můžeme pozorovat folikulární hyperplasii, zmnožení tukové tkáňe mediastina je zase typické pro pacienty nad 45 let věku.

1.4.5. Diagnostická kritéria MG

Americká neurologická akademie (AAN) navrhla “Diagnostická kritéria získané autoimunitní MG”, které zohledňují klinické a laboratorní parametry (Sanders, 2004).

DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA PODLE AAN

A. Definitivní MG

Anamnéza svalové slabosti a unavitelnosti a klinické vyšetření, které je normální, kromě slabosti, která neodpovídá anatomické lokalizaci parézy jednoho, nebo více periferních nervů **plus**:

- alespoň 1 ze dvou následujících kritérií:
 - a) pozitivníprotilátky proti AChR nebo anti MuSK nebo
 - b) dekrement při RSMN nebo zvýšený jitter při SF EMG bez elektrofyziologických známek neurogenní, či myogenní léze

nebo

- 3 z následujících kritérií:
 - a) anamnéza svalové slabosti a unavitelnosti, která se akcentuje po zátěži a zlepšuje se po odpočinku
 - b) pozorované změny v lokalizaci svalové slabosti v průběhu choroby
 - c) pozorované zlepšení po odpočinku, či v chladu, zhoršení po fyzické zátěži

- d) zlepšení objektivního nálezu (např. ptózy, artikulace, elevace HK) po podání IChE parenterálně, nejlépe i. v. aplikací Syntostigminu
- e) evidentní zlepšení po podání perorálních IChE
- f) pozorované zlepšení po plazmaferéze (PF), intravenózních imunoglobulinech (IVIG), kortikoidech nebo imunosupresivech (IS)

B. Pravděpodobná MG

Anamnéza svalové slabosti a unavitelnosti a klinické vyšetření, které neodpovídá anatomické lokalizaci parézy jednoho, či více periferních nervů a neodpovídá plně kritériím definitivní MG plus alespoň

2 z následujících kritérií:

- a) anamnéza svalové slabosti a unavitelnosti, která se akcentuje po zátěži a zlepšuje se po odpočinku
- b) pozorované změny v lokalizaci svalové slabosti v průběhu choroby
- c) pozorované zlepšení po odpočinku, či v chladu, zhoršení po fyzické zátěži
- d) evidentní zlepšení po podání IChE parenterálně, nejlépe i. v. aplikací Syntostigminu
- e) evidentní zlepšení po podání perorálních IChE
- f) pozorované zlepšení po PF, IVIG, kortikoidech nebo IS

C. Možná MG

Anamnéza svalové slabosti a unavitelnosti, která plně neodpovídá kritériím definitivní nebo pravděpodobné MG plus alespoň 1 z následujících kritérií:

1. anamnéza svalové slabosti a unavitelnosti, která se akcentuje zátěží a zlepšuje se po odpočinku
2. klinické vyšetření neodpovídá anatomické lokalizaci parézy jednoho, či více periferních nervů, s pozorovaným zlepšením po odpočinku, či v chladu a zhoršením po fyzické zátěži
3. pozorované změny v lokalizaci slabosti v průběhu choroby
4. evidentní zlepšení po podání IChE parenterálně, nejlépe i. v. aplikací Syntostigminu
5. evidentní zlepšení po podání perorálních IChE
6. pozorované zlepšení po PF, IVIG, kortikoidech nebo IS

1.5. Terapie myasthenia gravis

1.5.1. Farmakoterapie myasthenia gravis

Nechirurgická léčba je vedena jako chronická nebo akutní. Dlouhodobá chronická léčba směřuje k navození kompletní stabilní remise (KSR) a akutní léčba má za účel ovlivnit fulminantní průběh onemocnění či myastenickou krizi.

Dále můžeme léčbu MG rozdělit na symptomatickou – inhibitory cholinesterázy – a imunopatogeneticky orientovanou – kortikosteroidy a imunosupresiva.

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. Mezi IAChE patří pyridostigmin (Mestinon), ambenonium (Mytelase), krátkodobě působící neostigmin (Syntostostigmin) nebo dlouhodobě působící distigmin (Ubretid). Tyto léky u pacientů s MG přinášejí okamžitou symptomatickou úlevu. Dávkování je velice individuální dle fyzické zátěže a výrazně vázané na denní aktivity pacienta. Doporučené dávkování je 4-5 mg/kg tělesné hmotnosti, rozdělené do 4-6 dílčích dávek/denně. Hlavní nežádoucí účinky vyplývají z cholinergního efektu, který je dán akumulací ACh na muskarinových receptorech hladkých svalů a žláz s vnitřní sekrecí (průjmy, nausea, zvracení, slinění, slzení, někdy i bronchospasmus) a aktivací svalových nikotinových receptorů (svalové křeče, fascikulace). Ve vzácných případech může dojít až ke cholinergní krizi (depolarizační blokáda se svalovou slabostí), která může vyústit až v respirační insuficienci. Na rozdíl od myastenické krize je přítomen bronchospasmus, mióza a bradykardie. Nutno podat atropin i.v. v dávce 0.5-1 mg.

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. Na počátku léčby se asi u 1/3 pacientů může objevit přechodné zhoršení, které trvá asi týden. Je bezpečnější zvyšovat dávky

kortikosteroidů postupně, hlavně pokud se nasadí nově nebo se dávky zvyšují u relapsu onemocnění. Při tzv. kortikoidové kúře je osvědčeným schématem týdenní podávání dávky 5mg, 2.týden 15mg, 3.týden 30mg a dále cca 6-8 týdnů 60mg/den, při vyšší hmotnosti pacienta i 70-80mg/den. Při jednoznačném efektu léčby je pak možné dávky zvolna snižovat, o 10mg/týden, dávku 20mg ponechat cca 3týdny a pak opět velmi pomalu po 5mg/týden snižovat na udržovací dávku 5-10mg/den. Bolusové podání intravenózního metylprednisolonu (5x500mg), nasledováno sestupnou dávkou prednisonu (1mg/kg t.hm.), volíme zpravidla u nemocných se závažnou slabostí na UPV, kde očekáváme rychlý efekt a nebojíme se již další progresu. Nežádoucí účinky kortikoidů jsou nejčastěji myopatie, osteoporóza, vředová choroba gastroduodenální, deprese, podrážděnost, nespavost, glaukom, katarakta, arteriální hypertenze, hypokalemie, hyperglykemie, zvýšená vnímavost k infekcím. Proto se preventivně podávají H2 antagonisté nebo blokátory protonové pumpy na ochranu žaludeční sliznice, dostatečný příjem kalia, pravidelné měření kostní density. Významným problémem dlouhodobé léčby je steroidní myopatie, která je závislá na kumulativní dávce. Bývá omezena na kořenové svaly a nedochází při ní k typickému cirkadiánnímu kolísání a unavitelnosti. Léčí se snížením dávky kortikoidů na nejnižší účinnou hladinu, dostatkem pohybu a přísunu proteinů ve stravě.

Imunosupresiva

Jsou obecně považována za léky šetřící kortikoidy a měly by být použity vždy, kdy udržovací dávka prednisonu je větší než 20mg denně. Rizika podávání této léčby má svoje úskalí a mezi nejvýznamnější patří snížení fertility, zvýšené riziko nádorového onemocnění a celkové snížení antiinfekční imunity.

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). Další prospektivní randomizovanou studií bylo prokázáno, že azathioprin nejenom signifikantně redukuje dávku kortikoidů potřebnou k udržení remise, ale současně významně redukuje počet relapsů (Witte et al., 1984). Samotné podávání azathioprinu je málokdy efektivní. V průběhu léčby je nutná pravidelná kontrola krevního obrazu a jaterních testů a před nasazením se doporučuje vyšetření aktivity enzymu thiopurin-S-methyltransferázy (TPMT), účastnícího se metabolismu azathioprinu. V evropské populaci existuje cca 11% jedinců, kteří mají jednu funkčně deficitní alelu v genomu způsobující významné snížení

katalytické aktivity enzymu, která následně vede k myelotoxicitě. Doporučená dávka je 2-3mg/kg/den. Terapeutický účinek začíná až po 3 měsících a trvá ještě 2-3 měsíce po vysazení. Mezi časné nežádoucí účinky léčby patří gastrointestinální obtíže, někdy spojené hyperpyrexii. Azathioprin je teratogenní a mutagenní, při podávání ženám ve fertilním věku proto doporučujeme účinnou antikoncepci.

Mykofenolát mofetil (MMF) potlačuje produkci protilátek a buněčnou imunitu a to zvýšením lymfocytární apoptózy, redukcí sekrece TNF- α a zvýšením exprese IL-10. Dávka je 2x1g, účinek nastupuje po 2 týdnech, nejpozději do 2 měsíců. Byly publikovány dvě prospektivní randomizované placebem kontrolované studie, které neprokázaly efekt MMF oproti placebo ani úsporu kortikoidů (Sanders et al., 2008, The Muscle Study Group, 2008). I přesto, že účinnost MMF není jednoznačně dokumentována, je indikován u pacientů s MG netolerujících nebo neodpovídajících na azathioprin. Lék je vysoce teratogenní a nesmí být podáván s azathioprinem pro zvýšené riziko myelosuprese, vhodná je kombinace s kortikoidy. Nežádoucí účinky jsou průjem, zvracení, neutropenie a oportunní infekce. Dlouhodobé podávání je spojeno se zvýšeným výskytem lymfomu (0.4-1%).

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

Intravenózní imunoglobulin (IVIg)

Vysoké dávky IVIg, izolované z plazmy zdravých dárců, se ukázaly jako efektivní u MG na základě ověření randomizovanými kontrolovanými studii (Wolfe et al., 2002) i četnými otevřenými, nekontrolovanými studii. Je lékem volby u myastenické krize či farmakologicky refrakterní myastenie. Dávka je 0.4g/kg/každý den, podává se obvykle 5dnů po sobě. Účinek je většinou krátkodobý (3-4 týdny) a koreluje s biologickým poločasem IVIg. Vedlejší účinky, které vznikají během aplikace (třesavka, bolesti hlavy, někdy vzestup TK), léčíme symptomaticky. Před první aplikací je nutné vyšetřit hladinu imunoglobulinů, protože u IgA deficientních osob hrozí riziko anafylaktické reakce.

Terapeutická plazmaferéza (PF)

Rovněž PF, při které dochází k separaci erytrocytů z plazmy a jejich reinfuzi společně s koloidním roztokem, většinou albuminu zpět do krevního řečiště, příznivě ovlivní průběh MG. Efekt spočívá v eliminaci patologických autoprotilátek. Režim spočívá v aplikaci 3-5 PF obden. PF je indikována ke krátkodobému zlepšení stavu (např. před operací) či k zvládnutí myastenické krize (Gajdos et al., 2009). Efekt PF nastupuje velmi rychle (rychleji než u IVIG, už během 24hodin) a přetrvává 4-10 týdnů (Batocchi et al., 2000) Tato léčba je však zatížena velkým počtem nežádoucích účinků (masivní žilní vstup – sepse, trombóza, pneumothorax, neselektivní odstranění všech krevních bílkovin, hypotenze).

Imunoadsorbcce je alternativou PF, kdy se selektivně odstraňují jen některé třídy imunoglobulinů. Oproti PF je popisováno méně nežádoucích účinků, účinnost je dle některých autorů větší než u klasické PF (Sanders, 2004), je ale finančně náročnější.

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 imunoadsorbcí. Rituximab je monoklonální protilátka proti CD20 znaku na B lymfocytech, která vede k depleci B lymfocytů. Projevila se jako účinná léčba u refrakterních forem SPMG a taky u SNMG s protilátkami proti MuSK (Hain et al., 2006). 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).

Spolu s kortikosteroidy jsou imunosupresiva hlavní pilíře imunomodulační a imunosupresivní léčby MG. Nicméně jejich účinnost a optimální využití jsou stále nejasné. Hart et al identifikovali sedm randomizovaných kontrolovaných studií různých imunosupresiv v léčbě generalizované MG (Hart et al., 2009). Všechny studie byly malé (14-41 účastníků) a design heterogenní. Autoři shrnují, že oproti placebo došlo po jednom roce léčby k signifikantnímu zlepšení pouze u nemocných léčených cyclosporinem A (bez ohledu na současnou léčbu kortikoidy) a cyklofosfamidem s kortikoidy. Nebyly nalezeny spolehlivé důkazy o účinku léčby azathioprinem, MMF nebo tacrolimem.

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 (Piřha et al., 2012). TE není indikována u okulární formy MG a generalizované MG s protilátkami proti MuSK.

Myšlenka na operativní odstranění brzlíku přišla na svět koncem 19. století v souvislosti s poznatkem přítomnosti nádorů brzlíku a zánětlivých histopatologických změn u zemřelých pacientů s MG. První operaci provedl Sauerbruch v r. 1912, u nemocné došlo ke zlepšení, avšak zcela uzdravena nebyla. První pozorování, že TE dokáže pozitivně ovlivnit průběh MG, bylo uskutečněno v roce 1939 poté, co Blalock provedl TE u 21 leté pacientky s MG, která vyústila v dramatické zlepšení stavu (Blalock et al., 1939). Následně publikoval Blalock 6 případů operace brzlíku u pacientů s MG bez thymomu s dvěma úplnými remisemi, třemi částečnými a jedním úmrtím. Myšlenka odstranit thymus u pacientů s MG bez nádoru se stále více prosazovala. Kromě USA a Velké Británie, kde byly prováděny thymektomie standardně a byly publikovány příznivé výsledky, ostatní Evropa zůstávala v operační léčbě MG značně konzervativní až do konce 70. let a publikace větších sestav operovaných jsou výjimečné (Buckberg a Mulder, 1967, Eckmann, 1969). První thymektomii u pacienta s MG bez thymomu provedl v Československu v roce 1948 prof. Jiří Diviš, v následujících letech provedl dalších 15 thymektomií s pooperační mortalitou 20% (Diviš, 1954). Za posledních 50 let uvádí mnoho retrospektivních studií výhody léčby TE u nonthymomatózní MG. V důsledku toho, TE (s nebo bez přítomnosti thymomu) je všeobecně přijímaná jako součást léčby u MG. Dosud ale neexistují nepochybná data ověřená prospektivní kontrolovanou studií, která by prokazovala efekt této léčebné alternativy (Gronseth a Barohn, 2000; Newsom-Davis J et al.; 2008, Wolfe et al. 2003). 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 (Papatestas et al., 1987), každopádně zůstávají otázky v mnoha oblastech, pokud jde o terapeutickou roli TE u nonthymomatózní MG.

U seropozitivní MG, s časnou manifestací s histopatologickým nálezem folikulární hyperplazie s protilátkami anti-AChR, thymus významně přispívá k produkci protilátek a obsahuje germinální centra; nicméně, orgán zodpovědný za produkci autoprottilátek dosud nebyl identifikován u jiných imunopatogenetických typů MG (Berrih-Aknin et al., 2014). Z těchto důvodů efektivita TE u nonthymomatózní MG zůstává stále nejasná.

Dle různých zdrojů vede TE k navození klinické remise MG ve vysokém procentu případů, což umožňuje snížit dávky imunosupresiv. Guillermo et al popisuje, že 52% pacientů mělo dobrou odezvu po TE (Guillermo et al., 2004), ve srovnání s 59% pacientů ve studii Hatton et al (Hatton et al., 1989), 71% myastenických pacientů profitovalo z thymektomie podle Busch et al (Busch et al., 1996) a výrazné klinické zlepšení popisuje až u 87% myastenických pacientů Frist et al (Frist et al., 1991).

Gronseth a Barohn v roce 2000 realizovali systematický přehled kontrolovaných nerandomizovaných studií popisujících výsledky u pacientů s generalizovanou formou MG, kteří buď podstoupili nebo nepodstoupili TE (Gronseth a Barohn, 2000). Zjistili, že ve většině studií byly zjištěny pozitivní asociace mezi TE a klinickou remisí MG .

Odstranění thymu může rovněž zlepšit příznaky MG i u séronegativních pacientů (Mantegazza et al., 2003).

V současné době je považována dlouhodobá konzervativní terapie generalizované MG s mírnou progresí za nesprávný postup, jeho výsledkem je destabilizace choroby. Včasná indikace k thymektomii je jednou z důležitých zásad dnešní péče o myasteniky.

1.5.3. MGFA postintervenční status

MGFA postintervenční status byl vytvořen k vyhodnocení zavedené léčby a je určen k posouzení klinického stavu pacientů s MG (Jaretzki et al., 2000).

Tab. 4 MGFA postintervenční status

Kompletní stabilní remise (KSR)	Žádné subjektivní potíže ani symptomy alespoň jeden rok, bez terapie jeden rok Akceptuje se izolovaná slabost m. orbicularis oculi
Farmakologická remise (FR)	Stejná kritéria, ale pacient je léčen. Nesmí ale brát inhibitory acetylcholinesterázy
Minimální manifestace (MM)	Žádné příznaky funkčního omezení, může být určitá slabost některých svalů.
Změny	
Zlepšen	Podstatný pokles potíží nebo podstatná redukce medikace
Nezměněn	Žádné podstatné změny klinické symptomatiky nebo medikace
Zhoršen	Podstatný nárůst klinických projevů nebo podstatný nárůst medikace
Exacerbace	Pacient, který splňoval kritéria KSR, FR nebo MM, ale následně došlo k rozvoji klinických potíží, které tato kritéria nepřipouští
Smrt z důvodu MG	Pacient zemřel v důsledku MG, v důsledku komplikací léčby nebo do 30 dnů po thymektomii

Legenda:

FR Farmakologická remise

KSR Kompletní stabilní remise

MG Myasthenia gravis

MGFA Myasthenia Gravis Foundation of America

MM Minimální manifestace

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

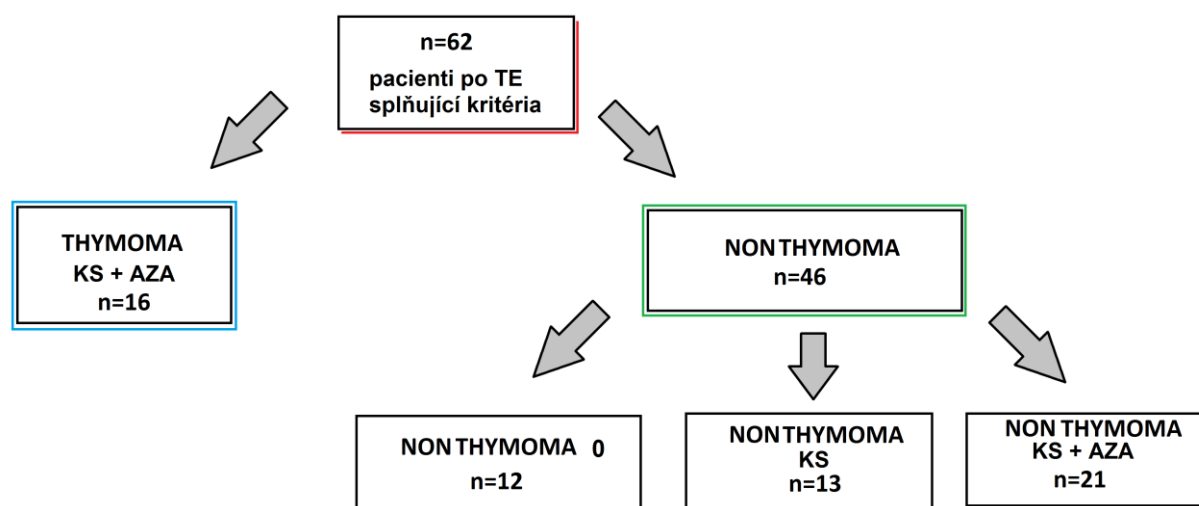
4.1. Soubor thymektomovaných pacientů

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 elektrofyziologické 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 zahájena terapie kombinovanou imunosupresí – tj. kombinací kortikoidů a azathioprinu, proto se tato skupina posuzovala jako jeden

celek; *skupina Thymoma*. Histopatologický nálezn thymomu nebyl u žádného pacienta překvapením, u všech pacientů byl znám již předoperačně z provedených CT snímků mediastina. 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* (b) léčení kortikoidy; *skupina NonThymoma KS* (c) léčení kombinovanou imunosupresí, tj. kortikody a azathioprinem; *skupina NonThymoma KS+AZA*. 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. Schématické znázornění pacientů je na obr. 4



Obr. 4 Schématické znázornění pacientů po TE zařazených do projektu

Celkem 7 pacientů muselo být z projektu vyřazeno a to buď kvůli nedostavení se na kontrolní odběry z osobních nebo zdravotních důvodů (5 pacientů) anebo z důvodu laboratorní chyby a nemožnosti opakovat odběr u daného pacienta (2 pacienti).

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).

4.3.1. Průtoková cytometrie

Povrchové buněčné značení bylo měřeno za použití průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je laboratorní metoda, pomocí které je možno měřit a analyzovat fyzikální (optické) a chemické (fluorescenční) vlastnosti buněk v proudu kapaliny během jejich průchodu laserovým paprskem. Výhodou této metody je, že je možné analyzovat během krátkého času velké množství buněk, určit jejich jednotlivé subpopulace a třídít je podle námi zvolených parametrů .

4.3.1.1. Metoda stanovení lymfocytárních subpopulací

Základní subpopulace lymfocytů (T lymfocyty CD3+ a jejich subpopulace CD4+, CD8+, B lymfocyty CD19+) byly stanoveny rutinní imunofenotypizační metodou pomocí průtokového cytometru FACSCanto a monoklonálních protilátek firmy BD Biosciences. Fixní kombinace CD4/CD25 byla použita pro detekci T regulačních lymfocytů definována jako CD4+CD25high+ (všechny protilátky komerčně dostupné od firmy BD Biosciences). Vzorky periferní krve byly inkubovány v přítomnosti odpovídajících monoklonálních protilátek po dobu 15 minut při pokojové teplotě (20-25° C) ve tmě. Po lyzační a promývací fázi byla provedena šestibarevná průtoková cytometrická analýza na průtokovém cytometru FACSCanto pomocí softwaru FCSDiva 5,03 (BD Biosciences).

4.3.1.2. Metoda stanovení intracelulárních cytokinů

1. 100 ml kultivované krve + 20 ml monoklonální protilátky proti povrchovým antigenům (CD3, CD14) bylo inkubováno 20 minut v temnu za pokojové teploty
2. pro lýzu erytrocytů a fixaci lymfocytů byl přidán lyzační roztok (2 ml) a vše inkubováno 10 minut v temnu za pokojové teploty. Následně byla zkumavka centrifugována (1000 rpm celkem 5 minut) a byl odstraněn supernatant
3. do zkumavky bylo přidáno 500 ml permeabilizačního roztoku, inkubováno 10 minut v temnu za pokojové teploty. Přidán promývací roztok, centrifugováno a opět odstraněn

supernatant

4. přidáno 20 ml příslušné monoklonální protilátky proti intracelulárnímu antigenu, inkubováno 25 minut v temnu při pokojové teplotě. Poté byl vzorek dvakrát promyt promývacím roztokem

5. intracelulární cytokiny byly analyzovány na průtokovém cytometru. T lymfocyty byly ohraničeny pomocí FSC (forward scatter) a CD3; monocyty byly ohraničeny pomocí SSC (side scatter) a CD14.

4.3.2. Reagencie

4.3.2.1. Monoklonální protilátky

Ke značení jednotlivých populací byly použity monoklonální protilátky:

- CD4 APC Cy7
- CD8 PE Cy7
- CD19 APC
- CD3 FITC
- CD4 FITC/ CD25 PE
- TNF α - PE Cy7
- IFN γ -FITC
- IL17-PE

4.3.2.2. Ostatní reagencie a jejich příprava

Kromě monoklonálních protilátek byly použity ještě další reagenci, které byly připraveny k použití přímo od výrobce, nebo se musely před použitím nejdříve připravit.

Tab. 5 Reagencie a jejich příprava

Reagencie	Název	Výrobce	Uchovávání
Mitogen	PHA	Sigma	při 4°C
<i>Příprava zásobního roztoku: rozpuštěním 1 mg lyofilizovaného PHA v 10 ml dH₂O. Roztok se poté rozpipetuje po 25 µl do zkumavek Eppendorf a zamrazí. Příprava pracovního roztoku: ředěním zásobního roztoku pomocí RPMI v poměru 1:100 (tj. 10µl zásobního roztoku + 1000 µl RPMI).</i>			
	PMA	Sigma	při -18°C
<i>Příprava zásobního roztoku: rozpuštěním 1 mg lyofilizovaného PMA v 10 ml DMSO. Roztok se poté rozpipetuje po 10 µl do zkumavek Eppendorf a zamrazí. Příprava pracovního roztoku: ředěním zásobního roztoku pomocí RPMI v poměru 1:100 (tj. 10µl zásobního roztoku + 1000 µl RPMI).</i>			
	BFA	Sigma	při 4°C
<i>Příprava zásobního roztoku: rozpuštěním 5 mg lyofilizovaného BFA v 1 ml DMSO. Roztok se poté rozpipetuje po 10 µl do zkumavek Eppendorf a zamrazí. Příprava pracovního roztoku: ředěním zásobního roztoku pomocí RPMI v poměru 1:10 (tj. 10µl zásobního roztoku + 100 µl RPMI).</i>			
	IO	Sigma	při 4°C
<i>Příprava zásobního roztoku: rozpuštěním 5 mg lyofilizovaného IO ve 2 ml 96% ethanolu. Roztok se poté rozpipetuje po 15 µl do zkumavek Eppendorf a zamrazí. Příprava pracovního roztoku: ředěním zásobního roztoku pomocí RPMI v poměru 1:10 (tj. 10µl zásobního roztoku + 100 µl RPMI).</i>			
kultivační médium	RPMI	Lonza	při 4°C
<i>Dodáváno od výrobce k okamžitému použití.</i>			
lyzační roztok	FACS TM Lysing Solution	BD Biosciences	při 20-24°C
<i>Příprava: ředěním koncentrovaného lyzačního roztoku v poměru 1:9 (tj. 10 ml koncentrátu + 90 ml destilované vody).</i>			
permeabilizační roztok	FACS TM Permeabilizing Solution2	BD Biosciences	při 20-24°C
<i>Příprava: ředěním koncentrovaného permeabilizačního roztoku v poměru 1:9 (tj. 1,4 ml koncentrátu + 36 ml destilované vody).</i>			
promývací roztok (PBS)	pufr Cell WASH	BD Biosciences	při 20-24°C
<i>Dodáváno od výrobce k okamžitému použití.</i>			

PHA – fytohemaglutinin, PMA – forbol myristát acetát, BFA – brefeldin A, IO – kalcium ionofor, RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium, PBS – Phosphate Buffered Saline

4.3.3. Přístrojové vybavení a ostatní pomůcky

4.3.3.1. Přístroje

Tab. 6 Přístroje

Přístroj	Název	Výrobce
inkubátor	IR 1500 Automatic CO ₂ Incubator	Flow Laboratories
třepačka	VIBRAX	Serono Diagnostics
centrifuga	Rotina 420 R	Hettich Lab Technology
průtokový cytometr	BD FACSCanto	BD Biosciences

4.3.3.2. Ostatní pomůcky

Tab. 7 Ostatní pomůcky

Pomůcka	Název	Výrobce
zkumavky	sterilní zkumavky s heparinem sodným	BD Vacutainer
	sterilní zkumavky	FL medical
	zkumavky 5 ml	BD Falcon
pipety	Finpipette F1 fixed 5 µl	Thermo SCIENTIFIC
	Finpipette F1 20 – 200 µl	
	Finpipette F1 100 – 1000 µl	
jednorázové nástavce na pipety	Fintip 10	Thermo SCIENTIFIC
	nástavce 20 – 200 µl	FL medical srl – Italy
	nástavce 100 – 1000 µl	

4.4. Statistické metody

K modelování vývoje jednotlivých lymfocytárních subpopulací, autoprotilátek a intracelulárních cytokinů byl použit lineární smíšený model s náhodným efektem pacienta. Model je pro každý problém zvolen tak, aby zodpovídal na položené otázky či potvrdil/vyvrátil hypotézy a současně obsahuje všechny ostatní významné prediktory (tím sa ošetří případný „confounding“). 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

úrovni se statisticky významnými rozdíly použila metoda mnohonásobného srovnávání. K bodovým odhadům pevných efektů jsou dodány Waldovy 95% intervaly spolehlivosti založené na asymptotické normalitě.

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

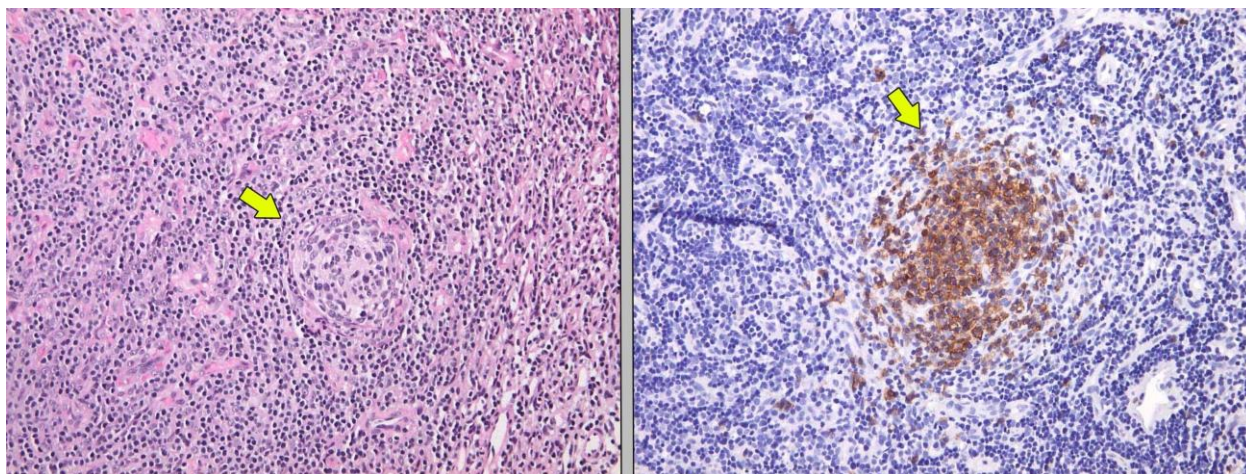
U 35 letého pacienta s negativní rodinnou i osobní anamnézou postupně vznikla kolísající, následně trvalá diplopie, ptóza na pravém oku, slabost a zvýšená unavitelnost horních končetin, posléze dysartrie a dysfagie. Šest měsíců před vznikem neurologických obtíží se u pacienta začaly objevovat nápadné 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 (pozitivní protilátky proti AChR; konstantní dekrement 10.8% sumačního akčního potenciálu (CMAP) při repetitivní stimulaci ulnárního nervu potvrzující poruchu nervosvalového přenosu postsynaptického

typu, kondukční studie motorických a senzitivních nervů byly v normě) 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 vypreparovat 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 hyperplasie, thymom nebyl nalezen. Vzorky z retroperitonea byly popsány jako solitární forma smíšeného typu Castlemanovy nemoci.



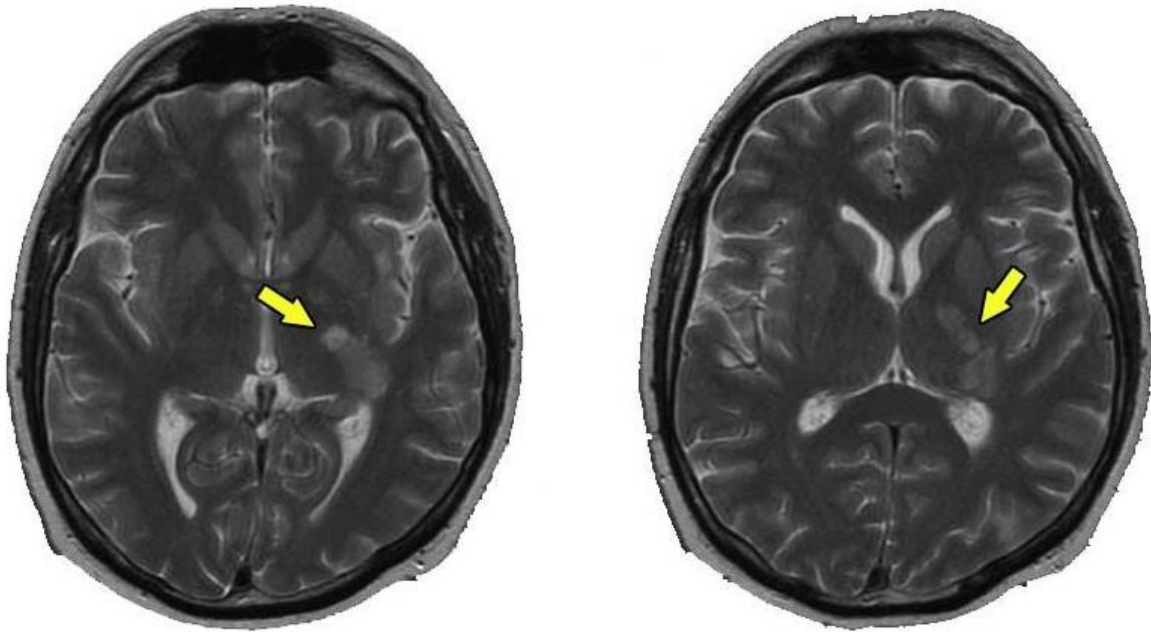
Obr.5 Histologické vyšetření retroperitoneálního tumoru. Levá část preparátu byla barvena hematoxylinem-eosinem, ve středu je atrofický lymfoidní folikul se širokou perifolikulární zónou (šipka), jsou přítomny četné hyalinizované cévy. Pravá část preparátu byla obarvena protilátkou proti CD20, zvýrazněný folikul se barví hnědě (šipka). Imunofenotypizace byla pozitivní na antigeny CD20, CD23, CD10. Byly nalezeny četné kappa- a lambda-pozitivní plazmatické buňky.

Děkujeme prim. MUDr. J Kodetové z Ústavu patologie 2.LF UK a FN Motol za možnost prezentace histologických nálezů.

Pooperační průběh byl u pacienta komplikován vznikem retrosternálního abscesu se septickým šokem, s nutnou operační revizí a dlouhodobou antibiotickou léčbou. Následně došlo k progresi svalové slabosti se zhoršením bulbární symptomatiky. Ke stabilizaci stavu byla nutná kúra pěti plazmaferéz s dobrým efektem.

Protilátky proti human immunodeficiency viru (HIV-1 a HIV-2) byly negativní. Kontrolní CT břicha 6 měsíců od operace neprokázalo progresi retroperitoneálního tumoru, dle chirurgů byl tumor inoperabilní, chirurgická revize nebyla indikována.

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.



Obr. 6 MRI mozku s nálezem 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 uvedené komorbiditě a suspektní souvislosti s B buněčnou patologií, byla po konzultaci s hematologem zahájená biologická terapie rituximabem (Mabthera) v iniciální dávce 375mg/m^2 . 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

(Klinické charakteristiky sledované populace jsou uvedeny v tabulce 8.)

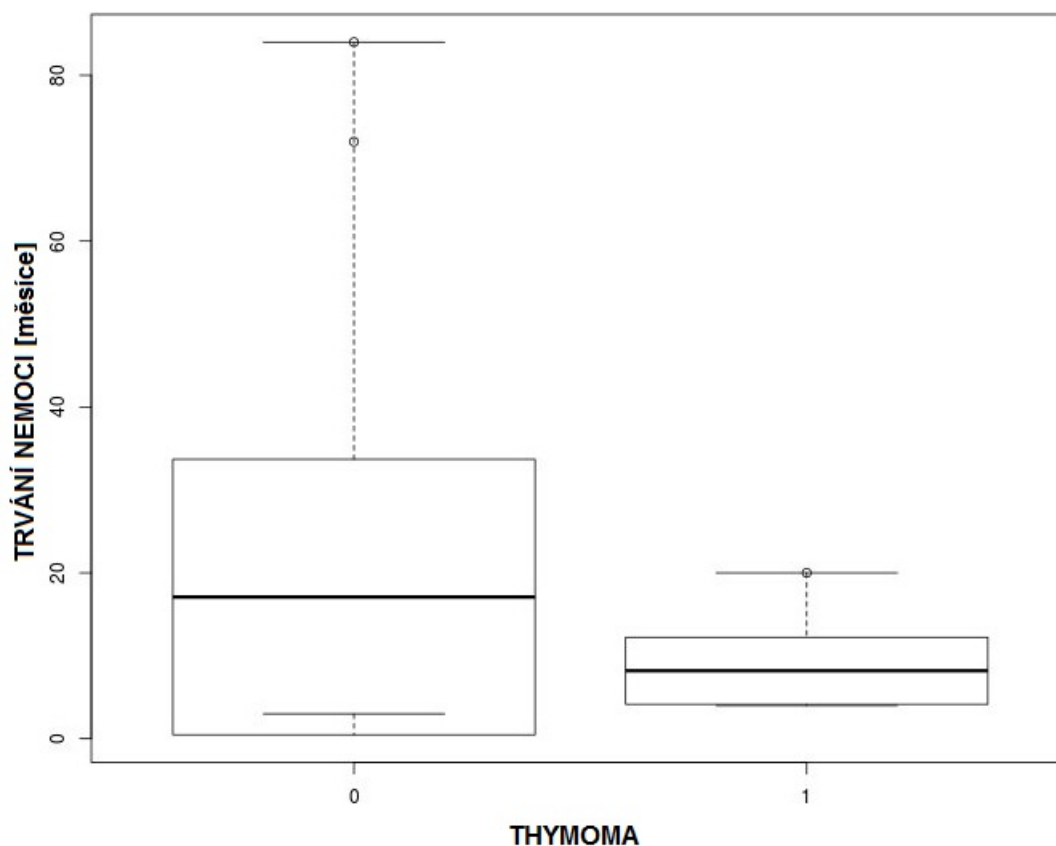
Tab. 8 Klinické charakteristiky 62 pacientů s MG, kteří podstoupili thymektomii

	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 PROTI LÁTKOVÝ 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 astma 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

Thymom byl histopatologicky potvrzen po operaci u 16 (26%) pacientů. V skupině pacientů s thymomem bylo zahrnuto 9 mužů a 7 žen s průměrným věkem 55 (22-72) let. Skupina nonthymomatózních myasteniků zahrnovala 12 mužů a 34 žen s průměrným věkem 34 (17-60) let. Průměrné trvání předoperačních příznaků bylo 8 měsíců u pacientů s thymomem a 17 měsíců u těch bez thymomu (Obr. 7). Nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi nonthymomatózní a thymomatózní MG co se týče předoperační závažnosti MG (Tab. 8, klasifikace MG dle MGFA před thymektomií).

Ve skupině s thymomem, 100% pacientů dostávalo kombinovanou imunosupresi před operací. Ve skupině bez thymomu, 46% pacientů bylo léčených kombinovanou imunosupresí, 28% kortikosteroidy, a 26% izolovanou terapii inhibitory AChE, t.j pyridostigminem. Zaznamenali jsme jednu pooperační komplikaci spojenou s TE v každé skupině (ranou infekci ve skupině nonthymomatózní a hemopericardium ve skupině thymomatózní). Nebyly žádné perioperační nebo postoperační úmrtí. Mezi nonthymomatózními pacienty, 26% mělo další autoimunitní onemocnění, jako je autoimunitní onemocnění štítné žlázy, astma bronchiale, roztroušená skleróza, vaskulitida, revmatoidní artritida, ankylozující spondylitida HLA-B27 +. Ve thymomatózní skupině trpělo jiným autoimunitním onemocněním jenom 12,5% pacientů (ulcerózní kolitidou nebo autoimunitním onemocněním štítné žlázy).



Obr. 7 Krabicový graf trvání nemoci od generalizace do provedení TE u nonthymomatózních (0) a thymomatózních (1) pacientů

5.1.2. Neurologické výsledky

Neurologické výsledky po TE byly příznivé pro většinu pacientů (Obr. 8, Tab. 9). 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.

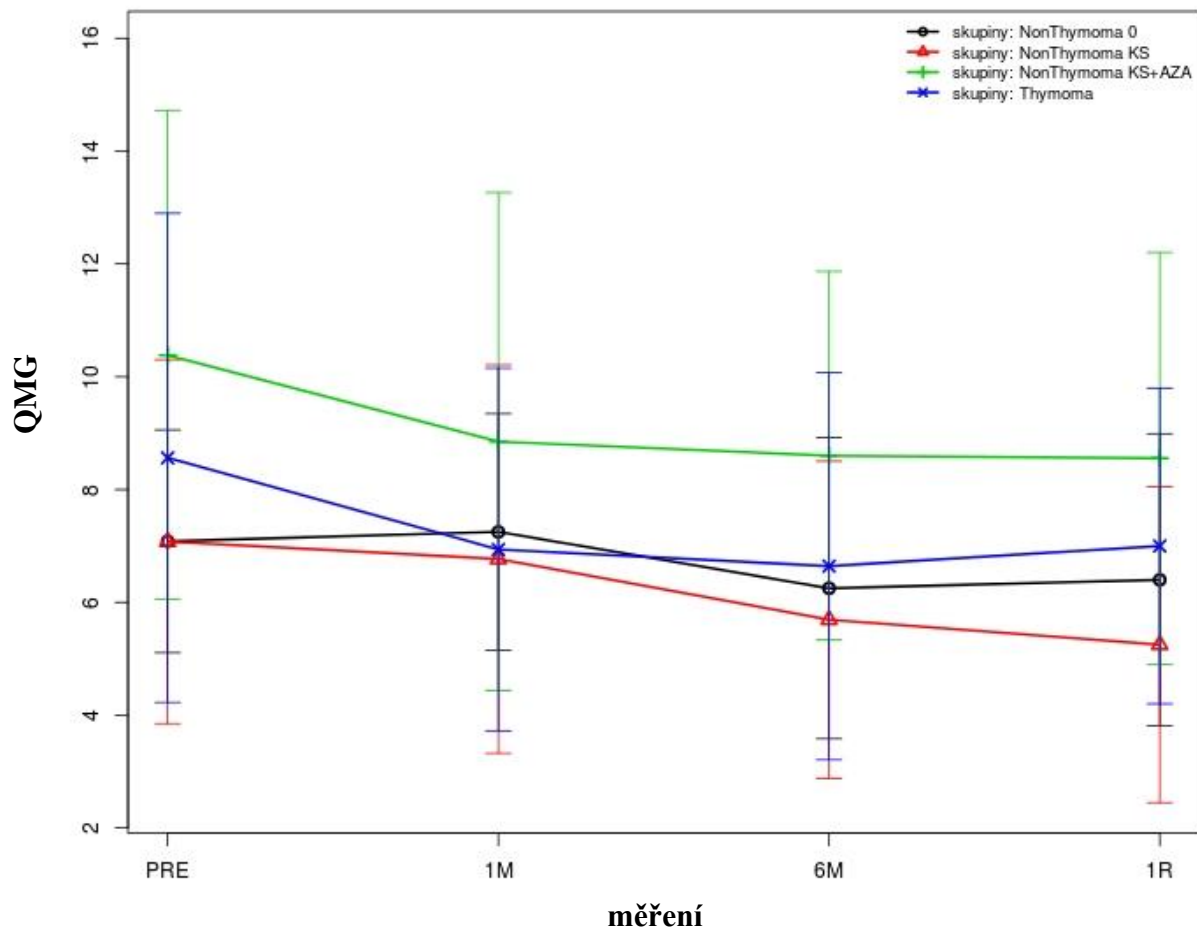
Kompletní stabilní remise (KSR) bylo dosaženo 24 měsíců po TE u 24% nonthymomatózních a 25% thymomatózních pacientů (Tab. 9). Výrazné zlepšení myastenické symptomatiky (status “zlepšení”) jsme zaznamenali u 48% nonthymomatózních a 44% thymomatózních pacientů. Žádnou změnu stavu referovalo 17% nonthymomatózních a 25% thymomatózních pacientů, a celkové zhoršení myastenické symptomatiky (status “zhoršení”) 24 měsíců po TE bylo pozorováno u 11% pacientů bez thymomu a u 6% pacientů s thymomem. Celkem u 5 nonthymomatózních pacientů 2 roky po thymektomii došlo k progresi svalové slabosti, zatímco pouze 1 pacient s přítomností thymomu plynule progredoval v neurologické symptomatice. 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 statu „kompletní stabilní remise“ anebo statu „zlepšení“ bylo velmi podobné u obou skupin (Tab. 9), 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 statu 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. 9). 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. 9).

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 statu 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.**

Obr.8 Vývoj QMGS po TE u 4 sledovaných skupin MG pacientů



Tab. 9 Neurologické výsledky 24 měsíců po TE v jednotlivých sledovaných skupinách

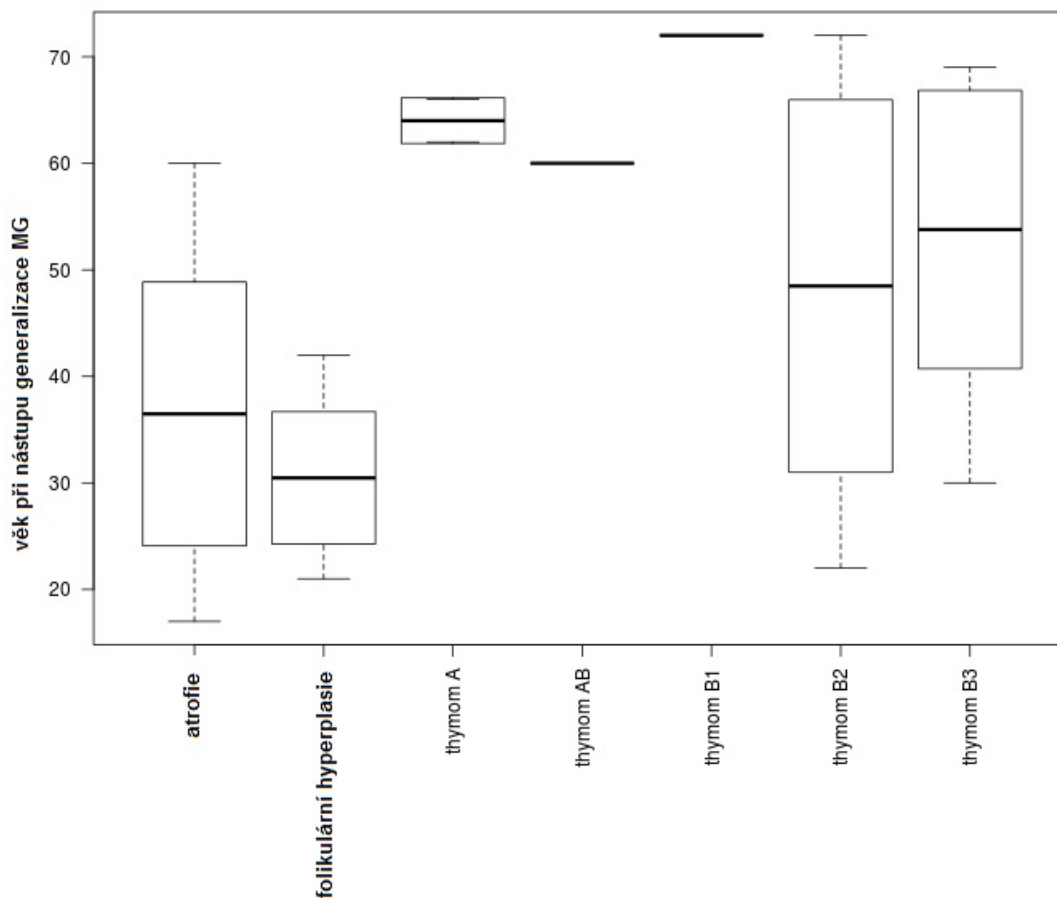
	NONTHYMOMA				THYMOMA		
	Terapie před provedením TE			AChR protilátkový status			
všichni (n=46)	JENOM PYRIDOSTIGMIN (n=12)	PYRIDOSTIGMIN+ KS (n=13)	PYRIDOSTIGMIN +KS+AZA (n=21)	séropozitivní (n=36)	séronegativní (n=10)	všichni séropozitivní (n=16)	
Kompletní stabilní remise	11 (24%)	1 (8%)	5 (38%)	5 (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%)

5.1.3. Komparativní zhodnocení klinických a laboratorních charakteristik séropozitivních a séronegativních myastenických pacientů po thymektomii

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. 9). Proto můžeme tvrdit, že **hypotéza D u cíle č. 1, že „Séropozitivní a séronegativní pacienti profitují z thymektomie stejně“ se potvrdila.**

5.2. Histologické nálezy thymu a jejich vztah k věku

U pacientů s MG bez thymomu byla histologicky v 37% prokázána folikulární hyperplazie a u 63% pacientů atrofie. Thymom typu B2 byl zastoupen v 37,5% všech thymomů, typ B1 v 6,5%, typ AB v 6%, typ A ve 12,5%, a typ B3 u 37,5% všech sledovaných pacientů s thymomem. Klinické zlepšení po TE bylo pozorováno u všech histologických podtypů (jak nonthymomatózních, tak thymomatózních pacientů) bez přítomnosti statisticky významného rozdílu ($p = 0,999$). Při srovnávání věkových rozdílů, kdy nastala generalizace MG a souvislosti s histologickým nálezem thymu, nebyl nalezen významný rozdíl mezi pacienty s atrofií thymu a folikulární hyperplazií thymu. Z tohoto hlediska nebyl nalezen významný rozdíl ani mezi skupinami pacientů s různým typem thymomu. Mezi statisticky významné výstupy patří fakt, že thymomatózní pacienti byli častěji muži ($p = 0,036$), v průměru o 20 let starší s trváním nemoci zhruba o 8,19 měsíce kratším než nonthymomatózní pacienti ($p = 0,001$, Obr. 7, Obr. 9).



Obr.9 Krabicový graf věkových rozdílů při generalizaci MG u různých histologických nálezů thymu

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

5.3.1. 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.

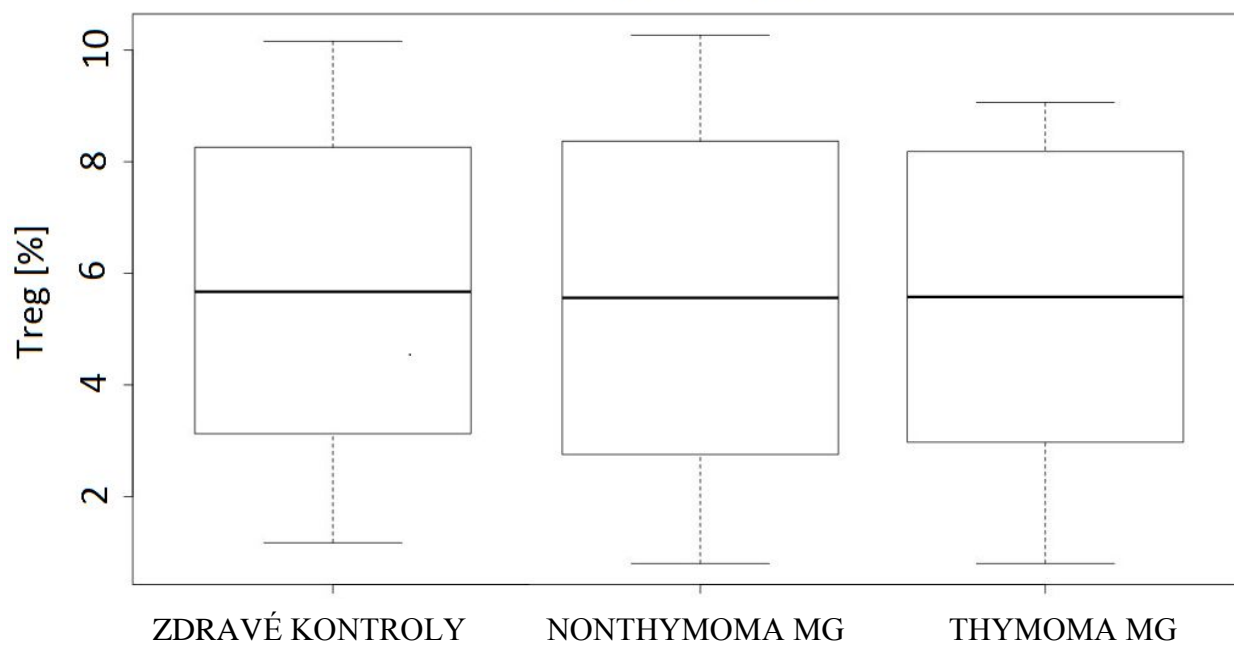
Vývoj procentuálního zastoupení množství Treg buněk v čase u všech pacientů jsme modelovali pomocí lineárního smíšeného modelu s náhodným efektem pacienta a s pevným

efektem určujícím čas od operace, kdy bylo měření provedené. 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 ($p = 0,361$, Obr.10). 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 % ($p = 0,177$).

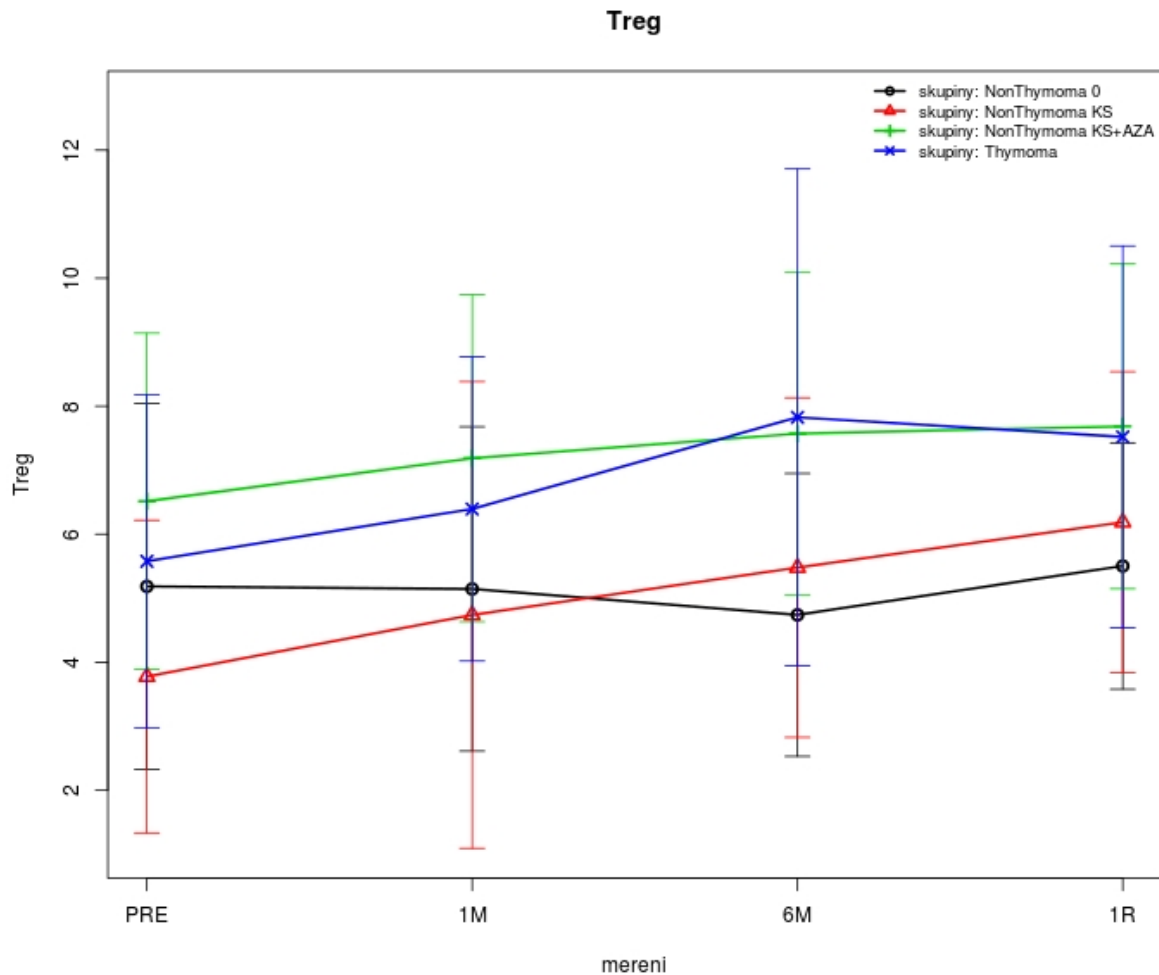
Během prvního roku po operaci, došlo k výraznému zvýšení podílu buněk Treg (2,72%, $p < 0,001$) u nonthymomatózních pacientů léčených kortikosteroidy a výraznému nárůstu (1,75%, $p = 0,008$) u pacientů léčených kombinovanou imunosupresivní terapií. **První část hypotézy E u cíle č. 2 o vzrůstu procentuálního podílu Treg buněk mezi lymfocyty u nonthymomatózních pacientů s konkomitantní imunoterapií rok po thymektomií 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 (Obr. 11).

Obr. 10 Krabicové grafy předoperačních průměrných hodnot Treg buněk



Obr. 11 Vývoj průměrných hladin Treg buněk u 4 sledovaných skupin pacientů po TE



5.3.1.1. 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 (kap. 5.3.1.) a zlepšují se myastenické příznaky (klesá QMGS, kap. 5.1.2.). 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.

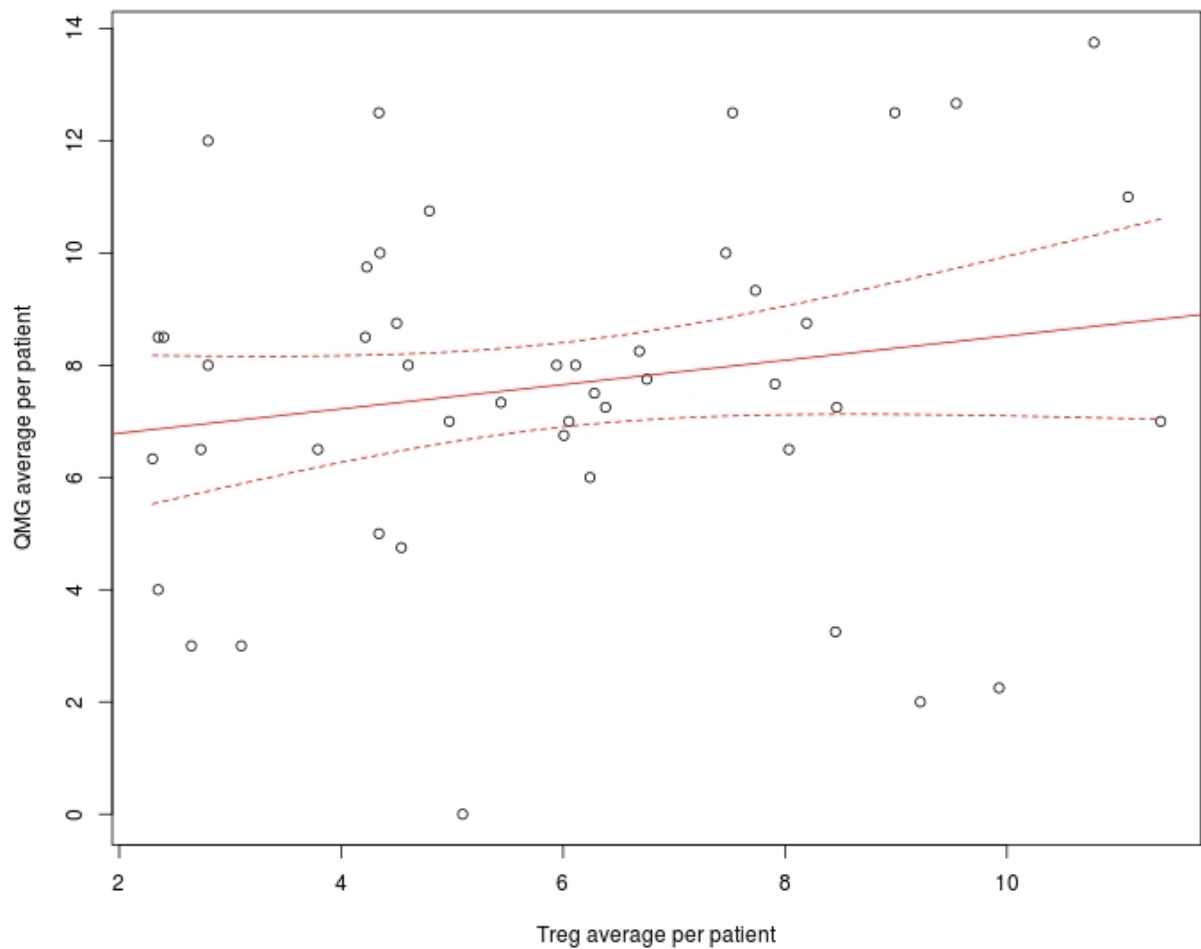
Tab. 10 Univariantní modely pro QMGS 1R – nonthymomatózní pacienti (*skupina NonThymoma KS a skupina NonThymoma KS+AZA*)

	Wald CI			
	Parameter estimator	lower	upper	p-value
QMG mean ~ Treg mean	0.216616447	-0.13117083	0.56440373	0.289
QMG ~ Treg (LMM*)	-0.037154505	-0.25596787	0.18165886	0.887
QMG 1R ~ Treg PRE	0.080659866	-0.36632303	0.52764276	0.853
QMG diff ~ Treg diff (LMM*)	0.111396637	-0.21183088	0.43462415	0.735

* LMM = byl použit lineární smíšený model s nahodným efektem pacienta

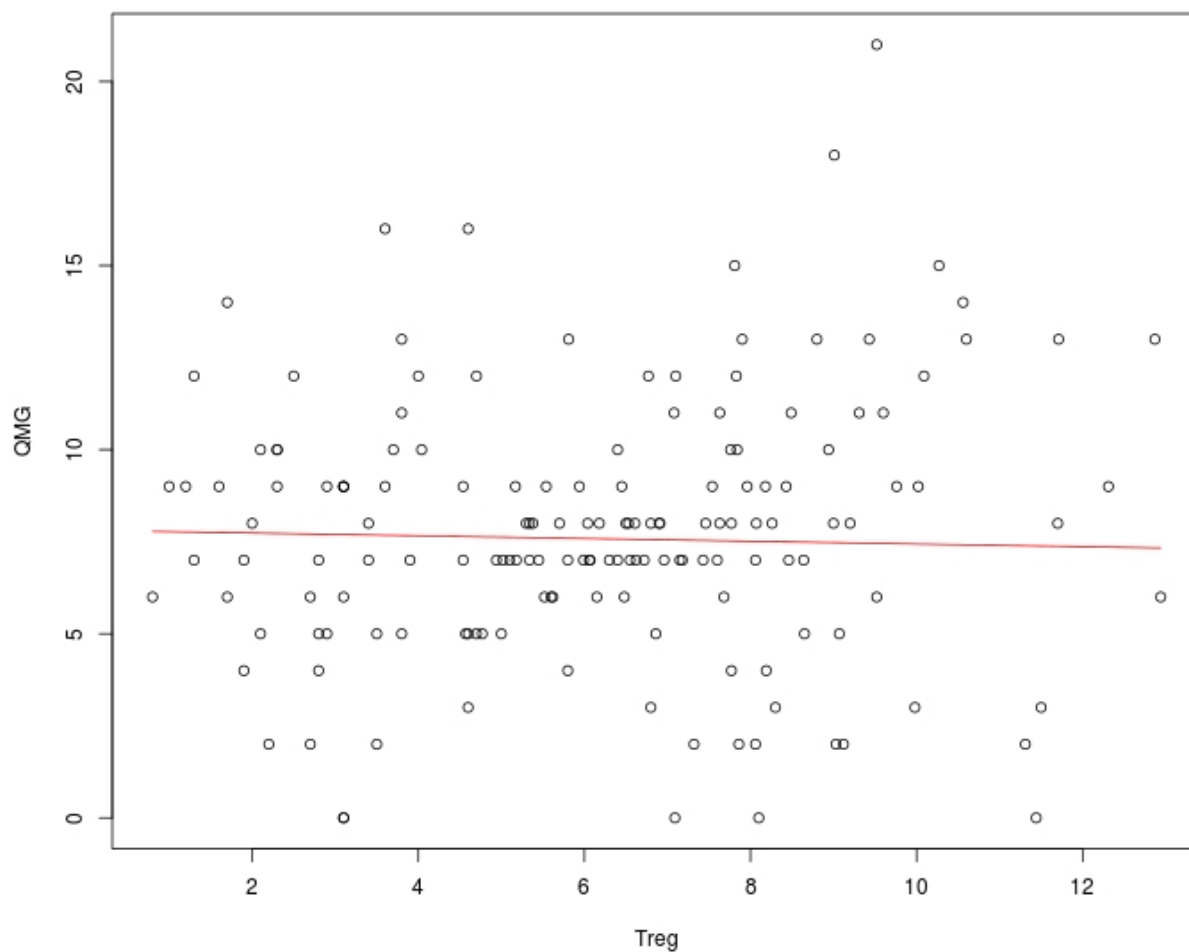
Vypočetli jsme průměrnou hodnotu Treg a průměrnou hodnotu QMGS u každého nonthymomatózního pacienta léčeného nějakou formou imunoterapie ze všech časových období. Tím jsme získali nezávislá data a vztah mezi QMGS a Treg jsme modelovali pomocí univariantního lineárního modelu s QMGS jako závislou proměnnou. 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 (Obr. 12).

Obr. 12 Vztah QMGS mean a Treg mean



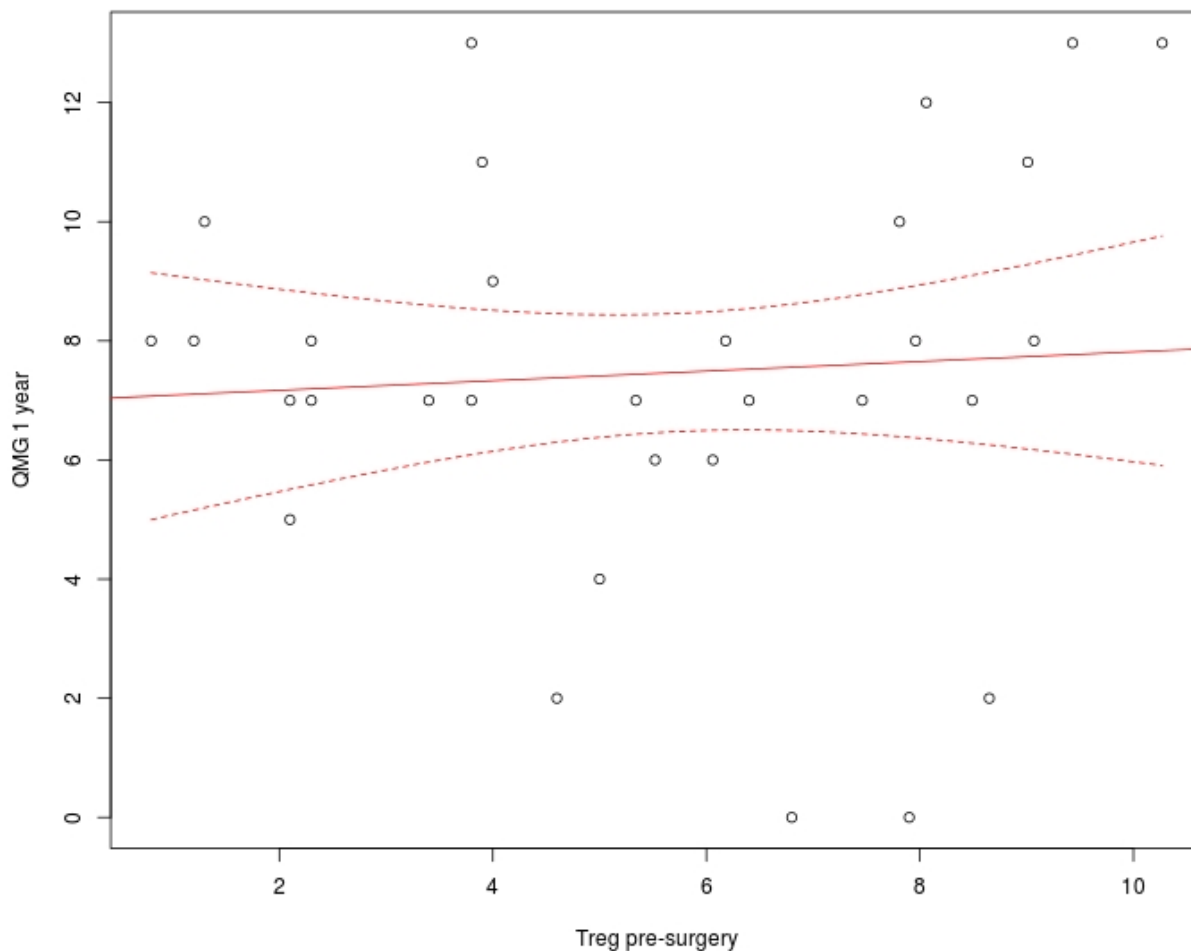
Dále jsme porovnali přímo hodnoty QMGS a Treg pomocí univariantního smíšeného lineárního modelu s náhodným efektem pacienta a s QMGS jako závislou proměnnou. Odhad je sice záporný, ale není statisticky významný (Obr. 13).

Obr. 13 Vztah QMGS a Treg



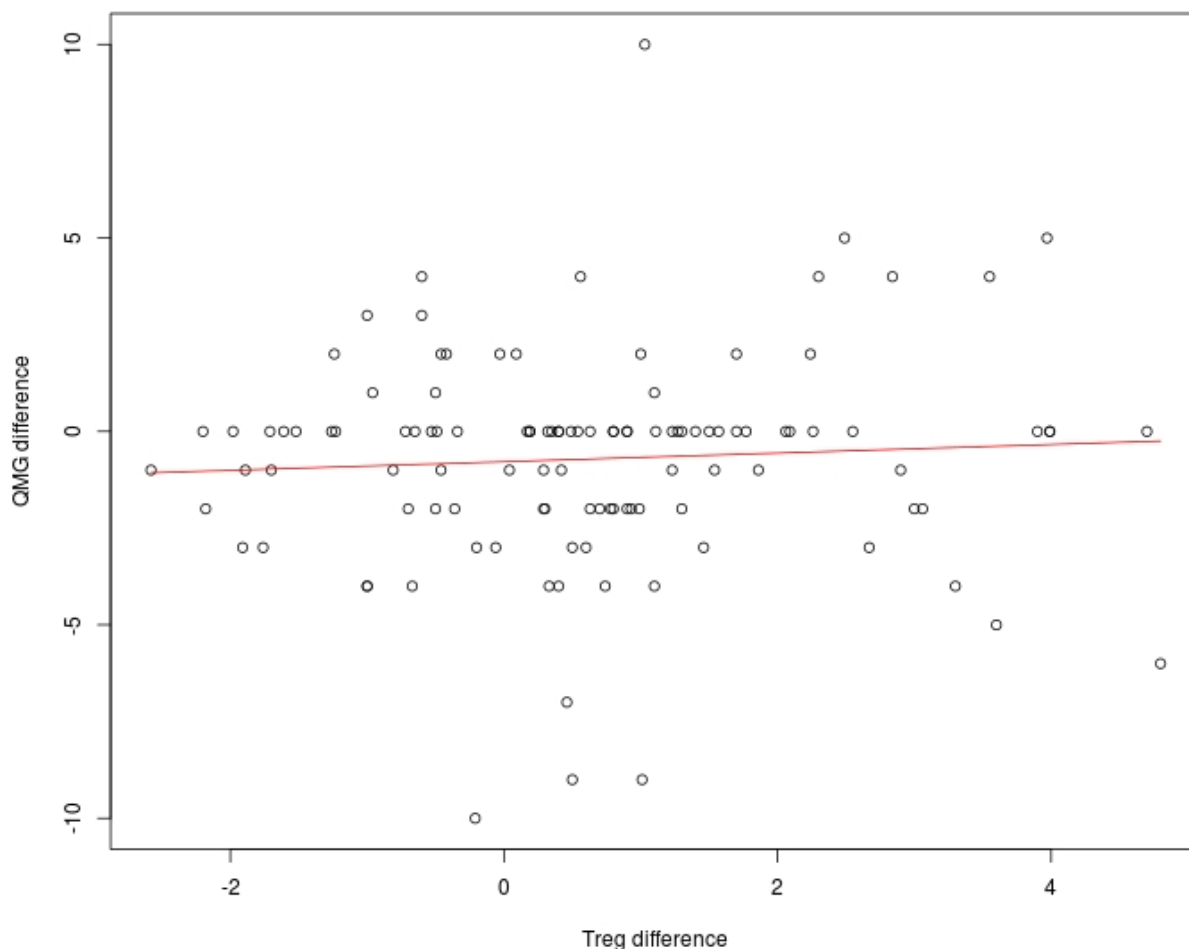
Porovnali jsme hodnotu QMGS po 1 roku od operace s hodnotou Treg před operací pro každého pacienta pomocí univariálního lineárního modelu s QMGS jako závislou proměnnou. Za platnosti hypotézy by odhad parametru měl být záporný a signifikantní. Odhad parametru je kladný a není statisticky významný.

Obr. 14 Vztah QMG 1R a Treg předoperačně



V posledním přístupu jsme zvažovali difference hodnot QMGs mezi jednotlivými časovými intervaly a difference hodnot Treg mezi jednotlivými časovými intervaly. Modelovali jsme jejich závislost pomocí univariantského smíšeného lineárního modelu s náhodným efektem pacienta a s QMGs jako závislou proměnnou. Znovu, za platnosti hypotézy by odhad parametru měl být záporný a signifikantní. Odhad je ale znovu kladný a není statisticky významný.

Obr. 15 Vztah mezi QMG diff a Treg diff



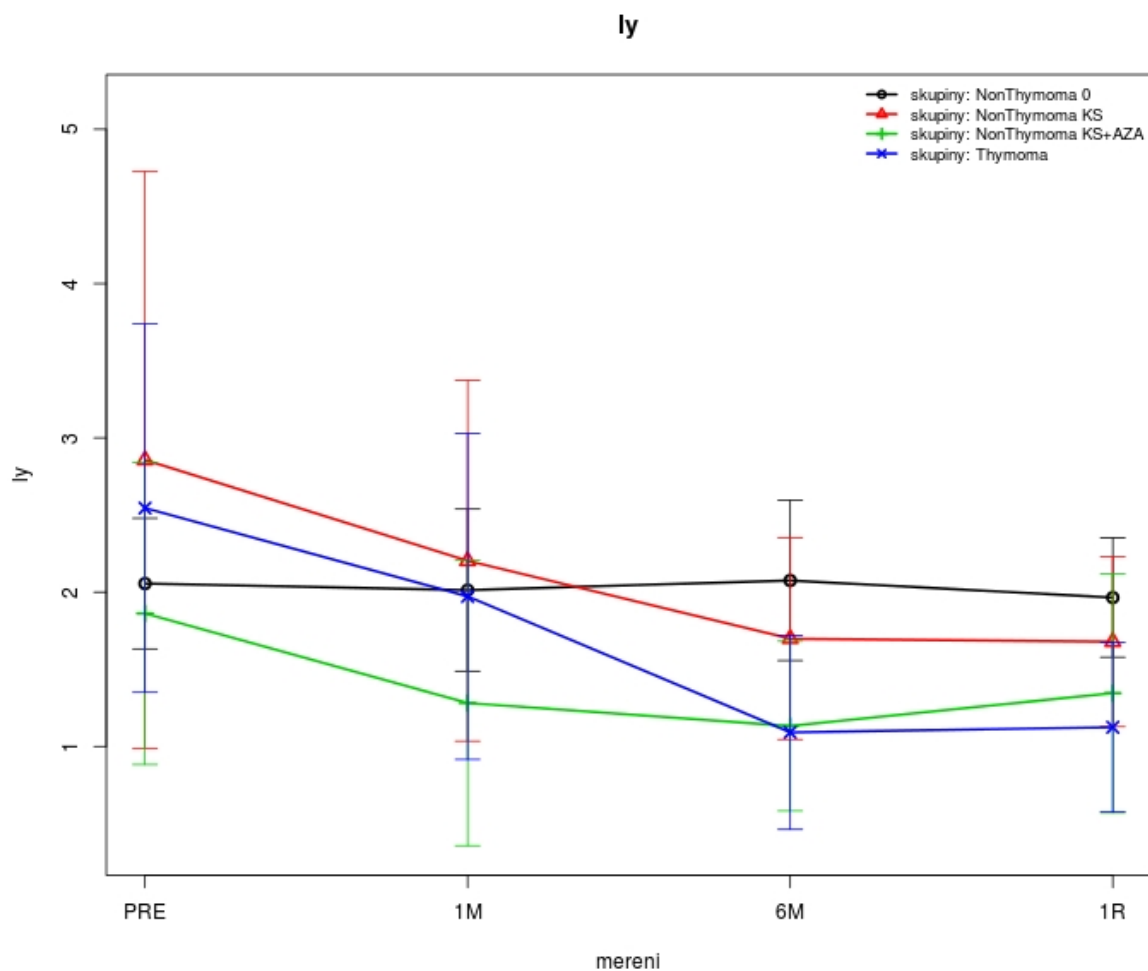
Předpokládali jsme, že vyšší podíl Treg buněk bude spojen s nižším QMGs a to hlavně u nontymomatózních pacientů léčených nějakou formou imunoterapie (*skupina NonThymoma KS* a *skupina NonThymoma KS+AZA*). Nicméně, přímý vztah mezi těmito proměnnými nebyl potvrzen ($p = 0,289$). I když jsme vzali do úvahy všechny thymektomované pacienty s MG (nontymomatózní 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 nontymomatózních pacientů léčených současně nějakou formou imunoterapie stoupá množství Treg buněk, ale dle našich zjištění to přímo nesouvisí se zlepšením myastenických příznaků.**

5.3.2. 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 ($p<0,001$).

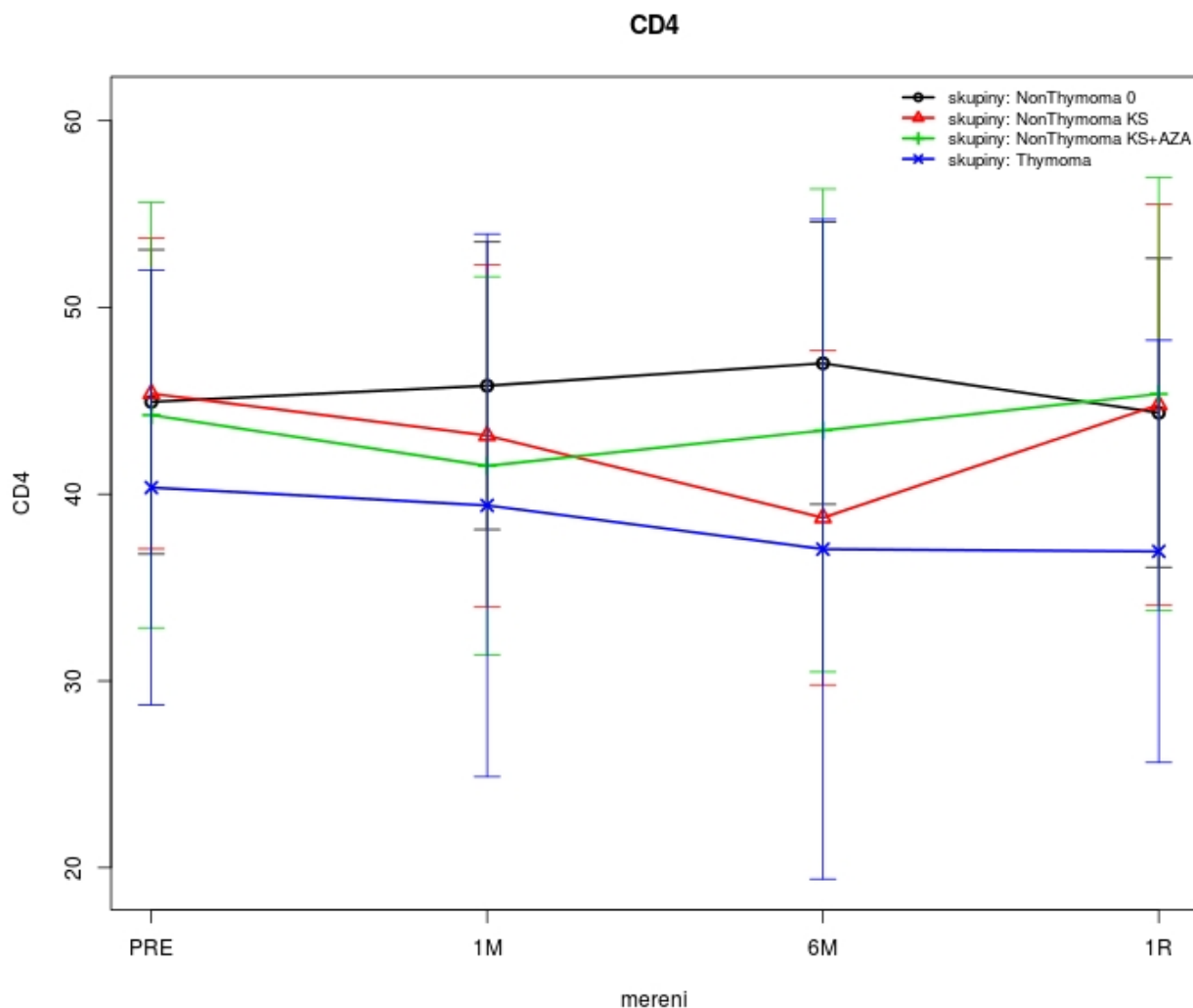
Obr. 16 Vývoj průměrných hladin absolutního počtu lymfocytů u 4 sledovaných skupin pacientů po TE



5.3.3. 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.

Obr. 17 Vývoj průměrných hladin % zastoupení CD4+ lymfocytů u 4 sledovaných skupin pacientů po TE



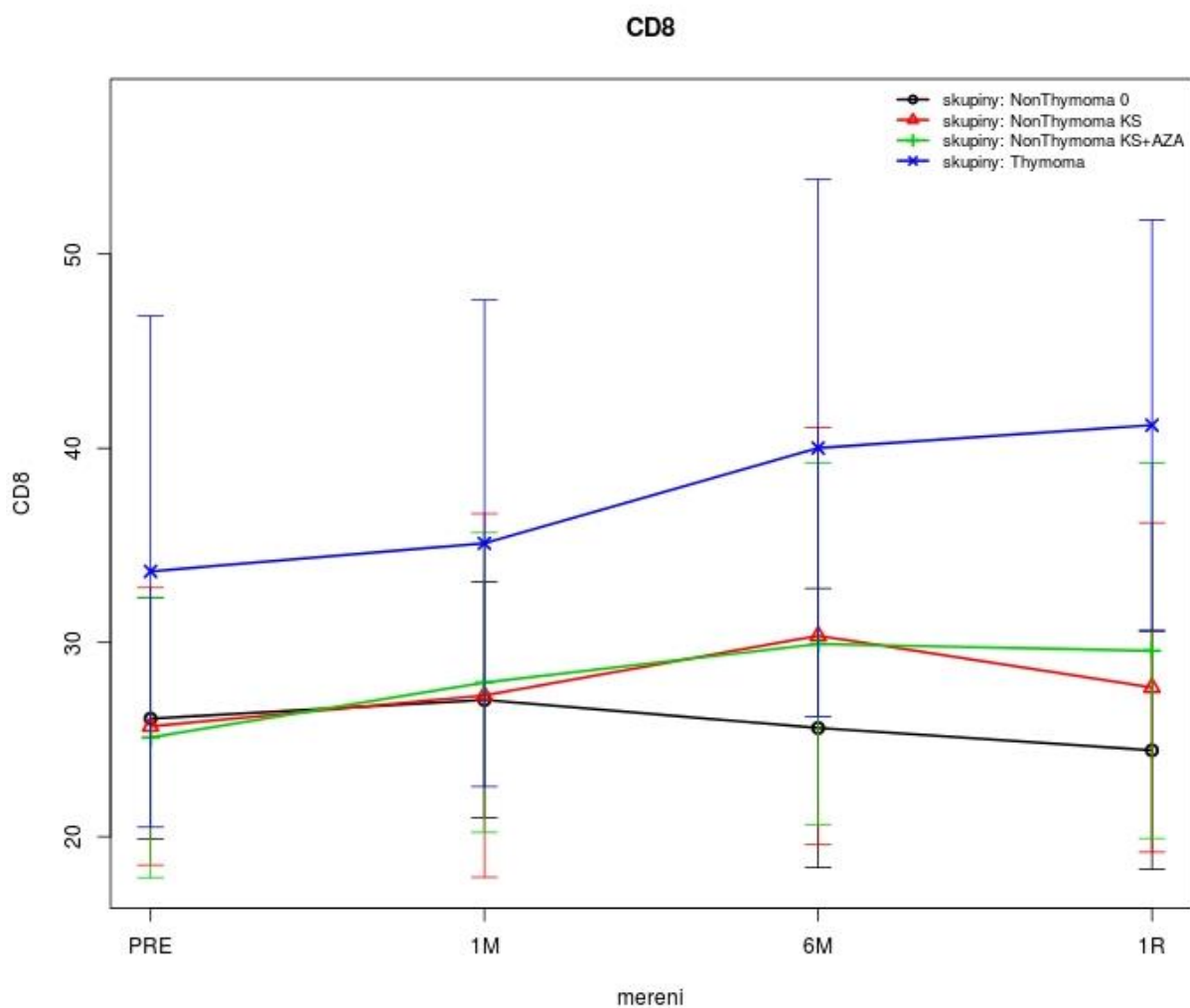
5.3.4. CD8 lymfocyty

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.

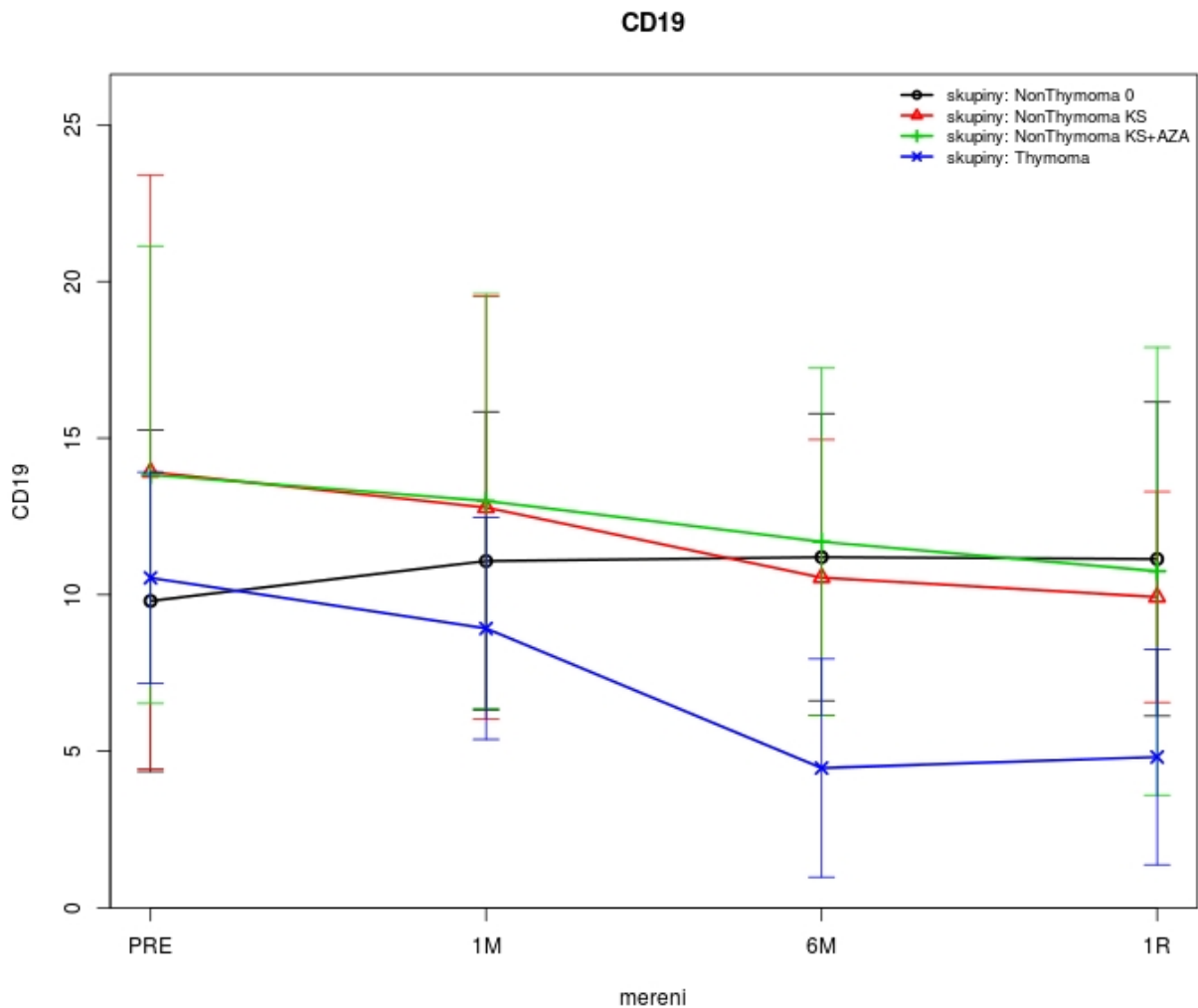
Obr. 18 Vývoj průměrných hladin % zastoupení CD8+ lymfocytů u 4 sledovaných skupin pacientů po TE



5.3.5. 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 ($p < 0,001$).

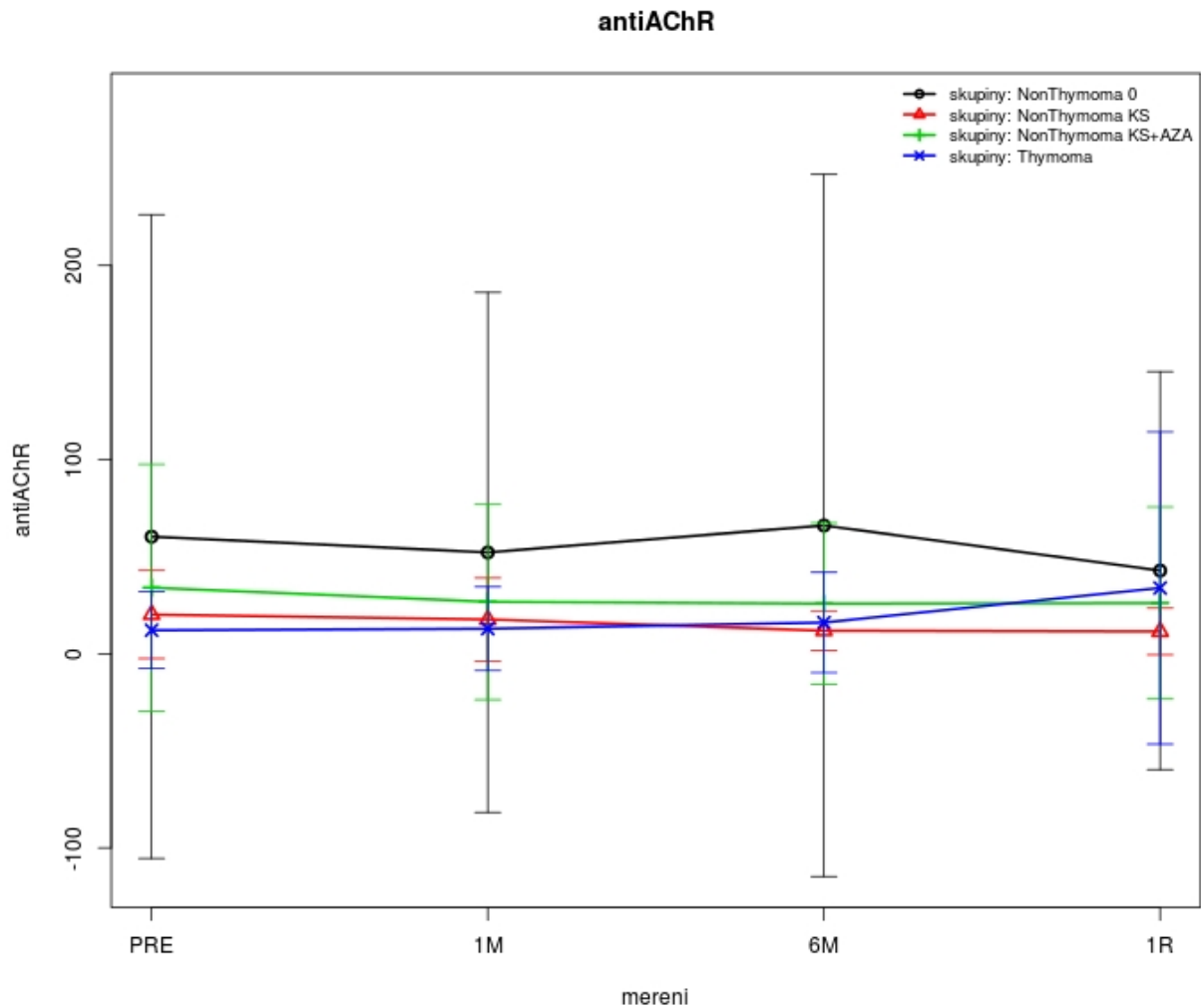
Obr. 19 Vývoj průměrných hladin % zastoupení CD19 lymfocytů u 4 sledovaných skupin pacientů po TE



5.3.6. 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.

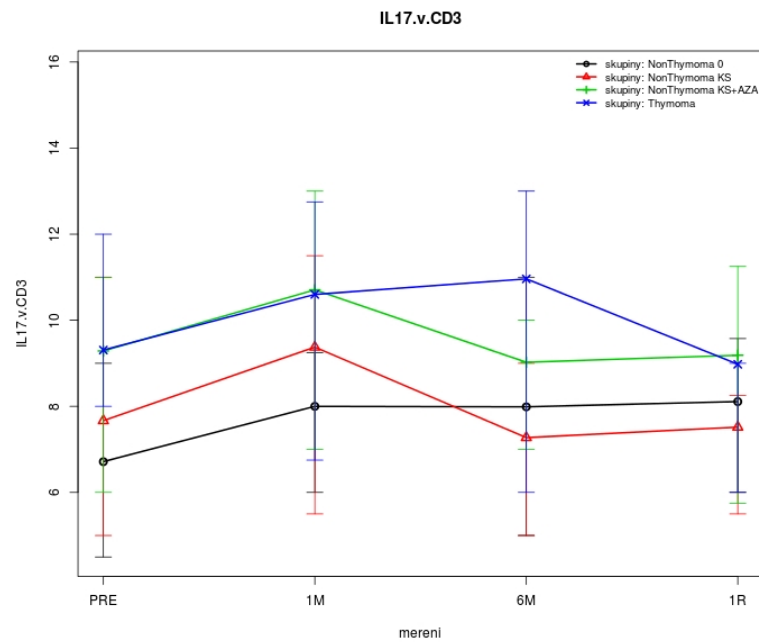
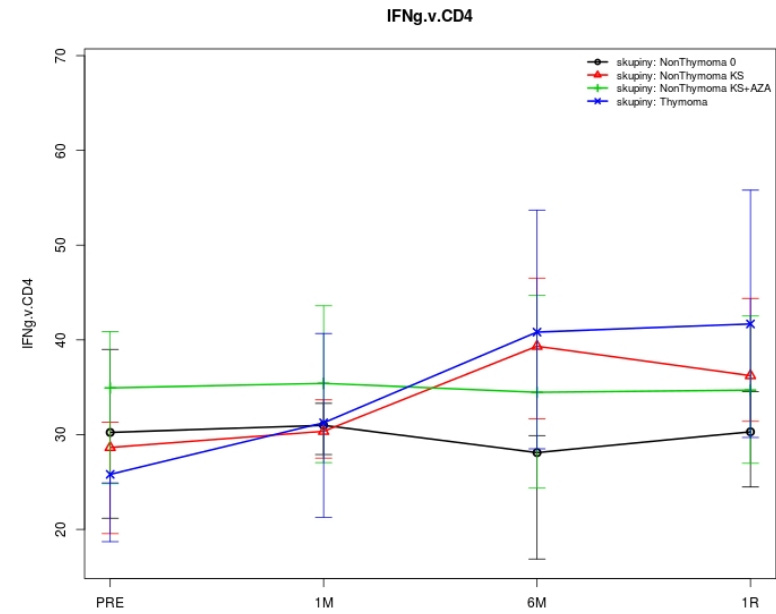
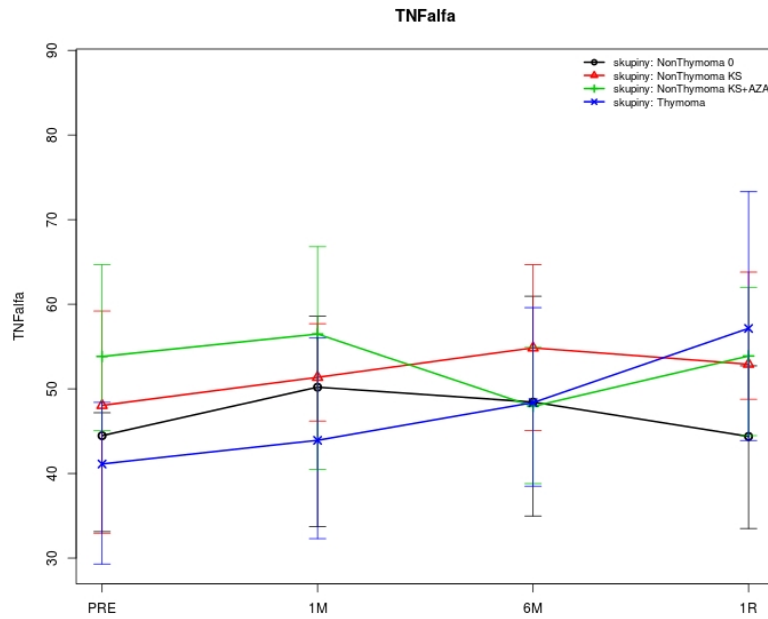
Obr. 20 Vývoj průměrných hladin antiAChR protilátek u 4 sledovaných skupin pacientů po TE



5.3.7. 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.

Obr. 21 Vývoj absolutních hladin vybraných cytokinů u 4 sledovaných skupin pacientů po TE

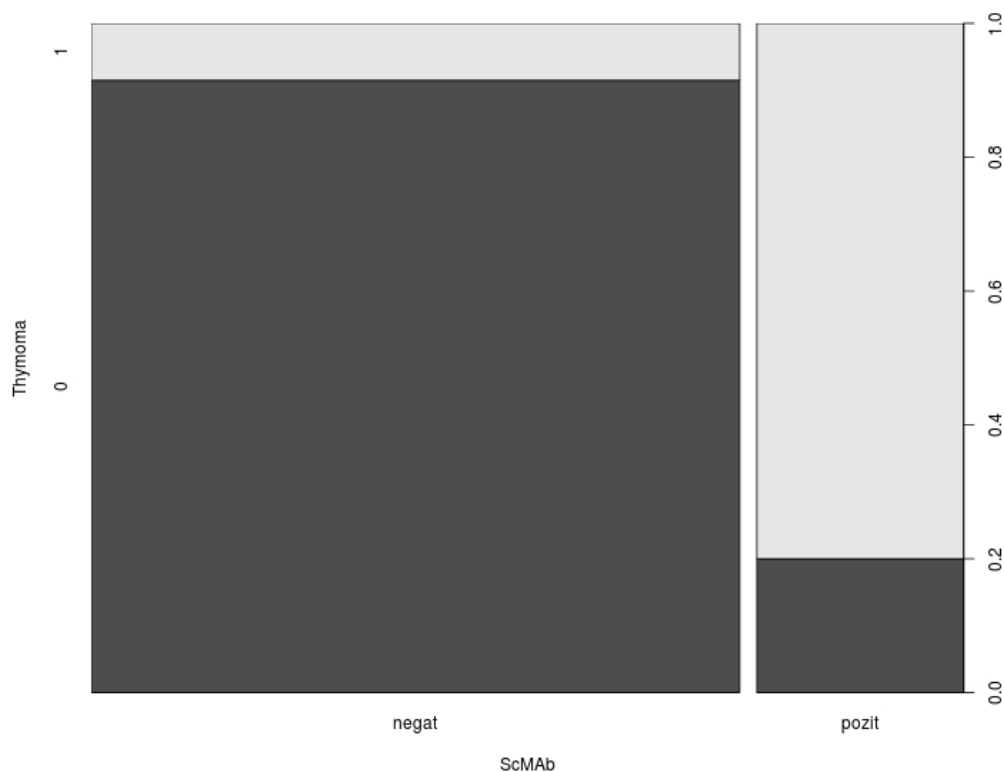


5.3.8. Výskyt protilátek ScMAb u thymomatózních pacientů

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.

Tab. 11 Kontingenční tabulka ScMAb u nonthymomatózní a thymomatózní skupiny

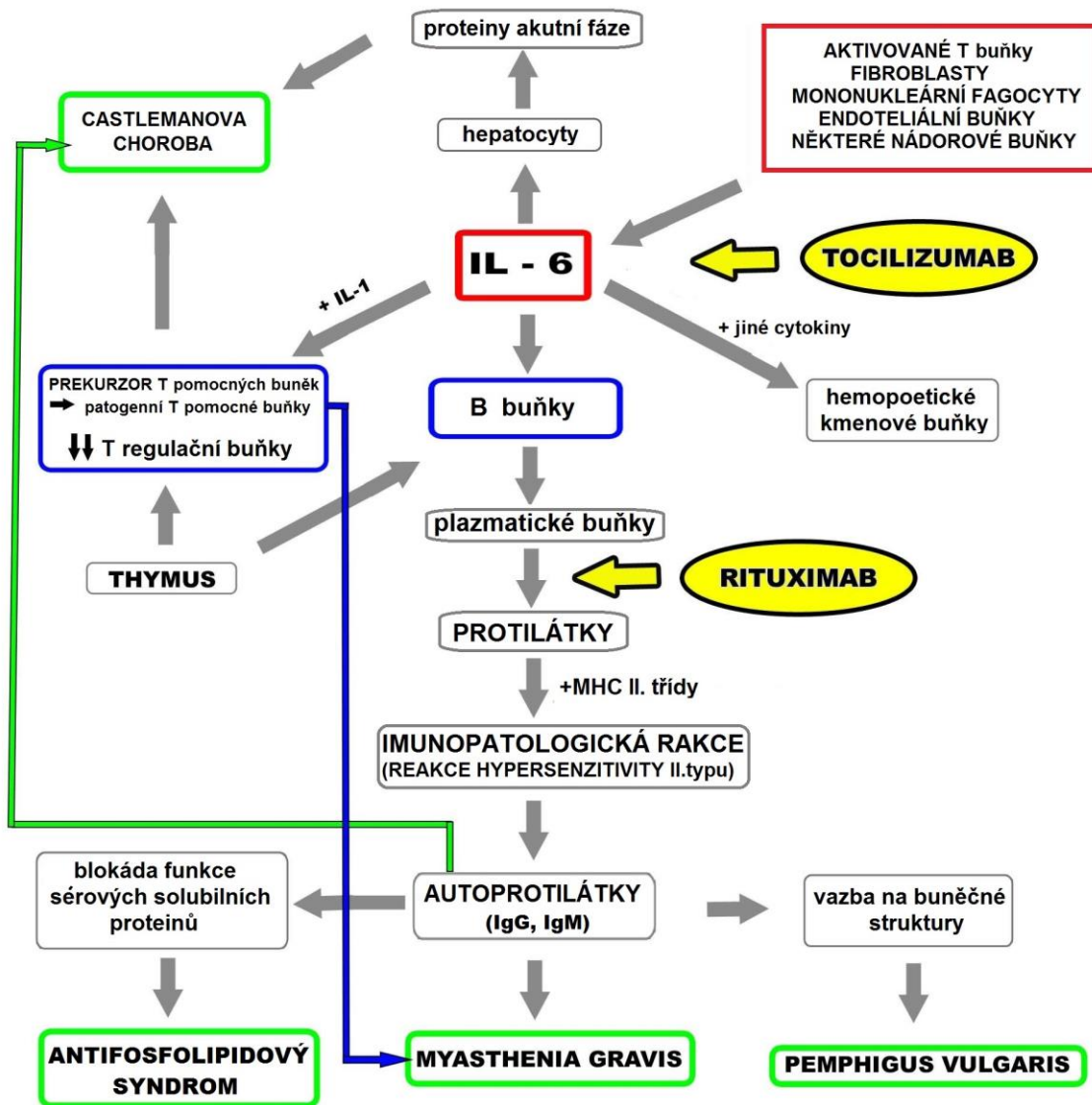
	Nonthymoma	Thymoma:
ScMAb_general: negat	43	4
ScMAb_general: pozit	3	12



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

U našeho pacienta se potvrdily 4 klinické jednotky: myasthenia gravis (MG), Castlemanova nemoc (CN), paraneoplastický pemphigus a antifosfolipidový syndrom (APLA). U autoimunitních onemocnění není neobvyklé, že dochází ke „clustering“ fenoménu – sdružování některých autoimunit, jako je tomu např. u polyglandulárního syndromu.

U námi popisovaného případu pravděpodobně nejde jen o koincidenci 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. 22).



Obr. 22 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)

U CN je nadprodukce IL-6 (produkt aktivovaných T lymfocytů) příčinou zvýšené diferenciace B lymfocytů se vznikem klonu plazmocytů a následnou tvorbou autoprotilátek, které zahájí imunopatologickou reakci II. typu. MG je rovněž autoprotilátkami zprostředkovaná nemoc, zvýšená proliferace B lymfocytů je přítomna jak u CN tak u MG. MG je ovlivněna také T lymfocyty s dysfunkcí jak pomocných, tak regulačních T lymfocytů. Některé studie prokázaly,

že IL-6 se podílí na rozvoji MG, což je v souladu s jeho činností jako promotoru B buněčné diferenciace a proliferace a následné indukce tvorby plazmatických buněk a protilátek. Již dříve bylo prokázáno, že léčba protilátkou anti-IL-6 potlačuje probíhající MG u krys. Při vzniku kožního a slizničního onemocnění pemphigus vulgaris stojí na prvním místě rovněž autoprottilátky, které se váží na buněčné struktury. Jako hlavní imunopatologický faktor u antifosfolipidového syndromu jsou autoprottilátky, které blokují funkce solubilních sérových proteinů.

Vzhledem k přítomnosti antigenu CD20 na lymfoidních buňkách u našeho pacienta (viz histologické nálezy) se zdálo být logické, abychom se pokusili použít anti-CD20 monoklonální protilátku (rituximab) v léčbě pacienta se současným výskytem MG a CN.

Musíme však přiznat, že v našem případě léčba úspěšná nebyla. Jak bylo uvedeno výše, základní vztah mezi MG a CN představuje pravděpodobně molekula IL-6, která stimuluje oba typy lymfocytů – B a T buňky. Toto uznání role IL-6 v imunopatogenezi onemocnění vedlo k vyvinutí monoklonální protilátky – tocilizumabu - namířené proti lidskému IL-6 receptoru, určené k léčbě revmatoidní artritidy, juvenilní idiopatické artritidy a CN. Nicméně, zatím nebyla publikována studie o použití tocilizumabu k léčbě MG, pemphigu nebo anti-fosfolipidového syndromu. 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.**

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 postižení 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). Sonett a Jaretzki konstatovali, že při posuzování neurologických výsledků po provedené TE existuje významná variabilita a to hlavně při posuzování remise po TE, která závisí na řadě proměnných faktorů, např. předoperační závažnosti MG symptomů, načasování operace, použití/nepoužití imunosupresivní léčby, výrazné heterogenitě pooperačních metod při hodnocení neurologického stavu a konečně samotné definici klinické remise (Sonett a Jaretzki, 2008). V našem projektu jsme se snažili popisované variabilitě vyhnout stanovením jasně definovaných kritérií kompletní stabilní remise, zlepšení nebo zhoršení v myastenickém statu (dle MGFA) a dále zavedením skórovacího systému QMGS. Současně byl každý pacient zařazen do konkrétní sledované skupiny na základě jasně definované předoperační léčby a přítomnosti thymomu. Důvody, které nás vedly rozdělit pacienty na základě předoperační léčby byly hlavně ty, že hlavním cílem práce je vyhodnocování efektu thymektomie na imunitní parametry v periferní krvi myastenických pacientů, které jsou nejvíc ovlivněny právě přítomností nebo absencí specifické imunomodulační (kortikosteroidy) nebo imunosupresivní (kortikosteroidy a azathioprin) léčby. Vzhledem k tomu, že z etických důvodů není možné získat kontrolní skupinu myasteniků, kteří by v daném věkovém rozmezí TE nepodstoupili a užívali jenom imunoterapii (porušila by se indikační kritéria pro TE, kdy každý pacient s generalizovanou formou MG ve věkovém rozmezí 17-60 by měl po stabilizaci myastenické symptomatiky TE podstoupit), chtěli jsme alespoň vyhodnotit efekt samotné TE u nonthymomatózních pacientů bez užívání jakékoliv imunoterapie, k čemu nám posloužila skupina léčená jenom inhibitory AChE, t.j.

pyridostigminem.

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. 8, Klasifikace MG dle MGFA před thymektomií). 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. 9). 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.

Ve většině světových studií pacienti s MG, kteří podstoupili TE, dosáhli s větší pravděpodobností klinické remise anebo zlepšení klinických příznaků generalizované MG než

pacienti s MG, kteří TE nepodstoupili. Zatím nebyla popsána statisticky signifikantní asociace mezi provedením TE u pacientů s MG a negativním terapeutickým výstupem, jednalo se ale vždy o nerandomizované studie (Gronseth a Barohn, 2002; Skeie et al., 2006).

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), co je výsledek podobný jiným souborům thymektomovaných pacientů. Guillermo et al popisuje, že 52% pacientů mělo dobrou odezvu po TE (Guillermo et al., 2004), ve srovnání s 59% pacientů ve studii Hatton et al (Hatton et al., 1989). 71% myastenických pacientů profitovalo z thymektomie podle Busch et al (Busch et al., 1996) a výrazné klinické zlepšení popisuje až u 87% myastenických pacientů Frist et al (Frist et al., 1991). Většina nonthymomatózních MG pacientů v našem souboru, kteří dosáhli KSR, bylo léčených konkomitantní imunopresivní terapií (91%) a současně podobné výsledky byly dosaženy u pacientů, kteří dosáhli stavu 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 imunopresivní nebo imunomodulační léčby nestačí k dosažení stavu 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). V našem Centru pro diagnostiku a terapii MG máme 15-17% dvojité séronegativních pacientů, což vysvětluje fakt, proč je celkový podíl séronegativních pacientů v rámci souboru všech thymektomovaných MG pacientů až 22%, tedy poměrně vysoký procentuální podíl. Stále více autorů se přiklání k názoru, že séronegativní pacienti by měli být indikováni k TE podobně jako séropozitivní, protože benefítují z TE stejně. Lauriola et al dokázali, že u více než 50% dvojité séronegativních pacientů se v thymu nacházejí změny popisované jako „thymitis like“ infiltráty, které jsou podobné změnám nacházejícím se u thymické folikulární hyperplasie u séropozitivních pacientů, jedině počet germinálních center je nižší (Lauriola et al., 2005). Hayashi et al rovněž dokázali, že séronegativní pacienti mohou prezentovat podobné patologické nálezy thymu jako pacienti séropozitivní (t.j. folikulární hyperplasii s přítomností germinálních center infiltrovaných B

lymfocyty) (Hayashi et al., 2007). Práce Leite et al rovněž dokazuje, že dvojité séronegativní pacienti jsou podobní AChR+ séropozitivním jak po stránce klinické symptomatiky, tak po stránce thymické patologie. V této souvislosti se zvažuje přítomnost nízkoafinitních protilátek proti AChR, které nejsou detekovatelné dostupnými laboratorními metodami (Leite et al., 2008). Mantegazza et al zjistili, že procentuální zastoupení pacientů, kteří dosáhli statut KSR po TE se neliší mezi těmito dvěma skupinami (Mantegazza et al., 2003).

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. Guillermo et al rovněž nepozorovali žádné významné rozdíly mezi skupinou séronegativních a séropozitivních pacientů po TE (Guillermo et al., 2004).

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). Naše zjištění na první pohled oponuje zjištěním skupiny Fattorossi et al, kteří poprvé ukázali, že počet cirkulujících buněk Treg u neléčených MG pacientů je nižší než u zdravých kontrol, ale normalizuje se po imunosupresivní terapii (Fattorossi et al., 2005). Tato studie ale primárně hodnotí pouze neléčené MG pacienty (před nasazením specifické terapie), zatímco naše skupina pacientů MG před operací pozůstávala z

pacientů MG neléčených imunoterapií, léčených kortikosteroidy nebo v kombinovanou IS terapií, což by mohlo vysvětlit tento rozdíl.

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). Existují důkazy, že kortikosteroidy mohou interferovat se zráním dendritických buněk, snižují jejich povrchovou expresi a také vedou k tvorbě IL-10, který podporuje produkci supresivních T-lymfocytů (Canning et al., 2000; Gregori et al., 2001; Barrat et al., 2002). 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*). Nemáme srovnání o podobné skupině pacientů, kteří by byli sledováni po stejnou dobu, ale nepodstoupili by operaci. Důvodem je, že tato kontrolní skupina pacientů s generalizovanou MG ve věkovém rozmezí 17-60 let, kteří by nepodstoupili TE a byli by léčeni pouze kortikosteroidy nebo kombinovanou IS terapií nemůže vzniknout z etických důvodů, protože každý pacient s generalizovanou MG v této věkové kategorii by dle Českého

standardu pro klinickou diagnostiku a léčbu MG thymektomií podstoupit měl (Pit'ha et al., 2012).

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.

Otázkou je odkud pochází tato rozšířená populace Treg buněk u thymektomovaných pacientů s MG, když vezmeme do úvahy fakt, že CD4+CD25+ T buňky jsou produkovány v brzlíku. Teoreticky by se mohly vyvinout z CD25- T buněk, které migrovaly do periferie ještě před TE (Asano et al., 1996). CD25- paměťové T buňky v periférii se mohou diferencovat do CD4+CD25+ T buněk pomocí kostimulace cestou 4C8 (Masuyama et al., 2002). Výsledky od thymektomovaných MG pacientů podporují hypotézu, že cirkulující CD4+CD25+ regulační T buňky jsou odvozeny z periferní T buněčné populace.

MG je autoimunitní onemocnění závislé na T buňkách, ale současně spojené i s autoprotilátkami, kterých produkce je závislá na AChR-reaktivních T buňkách. Většina z nich patří lymfocytární subpopulaci CD4+ (Hohlfeld et al., 1984). AChR-specifické CD4+ T lymfocyty hrají významnou roli ve vývoji EAMG a je dokázáno, že TE a specifická terapie monoklonálními protilátkami proti CD4+ T lymfocytům zlepšuje klinické příznaky MG u tohoto modelu (Ahlberg et al., 1994). Lisak et al prokázali, že deplece CD8+ T buněk z mononukleárních buněk u pacientů s MG vede ke zvýšené produkci autoprotilátek a zvýšené hladině imunoglobulinů, což ukazuje, že autologní CD8+ T buňky vykazují určitou regulační kontrolu nad anti-AChR CD4+ T buňkami u MG (Lisak et al., 1983).

V našem projektu jsme ukázali, že podíl CD4+ T buněk výrazně poklesl po TE jen ve skupině pacientů léčených kortikosteroidy ($p = 0,038$), zatím co 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 ($p < 0,001$).

Kombinovaná imunosupresivní terapie je obvykle indikována v těžších případech MG, takže když srovnáme výsledky skupiny *NonThymoma KS* a *NonThymoma KS+AZA* může nám to vysvětlit některé lepší výsledky v skupině léčené čistě kortikosteroidy (hlavně vyšší podíl KSR, výraznější změny v lymfocytárních subpopulacích – vyšší podíl Treg a CD8+ lymfocytů a naopak nižší podíl CD4+ lymfocytů a CD19-lymfocytů).

Při zkoumání výskytu antistriatálních 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 (Romi 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

CN je angiofolikulární uzlinová hyperplasie, která nemá charakter maligního lymfomu. Etiologie není zcela jasná. Kromě možné souvislosti s virovými infekcemi (HHV-8 a HIV) (Cesarman, 2002; Soulier et al., 1995) se zvažuje i možnost hyperprodukce IL-6, která následně vede k proliferaci plazmatických buněk a zdá se, že je důležitou komponentou v imunopatogenezi CN.

CN se vyskytuje u mladších jedinců a v klinickém obraze se jedná buď o lokalizovanou periferní nebo mediastinální adenopatii – většinou asymptomatickou (lymphoma in situ). Velmi charakteristická je histopatologie s interkapilární proliferací, hyperplasií folikulů s příměsí plazmatických buněk. Existují různé klasifikace, dle histologického obrazu se dělí na hyalinně-vaskulární typ, typ s predominancí plazmatických buněk a smíšený typ. Z anatomického hlediska existují mediastinální a abdominální tumory – nejčastěji retroperitoneální lokalizace. Z morfologického hlediska se rozlišuje solitární a multicentrický typ. V případě našeho pacienta se jednalo o solitární typ v retroperitoneální lokalizaci s typickým histologickým obrazem. CN může být asociována s polyneuropatií, organomegalií, endokrinopatií, monoklonální gamapatií a kožními změnami (POEMS syndrom) (Dispenzieri et al., 2003; Adelman et al., 1994), dále s Hodgkinovým lymfomem (Abdel-Reheim et al., 1996) a paraneoplastickým pemphigem (Caneppele et al., 2000; Fujimoto et al., 2002; Menenakos et al., 2007). Byla publikována asociace se SLE, revmatoidní artritidou, MG a Sjögrenovým syndromem (De Marchi et al., 2004). Kombinace CN, MG, pemphigu a antifosfolipidového syndromu je extrémně vzácná a jedná se o první popsanou souvislost těchto klinických jednotek (Jakubíková et al., 2013).

K diagnóze paraneoplastického pemphigu se většinou dojde retrospektivně. V případě rozsáhlých mukokutánních erozivních lézí nereagujících na léčbu ve spojitosti s hypervaskulárním tumorem mediastina nebo retroperitonea se vždy musí myslet na tuto spojitost (Menenakos et al., 2007).

Antifosfolipidový syndrom je jeden z nejčastějších získaných trombofilních stavů. Je nazýván podle charakteristické přítomnosti protilátek. Existují 2 základní formy: sekundární, která je podmíněna přítomností jiného systémového onemocnění (nejčastěji SLE) a forma primární při neprokazatelné jiné příčině tvorby antifosfolipidových protilátek.

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. 22). Byla vyslovena hypotéza, že chronická stimulace B buněčných klonů (Obr. 5), 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, a to nejčastěji těmi, ve kterých B buněčné mechanismy hrají důležitou roli jako jsou autoimunitní poruchy štítné žlázy, revmatoidní artritida, diabetes mellitus a SLE. Podobně jako CN i paraneoplastický pemphigus je autoimunitní onemocnění kůže a sliznic spojené s novotvary lymfocytárního původu. Paraneoplastický pemphigus může napodobovat různá dermatologická onemocnění včetně erythema multiforme, erozivního lichen planus a SLE, tak jako to bylo u našeho pacienta. 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 popsanych 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 popsaná 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). Jak bylo uvedeno výše, základní vztah mezi MG a CN představuje pravděpodobně molekula IL-6, která stimuluje oba typy lymfocytů. Je zajímavé, že IL-6- / IL-6- myši jsou rezistentní k indukci EAMG (Deng et al., 2002). 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. Abdel-Reheim FA, Koss W, Rappaport ES, Arber DA. Coexistence of Hodgkin's disease and giant lymph node hyperplasia of the plasma-cell type (Castleman's disease). Arch Pathol Lab Med 1996; 120:91-96.
3. Adelman HM, Cacciatore ML, Pascual JF, Mike JM, Alberts WM, Wallach PM. Case report: Castleman disease in association with POEMS. Am J Med Sci 1994; 307:112-114.
4. 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.
5. Alsheklee A, Miles JD, Katirji B, Preston DC, Kaminski HJ. Incidence and mortality rates of myasthenia gravis and myasthenic crisis in US hospitals. Neurology 2009;72(18):1548-1554.
6. Araga S, Kishimoto M, Adachi A, Nakayasu H, Takenaka T, Takahashi K. The CD5+ B cells and myasthenia gravis. Autoimmunity. 1995;20:129-134.
7. Aricha R, Feferman T, Fuchs S, Souroijon MC. Ex vivo regulatory T cells modelate experimental myasthenia gravis. J Immunol. 2005;175:7898-7904.
8. Aricha R, Mizrachi K, Fuchs S, Souroujon MC. Blocking of IL-6 suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis. J Autoimmun 2011; 36(2):135-141.
9. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. J Exp Med 1996;184:387-396.
10. 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.
11. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. J Exp Med 2002;195:603-616.

12. Batocchi AP, Evoli A, Di Schino C, Tonali P. Therapeutic apheresis in myasthenia gravis. *Ther Apher*. 2000;4:275-279.
13. Béhin A, Mayer M, Kassis-Makhoul B, Jugie M, Espil-Taris C, Ferrer X et al. Severe neonatal myasthenia due to maternal anti-MuSK antibodies. *Neuromuscul Disord*. 2008;18(6):443-6.
14. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2006;126:15-24.
15. 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.
16. Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: a comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*. 2014;52:90-100.
17. 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.
18. Berrih-Aknin S. Myasthenia Gravis: paradox versus paradigm in autoimmunity. *J Autoimmun*. 2014; 52:1-28.
19. Blalock A, Mason MF, Morgan HJ, Riven SS. Myasthenia gravis and tumors of the thymic region: report of a case in which the tumor was removed. *Ann Surg* 1939;110:544.
20. Buckberg GD, Mulder DG. Thymectomy for Myasthenia Gravis: principles of surgical management. *Am Surg*. 1967;33:797-800.
21. 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.
22. 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.
23. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001;2:1126-1132.
24. 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.

25. Canning MO, Grotenhuis K, de Wit HJ, Drexhage HA. Opposing effect of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Endocrinol* 2000;143:687-695.
26. Cesarman E. The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases. *Rec Res Cancer Res* 2002; 159:27-37.
27. 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.
28. 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.
29. Conti-Fine BM, Diethelm-Okita B, Ostlie N, Wang W, Milani M. Immunopathogenesis of myasthenia gravis. In: Kaminski HJ. *Myasthenia gravis and related disorders*. New York, Humana Press 2009:43-70.
30. Cordiglieri C, Marolda R, Franzi S, Cappelletti C, Giardina C, Motta T et al. Innate immunity in myasthenia gravis thymus: pathogenic effects of Toll-like receptor 4 signaling on autoimmunity. *J Autoimmun* 2014;52: 74–89.
31. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:211-221.
32. Dau PC. Plasmapheresis therapy in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 1980;3:468-482.
33. Davidson A. Targeting BAFF in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 2010;22:732-9.
34. Day JR, Bew D, Ali M, Dina R, Smith PL. Castleman disease associated with myasthenia gravis. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:1648-1650.
35. 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.

36. Deng C, Goluczko E, Tuzun E, Yang H, Christadoss P. Resistance to experimental autoimmune myasthenia gravis in IL-6-deficient mice is associated with reduced germinal center formation and reduced C3 production. *J Immunol* 2002; 169:1077-1083.
37. Dispenzieri A, Kyle AR, Lacy QM, Rajkumar VS, Therneau MT, Larson RD, et al. POEMS syndrome: definitions and long-term outcome. *Blood* 2003; 101:2496-2506.
38. Diviš J. *Nádory mezihrudí*. Praha: SZN; 1954
39. 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.
40. 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.
41. Eckmann L. Thymectomy in myasthenia gravis. *Helv Chir Acta*. 1969;36:131-135.
42. Emilie D, Crevon MC, Cohen-Kaminski S, Peuchmaur M, Devergne O, Berrih-Aknin S et al. In situ production of interleukins in hyperplastic thymus from myasthenia gravis patients. *Hum Pathol*. 1991;22:461-468.
43. 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.
44. Engel AG, Fumagalli G. Mechanisms of acetylcholine receptor loss from the neuromuscular junction. *Ciba Found Symp* 1982;90:197-224.
45. Epton HE. Extrathoracic angiofollicular lymphoid hyperplasia with coincidental myasthenia gravis. *Cancer* 1973; 21:241-245.
46. Fattorossi A, Battaglia A, Buzzonetti A, Ciaraffa F, Scambia G, Evoli A. Circulating and thymic CD4+CD25+ T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment. *Imunology* 2005;116:134-141.
47. Frist W, Thirumalai S, Doehring C. Thymectomy for the myasthenia gravis patient: factors influencing outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:406-411.

48. 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.
49. Gajdos P, Chevret S, Toyka K. Plasma exchange for myasthenia gravis. Review. The Cochrane Collaboration. John Wiley and Sons Ltd. The Cochrane Library 2009; Issue 2. Dostupné z: <http://www.thecochranelibrary.com>
50. Gertel-Lapter S, Mizrachi 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.
51. Gomez AM, Burden SJ. The extracellular region of Lrp4 is sufficient to mediate neuromuscular synapse formation. *Dev Dyn* 2011; 240: 2626–2633.
52. Gradolatto A, Nazzari D, Truffault F, Bismuth J, Fadel E, Foti M et al. Both Treg cells and Tconv cells are defective in the Myasthenia gravis thymus: roles of IL-17 and TNF- α . *J Autoimmun.* 2014;52:53-63.
53. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davakki AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001;167:1945-1953.
54. Grob D, Brunner N, Namba T, Pagala M. Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2008; 37: 141-149.
55. Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2000;55:7-15.
56. Gronseth GS, Barohn RJ. Thymectomy for Myasthenia Gravis. *Curr Treat Options Neurol* 2002;4:203-209.
57. 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.

58. Hain B, Jordan K, Deschauer M, Zierz S. Successful treatment of MuSK antibody-positive myasthenia gravis with rituximab. *Muscle Nerve* 2006; 33:575-580.
59. 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.
60. Hart IK, Sharshar T, Sathasivam S. Immunosuppressant drugs for myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Jan;80(1):5-6.
61. 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.
62. Hayashi A, Shiono H, Ohta M, Ohta K, Okumura M, Sawa Y..Heterogeneity of imunopathological features of AChR/MuSK autoantibody-negative myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2007;189:163-168.
63. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 2011; 69(2):418-22.
64. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Autoantibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001; 7: 365-368.
65. Hohlfeld R, Toyka KV, Heininger K, Grosse-Wilde H, Kalies I. Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor. *Nature* 1984;310:244-246.
66. Hoosterhuis H. The natural course of myasthenia gravis: a long term follow-up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:1121-1127.
67. 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.
68. 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.

69. 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.
70. 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.
71. Kaminski HJ, Ruff RL. Structure and kinetic properties of the acetylcholine receptor. In: Engel AG. *Myasthenia gravis and myasthenic disorders*. Oxford: University Press 1999:40-64.
72. 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.
73. Kim JY, Yang Y, Moon JS, Lee EY, So SH, Lee HS et al. Serum BAFF expression in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 2008;199:151-4.
74. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21:467-476.
75. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002;109:131-140.
76. Kuks JBM. The thymus and myasthenia gravis. Doctoral thesis. Groningen: University of Groningen 1992.
77. Lauriola L, Ranelletti F, Maggiano N, Guerriero M, Punzi C, Marsili F et al. Thymus changes in anti-MUSK-positive and -negative myasthenia gravis. *Neurology* 2005;64:536-538.
78. 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.
79. Lee KW, Lee SH, Kim HJ, Kim JM, Choi YM, Motomura M. Experimental autoimmune myasthenia gravis and CD5+ B-lymphocyte expression. *J Korean Med Sci*. 1999;14:75-79.
80. Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain*. 2008;131:1940-1952.

81. Leite MI, Strobel P, Jones M, Micklem K, Moritz R, Gold R et al. Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody negative MG. *Ann Neurol*. 2005;57:444-448.
82. Limburg PC, The TH, Hummel-Tappel E, Oosterhuis HJ. Anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. Part 1. Relation to clinical parameters in 250 patients. *J Neurol Sci* 1983;58(3):357-370.
83. Lindstrom J, Shelton D, Fujii Y. Myasthenia gravis. *Adv Immunol* 1988;42:233-284.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. Marx A, Hohenberger P, Hoffmann H, Pfannschmidt J, Schnabel P, Hofmann HS et al. The autoimmune regulator AIRE in thymoma biology: autoimmunity and beyond. *J Thorac Oncol*. 2010;5:266-72.
88. Marx A, Wilisch A, Schultz A, Gattenlöhner S, Nenninger R, Müller-Hermelink HK. Pathogenesis of myasthenia gravis. *Virchows Arch*. 1997; 430: 355-364.
89. Masuyama J, Kaga S, Kano S, Minota S. A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4+ regulatory T cells. *J Immunol* 2002;169:3710-3716.
90. 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.

91. 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.
92. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurology*.2009;8:475-490.
93. 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.
94. Motomura M, Narita Masuda T. Autoantibodies in myasthenia gravis. *Brain Nerve* 2013;65(4):433-439.
95. 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.
96. Nenninger R, Schultz A, Hoffacker V, Helmreich M, Wilisch A, Vandekerckhove B et al. Abnormal thymocyte development and generation of autoreactive T cells in mixed and cortical thymomas. *Lab Invest*. 1998;78:743-753.
97. Newsom-Davis J, Cutter G, Wolfe GI, Kaminski HJ, Jaretzki A 3rd, Minisman G, et al. Status of the thymectomy trial for nonthymomatous myasthenia gravis patients receiving prednisone. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:344-347.
98. Newsom-Davis J. The emerging diversity of neuromuscular junction disorders. *Acta Myol* 2007; 16: 5-10.
99. 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.
100. 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.
101. Papatestas AE, Genkins G, Kornfeld P, Eisenkraft JB, Fagerstrom RP, Pozner J, et al. Effects of thymectomy in myasthenia gravis. *Ann Surg* 1987;206:79-88.

102. Pasaoglu I, Dogan R, Topcu M, Gungen Y. Multicentric angiofollicular lymph-node hyperplasia associated with myasthenia gravis. *Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 42:253-256.
103. Pevzner A, Schoser B, Peters K, Cosma NC, Karakatsani A, Schalke B et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol.* 2012; 259(3):427-35.
104. 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.
105. Roche JC, Capablo JL, Larrad L, Gervas-Arruga J, Ara JR, Sánchez A et al. Increased serum interleukin-17 levels in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2011. 44: 278-280.
106. Rodolico C, Toscano M, Autunno S. Limb-girdle myasthenia: clinical, electrophysiological and morphological features in familiar and autoimmune cases. *Neuromuscul Disord* 2002;12:964-969.
107. Romagnanni S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis.* 1999;5:285-294
108. Romi F, Gilhus NE, Varhaug JE, Myking A, Aarli JA. Disease severity and outcome in thymoma myasthenia gravis: a long-term observation study. *Eur J Neurol.* 2003;10:701-706.
109. Romi F, Skeie GO, Aarli JA, Gilhus NE. Muscle autoantibodies in subgroups of myasthenia gravis patients. *J Neurol* 2000;247:369- 375.
110. Romi F, Skeie GO, Gilhus NE, Aarli JA. Striational antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance. *Arch Neurol.* 2005;62:442-446.
111. 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.
112. Rothstein DH, Voss Sd, Puder MIM. Thymoma in a child: case report and review of the literature. *Pediatr Surg Int* 2005;21:548-551.
113. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-787.

114. Sanders DB, Hart IK, Mantegazza R, Shukla SS, Siddiqi ZA, De Baets MH et al. An international, phase III, randomized trial of mycophenolate mofetil in myasthenia gravis. *Neurology* 2008;71:400-406.
115. Sanders DB. Generalised myasthenia gravis: Clinical presentation and diagnosis. In: Kaminski HJ. *Myasthenia gravis: Diagnosis and Treatment. Education program syllabus American Academy of Neurology. 56th Annual Meeting. San Francisco: 2004. p 10-17.*
116. Seybold ME, Lindstrom JM. Patterns of acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1981;377:292-306.
117. Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400.
118. Shigemotto K, Kubo S, Jie C, Hato N, Abe Y, Ueda N et al. Myasthenia gravis experimentally induced with muscle-specific kinase. *Ann N Y Acad Sci.*2008; 1132:93-98.
119. Skeie GO, Apostolski S, Evoli A, Gilhus NE, Hart IK, Harms L, et al. Guidelines for the treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol* 2006;13:691-699.
120. Sommer N, Tackenberg B, Hohlfeld R. The immunopathogenesis of myasthenia gravis. In: Engel AG. *Neuromuscular junction disorders. Amsterdam; Elsevier 2008: 169-212.*
121. Sonett JR, Jaretzki A 3rd. Thymectomy for nonthymomatous myasthenia gravis. A critical analysis. *Ann NY Acad Sci* 2008;1132:315-328.
122. Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* 1995; 86:1276-1280.
123. Špalek P, Cibulcik F, Vincent A. Myasthenia gravis and associated neurologic autoimmune disorders. *Neuromusc Dis* 2004; 14:618.
124. Špalek P, Schnorrer M, Krajč T. Imunopatogenéza paraneoplastickéj myastenie gravis asociovanej s tymómom. *Neurologia.* 2010;5:7-11.
125. Špalek P. Myasténia gravis - autoimunitné spektrum a imunopatogenetická klasifikácia. *Neurologia.* 2009;4:25-30.

126. Špalek P. Myasténia gravis. *Cesk Slov Neurol N* 2008; 71/104:7-24.
127. Špalek P. Týmómy a paraneoplastická autoimunita. *Cesk Slov Neurol N* 2002;65/98: 367-373.
128. Ströbel P, Chuang WY, Marx A. Thymoma-associated paraneoplastic myasthenia gravis. In: Kaminski HJ, editor. *Myasthenia gravis and related disorders*. New York: Humana Press 2009; p. 105-117.
129. Ströbel P, Helmreich M, Menioudakis G, Lewin SR, Rüdiger T, Bauer A et al. Paraneoplastic myasthenia gravis correlates with generation of mature naive CD4(+) T cells in thymomas. *Blood* 2002;100:159-166.
130. Strober J, Cowan MJ, Horn BN. Allogenic hematopoietic cell transplantation for refractory myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2009;66:659-661.
131. 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.
132. 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.
133. Suster S, Moran CA. Thymoma classification: current status and future trends. *Am J Clin Pathol* 2006;125:542-554
134. Takatsu K. Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 215:121-133.
135. 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.
136. The Muscle Study Group. A trial of mycophenolate mofetil with prednisone as initial immunotherapy in myasthenia gravis. *Neurology* 2008;71:394-399.
137. Tormoehlen LM, Pascuzzi RM. Thymoma, myasthenia gravis, and other paraneoplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2008;22:509-526.

138. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*, 2006;108:253-61.
139. Vernino S, Lennon VA. Muscle and neuronal autoantibody markers of thymoma: neurological correlations. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;998:359-361.
140. Vigiotta 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.
141. Vincent A. Autoantibodies in neuromuscular transmission disorders. *Ann Indian Neurol*. 2008;11:140-145.
142. 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.
143. Walker LS. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun* 2013;45:49-57.
144. Wang Z, Wang W, Chen Y, Wei D. T helper type 17 cells expand in patients with myasthenia-associated thymoma. *Scand J Immunol* 2012;76: 54–61.
145. Wang ZY, Link H, Qiao J, Olsson T, Huang WX. Cell autoimmunity to acetylcholine receptor and its subunits in Lewis rats over the course of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 1993;45:103-112.
146. Wang ZY. Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: role of CD4+ and CD8+ cells. *Neurology*. 1999;52:484-497.
147. Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 2006; 133: 4993–5000.
148. Witte AS, Cornblath DR, Parry GJ, Lisak RP, Schatz NJ. Azathioprine in the treatment of myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 1984;15:602-605.

149. Wolfe GI, Barohn RJ, Foster BM, Jackson CE, Kissel JT, Day JW et al. Randomized, controlled trial of intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2002; 26:549-552.
150. Wolfe GI, Oh SJ. Clinical phenotype of muscle-specific tyrosine kinase-antibody-positive myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:71-75.
151. Wolfe GI, Triverdi JR, Oh SJ. Clinical review of muscle-specific tyrosine kinase-antibody positive myasthenia gravis. *J Clin Neuromusc Dis* 2007; 8:217-224.
152. Wolfe GI, Kaminski HJ, Jaretzki A 3rd, Swan A, Newsom-Davis J. Development of a thymectomy trial in nonthymomatous myasthenia gravis patients receiving immunosuppressive therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2003;998:473-480.
153. Yadav S, Lesic C. Extra thoracic Castleman disease associated with myasthenia gravis. *Indian J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 26(4):275-276.
154. Yates A, Bergmann C, van Hemmen JL, Stark J, Callard R. Cytokine-modulated regulation of helper T Cell populations. *J Theor Biol.* 2000;206:539-560.
155. Zebardast N, Patwa HS, Novella SP, Goldstein JM. Rituximab in the management of refractory myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2010; 41(3): 375-378.
156. Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L. LRP4 Serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 2008; 60: 285–297.
157. 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.
158. 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.
159. Zisimopoulou P, Evangelakou P, Tzartos J, Lazaridis K, Zouvelou V, Mantegazza R et al. A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. *J Autoimmun* 2014;52:139-145.

PŘÍLOHA č.1 – IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

JAKUBÍKOVÁ, Michala. Imunopatogenetické mechanismy u myasthenia gravis a vliv thymektomie.[Thymectomy and immune mechanisms in patients with myasthenia gravis]. Praha, 2016. 109 s., 2 příl. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd. Vedoucí práce Nevšímalová, Soňa.

PŘÍLOHA č. 2 – 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., Dušl 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.