

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Myasthenia gravis a léčba pomocí inhibitorů acetylcholinesterázy

Daniela Brandová

Bakalářská práce

2012

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Myasthenia gravis and the treatment with acetylcholinesterase inhibitors

Daniela Brandová

Thesis

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Daniela Brandová**
Osobní číslo: **C09574**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Myasthenia gravis a léčba pomocí inhibitorů acetylcholinesterázy**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši zabývající se Myasthenia gravis a možnostmi její léčby.
2. Zaměřit se na popis podstaty Myasthenia gravis, klinického obrazu, diagnostiky a možné terapie.
3. Dále popsat funkci, strukturu a mechanismus působení cholinesteráz.
4. Další část věnovat popisu inhibitorů cholinesteráz, mechanismu jejich působení, dělení a možnosti jejich využití jako léčiv Myasthenia gravis.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 4. 2012

Daniela Brandová

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za trpělivost, vstřícné jednání a velkou pomoc při vedení mé bakalářské práce.

Také děkuji rodině a přátelům za podporu během celého studia.

SOUHRN

Myasthenia gravis je autoimunitní onemocnění postihující nervosvalový přenos. V těle cirkulují protilátky napadající acetylcholinové receptory, na něž se pak nemůže navázat uvolněný acetylcholin, který je mediátorem umožňující nervový transfer. Tento děj způsobuje slabost příčně pruhovaných svalů a jejich snadnou unavitelnost při fyzické zátěži.

Tato práce je zaměřena na charakterizaci Myasthenia gravis z hlediska klasifikace, klinického obrazu, způsobů diagnostiky a možností terapie, a také na popis struktury a funkce cholinesteráz a jejich inhibitorů, neboť symptomatická terapie Myasthenia gravis využívá inhibitorů acetylcholinesterázy.

Acetylcholinesteráza je enzym, který způsobuje rozklad acetylcholinu na nervových zakončeních. Inhibitory acetylcholinesterázy zajišťují dostatek acetylcholinu na nervových zakončeních v případě patofyziologie Myasthenia gravis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Myasthenia gravis, acetylcholin, cholinesterázy, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, inhibitory acetylcholinesterázy.

ABSTRACT

Myasthenia gravis is an autoimmune disease affecting a neuromuscular transmission. The antibodies are circulating in the body and they are invading the acetylcholine receptors, where the acetylcholin is a mediator and it cannot be binding on receptors. This process causes the weakness of the striated muscles and an ease fatigue during the physical activity.

This work is about a characterization of Myasthenia gravis in the terms of the classification, clinical presentation, diagnostic methods and treatment options, and also the description of the structure and function of cholinesterase inhibitors. Acetylcholinesterase inhibitors are used as one of the options of therapy in Myasthenia gravis.

Acetylcholinesterase is an enzyme causing the breakdown of acetylcholine at nerve endings. Acetylcholinesterase inhibitors provide enough acetylcholine at nerve endings in the case of the pathophysiology of Myasthenia gravis.

KEYWORDS

Myasthenia gravis, acetylcholin, cholinesterases, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, acetylcholinesterase inhibitors.

Seznam použitých zkratk

Ab-AChR	protilátka proti acetylcholinovému receptoru
Ab-MuSK	protilátka proti svalové specifické tyrosinkináze
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChEI	inhibitor acetylcholinesterázy
AChR	acetylcholinový receptor
AP	akční potenciál
BCh	butyrylcholin
BChE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervový systém
CT	počítačová tomografie
EMG	elektromyografie
E2	17- β -estradiol
FVC	usilovný výdech (forced vital capacity)
ChE	cholinesterázy
ChEI	inhibitory cholinesteráz
MG	myasthenia gravis
MK	myastenická krize
MR	magnetická rezonance
MuSK	svalově specifická tyrosinkináza
PCh	propionylcholin
RIA	radioimunoanalýza
RTG	rentgen
SFEMG	single-fibre elektromyografie
SNMG	séronegativní myasthenia gravis
SPMG	séropozitivní myasthenia gravis
StMA	antistriatální protilátka

Obsah

1 ÚVOD	13
2 Myasthenia gravis	14
2.1 Definice Myasthenia gravis	14
2.2 Etiologie Myasthenia gravis	14
2.2.1 Nervový a nervosvalový přenos.....	14
2.2.2 Acetylcholinový receptor.....	16
2.2.3 Porucha nervosvalového přenosu u MG.....	17
2.3 Imunopatogeneze Myasthenia gravis.....	17
2.3.1 Genetické vlivy.....	17
2.3.2 Hormonální faktory.....	18
2.3.3 Vliv zevního prostředí	19
2.4 Klasifikace MG	19
2.4.1 Séropozitivní Myasthenia gravis (SPMG) s časnou manifestací.....	19
2.4.2 Séropozitivní Myasthenia gravis (SPMG) s pozdní manifestací.....	20
2.4.3 Séronegativní Myasthenia gravis (SNMG).....	20
2.4.3.1 Séronegativní Myasthenia gravis (SNMG) s protilátkami proti specifické tyrozinkináze (MuSK).....	20
2.4.4 Myasthenia gravis asociovaná s thymomem	20
2.5 Klinický obraz.....	21
2.5.1 Slabost vnějších okohybných svalů (oslabení extraokulárních svalů)...	21
2.5.2 Slabost dýchacích svalů	22
2.5.3 Slabost mimických svalů.....	22
2.5.4 Slabost šíjových svalů.....	23
2.5.5 Slabost pažních, pánevních a akrálních svalů	23
2.5.6 Myastenická krize (MK).....	23

3 Diagnostika Myasthenia gravis	24
3.1 Anamnéza	24
3.2 Klinické vyšetření	25
3.2.1 Symptomy a znaky onemocnění Myasthenia gravis	25
3.2.2 Objektivní vyšetření	25
3.2.3 Speciální klinické testy	25
3.2.4 Testování extraokulárních svalů	26
3.2.5 Vyšetření mimických, šjiových a orofaryngeálních svalů	28
3.2.6 Testování svalstva horních a dolních končetin	28
3.2.7 Vyšetření respiračního svalstva	29
3.3 Elektrodiagnostika	29
3.3.1 Repetitivní stimulace motorického nebo smíšeného nervu	29
3.3.2 Vyšetření nervosvalového jitteru metodou elektromyografie (EMG) jednotlivého vlákna (single fibre EMG- SFEMG)	29
3.3.3 Konvenční elektromyografie (EMG)	30
3.4 Imunologická diagnostika	30
3.4.1 Protilátky proti acetylcholinovému receptoru (Ab-AChR)	30
3.4.2 Protilátky proti svalově specifické tyrozinkináze (MuSK)	31
3.4.3 Antistriální protilátky (StMA)	31
3.5 Radiodiagnostika	31
4 Léčba	32
4.1 Historie	32
4.2 Léčba Myasthenia gravis	32
4.2.1 Symptomatická terapie	33
4.2.2 Imunosupresivní a imunomodulační terapie	33
5 Epidemiologie Myasthenia gravis	36
6 Cholinesterázy	37

6.1 Acetylcholinesteráza (AChE).....	37
6.2 Butyrylcholinesteráza (BChE)	39
7 Inhibitory cholinesteráz (ChEI).....	40
7.1 Dělení inhibitorů cholinesteráz	40
7.2 Inhibitory acetylcholinesterázy používané k léčbě Myasthenia gravis.....	42
7.2.1 Dělení inhibitorů acetylcholinesterázy (AChEI)	42
7.2.2 Inhibitory acetylcholinesterázy používané k léčbě myasthenia gravis...	43
8 ZÁVĚR	44
9 SEZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ:	45

1 ÚVOD

Myasthenia gravis (MG) patří mezi onemocnění autoimunitní povahy postihující nervosvalový přenos. MG je charakterizována slabostí příčně pruhovaného svalstva a po fyzické námaze dochází k jejich rychlé unavitelnosti. To je způsobeno autoprotilátkami, které jsou namířeny proti vlastním tkáním organismu, zde se jedná o acetylcholinové receptory (AChR), díky nimž je umožněn nervový transfer. U MG dochází k blokaci nikotinového AChR, takže acetylcholin není schopen se navázat. Existuje mnoho vlivů, díky nimž může MG vzniknout a progredovat (genetické, hormonální vlivy, vlivy vnějšího prostředí atd.).

Mezi hlavní a první příznaky MG patří ptóza víček a diplopie. V případě neléčené nemoci dochází k progresi a vzniku generalizované MG. Z epidemiologických výzkumů vyplývá, že prevalence MG stabilně narůstá, ale mortalita se ustálila.

Cílem této práce je seznámení a charakterizace onemocnění MG, přiblížení pomocí jakých diagnostických metod lze MG určit a jak se MG léčí. Tato práce také zahrnuje popis struktury a mechanismu působení cholinesteráz (ChE) a jejich inhibitorů (ChEI). Zabývám se zde i popisem struktury, funkce a mechanismu působení inhibitorů acetylcholinesteráz (AChEI), které jsou využívány v symptomatické terapii MG.

2 Myasthenia gravis

2.1 Definice Myasthenia gravis

Myasthenia gravis (MG) je chronické nervosvalové onemocnění charakterizované slabostí příčně pruhovaných svalů a při tělesném výkonu dochází k rychlé svalové únavě. Toto postižení je autoimunitní povahy a poprvé bylo objasněno Thomasem Willisem roku 1672. MG postihuje postsynaptickou část nervosvalového spojení. Je to způsobeno protilátkami, jež směřují proti vlastním tkáním organismu. Zde se jedná o acetylcholinové receptory (AChR), díky nimž dochází k nervovému transferu. Tyto receptory jsou autoprotiátkami ničeny nebo slučovány se sousedními a startuje se tak jejich likvidace pomocí endocytózy. Mezi první příznaky MG u většiny pacientů patří ptóza víček a binokulární diplopie. U 90 % pacientů s těmito příznaky dochází k progresi do stádia slabosti bulbárních a končetinových svalů během 3 let. [1,2,3,4,5]

2.2 Etiologie Myasthenia gravis

Za původ onemocnění Myasthenia gravis zodpovídá mnoho vlivů. Pro pochopení etiologie MG je nutné přiblížit, jak nervy a svaly spolupracují, aby mohl vzniknout pohyb, jak se šíří vzruch a co vlastně indukuje vznik této choroby.

V následujících oddílech bude objasněna funkce nervového, nervosvalového přenosu a význam pojmů acetylcholin a acetylcholinový receptor.

2.2.1 Nervový a nervosvalový přenos

Citlivý organismus odpovídá na nějaký stimul či změnu vnějšího prostředí pomocí dráždivosti. Dispozicí pro dráždivost je tedy senzibilita.

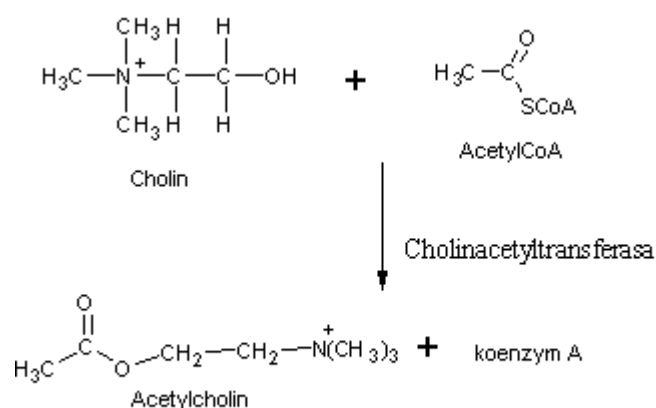
Například z bezprostředního okolí mohou k buňce prostoupit informace, které mají povahu chemických signálních látek (změna skladby extracelulární tekutiny), nebo informace mířící ke specializovaným chuťovým či čichovým buňkám.

Nervová signalizace, jež je mnohem rychlejší, se pohybuje pomocí vzruchů nervovými vlákny přes synapse, kde je obvykle převáděna chemicky, k dalším neuronům (buňky nervového systému), nebo svalovým či sekrečním, eventuelně neurosekrečním buňkám. Rozpoznání chemického podnětu probíhá na povrchu

nebo uvnitř buňky na specifických vazebných místech. Tato vazebná místa jsou označována jako receptory. Mají bílkovinný charakter a schopnost vázat speciální signální molekuly s vysokou afinitou.

Kosterní svalstvo je ovládáno téměř všemi oddíly centrálního nervového systému (CNS) od mozkové kůry po páteřní míchu.

Mediátorem přenášejícím vzruchy v nervosvalovém přenosu je acetylcholin (ACh). ACh je uložen ve vezikulech v presynaptických zakončeních nervových vláken a vzniká syntézou cholinu a acetátu. Cholin je amin a je vychytáván a syntetizován cholinergními neurony. K aktivaci acetátu (převedení na acetyl-CoA) dochází sloučením acetylové skupiny a redukovaného koenzymu A. Cholinacetyltransferáza je enzym, jenž katalyzuje reakci mezi acetyl-CoA a cholinem. Cholinergní neurony jsou ty neurony, které uvolňují ACh. [3,6]

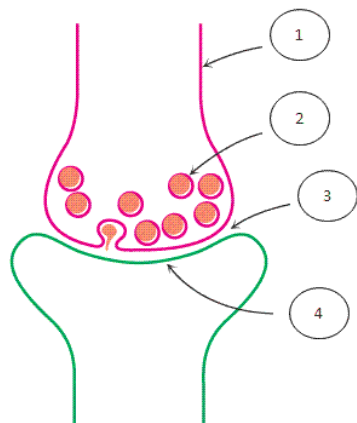


Obr. 1: Syntéza acetylcholinu (ACh)

Acetylcholin se uvolňuje v době, kdy dochází k nervové excitaci po vlákně motoneuronu v místě nervosvalové ploténky, která se skládá z axonů nervosvalové buňky a sarkolemy. Tento proces dává podnět pro zrod akčního potenciálu (AP) na sarkolemě, což analogizuje s inervací v CNS. Tím, že se acetylcholinové (nikotinové) receptory uvedou v činnost, dojde k lokální depolarizaci, neboť tato aktivita souvisí se změnou koncentrace Na⁺ iontů v buňce.

Mediátor je propouštěn na zakončení nervových vláken a to probíhá jak hromadně, tak i jednotlivě, když se nahodile setká váček obsahující ACh a presynaptická membrána. ACh se uvolní v malém množství do synaptické štěrbině

a tím aktivuje na postsynaptické membráně poměrně nízký počet postsynaptických receptorů. Dochází k místnímu podráždění, avšak nezpůsobí vznik AP. [2,3,4,6]



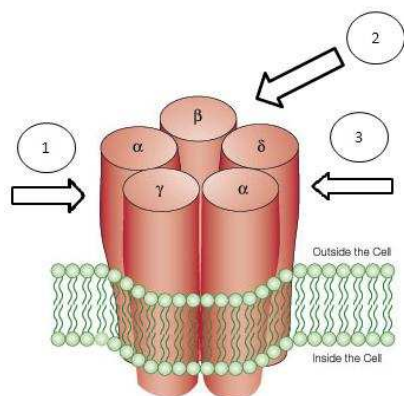
Obr. 2: Synapse a uvolnění mediátoru [7]

1) presynaptické zakončení axonu nervu, 2) synaptická tělíska (váčky s ACh), 3) synaptická štěrbina, 4) postsynaptická membrána

2.2.2 Acetylcholinový receptor

Známe dva druhy acetylcholinových receptorů, a to muskarinové a nikotinové. Muskarin je alkaloid obsažený v muchomůrkách a je zodpovědný za jejich toxickou povahu. Jeho účinnost je malá a jeho dráždivé působení kopíruje účinky acetylcholinu na hladké svalstvo a žlázy. Příslušné receptory nazýváme muskarinové a jejich činnosti brání atropin.

Nikotinové receptory představují druhý typ a na jejich aktivitu má vliv nikotin. Tlumícími účinky disponuje kurare (šípový jed), dojde k inaktivaci acetylcholinu pomocí acetylcholinesterázy (AChE).



Obr. 3: Nikotinový acetylcholinový receptor [8]

1) a 3) vstup acetylcholinu, 2) vstup iontů Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , 2 α -, β -, γ -, δ - podjednotky

Nikotinový acetylcholinový receptor (AChR) je iontový kanál, který ovládá ligand. Jeho struktura se skládá z 5 podjednotek zastoupených 2 podjednotkami alfa, jednou beta a delta. U dospělých se dále vyskytuje podjednotka ϵ . U fetálního typu se objevuje podjednotka γ . Po navázání dvou ACh molekul na vazebná místa pro ně určená se otevírá iontový kanál. Poté se uvolní i sodíkový kanál uvnitř AChR a svalové vlákno je depolarizováno a kontrahováno po vstupu Na^+ iontů. Nervosvalový přenos zakončuje enzym AChE, který hydrolyticky rozkládá acetylcholin na acetyl a cholin.

Organizaci nervosvalového spojení má na starost funkční komplex bílkovin-svalově specifická tyrosinkináza (MuSK), má vliv i na správnou funkci AChR. [6,9]

2.2.3 Porucha nervosvalového přenosu u MG

Nikotinový receptor je blokován protilátkou, a tak nemůže dojít k navázání acetylcholinu.

2.3 Imunopatogeneze Myasthenia gravis

Thymus zaujímá velmi podstatnou roli v imunopatogenezi MG. Selektuje paměťové T-buňky, jejichž úkolem je rozeznat vlastní a cizí antigeny. Mechanismus poruchy autotolerance je stále neznámý. S folikulární hyperplazií se setkáváme u 80 % pacientů s MG.

I genetické, hormonální, environmentální a imunitní faktory se uplatňují v imunopatogenezi MG. [2,10]

2.3.1 Genetické vlivy

Četnost familiárních MG je relativně nízká. Jisté riziko, že se MG projeví u pokrevních příbuzných 1. generace je 2-3 %, 40 % je u jednovaječných dvojčat.

Nejdůležitějším genetickým faktorem je HLA systém. V bělošské populaci pacientů s MG s thymickou folikulární hyperplazií se objevuje haplotyp A1, B8, DR3. Haplotyp vysvětlujeme jako skupinu alel, která se nachází na jednom chromozomu a nerekombinují se, to vede k tomu, že se dědí spolu a ne jen jedna. Thymická folikulární hyperplázie znamená, že se v brzlíku objevuje nadpočet zárodečných center, které jsou formovány B-lymfocyty a dochází k infiltraci

perivaskulárního prostoru. Vyskytují se rozdílné nálezy u pacientů z Dálného Východu a evropských pacientů. U nemocných s thymomem (nádor brzlíku) není dokázána žádná spojitost s HLA antigeny. Pokud mají pacienti s MG protilátky proti MuSK, existuje asociace s antigeny HLA systému s haplotypy DR14-DQw5.

Pozornost je věnována i genům mimo MHC (u lidské populace je to HLA) systém. Major Histocompatibility Complex (MHC systém) se účastní rozeznávání cizorodých antigenů a po přichycení těchto antigenů na povrch MHC je prezentují buňkám imunitního systému. Těmito geny jsou kódovány strukturální proteiny nervosvalové ploténky nebo buňky podílející se na patogenezi MG. [2,11,12]

2.3.2 Hormonální faktory

Ženské pohlavní hormony hrají významnou roli v autoimunitních pochodech v souvislosti s menstruačním cyklem, těhotenstvím, kojením a postmenopauzálním stavem. Dysregulace estrogenních receptorů lymfocyty u MG podporuje progresi autoimunitní odpovědi. B buňky produkují autoprotiilátky. 17 β - estradiol (E2) v periovulačních a těhotenských dávkách inhibuje prozánětlivé cytokiny. Takže je možné, že těhotenství s vysokými titry E2 a progesteronu může manifestovat MG. Tudíž v raném reprodukčním věku je možné, že dojde k zesílení onemocnění. Standardně dochází k eliminaci B buněk v kostní dřeni, ale za patologických procesů v organismu přežívají a vyžívají v lymfatických orgánech. V případě, že účinek T a B lymfocytů je v rovnováze, počínající MG u žen je opožděna, neboť E2 inhibuje T buněčnou autoimunitu, ale stimuluje B buňkami spouštěnou autoimunitu.

Prolaktin je dalším hormonem, s nímž je spojen hormonální vliv na MG. Tento hormon produkuje adenohypofýza a během kojení je stimulována jeho sekrece. Jeho zvýšenou hladinu pozorujeme u řady autoimunitních nemocí.

Melatonin je též produkován hypofýzou, ale i kostní dření, lymfatickými uzlinami a thymem. Hraje důležitou roli v regulaci cirkadiálních rytmů. Jeho hladina koreluje s výskytem autoimunitních chorob.

U pacientů s MG v 5-10 % nacházíme onemocnění štítné žlázy. Hypotyreóza zaujímá 50 % a hypertyreóza druhou polovinu. [4,13]

2.3.3 Vliv zevního prostředí

Prostředí, ve kterém se člověk pohybuje, značně ovlivňuje jeho imunitní systém. Jde o citlivost na fyzikální, chemické a biologické faktory. Pokud je jedinec jistým způsobem geneticky predisponován, může dojít k poruchám imunity (alergie, autoimunita). Kouření, alkohol, další návykové látky, exhalace rtuti apod. provokuje vznik autoimunitních chorob.

Podání D-penicilaminu indukuje MG (při léčbě revmatoidní horečky). Reaktivní thiolové skupiny obsažené v D-penicilaminu mohou přeměňovat autoantigeny. To pak vede k MG u predisponovaných osob s HLA-DR1. K manifestaci MG přispívá i rituximab, který je indikován při léčbě invazivní aspergilózy.

Nedílnou součástí zevních faktorů jsou i vlivy životních a pracovních podmínek, sociální prostředí, životní úroveň, stravovací návyky a psychosociální vlivy. Modulují totiž predispozice ke vzniku autoimunitních nemocí.

Infekční faktory tvoří další složku imunopatogeneze autoimunitních onemocnění. Patří sem zejména mikrobiální infekce a viry.

Mezi imunitní faktory řadíme autoprotilátky. [4]

2.4 Klasifikace MG

MG členíme do jednotlivých skupin podle přítomných protilátek, patologie brzlíku a věku manifestace. Tyto oddíly je možné charakterizovat i podle klinických projevů.

2.4.1 Séropozitivní Myasthenia gravis (SPMG) s časnou manifestací

Tento druh MG je nejznámější a nejprozkoumanější. Setkáváme se s ním u pacientů do 45ti let a nacházíme u nich hyperplazii thymu. Thymus má za fyziologických okolností schopnost pozitivně eliminovat T-buňky, které rozpoznávají vlastní a cizí antigeny. Ženy jsou postiženy častěji než muži. Pozorujeme generalizovanou slabost, ale i slabost okulárních svalů (okulární MG). Pro dosažení bezpříznakového období je nejúčelnější a nejúčinnější thymektomie (70 % případů). [2,14]

2.4.2 Séropozitivní Myasthenia gravis (SPMG) s pozdní manifestací

Tato SPMG se vyskytuje nejčastěji. U mužů se objevuje až dvojnásobná prevalence. Pokud pacienti trpí vyšším výskytem thymomu, mohou podléhat těžším příznakům. Jestliže se thymom neobjevuje, tak nejčastěji nacházíme u pacientů atrofii thymu. Takže zde nemá thymektomie vyšší význam. [2,14]

2.4.3 Séronegativní Myasthenia gravis (SNMG)

Pokud máme v rukou jasný elektrofyziologický náález, aniž by byly přítomny protilátky při klinických známkách MG, jde o SNMG. Ke zlepšení klinického stavu přispívá léčebná plasmaferéza, imunosupresivní terapie a někdy i thymektomie. Postižení s tímto typem MG mají obvykle patologický thymus, u některých se vyskytují nízkoafinní protilátky. [2,15]

2.4.3.1 Séronegativní Myasthenia gravis (SNMG) s protilátkami proti specifické tyrosinkináze (MuSK)

Někteří pacienti s MG nemají protilátky proti AChR (asi 15-20 % pacientů). Zde jde také o onemocnění s cirkulujícími autoprotiilátkami. Jedná se o autoprotiilátky proti MuSK. MuSK je povrchový protein svalového vlákna, jehož nejdůležitějším a hlavním úkolem je zprostředkování nervosvalového spojení. Ovšem způsob, jakým je ovlivňován vznik MG, není dosud známý.

Diagnostika této MG je obtížná vzhledem k atypickým klinickým projevům, nízké prevalenci, nižší senzitivitě elektrodiagnostických testů a terapeutickém selhání při nasazení inhibitorů cholinesterázy. Můžeme pozorovat i pasivní přenos z krve matky na novorozence. Thymus je bez patologických změn, tudíž thymektomie nemá žádný význam. [2,15]

2.4.4 Myasthenia gravis asociovaná s thymomem

Tuto formu MG pozorujeme většinou u mladších pacientů. Thymomy jsou nejčastěji spojovány s autoimunitou. Závažnost onemocnění není určována velikostí a funkčním stavem thymu. Nejčastěji se objevuje hyperplazie, atrofie, nádory (thymomy) a cysty. Z chirurgické praxe je zajímavé, že 10-15 % myasteniků má thymom a až 40 % postižených thymomem trpí MG. [2,16]

2.5 Klinický obraz

Klinické projevy u myastenie jsou velmi individuální. Záleží na rozvoji, stupni a intenzitě onemocnění. Všeobecně je známa charakteristická svalová slabost a abnormální fyzická unavitelnost. To je možné kvantifikovat objektivně. Únava patří mezi subjektivní vjemy pacienta. Příznaky se zintenzivňují po fyzické či psychické zátěži, při stresu. MG je proměnlivá v čase (denní rytmus).

Slabost se může přenést z jedné svalové skupiny na jinou, i velmi vzdálenou, např. při rychlé chůzi padají víčka. U žen ke zhoršení klinických příznaků přispívá gravidita, poporodní stavy či v souvislosti s menstruací. Velmi významný vliv mají infekty, operace, očkování apod.

Pacienti netrpí bolestmi ani nemají poruchy citlivosti. Choroba má většinou monofázický průběh. Vzácně dochází ke spontánní remisi. Neléčená MG progreduje s velkým sklonem ke vzniku myastenické krize, ta postihuje až 20 % nemocných.

Prvním symptomem je postižení jedné svalové skupiny s postupným šířením do dalších svalových skupin v průběhu několika týdnů, měsíců či dokonce i několika let.

V prvotním stádiu se to může vztahovat na jakýkoli sval. Nejčastěji se to týká svalů okohybných, mimických, žvýkacích, končetinových, bránice, dýchacích svalů a svalů šíjových. [4,16,17,18,19]

2.5.1 Slabost vnějších okohybných svalů (oslabení extraokulárních svalů)

Myastenie se může rozvíjet, aniž bychom si toho všimli. Dochází k ptóze víčka, diplopii, poruše akomodace, která se projevuje zamlženým viděním. Oslnění, řízení či čtení zhoršuje symptomy, ale naopak přitnutí má kladnější vliv.

Extraokulární svaly obsahují větší počet nervosvalových plotének, malý počet svalových vláken v jedné motorické jednotce. Jsou to svaly rychlé a snadno unavitelné. Je zde nižší denzita ACh. Ptóza víčka je většinou asymetrická bez preference dominujícího oka. S tímto problémem se potýká 75 % pacientů. [2,18,19]



Obr. 4: Ptóza víček u pacientů s MG [20]

2.5.2 Slabost dýchacích svalů

Dochází k postižení bránice, pomocných dýchacích svalů a mezižebních svalů. Největším nebezpečím je, pokud dojde k selhání svalové činnosti a pacient není schopen samostatně dýchat, a tak je rychle využita umělá plicní ventilace. Pacienti vnímají subjektivně zhoršené dýchání, dušnost při námaze. [2]

2.5.3 Slabost mimických svalů

Tímto symptomem trpí asi 5-10 % nemocných. Pacient nedokáže zavřít oči, neboť je postižen musculus orbicularis oculi. Potýká se s nepříjemným pálením očí. Pokud se jedná o musculus orbicularis oris, setkáváme se u nemocných s vytékáním slin z úst.

U stavu označovaného jako „facies myasthenica“ dochází k hypomimii a pacient má ospalý, smutný výraz. [2]



Obr. 5: Slabost obličejových svalů [21]

2.5.4 Slabost šíjových svalů

Symptomem je tzv. „dropped head syndrom“, kdy nemocným přepadává hlava, jde o postižení především flexorových svalů. [2]

2.5.5 Slabost pažních, pánevních a akrálních svalů

Slabost se projevuje při vzpažení horní končetiny, u postižení pánve při chůzi. Jedná se o 5-10 % případů. [2]

2.5.6 Myastenická krize (MK)

Tento stav bezprostředně ohrožuje pacienta na životě. Je to dáno tím, že selhávají pomocné dýchací svaly spolu s bránicí, a tudíž je nutné zavést umělou plicní ventilaci. V prvních 2 letech od počátku onemocnění je riziko vývoje MK zhruba 20 % u pacientů, kteří jsou starší 60 ti let, trpí přidruženými chorobami (ischemická choroba srdeční, arteriální hypertenze apod.) a ti pacienti, kteří již MK prošli. K vývoji MK přispívají respirační infekce. Dále má vliv hypohydratace a malnutrice, jejichž důsledkem je oslabení orofaryngeálních svalů. Náhlý psychický stres, podání rizikových léků apod. pomáhá také k rozvoji MK.

MK má obvykle velmi rychlý průběh v řádech minut nebo probíhá pomalu s generalizovanou slabostí. Jakmile dojde k zástavě dýchání, kyslík nesaturuje krev a do 4-5 minut se zastavuje srdeční činnost. Při postupném vývoji je pacient dušný, úzkostný, psychicky neklidný.

MK setrvává po dobu 10-14dnů. [13,22,23]

3 Diagnostika Myasthenia gravis

Pomocí charakteristického průběhu a vyšetření pacienta podezřelého z onemocnění MG je možné stanovit diagnózu MG. Nicméně není neobvyklé, že si lékaři této diagnózy nevšimnou. Dochází tomu zvláště u starších pacientů, kteří trpí oslabením okulárních či orofaryngeálních svalů nebo u mladších pacientů, u kterých převažuje slabost končetinových svalů. Nejdříve se lékaři při diagnostice věnují rodinné anamnéze, subjektivním údajům postiženého a objektivním posudkům vyšetřujícího lékaře. Je třeba pozorného neurologického vyšetření i zátěžových testů. Prvním doporučeným krokem bývá vyšetření protilátek proti AChR, eventuelně MuSK. I když bude test negativní a klinické podezření stále trvá, je pacient podroben vyšetření elektrofyziologickému. Pomocí počítačové tomografie (CT) je u pacienta s MG provedeno vyšetření, které vede buď k pozitivnímu nebo negativnímu nálezu thymomu. Je nutné brát v úvahu, že se může jednat i o jiné MG podobné onemocnění. [2,4,5]

3.1 Anamnéza

Rozbor anamnézy je základním krokem k diagnostice MG. Detailní analýze průběhu a výskytu symptomů vedoucích k diagnóze MG je třeba věnovat velkou pozornost. Lékaři se snaží pomocí subjektivního výkladu pacienta najít dobu prvních příznaků. Tyto symptomy mohou být opomenuty po řadu let. Je třeba uvážit, co a kdy provokovalo a provokuje k manifestaci MG. Důležitá je závislost osobně vnímaných obtíží na stresu nebo fyzické zátěži. Lékař potřebuje znát i průběh předchozích infekcí, kterému očkování se pacient podrobil, které léky užívá a u žen je podstatný i vliv menstruace. Někdy si pacienti stěžují na křeče či bolest. Pokud pacient uvádí parestézii, tj. brnění, pálení (obecně označováno jako mravenčení), nejde o symptom MG.

I při normálním pohledu na vzhled pacienta si můžeme všimnout některých typických rysů MG, mezi něž patří např. padající oční víčka, pokles hlavy či utlumená mimika.

MG nemá charakter dědičné choroby, ale v rodině se mohou objevovat jiná autoimunitní onemocnění, jimž je třeba věnovat pozornost. [13]

3.2 Klinické vyšetření

3.2.1 Symptomy a znaky onemocnění Myasthenia gravis

Pacienti si často stěžují na svalovou slabost. Více než 65 % postižených trpí okulárními symptomy dvojitého vidění a padajících očních víček. Méně než jedna čtvrtina pacientů poukazuje na přítomnost příznaků typu ztíženého žvýkání, změny hlasu, apod. Dalším znakem vedoucí k diagnóze MG je dušnost. Nejmírnější příznaky MG jsou po probuzení, během dne se stav nemocného zhoršuje. [2,4]

3.2.2 Objektivní vyšetření

Pomocí klasické neurologie odlišujeme MG od jiných onemocnění s podobnými symptomy. Lékař vyšetřuje reakce zornic a příznaků, díky nimž může odhalit lézi v zadní jámě lební. Pokud jde o tzv. centrální symptomatologii, můžeme vyloučit poruchu nervosvalového typu. Kognitivní funkce nejsou porušeny u MG. Při vyšetření v klidovém stavu si všímáme některých příznaků, mezi něž řadíme strabismus, poruchu okohybného svalstva, utlumení mimiky či atrofii jazyka. [2,24]

3.2.3 Speciální klinické testy

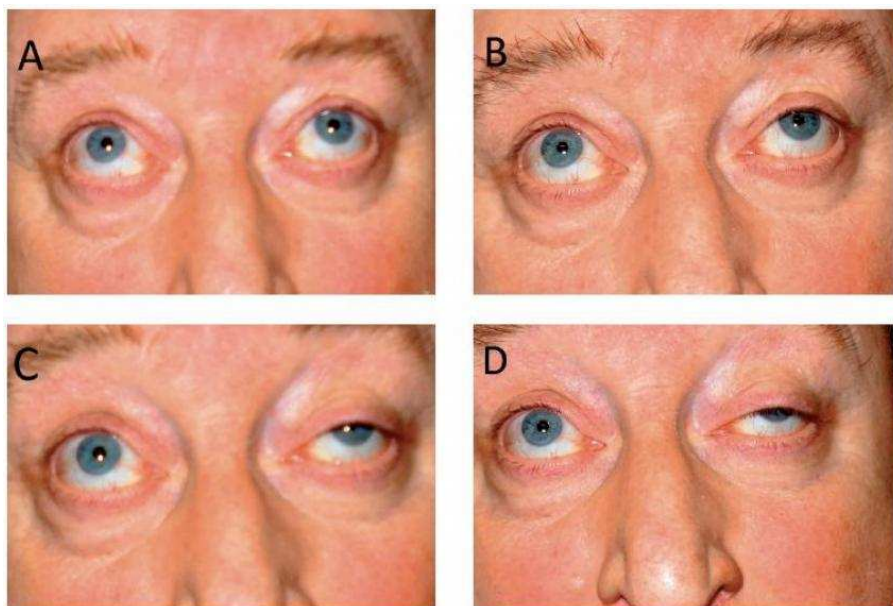
Patří mezi první vyšetření u pacientů s příznačnými symptomy a napomáhá k odhalení slabostí svalů. I těch, které jsou skryté. Lékař se zaměřuje hlavně na nejnáchylnější svalové skupiny podléhající oslabení. Tyto testy uplatňujeme především u vyšetření extraokulárních svalů, neboť diagnostika v této oblasti bývá nejnáročnější. Jde o speciální provokační nebo reparační testy. Princip reparačních testů tkví v tom, že zlepšují manifestní zánikové příznaky. Zátěžové testy manifestují subklinické slabosti svalů. Správné určení diagnózy pomocí klinických testů záleží na vhodných podmínkách. Je třeba klidného prostředí s neměnnou teplotou. Diagnóza se potvrzuje laboratorním vyšetřením. Pokud je klinický nález negativní, neznamená to, že o MG nejde. [2,4,5,13]

3.2.4 Testování extraokulárních svalů

Jedná se o reparační farmakologický test. K jeho provedení je předpokladem očividná ptóza víčka, která může být jak jednostranná, tak oboustranná. Nebo pokud pacient trpí oslabením jednoho nebo více extraokulárních svalů. Pokud lékař aplikuje pacientovi edrofonium (Tensilon®), jedná se o klasický farmakologický test. Edrofonium slouží jako inhibitor cholinesterázy, jehož působení je velmi krátké. Účinek zaznamenáváme již po 30s. A po cca 5 minutách se vytratí. Po aplikaci 2 mg Tensilonu® intravenózně čekáme 60s kvůli podchycení případné intolerance. Pokud pacient nejeví žádné známky intolerance, pokračujeme v podávání Tensilonu® v množství 2-4 mg. V případě, že se objeví nějaké nežádoucí účinky, má lékař připravený atropin v injekční stříkačce v množství 0,4-1 mg. Jako nežádoucí účinek se může objevit např. bradykardie, hypotenze, bronchospasmus, apod. Během provádění testu je nutné sledovat puls a krevní tlak. Je žádoucí pořídít fotodokumentaci z důvodu objektivního posouzení nezávislými osobami.

V ČR a SR se edrofonium nepoužívá. Alternativou je tedy aplikace neostigminu (Syntostigmin®). Podává se subkutánně po předchozím podání atropinu 0,3-0,4 mg u dospělých či 0,01-0,02 mg/kg hmotnosti u dětí. Po 10 minutách aplikujeme Syntostigmin® intramuskulárně v množství 1-1,5 mg, u dětí 0,1-0,2 mg. Efekt je ale výrazně pomalejší, první známky pozorujeme nejdříve po 30 minutách a trvá až 3 hodiny.

Dalším vyšetřením je *Simpsonův* test. Je založen na tom, že pacient hledí usilovně vzhůru. Do 60s se projevuje ptóza.



Obr. 6: Simpsonův test

a) usilovný pohled vzhůru, b) horní víčko v kontaktu s duhovkou po 10s, c) po 20s víčko překrývá zornici z více než 50%, d) po 30s výrazná ptóza [25]

V návaznosti na předchozí test se provádí *Gorelickův* test. Pacientovi se zvedne víčko, kde je větší ptóza a po pár sekundách poklesne víčko druhého oka.

Mezi nejznámější reparační klinické testy patří „*Ice pack*“ test. K zavřenému ptotickému víčku přikládáme kostku zabaleného ledu a po 60s dojde ke zlepšení ptózy. To je dáno tím, že chlad zlepšuje funkci nervosvalové ploténky. Je to neinvazivní a bezpečný test.



Obr. 7: Ice pack test

A) před provedením testu, B) ihned po provedení (zlepšení ptózy) [26]

Pro klinickou diagnostiku je významný i *Sleep* test. Je výbornou alternativou farmakologického testování, neboť je bezpečný a vysoce specifický právě pro MG. Test je vykonáván poté, co byl pacient po dobu 30 minut v klidu se zavřenýma

očima. Po uplynutí času určeného pro odpočinek pacienta měříme rozdíly v šířce oční štěrbiny.

Obměna tohoto vyšetření je „rest“ test. Po 2 minutách, kdy má pacient zavřené oči, se jeho ptóza zlepší.

Je žádoucí zmínit další typ testu a tím je „lid twitch“ test. V roce 1965 byl popsán Coganem. Po dobu 20-30s pacient hledí dolů a poté rychle a usilovně upře pohled vpřed. Ptóza se napraví, ale prakticky ihned se navrátí do prvotního stavu.

Užitečným vyšetřením je i tzv. „recovery bedside“ test. Po 10-30s snažného sevření víček dojde opět ke zlepšení ptózy. [2,27,28]

3.2.5 Vyšetření mimických, šíjových a orofaryngeálních svalů

Testování síly musculus orbicularis oculi napoví tomu, že je u pacienta oslabena skupina mimických svalů. Síla musculus orbicularis oris se vyšetřuje tak, že pacient se snaží zapísknout, nafouknout tváře, špulit rty. Opakovaným stisknutím čelisti (100x) pozorujeme sílu žvýkacích svalů.

Další testy napomáhají k odhalení postižených různých svalových obličejových a krčních skupin. Pacient může trpět dysfagií nebo dysartrií.

K diagnostice se používá Seemanova testu, endoskopické fibroskopie, monitorace kvality polykání, atd. [2]

3.2.6 Testování svalstva horních a dolních končetin

Zde pozorujeme často asymetrický postupný pokles paží či jejich chvění a třes při abdukci a pronaci paže. Ruční dynamometr slouží k objektivizaci akrální slabosti.

Pro vyšetření dolních končetin se využívá test spočívající v udržení končetin v elevaci (flexe v kyčli) nad podložkou déle než 100s. Naopak se v praxi neosvědčily dřepy, stoupaní na židli bez opory rukou, apod. Pokud testujeme osobu tak, že stojí s flexí v kyčli a koleni a rukama se opírá o zeď v úrovni očí, jedná se o vyšetření svalstva pletence pánevního. [2]

3.2.7 Vyšetření respiračního svalstva

V případě progresu u postižených MG je nutné vyšetřit základní ventilační funkce. Pomocí přenosného ventilometru se měří usilovný výdech (FVC). Pokud změříme hodnotu FVC pod 1000 ml, pacient je v ohrožení oslabení svalstva bránice a mezižeberních svalů a manifestace myastenické krize. Když se pacient nachází v takovém stavu, kdy není schopen ústy obemknout trubičku ventilometru, je možné využití ventilometru s obličejovou maskou. Ač je to neobvyklé, slabost dýchacích svalů může být prvním příznakem MG. [2]

3.3 Elektrodiagnostika

V roce 1985 byla poprvé popsána a aplikována elektrofyziologická technika u pacientů s MG. Jolly ukázal stoupající pokles síly svalů.

3.3.1 Repetitivní stimulace motorického nebo smíšeného nervu

Základní vyšetření při poruše nervosvalového přenosu. Používá se stimulace impulzy o frekvenci 2-3 Hz. Při MG je pozitivní nález značně typický. Pozitivní nález znamená, že klesne amplituda evokované odpovědi o více jak 10 %. I u tohoto typu vyšetření sloužící k prokázání MG existují jistá omezení. Mezi tato omezení patří to, že nervosvalový přenos lze vyšetřit pouze v některých svalech, které navíc musí být přístupné k povrchové stimulaci elektrickými impulzy. Dále se musíme ohlédnout na to, jestli zrovna ten vyšetřovaný sval je či není postižen MG. Tento test nabízí snadné provedení, vysokou reprodukovatelnost a je pacienty dobře snášen.

3.3.2 Vyšetření nervosvalového jitteru metodou elektromyografie (EMG) jednotlivého vlákna (single fibre EMG- SFEMG)

Touto metodou lze pozorovat interakce mezi jednotlivými svalovými vlákny téže motorické jednotky. Je zachycena elektrická aktivita jednoho svalového vlákna při aktivaci vůlí nebo díky mikrostimulaci. Hodnotíme individuální *jitter* (chvění) jednotlivých párů u volní aktivace nebo při mikrostimulaci zaznamenáváme chvění plotének. Nervosvalový jitter definujeme jako proměnlivost časového intervalu mezi dvěma AP svalového vlákna. Tato variabilita

je velmi malá za fyziologických okolností (méně než 3 μ s). Pomocí SFEMG jsou lékaři schopni předpovídat progresi od okulární MG do generalizované formy MG. [2,10,29-32]

3.3.3 Konvenční elektromyografie (EMG)

Díky této metodě můžeme především vyloučit jiné neuromuskulární onemocnění a posuzujeme vzniklý neurograf. U MG je vždy normální, jen u těžších MG nebo myastenických krizí bývá amplituda snížena, neboť dochází k postsynaptické nervosvalové blokádě. [2]

3.4 Imunologická diagnostika

Do této skupiny vyšetření zařazujeme stanovení protilátek proti acetylcholinovému receptoru (Ab-AChR), protilátek proti receptoru svalově specifické tyrosinkinázy (Ab-MuSK) a antistriatální protilátky (StMA).

3.4.1 Protilátky proti acetylcholinovému receptoru (Ab-AChR)

Rozlišujeme tři typy těchto protilátek: vázající se, blokující a modulující. U generalizované MG je 80% senzitivita vázající se Ab-AChR, u okulární MG je 20%. Pokud diagnostikujeme pacienta s MG asociované s thymomem, přítomnost těchto protilátek je 100%. U pacientů bez vázajících se Ab-AChR jsou modulující Ab-AChR nalezeny u 4 % a blokující u 1 % pacientů. Vyšší procento novorozenců s neonatální MG se vyskytuje u žen, které mají právě blokující a modulující protilátky.

Radioimunoanalýza (RIA) se používá k vyšetření Ab-AChR. Svalový AChR se precipituje a je označený navázaným radioizotopem 124 I- α -bungarotoxinem. Alfa-bungarotoxin řadíme mezi specifické cholinergní antagonisty, který separujeme z jedu tchajwanské krajty *Bungarus multicinctus*. Princip spočívá v tom, že protilátky soupeří o vazebná místa acetylcholinu nebo alostericky potlačují značený α -bungarotoxin na AChR. Falešně negativní výsledky nacházíme u pacientů, kteří jsou léčeni imunosupresivou nebo může být hladina protilátek snížena (např. po léčebné plasmaféze). Hladiny kolísají a nereflektují klinický stav. Pouze po dlouhodobém snížení Ab-AChR o více než 50 % se objevuje jistá

závislost na zlepšení klinického stavu. Proto efekt léčby posuzujeme vždy z klinického hlediska. [2]

3.4.2 Protilátky proti svalově specifické tyrosinkináze (Ab-MuSK)

U pacientů trpících generalizovanou MG, avšak bez přítomnosti Ab-AChR, je třeba potvrdit, jestli se u nich nevyskytují Ab-MuSK. Přítomnost je zhruba 40%. MG s Ab-MuSK je fenotypově odlišná, takže vyšetření je nutné jak z diagnostického pohledu, tak i z pohledu terapeutického, neboť u těchto pacientů nemá thymektomie žádný význam a jejich prognózu určuje včasné nasazení imunosupresivní léčby. [2]

3.4.3 Antistriatální protilátky (StMA)

Tyto protilátky míří proti kontraktilním elementům vláken svalů a svalovým bílkovinám. Nejdůležitějšími jsou titin, který řadíme mezi filamenta a je zodpovědný za stavbu a strukturu svalových vláken, a ryanodinový receptor formující intracelulární kalciové kanály a modulující jejich přestup z endoplasmatického retikula, což je proces nutný ke vzniku svalové kontrakce. Tyto protilátky nacházíme u 30 % pacientů a v 80 % u nemocných s thymomem bez MG. Pokud nález na CT mediastina je pochybný, u mladších pacientů indikují přítomnost thymomu. [2]

3.5 Radiodiagnostika

Její význam spočívá v odhalování thymomů v předním mediastinu. Využívá se rentgenu (RTG), počítačové tomografie (CT) a magnetické rezonance (MR). [2,33,34]

4 Léčba

4.1 Historie

Z historického hlediska vývoj léčby MG rozdělujeme na dvě období. Dobu, kdy se léčilo jen podle klinických příznaků, aniž by byla známa funkce brzlíku nebo patologie a etiologie onemocnění, označujeme jako empirické období. První pokusy o symptomatickou terapii zaznamenáváme v roce 1934. Nemocným byl podán prostigmin Mary Walkerovou s cílem ovlivnění svalové síly. Mezi další, avšak méně racionální metody, řadíme transfuzi myotonické krve nebo vitaminové kúry.

Na počátku 20. století došlo k prvním operativním zákrokům brzlíku. Můžeme zde jmenovat Ferdinanda Sauerbrucha, který se jako první zhostil této operace v roce 1912. Šlo o odstranění nádoru s výrazným zlepšením zdravotního stavu pacientky. Později se prosazovalo odstranění thymu i u pacientů bez nádoru. Negativním odrazem byla však vysoká pooperační úmrtnost s více než 20 %, takže k operacím byli posláni pouze ti pacienti, kteří trpěli těžkou formou MG.

V 60. letech 20. století díky rozvoji anesteziologických technik a vývoji nových antibiotik klesala mortalita až na 5-7 %. Evropa měla konzervativní přístup k operační léčbě až do konce 70. let.

Operativní léčbu MG iniciovala Neurologická klinika akademika Karla Hennera v Praze. Po návštěvě pracoviště anglického chirurga G. Keynese došlo k seznámení s problematikou těchto operací. V roce 1948 přednosta II. chirurgické kliniky J. Diviš uskutečnil první odstranění brzlíku bez nádoru. V roce 2008 slavila tato první operace 60 ti leté výročí. [1,2,4]

4.2 Léčba Myasthenia gravis

V případě, že se MG u pacientů potvrdí, objevuje se spousta otázek. Dá se léčit? Jak se léčí? Jaká je úspěšnost léčby? Pacient se cítí zmatený a vylekaný.

V dnešní době patří MG mezi dobře léčitelná onemocnění. Svou roli hraje doba, kdy je nemoc rozpoznána, čím dříve, tím lépe. Průběh MG rozhoduje, jaké léky budou podány a jaká léčba bude praktikována.

Používají se léky, které zlepší nervosvalový přenos. Ale i léky, které mají vliv na imunitní systém. Záleží také na tom, jestli chceme momentálně zdravotní

stav pacienta zlepšit nebo již uspokojivý stav udržet. Lékaři stále ve většině případů doporučují operativní odstranění brzlíku.

Terapii MG dělíme na symptomatickou a imunosupresivní léčbu. Dále také léčbu dlouhodobou, která má za úkol stabilizovat stav. Při myastenické krizi nebo v období zhoršení choroby se využívá akutní intervence. Každý pacient je odlišný, i na to se musí pohlížet.

Pokud pacienti nemají určení k thymektomii, tak se u nich využívá konzervativní léčby. Tento způsob terapie se používá i u nemocných, kteří se připravují na plánovanou operaci, nebo u těch postižených, u nichž nedošlo ke klinické remisi po operativním odstranění brzlíku. [4,35]

4.2.1 Symptomatická terapie

V symptomatické terapii se využívá účinku inhibitorů acetylcholinesterázy (AChEI). Tyto léky mohou být použity ke zlepšení příznaků MG, ale nemají žádný vliv na to, když pacient trpí nějakou imunologickou dysfunkcí.

Tato léčba je účinná v časně fázi MG a u pacientů, kteří trpí mírnějšími příznaky. Princip mechanismu účinku těchto léků se zakládá na tom, že brání rozpadu acetylcholinu, za který je zodpovědná acetylcholinesteráza. Tudíž zvyšují množství acetylcholinu v nervosvalové ploténce. Edrofonium (Tensilon®), neostigmin a pyridostigmin (Mestinon®) jsou ChEI využívané v praxi.

Nejvíce užívaným lékem je Pyridostigmin bromid (Mestinon®). Pacientům, kteří jsou odolní Mestinonu® nebo jsou alergičtí na bromid, se podává Ambenonium chlorid (Mytelase®). V minulosti byl často indikován neostigmin (Syntostigmin®). U tohoto preparátu dochází k rozvoji cholinergní krize, pokud je podán ve větších dávkách. [31,36-39]

4.2.2 Imunosupresivní a imunomodulační terapie

Tato léčba se indikuje, pokud jde o generalizovanou MG a symptomatická léčba nestačí. Mohou být využity různé druhy léčby zahrnující kortikosteroidy, imunosupresiva jako jsou azathioprin, cyklosporiny, plasmaferéza, intravenózní lidské imunoglobuliny, a thymektomie. U většiny pacientů jsou kortikosteroidy léky první volby s výjimkou pacientů s psychiatrickými potížemi. Ovlivňují nálady a celkový duševní stav. Kortikosteroidy mohou zhoršit příznaky MG, a tak je leckdy nutná i hospitalizace pacienta s pečlivým monitoringem jeho stavu. Jsou většinou

užívány dlouhodobě, buď samostatně nebo v kombinaci s jinou imunoterapií nebo vynětím brzlíku. Většina pacientů vyžaduje léčbu 10 až 20 mg obden, dokud nebude použit jiný imunní modulátor. Bohužel úleva přichází pouze, když pacient pokračuje dlouhodobě v užívání steroidů. Vysazení steroidů může způsobit nové vzplanutí nemoci. Z toho důvodu by měla být léčba kortikosteroidy udržována i během těhotenství.

V mnoha případech je doporučována kombinace kortikosteroidů s azathioprinem (Imuran®). Výsledkem je vyšší terapeutický účinek při nižším dávkování. Azathioprin působí jako antimetabolit, tzn. že inhibuje purinové nukleotidy, prolíná se s tvorbou RNA a DNA a vede k ničení T- a B-lymfocytů. Mezi jeho nevýhody patří jeho pomalý účinek v řádu 2-3 měsíců. Nežádoucími účinky jsou gastrointestinální potíže a vysoká horečka. Během léčby tímto způsobem je nutné pravidelně kontrolovat jaterní funkce a krevní obraz včetně hodnot lymfocytů, neboť Azathioprin má při dlouhodobém užívání lymfotoxický a hepatotoxický účinek.

Cyklosporiny jsou léky druhé a třetí volby z důvodu jejich toxického účinku na ledviny a krevní tlak. Cyklosporin je užíván podobně jako Azathioprin. Cyklosporin inhibuje odpověď T-buněk na antigenní podnět tím, že blokuje receptory pro interleukin 2. Nevýhodou je, že při dlouhodobém podávání je pacient náchylnější k virovým infekcím a při vyšším dávkování se objevuje riziko manifestace lymfomů. Proto na počátku terapie monitorujeme plazmatické hladiny cyklosporinu. Mimo to je třeba sledovat ledvinné funkce.

Mykofenolát mofetil (MyM) je potentní imunosupresivní přípravek, efektivní při prevenci odmítnutí orgánu u příjemců transplantované ledviny, používaný spolu s kortikosteroidy a cyklosporinem. Účinnou látkou je kyselina mykofenolová, jejíž efekt tkví ve vratné inhibici monofosfát dehydrogenázy. Tím potlačuje tvorbu guanosinu a jeho inkorporaci do DNA. Dále blokuje proliferaci T-lymfocytů a protilátkovou odpověď B-lymfocytů [4,38-48].

Dalším typem léčby v tomto oddílu je intravenózní podávání imunoglobulinů. Izolují se z plazmy zdravých dárců. Snižují tvorbu autoprotiláték, ovlivňují komplement, modulují T-buněčné funkce s antigenním rozpoznáváním, snižují produkci protizánětlivých cytokinů a superantigenů, akcelerují katabolismus IgG, regulují apoptózu. Vedlejší účinky nejsou závažné ve většině případů, ale vzácně dochází ke vzniku anafylaktického šoku nebo aseptické meningitidy.

Dalším léčebným postupem je plasmaferéza. Během 4-6 transfuzí se vymění 3-5 litrů plazmy od zdravých dárců. Je to typ krátkodobé terapie pro myastenickou krizi, přípravu na operativní zákrok či pro přípravu na thymektomii. Mezi nevýhody této terapie patří hypotenze a u starších lidí je problém s přístupností cév. Ke zlepšení zdravotního stavu po provedení plasmaferézy dochází u 55-100 % pacientů [4,13,49].

Thymektomie se provádí, pokud existuje podezření na nádor brzlíku. Operativní odstranění thymu se indikuje po vyšetření CT. Lékaři operují pacienty i bez přítomnosti nádoru, neboť při MG je funkce leukocytů v thymu špatná. Proto dochází ke zbytnění brzlíku. Největší prospěch z thymektomie mají mladší pacienti ve věku 20-30 let [13,41,49].

5 Epidemiologie Myasthenia gravis

Nejvíce dat poskytujících informace o epidemiologii MG pochází z průzkumů v Evropě a Severní Americe.

Incidence a prevalence MG jsou celosvětově obdobné s výjimkou dětské myastenienie, která je neobvyklá v západním světě na rozdíl například od Číny. Četnost případů se zvýšila v posledních pěti desetiletích od 2-5 pacientů na 1 milion obyvatel k 9-21 nemocných na 1 milion obyvatel. Prevalence myastenienie stabilně narůstá, ale mortalita se ustálila.

Vyšší náchylnost k onemocnění mají ženy ve třiceti až čtyřiceti letech věku a muži ve stáří třiceti až šedesáti let.

Nárůst počtu pacientů s myastenii je připisováno několika činitelům zahrnujících jak včasné rozpoznání choroby, tak dostupnější diagnostiku s vyšší citlivostí a specifitou. I díky těmto faktorům pacienti žijí déle, což přispívá k rozvoji výzkumu nových možností léčby.

Co se týká prevalence v České republice, lékaři diagnostikují zhruba 130-150 dalších případů za rok. To odhadem odpovídá až 240 pacientům na jeden milion obyvatel ČR. [2,4,50-56]

6 Cholinesterázy

Cholinesterázy (ChE) patří do skupiny esteráz. Jejich úkolem je hydrolyzovat estery cholinu a jejich účinek je mnohem rychlejší na rozdíl od jiných esteráz. V roce 1914 byly cholinesterázy objeveny Dalem. Termín „cholinesterázy“ byl poprvé vysloven roku 1932 jako esteráza přítomná v koňském séru, která štěpí acetylcholin. Roku 1940 byly cholinesterázy přijaty i jako součást lidských tkání. Rozlišujeme dva druhy cholinesteráz a to, acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BChE). Oba dva typy se liší v substrátové specifitě a citlivosti k inhibitorům [57,58,59].

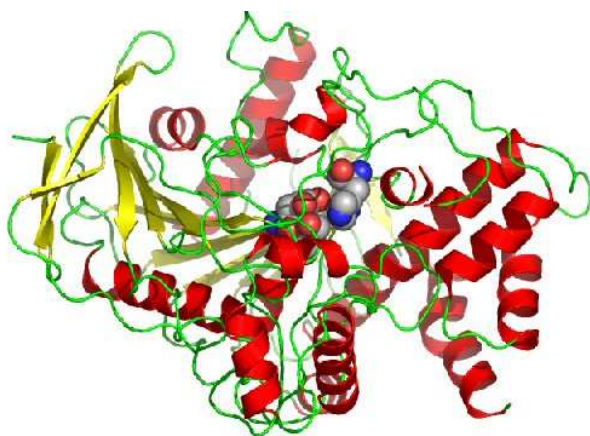
Acetylcholinesteráza je základní součástí cholinergních synapsí a nervosvalových spojení. Butyrylcholinesteráza, též známa jako pseudocholinesteráza, se nachází v plazmě a dalších tkáních, jako jsou např. játra, hladká svalovina, srdce atd. [60].

6.1 Acetylcholinesteráza (AChE)

Molekula AChE je elipsovitého tvaru a náleží do třídy α/β proteinů. 14 α -helixů obklopuje 12 β -skládaných listů vzájemně spletených.

Hlavní biologická úloha AChE spočívá v ukončování přenosu vzruchu na cholinergních synapsích tím, že hydrolyzuje acetylcholin. Avšak působí i na různé estery acetátu, a také katalyzuje transacetylaci.

Acetylcholinesteráza patří dle enzymové nomenklatury do 3. třídy, kterou představují hydrolázy. AChE má enzymové číslo EC 3. 1. 1. 7.. Systematicky AChE nazýváme acetylcholinacetylhydroláza.



Obr. 7: Struktura acetylcholinesterázy (AChE) [61]

Aktivní centrum ChE je lokalizováno ve středu molekuly enzymu blízko hluboké a mělké prohlubně a obsahuje katalytická a cholinová vazebná místa. Na vazebných místech dochází ke štěpení ACh. Dvě molekuly fenylalaninu v molekule AChE jsou odpovědné za vazbu substrátu. Aktivní centrum AChE se skládá z 5 vazebných míst:

- Katalytická triáda serin 200, histidin 440, kyselina glutamová 327 představující esteratické místo. Je to část molekuly AChE, kde dochází k rozpoznání a navázání ACh.
- Oxyanionová díra je součástí esteratického místa skládající se z glycinu 118, glycinu 119, alaninu 201, jejichž úkolem je stabilizace navázané acetylové skupiny.
- Acylové místo, tak nazýváme hydrofóbní oblasti obklopující esteratické místo. Skládá se z fenylalaninu 288 a 299. Na toto místo se váže acetylová skupina ACh.
- Cholin-vázající místo, dnes nazývané anionické, je negativně nabitě. Váže kvartérní konec ACh. Skládá se z tryptofanu 84, kyseliny glutamové 199, fenylalaninu 330.
- Okrajové „anionické“ místo slouží jako místo, kde se selektivně váží arylové substráty.

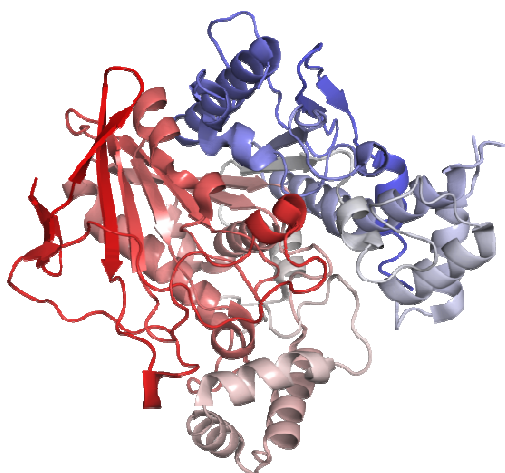
ACh a podobné sloučeniny jsou vázány na anionické místo pomocí Coulombických a hydrofóbních sil [62-65].

Prvním krokem enzymatické hydrolýzy ACh je navázání kvartérního dusíku ACh na α -anionické místo enzymu. Karboxylová skupina napomáhá tomu, aby se ACh navázal na esteratické místo molekuly AChE a vzniká komplex enzym-substrát. V dalším kroku se odštěpuje cholin za vzniku acetylovaného enzymu. Ten reaguje s vodou a vzniká komplex kyselina-enzym, který spontánně hydrolyzuje a výsledkem je kyselina octová a AChE.

Nervový přenos je ukončen, jakmile se inaktivuje ACh. Pokud by tomu tak nebylo, docházelo by ke křečím, neboť by byla nervová centra drážděna [64,66].

6.2 Butyrylcholinesteráza (BChE)

BChE je složena z dvou dimerů, které spolu vytváří homotetramer. Disulfidické můstky a hydrofóbní interakce tvoří vazbu mezi jednotlivými podjednotkami. BChE je známa i pod názvem pseudocholinesteráza. Její enzymatické číslo je EC 3. 1. 1. 8. a systematický název zní acylhydroláza acetylcholinu. Hydrolyzuje butyrylcholin (BCh), ale také se podílí na hydrolyze ACh. Ovšem je jednoznačné, že její hydrolyzující vlastnosti se druh od druhu liší, a tak více než ACh štěpí BCh nebo také propionylcholin (PCh). BCh slouží k odlišení těchto dvou ChE, není fyziologickou součástí lidského mozku. BChE je více aktivní v játrech, kde je syntetizována a vylučována do plazmy, dále v srdci, ledvinách, plicích a též v neuronech a gliích, je obsažena ve většině buněk vyjma červených krvinek. Má větší substrátovou specifitu než AChE [67,68,69].



Obr. 8: Struktura butyrylcholinesterázy [70]

Struktura BChE je podobná AChE, jen se odlišuje v sekvenci aminokyselin. Obsahuje 574 aminokyselin a na rozdíl od AChE nemá okrajové „anionické místo“. Aktivní místo obsahuje serin. Katalytická triáda se skládá z kyseliny glutamové 325, histidinu 438, serinu 198. V kvartérním amóniovém vazebném místě se nachází tryptofan 82 [63,71].

Dosud není zcela jasné, jakou fyziologickou funkci BChE zastává. Hydrolyzuje některé léky, mezi něž patří i kokain či aspirin. Je možné, že se podílí na regulaci proliferujících buněk (např. v mozku). Byla prokázána její jistá aktivita ve spojení s tumory [71,72].

7 Inhibitory cholinesteráz (ChEI)

ChEI představují skupinu látek, které jsou schopné potlačovat hydrolytické vlastnosti cholinesteráz. Podle selektivity k AChE a BChE rozlišujeme různé inhibitory. Schopnost inhibovat cholinesterázy je podstatou léků používaných k léčbě Alzheimerovy nemoci, neurotoxiny jsou používány jako insekticidy. Dále nervové plyny byly zneužity jako chemické zbraně.

Prvním ChEI byl fysostigmin, jenž představuje hlavní alkaloid rostliny *Physostigma venenosum*. Historie vývoje a výzkumu ChEI sahá daleko do minulosti, ale až v 80. letech 20. století byly poprvé využity k léčbě Alzheimerovy nemoci. První generaci ChEI tudíž představují fysostigmin a takrin. V 90. letech 20. století došlo k rozvoji druhé generace ChEI. Pozdější léky jsou klinicky efektivnější a vzniká méně vedlejších nežádoucích účinků [63,64].

7.1 Dělení inhibitorů cholinesteráz

1. ChEI dělíme do skupin dle typu a trvání účinku:

- Reverzibilní ChEI působí krátce a vazba cholinesterázy je reverzibilní. Tyto inhibitory se na enzym vážou slabými vazbami a doba jejich působení je velmi krátká (v řádech několika minut). Do této skupiny řadíme takrin a donepezil.
- Pseudo-reverzibilní inhibitory jsou inhibitory střednědobého účinku. Na enzym se vážou pomocí kovalentní vazby. Této kovalentní vazbě pomalu upadá síla a molekula se stává znovu přístupnou. Do této skupiny patří karbamáty, které vytváří karbamoylový komplex se serinovým zbytkem katalytické triády AChE a tento komplex je poté hydrolyticky štěpen. Prototypem zastávající tuto skupinu byl fysostigmin, jenž byl jako první inhibitor klinicky studován v otázce léčby Alzheimerovy choroby.
- Irreverzibilní ChEI působí dlouhodobě a jsou rovněž známy pod názvem enzymové inaktivátory. Tato skupina zahrnuje organofosfáty. Účinek jejich schopnosti inhibice spočívá ve fosforylaci a fosfonylaci serinové hydroxy skupiny v esteratickém místě enzymu. Vytváří silnou kovalentní vazbu. Zástupcem této skupiny je metrifonát [64,66].

2. Dělení ChEI dle chemické struktury:

- Piperidinové deriváty (např. donepezil) jsou reverzibilní inhibitory s vysokou selektivitou pro AChE a s vazbou směřující do anionického místa enzymu.
- Karbamáty (např. rivastigmin, pyridostigmin) jsou nejčastěji využívány jako insekticidy. Reverzibilně inhibují cholinesterázy jak AChE, tak BChE. Dochází ke karbamoylaci esteratické části aktivního místa. Tuto esteratickou část tvoří hydroxylová skupina serinu.
- Alkaloidy (např. galantamin) patří mezi reverzibilní kompetitivní inhibitory AChE.
- Akridiny (např. takrin) se řadí mezi nekompetitivní inhibitory, které se vážou na anionické místo enzymu.
- Organofosfáty (např. metrifonát) patří mezi izosterické inhibitory. To znamená, že se vážou na stejnou funkční skupinu jako substrát. Ale např. v molekule AChE existují i jiná vazebná místa. A jejich obsazení vede rovněž k inhibici. Organofosfáty se vážou reverzibilně pomocí elektrostatických hydrofóbních interakcí.

3. Dělení dle reakčního mechanismu

- Kompetitivní inhibitory se vážou na enzym v katalytickém místě, které je určeno pro substrát, takže inhibitor a substrát soutěží o vazebné místo na enzymu. Inhibitor není vázán na komplex enzym-substrát, ale na volný enzym. To je princip čisté kompetitivní inhibice.
- Nekompetitivní inhibitory se váží na místo, které se odlišuje od katalytického místa enzymu. Tímto dojde ke změně konformace, která zabrání přeměně komplexu enzym-substrát-inhibitor na produkt.
- Akompetitivní inhibitory se vratně vážou na komplex enzym-substrát a tím se opět zabrání tomu, že komplex enzym-substrát-inhibitor nemůže být přeměněn na produkt.
- Smíšené inhibitory mění jak afinitu enzymu k substrátu, tak zabraňují vzniklému komplexu přeměnit se na produkt [64,66,74].

4. Dělení dle speciálních vlastností

Speciálními vlastnostmi jsou farmakodynamické a farmakokinetické parametry, citlivost nikotinových receptorů a afinita inhibitorů k AChE a BChE.

7.2 Inhibitory acetylcholinesterázy používané k léčbě Myasthenia gravis

ChEI zpomalují hydrolytické štěpení ACh a tím zvyšují účinnost cholinergního přenosu. Touto cestou se zvyšuje jejich hladina v synaptické štěrbině. AChEI interagují s anionickým nebo esteratickým místem enzymu. Nepřímá parasymptomimetika a organofosfáty jsou látky inhibující AChE. U MG slouží ke zvýšení stimulace na nervosvalové ploténce [63,75].

7.2.1 Dělení inhibitorů acetylcholinesterázy (AChEI)

AChEI rozlišujeme podle doby, po kterou trvá jejich účinek.

- Krátkodobé AChEI jsou reverzibilní a kompetitivní. Po jejich účinku nahromaděný ACh navozuje muskarinové i nikotinové účinky. U MG je jejich podání vitální indikací, neboť zachrání život pacientovi, jehož zdraví je těžce ohroženo.

K léčbě MG se z této skupin AChEI používá neostigmin a pyridostigmin, ambenonium, distigmin.

- Dlouhodobé AChEI působí irreverzibilně a již se terapeuticky nepoužívají. Jejich význam je pouze toxikologický. Patří sem organofosfáty, které mají inhibiční účinek na AChE. Organofosfáty se používají jako insekticidy, a tak není složité, abychom se jimi intoxikovali. Pro léčbu MG nemají význam [76].

7.2.2 Inhibitory acetylcholinesterázy používané k léčbě myasthenia gravis

Tato terapie je obvykle nejefektivnější u časných a lehčích forem MG. Tento typ terapie ovšem neléčí MG, jen potlačuje její příznaky. Je to typ symptomatické léčby MG.

Lékem první volby se stává pyridostigmin bromid (Mestinon®). Navzdory jeho krátkodobému účinku a komplikované dostupnosti z biologických zdrojů je využíván již po několik desetiletí. U pacientů, kteří jsou léčeni tímto typem, pozorujeme málokdy celkové zlepšení, ale v některých případech může být dostačující bez potřeby další např. imunosupresivní terapie. Je však jisté, že se u pacientů mohou objevit vedlejší nežádoucí účinky způsobené zvýšenou aktivitou muskarinových receptorů. Pozorujeme křeče v břišní oblasti, průjem, pocení, slinění, bradykardii a zvýšené nutkání na močení.

Počáteční orální dávkování pyridostigminu u dospělých je 15-30 mg každou 4. až 6. hodinu, což zvyšuje chtěný účinek a snižuje výskyt nežádoucích vedlejších účinků. U pacientů s okulárními symptomy se pyridostigmin podává 30-60 minut před jídlem.

Dalším lékem využívaným k symptomatické terapii MG je neostigmin bromid (Syntostigmin®). Jeho účinek je nejrychlejší s nejrazantnějším nástupem avšak krátkodobého trvání (2-3h). Většinou je používán v kombinaci s Mestinonem® nebo Mytelase® u pacientů s okulárními příznaky v dávce 0,5-1 tableta zhruba půl hodiny před jídlem.

Ambemonium chlorid (Mytelase®) je indikován u pacientů rezistentních na Mestinon®. Svou úlohu dobře splňuje u pacientů trpících slabostí a unavitelností faciobulbárních svalů.

V kombinaci s předchozími preparáty se užívá též distigmin bromid (Ubretid®). Jeho účinek je dlouhodobý (až 24-36h) a pokud se podá pacientovi s paradoxní slabostí večer předchozího dne, je dobře pozorovatelný jeho kladný vliv na vývoj pacientova zdravotního stavu [4,35,77].

8 ZÁVĚR

V této práci jsem se zaměřila na popis onemocnění MG. Zabývala jsem se etiologií této choroby, jejími příčinami a jak MG vzniká. Zaměřila jsem se na charakterizaci MG z hlediska klasifikace, klinického obrazu, možností diagnostiky a druhů následné terapie po pozitivním nálezů MG a zohlednila jsem i epidemiologické výzkumy, jež se zabývají prevalencí, incidencí MG a případnou mortalitou.

Dále jsem se snažila popsat strukturu a funkci cholinesteráz (ChE) a jejich inhibitorů v závislosti na tom, že k symptomatickému typu terapie MG se využívá inhibitorů acetylcholinesterázy (AChEI). Popsala jsem funkci a účinek preparátů AChEI, které nacházejí uplatnění v léčbě pacientů postižených MG.

9 SEZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ:

[1] Hughes T. *The early history of myasthenia gravis*. Neuromusc Dis, 15, 2005, s. 878-886.

[2] Piřha J. a kol. *Myasthenia gravis a ostatní poruchy nervosvalového přenosu*. 1 vyd. Praha: MAXDORF, 2010. ISBN 978-80-7345-230-8.

[3] Ganong W. F. *Přehled lékařské fyziologie*. 1 vyd. Jinočany: H&H, 1995. ISBN 80-85787-36-9.

[4] Schützner J., Šmat V. et al. *Myasthenia gravis: Komplexní pojetí a chirurgická léčba*. 1 vyd. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-307-9.

[5] Pascuzzi R. M. *Medications and myasthenia gravis: a reference for health care professionals*. <http://www.myasthenia.org> cit.[2012-03-05], Accessed October 1, 2004.

[6] Trojan S. et al. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

[7]

<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/LIPIDS/transport.html> cit.[2012-04-25].

[8] http://www.sfn.org/index.aspx?pagename=publications_rd_nicotine cit.[2012-04-05].

[9] Ambler Z. *Neurofyziologie a elektrodiagnostika nervového přenosu*. *Neurologie pro praxi* [online]. 11, 2010, [cit. 2011-11-29]. Dostupný z WWW: <http://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2010/02/03.pdf> .

[10] Jaretzki A., Steinglass K. M., Sonett J. R. *Thymectomy in the management of myasthenia gravis*. Semin Neurol, 24 (1), 2004, s. 49-62.

[11] Giraud M., Beaurain G., Eymard B., Tranchant C., Gajdos P., Garchon H. J. *Genetic control of autoantibody expression in autoimmune myasthenia gravis: role of the self-antigen and of HLA-linked loci*. Gene Immun, 5, 2004, s. 398-404.

[12]

http://www.myastheniagravis.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=37 cit.[2011-12-20].

[13] Piřha, J. *Myasthenia gravis - Obávaná diagnóza: Vše, co byste měli vědět o své nemoci*. 1 vyd. Praha: MAXDORF, 2004. ISBN 80-7345-027-5.

[14] Hohlefeld R, Wekerle H. *The immunopathogenesis of myasthenia gravis*. Oxford Univ Press, 1999, s. 87-110.

[15] Špalek P., Vincent A. *Autoantibodies at the neuromuscular junction*. Neurol (Bratisl), 2 (1), 2007, s. 11-12.

[16] Morgenthaler T. I., Brown L. R., Colby T. V., Harper C. M. Jr, Coles D. T. *Thymoma*. Mayo Clin Proc, 68, 1993, s. 1110–23.

[17] Scherer K., Bedlack R. S., Simel D. L. *Does this patient have myasthenia gravis?* JAMA, 293 (15), 2005, s. 1906–14.

[18] Nicolle M. W. *Myasthenia gravis*. Neurologist, 8 (1), 2002, s. 2-21.

[19] Aarli J. A. *Late onset myasthenia gravis: a changing scene*. Arch Neurol, 56, 1999, s. 25-27.

[20] <http://medcert.com/myasthenia-gravis/> cit.[2012-04-05].

[21]

http://content.lib.utah.edu/cdm4/item_viewer.php?CISOROOT=/ehsl-shw&CISOPTR=359 cit.[2012-04-05].

[22] Schneider-Gold C., Gajdos P., Toyka K. V., Hohlfeld R. R. *Corticosteroids for myasthenia gravis*. Cochrane Database Syst Rev, 18 (2), 2005, CD002828.

[23] Keeseey J. C. *Clinical evaluation and management of myasthenia gravis*. Muscle Nerve, 29 (4), 2004, s. 484–505.

[24] Piřha J., Ambler Z. *Myasthenia gravis*. Neurol, 2003, s. 188-202.

[25]

<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/myasthenia-gravis-na-prahu-3-tisicileti-463472> cit.[2012-04-05].

[26]

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-2X2008000100025&script=sci_arttext cit.[2012-04-05].

[27] Winterkom J. M. S., Behrens M. M. *The sleep test for myasthenia gravis, a safe alternative to Tensilon*. Clin Neuro-Gphthalmol, 11 (4), 1991, s. 288-292.

[28] Stalberg E., Sanders D. B. *Elektrophysiological tests of neuromuscular transmission*. Clin neurophysiol, 1981, s. 88-116.

[29] Špalek P., Hupka Š. *Diagnostický význam stapédiovej reflexometrie pri myasthenia gravis*. Čas Lék Čes, 45, 1982, s. 1388-1390.

[30] Gilhus N. E. *Acute treatment for myasthenia gravis*. Nat Rev Neurol, 7 (3), 2011, s. 132–134.

[31] Pavesi G., Cattaneo L., Tinchelli S., Mancina D. *Masseteric repetitive nerve stimulation in the diagnosis of myasthenia gravis*. Clin Neurophysiol, 112, 2001, s. 1064-1069.

- [32] Galdi A. P. *Diagnosis and Management of Muscle Disease*. SP Med and Sci Books, 1984, s. 41-72.
- [33] Phillips L. H., Melnick P. A. *Diagnosis of myasthenia gravis in the 1990s*. Semin Neurol, 1990, s. 62-69.
- [34] Skeie G. O., Apostolski S., Evoli A. et al., *Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders*. Eur J of Neurol, 17 (7), 2010, s. 893–902.
- [35] Kumar V., Kaminski H. J. *Treatment of myasthenia gravis*. Curr Neurol and Neurosc Rep, 11, 2011, s. 89-96.
- [36] Hill M. *The neuromuscular junction disorders*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 74, 2003, s. 32-37.
- [37] Juel V. C., Massey J. M. *Autoimmune myasthenia gravis: recommendations for treatment and immunologic modulation*. Curr Treat Options Neurol, 7, 2005, s. 3-14.
- [38] Richman D. P., Agius M. A. *Treatment of autoimmune myasthenia gravis*. Neurol, 61, 2003, s. 1652–61.
- [39] Pascuzzi R. M., Coslett H. D., Johns T. R. *Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients*. Ann Neurol, 290, 1984, s. 81-84.
- [40] Ferrero S., Pretta S., Nicoletti A., Petrera P., Ragni N. *Myasthenia gravis: management issues during pregnancy*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 121 (2), 2005, s. 129-138.
- [41] Kokontis L., Gutmann L. *Current treatment of neuromuscular diseases*. Arch Neurol, 57, 2000, s. 939-943.

- [42] Palace J., Newsom-Davis J., Lecky B. *A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis*. *Neurol*, 50, 1998, s. 1778–1773.
- [43] Herrlinger U., Weller M., Dichgans J., Melms A. *Association of primary central nervous system lymphoma with long-term azathioprine therapy for myasthenia gravis*. *Ann Neurol*, 47, 2000, s. 682-683.
- [44] Matzuda S., Koyasu S. *Mechanism of action of cyclosporine*. *Immunopharmacol*, 47, 2000, s. 119-125.
- [45] Ciafaloni E., Nikhar N. K., Massey J. M., Sanders D. B. *Retrospective analysis of the use of cyclosporine in myasthenia gravis*. *Neurol*, 55, 2000, s. 448-450.
- [46] European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporine and corticosteroids for prevention of acute rejection*. *Lancet*, 60, 1995, s. 225-232.
- [47] Chaudhry V., Cornblath D. R., Griffin J. W., O'Brien R., Drachman D. B. *Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases*. *Neurol*, 56, 2001, s. 94-96.
- [48] Tindall R. S., Phillips J. T., Rollins J. A., Wells L., Hall K. *A clinical therapeutic trial of cyclosporine in myasthenia gravis*. *Ann NY Acad Sci*, 68, 1993, s. 539-551.
- [49] Chiu H. C., Chen W. H., Yeh J. H. *The six year experience of plasmapheresis in patients with myasthenia gravis*. *Ther Apher*, 4 (4), 2000, s. 291-295.
- [50] Phillips L. H. *The epidemiology of myasthenia gravis*. *Semin Neurol*, 24, 2004, s. 17-20.
- [51] Phillips L. H. *The epidemiology of myasthenia gravis*. *Ann N Y Acad Sci*, 998, 2003, s. 407-412.

- [52] Zhang X., Yang M., Xu J. et al. *Clinical and serological study of myasthenia gravis in HuBei Province, China*. J Neurol Neurosurg Psychiatr, 78, 2007, s. 386-390.
- [53] Chiu H. C., Vincent A., Newsom-Davis J., Hsieh K. H., Hung T. *Myasthenia gravis: population differences in disease expression and acetylcholine receptor antibody titers between Chinese and Caucasians*. Neurol, 37, 1987, s. 1854-1857.
- [54] Flachenecker P. *Epidemiology of neuroimmunological diseases*. J Neurol, 253, 2006, s. 2-8.
- [55] Aragonès J. M., Bolívar I., Bonfill X., Buñill E., Mummany A., Alonso F. et al. *Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly*. Neurol, 60, 2003, s. 1024-1026.
- [56] Grob D. *Natural history of myasthenia gravis*. Myasthenia Gravis and Myasthenic Disorders. Edited by Engel AG. Oxford Univ Press, 1999, s. 131-154.
- [57] Schwarz M., Glick D., Loewenstein Y., Soreq H. Pharmac Ther, 67, 1995, s. 283-322.
- [58] Taylor P., Radic Z. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 34, 1994, s. 281-320.
- [59] Tóugu V. *Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition*. Curr Med Chem, 1, 2001, s. 155-170.
- [60] Barnard E. A. *Neuromuscular transmission—enzymatic destruction of acetylcholine*. Plenum Press NY, 1974, s. 201–224.
- [61] <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Enzyme9.html> cit.[2012-04-05].
- [62] Giacobini E. *Cholinesterases And Cholinesterase Inhibitors*. 1. vyd. Londýn: Martin Dunitz Ltd., 2000. ISBN 1-85317-910-8.

- [63] Štěpánková Š., Komers K. *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. Current Enzyme Inhibition.* 4, 2008, s. 160-171.
- [64] Levitt M., Chothia C. *Structural patterns in globular proteins.* Nat, 261, 1976, s. 552–558.
- [65] Patočka J. *Základy toxikologie, Úvod do obecné toxikologie.* 2005, -skriptum
- [66] Giacobini E. *A Valid Alternative for Therapy of Alzheimer's Disease? Drug Aging.* 18, 2001, s. 891-898.
- [67] Dave K. R., Syal A. R., Katyare S. S. *Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties.* Z Naturforsch 55c, 2000, s. 100-108.
- [68] http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVACD.htm cit.[2012-03-23].
- [69] Ekholm M. *Molecular Modeling of Substrates and Inhibitors of Acetylcholine- and Butyrylcholinesterases.* Helsinki, December 13th, 2001, s. 44.
- [70] <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=1P0I> cit.[2012-04-05].
- [71] Mack A., Robitzki A. *The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders.* Prog in Neurobiol, 2000.
- [72] Jann M. W. *Preclinical pharmacology of metrifonate.* Pharmacoterap, 1998.
- [73] Jiráček R. *Kognitivní Farmakoterapie Alzheimerovy choroby: Současný Stav a Vyhledky do Blízke Budoucnosti.* Farmakoterap, 6, 2005, s. 604-609.
- [74] Cummings J. L., Back C. *The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease.* Am J Geriatr Psychiatr, 6 (1), 1998, s. 64–78.
- [75] Hynie S. *Farmakologie v kostce.* 2. vyd. Praha: Triton, 2001. ISBN 80-7254-181-1.

[76] Drachman D. B. *Myasthenia gravis*. N Engl J Med, 330, 1994, s. 1797–810.

[77] Vincent A., Drachman D. B. *Myasthenia gravis*. Adv Neurol, 88, 2002, s. 159–88.