

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Biomarkery u dětí se syndromy periodické horečky

MUDr. Petra Król

2016

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

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika dětského a dorostového lékařství, Všeobecná fakultní nemocnice, Ke Karlovu 2, 121 01, Praha

Školitel: prof. MUDr. Pavla Doležalová, CSc.

Abstrakt

Úvod: Syndromy periodické horečky jsou klinické jednotky patřící do velké skupiny autoinflamatorních chorob. Většina těchto syndromů vzniká na podkladě genetické predispozice. Mimo tuto klasifikaci stojí syndrom periodické horečky s aftózní stomatitidou, faryngitidou a krční adenitidou (*PFAPA*) s nejasnou etiologií.

Výsledky: V naší práci jsme popsali největší klinický soubor pacientů se syndromem PFAPA z jednoho centra. Z laboratorních výsledků jsme potvrdili benigní průběh PFAPA syndromu. Zaznamenali jsme signifikantně vyšší hladiny sérových cytokinů (IFN- γ a IL-1 β) v průběhu epizody horečky u PFAPA pacientů v porovnání s kontrolní skupinou. Měření ukázala zvýšené počty plazmatických buněk v periferní krvi PFAPA pacientů. Popsali jsme zvýšené hladiny naivních CD4 a CD8 T lymfocytů a přibližně 2-krát vyšší proporci CD8 T lymfocytů u PFAPA tonzil. Signifikantní rozdíly byly i v hladinách IFN- γ , IL-1 β , IL-6 a TNF- α ve stimulovaných supernatantech v porovnání s nestimulovanými supernatanty z periferní krve u pacientů s PFAPA syndromem. Měření bakteriálního profilu ukázalo, že profily mikroflory v tonzilách jednotlivých dětí jsou individuální.

Závěr: Odstraněním tonzilární tkáně s potenciálním bakteriálním/virovým/jiným spouštěčem dochází u pacientů s PFAPA syndromem k vymizení symptomů. Pacient s PFAPA syndromem je pravděpodobně imunologicky nezralý jedinec s vyšší vnímavostí k vnějším faktorům.

Klíčová slova: periodická horečka, vrozená imunita, zánět

Abstract

Introduction: Periodic fever syndromes are clinical entities classified as autoinflammatory diseases. The most of the periodic fever syndromes have genetic predisposition (monogenic periodic fever syndromes). PFAPA (*Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis a Adenitis*) syndrome is an idiopathic disease with unknown aetiology.

Results: In our study, we described the largest clinical series of patients with PFAPA syndrome from a single center. The laboratory results have confirmed uncomplicated course of PFAPA syndrome. In our measurements we observed significantly higher levels of serum cytokines (IL-1 β and IFN- γ) during episodes of fever in PFAPA patients compared to the control group. Our measurements showed increased numbers of plasma cells in the peripheral blood of PFAPA patients. We have found increased levels of naïve CD4 and CD8 T cells and approximately 2-fold higher proportion of CD8 T cells in tonsils of PFAPA patients. Significant differences were also present at levels of IFN- γ , IL-1 β , IL-6 and TNF- α in stimulated supernatants compared to supernatants from unstimulated peripheral blood from patients with PFAPA syndrome. Measurements of bacterial profile showed individual microbial profile in patients.

Conclusion: Removal of the tonsillar tissue with the potential bacterial/viral/other trigger leads to disappearance of recurrent episodes of fever. Patient with PFAPA syndrome is probably immunologically immature individual susceptible to external factors.

Keywords: periodic fever, innate immunity, inflammation

Obsah

1. ÚVOD	- 6 -
1.1 Syndromy periodických horeček	- 6 -
1.1.1 Periodická horečka s aftózní stomatitidou, faryngitidou/tonzilitidou a krční lymfadenopatií PFAPA	- 6 -
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	- 7 -
3. MATERIÁL A METODIKA	- 7 -
3.1 Klinická a epidemiologická část	- 8 -
3.1.1 Pacienti	- 8 -
3.1.2 Diagnostický algoritmus	- 8 -
3.1.3 Definice klinického obrazu	- 8 -
3.1.4 Terapeutické algoritmy	- 8 -
3.1.5 Sledování pacientů	- 8 -
3.2 Laboratorní část pro pacienty s PFAPA syndromem na konzervativní terapii	- 9 -
3.2.1 Vyšetření standardních zánětlivých parametrů	- 9 -
3.2.2 Vyšetření mevalonaturie	- 9 -
3.2.3 Vyšetření sérových hladin cytokinů	- 9 -
3.3 Laboratorní část pro pacienty s PFAPA syndromem po tonzilektomii	- 9 -
3.3.1 Vyšetření lymfocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie	- 9 -
3.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve	- 9 -
3.3.3 Histologické vyšetření tonzil	- 10 -
3.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil	- 10 -
3.3.5 Vyšetření DNA vybraných bakterií a virů	- 10 -
3.4 Kontrolní skupiny	- 10 -
3.5 Statistická analýza	- 10 -
4. VÝSLEDKY	- 10 -
4.1 Klinická a epidemiologická část	- 10 -
4.1.1 Pacienti se syndromem periodické horečky	- 10 -
4.1.2 Klinická charakteristika dětí s PFAPA syndromem	- 11 -
4.1.3 Terapie	- 11 -
4.1.4 Dlouhodobý průběh	- 11 -
4.2 Laboratorní část pro pacienty s PFAPA syndromem na konzervativní terapii	- 11 -
4.2.1 Standardní zánětlivé parametry	- 11 -
4.2.2 Vyšetření mevalonaturie	- 12 -
4.2.3 Vyšetření sérových hladin cytokinů	- 12 -
4.3 Laboratorní část pro pacienty s PFAPA syndromem po tonzilektomii	- 12 -
4.3.1 Imunofenotypizace lymfocytů z periferní krve a tonzil	- 12 -
4.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve	- 13 -
4.3.3 Histologické vyšetření tonzil	- 13 -
4.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil	- 13 -
4.3.5 Vyšetření DNA vybraných bakterií a virů	- 13 -
5. DISKUSE	- 14 -
5.1 Klinická a epidemiologická data	- 14 -
5.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii	- 14 -
5.2.1 Standardní zánětlivé parametry	- 14 -

5.2.2	<i>Vyšetření sérových hladin cytokinů</i>	- 14 -
5.2.3	<i>Vyšetření profilu bílé krevní řady pomocí průtokové cytometrie</i>	- 14 -
5.2.4	<i>Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve.</i>	- 15 -
	-	
5.2.5	<i>Histologické vyšetření tonzil</i>	- 15 -
5.2.6	<i>Mikrobiologické vyšetření tonzil a vyšetření DNA vybraných bakterií pomocí PCR-DGGE a virů pomocí PCR.</i>	- 15 -
6.	ZÁVĚR	- 15 -
7.	LITERATURA	- 16 -
8.	SEZNAM PUBLIKACÍ	- 18 -
8.1	Publikace k tématu dizertační práce s impact faktorem	- 18 -
8.2	Publikace k tématu dizertační práce bez impact faktoru	- 18 -
8.3	Publikace bez vztahu k dizertační práci s impact faktorem	- 19 -
8.4	Publikace bez vztahu k dizertační práci bez impact faktoru	- 19 -

1. ÚVOD

1.1 Syndromy periodických horeček

Syndromy periodických horeček se řadí mezi autoinflatorní onemocnění, u kterých je epizodická aktivace prozánětlivých mechanismů způsobena poruchou regulace procesů vrozené obranyschopnosti (McDermott a Aksentijevich 2002).

Rekurentní febrilie jsou doprovázeny lokálními zánětlivými projevy. U většiny syndromů periodických horeček se podařilo definovat vrozenou příčinu. Dle typu dědičnosti lze odlišit syndromy dědičné autozomálně dominantně, ke kterým se řadí periodické syndromy asociované s kryopyrinem (*CAPS; Cryopyrin Associated Periodic Syndromes*) a periodický syndrom asociovaný s TNF-receptorem (*TRAPS; TNFR-Associated Periodic Syndrome*), a autosomálně recesivně, familiární středomořská horečka a periodický syndrom asociovaný s mevalonátkinázou (*MAPS; Mevalonate kinase Associated Periodic fever Syndrome*).

Mimo tuto klasifikaci stojí syndrom periodické horečky s aftózní stomatitidou, faryngitidou a krční adenitidou (*PFAPA; Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis a Adenitis*), u kterého se doposud nepodařilo definovat vyvolávající příčinu.

1.1.1 Periodická horečka s aftózní stomatitidou, faryngitidou/tonzilitidou a krční lymfadenopatií *PFAPA*

V roce 1987 Marshall a kolektiv poprvé popsali stav charakterizovaný opakovanými horečkami u předškolních dětí (Marshall et al. 1987). Takzvaný Marshallův syndrom byl pak přejmenovaný na PFAPA syndrom (periodická horečka s aftózní stomatitidou, faryngitidou/tonsilitidou a krční lymfadenopatií) (Padeh et al. 1999).

Klinický obraz je typický: batole nebo předškolní dítě s opakujícími se (3-6 dní) febrilními epizodami doprovázenými minimálně jedním s následujícími příznaky: tonzilofaryngitida s negativním kultivačním nálezem, krční lymfadenopatie a afity v ústech. Vedlejší příznaky jsou nespecifické, patří mezi ně únava, bolesti hlavy, nauzea, bolesti břicha, zvracení, průjem, bolesti kloubů, atd. (Padeh et al. 1999). Pomocným vodítkem může být nepřítomnost dalších projevů typických pro virové infekce dýchacích cest, jako jsou zejména rýma a kašel (Krol et al. 2013). Postižené děti jsou mezi atakami horeček zcela bez obtíží, s normálním klinickým i laboratorním nálezem a dobře prospívají (Krol et al. 2013).

V průběhu horečnatých epizod je pravidlem přítomnost nespecificky zvýšené zánětlivé aktivity, která obvykle stoupá během prvních dnů neléčené epizody a po jejím odeznění se spontánně upravuje (Feder a Salazar 2010).

Diferenciální diagnostika PFAPA syndromu zahrnuje širokou škálu onemocnění: infekce, včetně atypických, defekty imunity, autoimunitní, autoinflatorní a nádorová onemocnění. Diagnostika PFAPA syndromu je založena na pečlivé anamnéze a zhodnocení hlavních klinických projevů dle Marshallových kritérií, která byla později upravena Hoferem et al. (Hofer et al. 2014).

V symptomatické léčbě se uplatňuje podávání antipyretik a/nebo nesteroidiních antiflogistik. U většiny pacientů jsou horečnaté epizody typicky zastaveny podáním jednorázové dávky prednisonu (Padeh et al. 1999). Tonzilektomie je nejúčinnějším terapeutickým zásahem (Burton et al. 2010). Prognóza PFAPA je dobrá a u většiny pacientů dochází během několika let k plnému ústupu projevů (Krol et al. 2013).

Předpokládá se, že tonzilární tkáň hraje ústřední roli v patogenezi PFAPA syndromu, protože u většiny pacientů dojde po tonzilektomii k remisi onemocnění (Krol et al. 2013). Vyšší vnímavost imunitního systému tonzilární tkáně k nespecifickému antigenu pravděpodobně vede k zánětu v oblasti orofaryngu spojeného se systémovou odpovědí organismu, přičemž není jasný podíl složek vrozené a získané imunity v tomto procesu.

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Předpokládáme, že PFAPA syndrom je způsoben alterací sekrece cytokinů a/nebo neadekvátní aktivací subpopulace/subpopulací B- nebo T-lymfocytů, což vede k deregulaci imunitního mikrosystému tonzilární tkáně a rozvoji klinického obrazu PFAPA syndromu.

Hlavním cílem práce je charakterizovat patofyziologické mechanismy v krvi a tonzilární tkáni u pacientů s PFAPA syndromem.

Cílem práce je přiblížit se odpovědi na tyto otázky:

- 1) Zjistit rozdíly v zánětlivých parametrech a v cytokinovém profilu.
- 2) Dokážeme podle těchto parametrů určit aktivitu onemocnění?
- 3) Mohou tyto parametry sloužit k predikci chronického zánětu?
- 4) Jaký je profil bílé krevní řady a cytokinů v krvi a tonzilární tkáni?
- 5) Jakou roli hrají tyto parametry u PFAPA syndromu?
- 6) Jsou opakované záněty tonzil spojené s přítomností infekčního agens?
- 7) Jaký je efekt tonsilektomie?

Očekávaným přínosem a možným praktickým dopadem projektu je charakteristika nových biomarkerů pro diagnostiku PFAPA syndromu a stanovení cíleného terapeutického postupu zaměřeného na léčbu nemoci.

3. MATERIÁL A METODIKA

Práce byla rozdělena na 3 části:

3.1 Klinická a epidemiologická část

3.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii

3.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii

3.1 Klinická a epidemiologická část

3.1.1 Pacienti

Do studie byli zařazeni pacienti se suspektním syndromem periodické horečky, kteří byli v období let 2004-2011 opakovaně vyšetřeni v ambulanci pro periodické horečky na Klinice dětského a dorostového lékařství VFN a 1. LF UK (Krol et al. 2013).

3.1.2 Diagnostický algoritmus

Diagnóza PFAPA syndromu byla stanovena na základě osobní a rodinné anamnézy, která byla součástí vytvořeného dotazníku, společně s klinickým a laboratorním vyšetřením (Krol et al. 2013).

3.1.3 Definice klinického obrazu

U PFAPA syndromu jsme hodnotili následující klinické parametry: aktivní onemocnění, plná remise, spontánní remise, remise po kortikoterapii a po tonzilektomii (Krol et al. 2013).

3.1.4 Terapeutické algoritmy

V okamžiku diagnózy byly rodičům pacientů navrženy následující možnosti terapie (Krol et al. 2013):

- 1) „sledovat a čekat“ (tzv. „watch-and-wait“ přístup)
- 2) prednison v jednorázové dávce 1mg/kg
- 3) další konzervativní terapeutické možnosti
- 4) tonzilektomie

3.1.5 Sledování pacientů

Pacienti na konzervativní terapii i pacienti po tonzilektomii byli prospektivně sledováni každých 3-6 měsíců.

3.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii

3.2.1 Vyšetření standardních zánětlivých parametrů

V prospektivní části studie byly standardní zánětlivé parametry (C-reaktivní protein, sedimentace a leukocytóza) vyšetřeny v rámci odběrů v horečnaté epizodě a v mezidobí horeček (Krol et al. 2013).

3.2.2 Vyšetření mevalonaturie

Mevalonaturie byla u všech nově diagnostikovaných pacientů vyšetřena k vyloučení MAPS, který má obdobné klinické příznaky. Mevalonaturie byla kvantifikována použitím kapilární plynové chromatografie/mass spektrometrie v Ústavu dědičných a metabolických poruch VFN v Praze.

3.2.3 Vyšetření sérových hladin cytokinů

Pro vyšetření sérových hladin vybraných cytokinů byl, po podepsání informovaného souhlasu, u pacientů odebrán vzorek krve navíc v rámci standardních odběrů v horečnaté epizodě a v mezidobí horeček. Hladiny cytokinů (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4, IL-2 a cytokinový receptor TNFR1) byly měřeny pomocí metody Cytometry Bead Array (CBA, FlowCytomix, eBioscience) (Castillo a MacCallum 2012).

3.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii

Pacienti indikovaní k tonzilektomii byli po podepsání informovaného souhlasu zařazeni do samostatné skupiny v rámci prospektivní studie. U všech pacientů byla vyšetřena tonzilární tkáň a všem byl odebrán vzorek krve při výkonu.

3.3.1 Vyšetření lymfocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie

Z části odebrané tkáně obou tonzil a z periferní krve byly izolovány periferní mononukleární buňky a provedena analýza průtokovou cytometrií. U všech vzorků byl vyšetřen profil T- a B-lymfocytárních subpopulací (Dytrych a et al. 2015).

Část vzorků byla dále stimulována monoklonální protilátkou anti-CD3 a lipopolysacharidem. Supernatanty těchto stimulovaných vzorků byly zamrazeny k analýze cytokinového spektra pomocí CBA.

3.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve

Supernatanty z tonzil a periferní krve byly vyšetřovány jako párové vzorky –nestimulovaný a anti-CD3 stimulovaný supernatant. Nestimulované a anti-CD3 stimulované (po ukončení stimulace) supernatanty byly zamrazeny v -70°C až do následného měření cytokinů (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4, IL-2, TNFR1) pomocí metody CBA.

3.3.3 Histologické vyšetření tonzil

Po každé tonsilektomii byla část tonzilární tkáně odeslána k rutinnímu histologickému vyšetření.

3.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil

Část tonzilární tkáně byla vyšetřena rutinním mikrobiologickým vyšetřením.

3.3.5 Vyšetření DNA vybraných bakterií a virů

V části tonzilární tkáně byla vyšetřena DNA vybraných bakterií pomocí metody PCR-DGGE (PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis)(Larsen et al. 1993) a virů pomocí PCR(Gautheret-Dejean et al. 2002).

3.4 Kontrolní skupiny

Veškeré výsledky u pacientů s PFAPA syndromem byly korelovány s výsledky příslušné kontrolní skupiny.

V projektu byly celkem 3 kontrolní skupiny, které všechny byly age- a sex-matched k vyšetřovaným pacientům:

- 1) Pacienti s febriliemi s jasně prokázanou bakteriální infekcí – pro pacienty s PFAPA syndromem na konzervativní terapii
- 2) Pacienti s hypertrofií tonsil (syndrom obstruktivní spánkové apnoe, OSAS) – pro pacienty s PFAPA syndromem indikovaných k tonsilektomii
- 3) Pacienti s chronickou streptokokovou tonsilitidou – pro pacienty s PFAPA syndromem indikované k tonsilektomii.

3.5 Statistická analýza

Deskriptivní statistika pro charakteristiku populace byla vyjádřena mediánem (rozmezí). Neparametrický Mann-Whitney test byl použit k porovnání mezi pacienty a kontrolami, pro párové měření byl použitý Wilcoxon test. Hodnoty $p < 0.05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

4. VÝSLEDKY

4.1 Klinická a epidemiologická část

4.1.1 Pacienti se syndromem periodické horečky

Identifikovali jsme celkem 176 dětí se syndromem periodické horečky, z toho 125 dětí s PFAPA syndromem (Krol et al. 2013).

4.1.2 Klinická charakteristika dětí s PFAPA syndromem

Všichni pacienti s PFAPA syndromem (n=125; 63 chlapců) byli kavkazské populace českého původu. 59/125 pacientů (47%) mělo pozitivní rodinnou anamnézu. U 31 pacientů byla diagnóza stanovena na základě retrospektivního sbírání dat, 94 dětí bylo zařazeno prospektivně. Medián věku první manifestace onemocnění byl 23 měsíců s mediánem intervalu mezi atakami 4 týdny a trváním horečnaté ataky 3.5 dne.

Z klinických příznaků byla faryngitida nejčastějším symptomem (91%). Zastoupení krční lymfadenopatie bylo 78% a 41% pacientů mělo aftózní stomatitidu. V mezidobí měli všichni pacienti normální klinický nález. V průběhu sledování našich pacientů byl zaznamenán normální vývoj a růst dětí.

4.1.3 Terapie

U 77 ze 125 pacientů (62%) byl podán prednison v jednorázové dávce 0.8 – 1.2 mg/kg na začátku typické horečnaté epizody. Z těchto pacientů mělo příznivou odpověď na léčbu 72 dětí (94%). Druhou dávku prednisonu dostalo zbylých 5 pacientů. U 2 pacientů byla zahájena terapie kolchicinem (0.5 mg/den).

Rodiče 48/125 pacientů (38%) žádali jiný typ léčby. U většiny byl zvolen přístup “watch – and – wait” s podáváním antipyretik v průběhu horečnaté fáze.

U 18 pacientů (14%) byla provedena tonzilektomie, která u všech vedla k vymizení příznaků ihned po operaci. Patnáct pacientů (83%) dosáhlo plné remise podle kritérií, 3 pacienti bez příznaků byli sledováni méně než 1 rok po zákroku.

4.1.4 Dlouhodobý průběh

Medián sledování pacientů byl 25 měsíců (2-60). Medián trvání nemoci v čase poslední návštěvy byl 8 měsíců (6-57). Déle než 12 měsíců jsme sledovali 94 (75%) pacientů, z nichž 46 (49%) dosáhlo plné remise. Zbylých 48 pacientů mělo nadále více než rok trvající rekurentní epizody PFAPA syndromu.

4.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii

4.2.1 Standardní zánětlivé parametry

Všech 125 pacientů s PFAPA syndromem mělo v průběhu typické horečnaté epizody zvýšené nespecifické zánětlivé parametry, u kterých došlo v čase k normalizaci. Výsledky zánětlivých parametrů byly porovnány s kontrolní skupinou dětí s febrilním infektem a nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi pacienty s PFAPA syndromem v horečnaté epizodě a kontrolními pacienty s febrilním infektem.

4.2.2 Vyšetření mevalonaturie

Profil organických kyselin včetně mevalonátu a mevalonolaktonu byl u všech pacientů s PFAPA syndromem ve fyziologickém rozmezí.

4.2.3 Vyšetření sérových hladin cytokinů

Sérové hladiny vybraných cytokinů byly změřeny u 67 pacientů, z toho u 23 pacientů párově v horečnaté epizodě a v mezidobí horeček. Tyto parametry byly také sledovány u 27 febrilních kontrol.

Ve vyšetřovaných cytokinech jsme našli signifikantní rozdíly mezi koncentrací IFN- γ u pacientů s PFAPA syndromem v horečce a u febrilních kontrol ($p=0.0243$), se signifikantním poklesem hladiny IFN- γ v mezidobí horeček ($p=0.0002$). Hladina cytokinu IL-1 β byla významně vyšší u pacientů v horečnaté epizodě v porovnání s febrilními kontrolami ($p=0.0007$). V mezidobí horeček u pacientů s PFAPA však nedošlo k signifikantnímu poklesu hladin IL-1 β , a to i přes to, že došlo k normalizaci základních zánětlivých parametrů. Hladiny IL-6 se nelišily v horečnaté epizodě u pacientů s PFAPA a febrilních kontrol, ale zaznamenali jsme signifikantní pokles IL-6 k nulovým nebo téměř nulovým hodnotám v mezidobí horeček u PFAPA pacientů ($p<0.0001$). Při korelaci standardních zánětlivých parametrů se sérovými hladinami cytokinů nebyla nalezena signifikantní korelace u pacientů s PFAPA. U febrilních kontrol jsme našli signifikantní korelaci mezi IL-6 a leukocytózou, respektive CRP.

4.3 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem po tonzilektomii

4.3.1 Imunofenotypizace lymfocytů z periferní krve a tonzil

Měření pomocí průtokové cytometrie bylo provedeno u 10 pacientů s PFAPA syndromem a u 10 kontrol (děti se syndromem obstruktivní spánkové apnoe, OSAS). U všech pacientů byl k dispozici párový vzorek periferní krve a tonzilární tkáň. Výsledky z levých a pravých tonzil v rámci jednoho pacienta/kontroly se vzájemně nelišily.

4.3.1.1 T-lymfocytární subpopulace

V periferní krvi bylo signifikantně zvýšeno zastoupení CD3^{pos} T-lymfocytů u PFAPA pacientů (medián 66% u PFAPA vs 56% u kontrol, $p=0.01$).

Tonzily pacientů s PFAPA tonzily obsahovaly více CD8^{pos} cytotoxických T-lymfocytů ($p=0.007$). Poměr CD4/CD8 byl signifikantně nižší v tonzilách PFAPA pacientů ($p=0.02$). Procento CD4/CD8-dvojitě negativních CD3^{high} buněk, které odpovídají zejména gamma/delta T-lymfocytům, bylo signifikantně zvýšené u tonzil PFAPA pacientů ($p=0.01$). Naivní CD45RA^{pos}CD27^{pos} CD4^{pos} T-lymfocyty byly signifikantně zvýšeny u PFAPA tonzil ($p=0.01$). Procento naivních CD8^{pos} CD45RA^{pos}CD27^{pos} T-lymfocytů bylo signifikantně zvýšené u PFAPA tonzil ($p=0.005$).

4.3.1.2 B-lymfocytární subpopulace

V periferní krvi pacientů s PFAPA bylo signifikantně vyšší procento plazmatických buněk ($p=0.002$).

V tonzilách PFAPA pacientů bylo signifikantně nižší zastoupení CD19^{pos} B-lymfocytů (p=0.02). Procentuální zastoupení CD19^{pos}CD27^{neg}CD24^{high}CD38^{high} transitional B-lymfocytů bylo signifikantně vyšší v PFAPA tonzilách (p=0.035). Procento switched paměťových B-lymfocytů (CD19^{pos}IgM^{neg}IgD^{neg}) bylo signifikantně nižší u PFAPA tonzil (p=0.03).

4.3.2 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve

Supernatanty byly vyšetřeny u 11 pacientů s PFAPA syndromem a 10 kontrol (7 dětí s chronickou tonzilitidou/3 děti s OSAS). Ve vyšetřovaných cytokinech jsme našli signifikantní rozdíly v hladinách IFN- γ v stimulovaných supernatantech v porovnání s nestimulovanými supernatanty z periferní krve u pacientů s PFAPA syndromem (p=0.0156). Hladiny IL-1 β byly signifikantně vyšší u stimulovaných supernatantů z periferní krve v porovnání s nestimulovanými u PFAPA pacientů (p=0.0312) a u stimulovaných supernatantů z periferní krve vs nestimulovaných u kontrolní skupiny (p=0.0311). Nestimulované vs stimulované supernatanty z periferní krve u PFAPA pacientů ukázaly signifikantní rozdíly i u hladin IL-6 (p=0.039) a TNF- α (p=0.0156), u kontrolních skupin u IL-6 (p=0.078) a TNF- α (p=0.0160). Hodnoty vyšetřovaných cytokinů u nestimulovaných a stimulovaných supernatantů z tonzilární tkáně neukázaly signifikantní rozdíly.

4.3.3 Histologické vyšetření tonzil

U všech 18 pacientů s PFAPA po tonzilektomii byl v histologickém vyšetření nález chronické tonzilitidy/chronické hypertrofické tonzilitidy. Tento nález se nelišil od kontrolní skupiny.

4.3.4 Mikrobiologické vyšetření tonzil

Mikrobiologické vyšetření bylo provedeno u všech 18 pacientů s diagnózou PFAPA po tonzilektomii. Ve vyšetřované části tonzilární tkáně rutinním mikrobiologickým vyšetřením byl u 2/18 pacientů potvrzen *Streptococcus pyogenes*, u 3 pacientů *Haemophilus influenzae* a u zbylých pacientů (n=13) byl nález viridujících streptokoků. U kontrolní skupiny (n=10) byl bakteriální profil různorodý.

4.3.5 Vyšetření DNA vybraných bakterií a virů

U 9 pacientů s PFAPA syndromem a 8 kontrol (7 pacientů s chronickou tonzilitidou/1 pacient s OSAS syndromem) bylo měřeno DNA vybraných bakterií pomocí metody DGGE-PCR. Nález u PFAPA tonzil byl: *Haemophilus influenzae* (n=7), viridujících streptokoků (n=8), *Prevotella* sp. (n=2), *Fusobacterium nucleatum* (n=6), *Prevotella melaninogenica/Bacteroidetes/ Bacteroidales* (n=5), *Prevotella nanceiensis* (n=3).

Nález u kontrolní skupiny byl různorodý.

Vyšetření virů v tonzilách PFAPA pacientů a kontrol neukázalo žádné signifikantní rozdíly.

5. DISKUSE

5.1 Klinická a epidemiologická data

V porovnání s publikovanými daty je naše kohorta pacientů se syndromem PFAPA největším souborem pocházejícím z jednoho centra (Krol et al. 2013).

Z terapeutických možností u PFAPA syndromu je nejčastěji použito jednorázové podání prednisonu. Na základě odpovědi na prednison jsme definovali tzv. „plnou“ a „částečnou“ odpověď na léčbu (Krol et al. 2013). Terapeutická odpověď na tonzilektomii byla v naší skupině vysoká podobně jako v jiných publikovaných studiích (Peridis et al. 2010).

Téměř polovina našich pacientů sledovaných více než 1 rok dosáhla plné remise. 51% dětí s PFAPA syndromem mělo přetrvávající obtíže po celou dobu sledování v rozmezí 2-6 let.

5.2 Laboratorní vyšetření pacientů s PFAPA syndromem na konzervativní terapii

5.2.1 Standardní zánětlivé parametry

Měření základních zánětlivých parametrů studii ukázalo podobné výsledky jako u ostatních studií (Thomas et al. 1999). Naše měření ukázala normalizaci hladin základních zánětlivých parametrů a SAA v mezidobí horeček. Tím jsme potvrdili naši domněnku, že PFAPA syndrom je benigní onemocnění a nedochází u něho k trvalé aktivaci imunitního systému ve smyslu chronického zánětu (Krol et al. 2013).

5.2.2 Vyšetření sérových hladin cytokinů

Zaznamenali jsme signifikantně vyšší hladiny sérových cytokinů, a to IFN- γ a IL-1 β v průběhu epizody horečky u PFAPA pacientů v porovnání s kontrolní skupinou. Otázkou je, do jaké míry hraje vyšší hladina prozánětlivých cytokinů v mezidobí horeček důležitou roli v zánětlivém procesu. Mohlo by se pravděpodobně jednat o větší stimulaci imunitního systému, kterou nelze při měření standardních zánětlivých parametrů rozeznat (nesignifikantní rozdíly mezi PFAPA a kontrolami), ale při sledování prozánětlivých cytokinů je zřejmý. Pokud by se jednalo o subklinický zánět, otázkou je, zda je potřeba jej dále monitorovat i přes to, že ostatní běžně měřitelné parametry zánětu se v mezidobí normalizují. Toto zjištění by mohlo být důležité pro prognózu a další péči.

5.2.3 Vyšetření profilu bílé krevní řady pomocí průtokové cytometrie

Naše měření ukázala zvýšené počty plazmatických buněk v periferní krvi PFAPA pacientů. V měřeních jsme našli zvýšené hladiny naivních CD4 a CD8 T lymfocytů a přibližně 2-krát vyšší proporcí CD8 T lymfocytů u PFAPA tonzil. Všechny vyšetřované parametry byly stejné mezi páry tonzil u našich pacientů; patogenetický mechanismus zřejmě postihuje tonzily jako celek, a ne jako izolovaný fokální proces. Měřeními jsme našli 2-krát nižší zastoupení CD4^{pos} T lymfocytů s vysokou expresí inhibiční molekuly PD1 u PFAPA tonzil. Tyto T lymfocyty byly dříve popsány jako lokalizované v okrajových částech germinálních center, jejichž hlavní funkcí je pomoc B lymfocytům,

hlavně přes produkci různých faktorů včetně LFA3, CD40L, ICOS, OX40, a CD10 (Wang et al., 2011). V naší práci jsme našli snížené počty switched memory B lymfocytů v PFAPA tonzilách, což je nález konzistentní s předešlou prací (Wang et al., 2011). V tonzilách pacientů s PFAPA byly zvýšené počty gamma/delta T-lymfocytů a CD8 T-lymfocytů, což vyvolává otázku, zda je horečnatá fáze syndromu PFAPA spouštěna virem. Doposud nebyla publikována studie zabývající se studiem virů v tonsilách pacientů s PFAPA. Naše data získaná z malého počtu tonzil však tuto teorii nepodporují.

5.2.4 Vyšetření solubilních cytokinů v tonzilárních supernatantech a supernatantech z periferní krve

V naší práci jsme našli signifikantní rozdíly v hladinách IFN- γ , IL-1 β , IL-6 a TNF- α v stimulovaných supernatantech v porovnání s nestimulovanými supernatanty z periferní krve u pacientů s PFAPA syndromem.

Zaměřili jsme se na porovnání nestimulovaných a stimulovaných supernatantů z tonzilární tkáně, které neukázalo signifikantní rozdíly u žádného z vyšetřovaných cytokinů. Tento nález je ale podobný tomu, který popsala skupina Valenzuela a kol., kteří vyšetřili cytokinový profil pomocí genové exprese (Valenzuela et al. 2013). K dnešnímu dni nebyla publikována data o měření cytokinového profilu v nestimulovaných/stimulovaných supernatantech z tonzilární tkáně u pacientů s PFAPA syndromem a kontrol jako funkční test k průkazu tvorby cytokinů. Naše práce jako jediná ukazuje výsledky tohoto měření. Je v souladu s nálezy získanými měřeními na úrovni genové exprese (Valenzuela et al. 2013).

Toto zjištění podporuje teorii, kde IL-1 β funguje jako kostimulátor T-buněčné funkce, většinou spolu s antigenem/mitogenem. Aktivované/stimulované T lymfocyty secernují IFN- γ , čímž zesilují stimulaci monocyto-makrofágového systému. Jejich zvýšené hodnoty v periferní krvi jsme potvrdili jak v měřených sérových hladinách, tak po stimulaci antiCD3.

5.2.5 Histologické vyšetření tonzil

Histologické vyšetření u 18 pacientů s PFAPA i kontrolní skupiny ukázalo v obou případech chronickou tonzilitidu, respektive chronickou hypertrofickou tonzilitidu. Náš nález je v souladu s publikovanými výsledky (Lantto U et al. 2015).

5.2.6 Mikrobiologické vyšetření tonzil a vyšetření DNA vybraných bakterií pomocí PCR-DGGE a virů pomocí PCR

Prokázali jsme individuální bakteriální a virový profil na tonzilách u PFAPA pacientů a kontrol bez signifikantních rozdílů. Nepotvrdili jsme souvislost mezi diagnózou a nálezy na tonzilách.

6. ZÁVĚR

PFAPA syndrom je nejčastější periodickou horečkou v České Republice. Výsledky naší práce podporují všeobecnou znalost o PFAPA syndromu jako o onemocnění benigní povahy. V případě typické prezentace příznaků a citlivém vyloučení ostatních možných příčin rekurentních horeček může být diagnóza PFAPA syndromu přímočará.

Prospektivní sledování pacientů pomůže vyhodnotit léčebnou odpověď a dlouhodobý průběh onemocnění. Přítomnost normálních laboratorních parametrů v mezidobí horeček, normální růst a vývoj dítěte společně s tendencí ke spontánnímu prodlužování afebrilních intervalů patří mezi základní rozpoznávací znaky pro diagnózu PFAPA syndromu. Jednorázové podání prednisonu by mělo být navrženo jako léčba první volby. Tonzilektomie by měla být indikována u pacientů, kteří nedopovídají na prednison.

Jeden z nejčastějších mechanismů diskutovaný u PFAPA syndromu je možná infekční příčina. Podobnost nálezů u PFAPA syndromu v geograficky a geneticky odlišných kohortách nabízí silný důkaz o tom, že patofyziologický mechanismus u těchto skupin je stejný (Brown et al. 2010; Stojanov et al. 2011). Při hledání infekční příčiny by se mohlo jednat o jedno konkrétní infekční agens s celosvětovou prevalencí nebo o větší počet různých infekčních agens, které jsou schopné nastartovat příznaky PFAPA syndromu. Vrozená složka imunitního systému odpovídá na různé infekční patogeny podobnou cestou. Odstraněním tonzilární tkáně s potenciálním bakteriálním/virovým/jiným spouštěčem u těchto pacientů dochází k vymizení rekurentních epizod horeček a přidružených příznaků.

Do současné doby bylo publikováno několik studií, které podporují teorii o zásadní roli IL-1 β v etiopatogenezi PFAPA syndromu (Stojanov et al. 2011; Kolly et al. 2013), který posiluje tvorbu Th1 chemokinů. Navržený model poukazuje na možnou existenci mikrobiálního spouštěče, který aktivuje kaskádu vrozené složky imunitního systému s následnou migrací aktivovaných T lymfocytů do periferie. Pacient s PFAPA syndromem představuje pravděpodobně imunologicky nezralého jedince, který je vnímavý k vnějším faktorům. Po setkání s nespecifickým faktorem dojde k zesílení imunitní odpovědi s následnou kaskádou dějů vedoucích k systémovému zánětu.

7. LITERATURA

BROWN, KL, P WEKELL, V OSLA, M SUNDQVIST, K SAVMAN, A FASTH, A KARLSSON a S BERG, 2010. Profile of blood cells and inflammatory mediators in periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis (PFAPA) syndrome. *BMC Pediatr* [online]. roč. 10, s. 65. ISSN 1471-2431. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2431-10-65

BURTON, MJ, AJ POLLARD a JD RAMSDEN, 2010. Tonsillectomy for periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis syndrome (PFAPA). *Cochrane database of systematic reviews (Online)* [online]. č. 9, s. CD008669. ISSN 1469-493X. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD008669

CASTILLO, L a DM MACCALLUM, 2012. Cytokine measurement using cytometric bead arrays. *Methods in Molecular Biology* [online]. roč. 845, s. 425–434. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-539-8

DYTRYCH, P, P KROL, M KOTROVA, D KUZILKOVA, P HUBACEK, L KROL, R KATRA, O HRUSAK, Z KABELKA, P DOLEZALOVA, T KALINA a E FRONKOVA, 2015. Polyclonal, newly derived T cells with low expression of inhibitory molecule PD-1 in tonsils define the phenotype of lymphocytes in children with Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis (PFAPA) syndrome. *Mol Immunol*. roč. 65, č. 1, s. 139–47.

FEDER, HM a JC SALAZAR, 2010. A clinical review of 105 patients with PFAPA (a periodic fever syndrome). *Acta Paediatr* [online]. roč. 99, č. 2, s. 178–184. ISSN 08035253. Dostupné z:

doi:10.1111/j.1651-2227.2009.01554.x

GAUTHERET-DEJEAN, A, C MANICHANH, F THIEN-AH-KOON, AM FILLET, N MANGENEY, M VIDAUD, N DHEDIN, JP VERNANT a H AGUT, 2002. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods* [online]. roč. 100, č. 1-2, s. 27–35. Dostupné z: doi:S0166093401003901 [pii]

HOFER, M, P PILLET, MM COCHARD, S BERG, P KROL, I KONE-PAUT, D RIGANTE, V HENTGEN, J ANTON, R BRIK, B NEVEN, I TOUITOU, D KAISER, A DUQUESNE, C WOUTERS a M GATTORNO, 2014. International periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome cohort: Description of distinct phenotypes in 301 patients. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. roč. 53, č. 6, s. 1125–1129. ISSN 14620332. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/ket460

KOLLY, L, N BUSSO, A VON SCHEVEN-GETE, N BAGNOUD, I MOIX, D HOLZINGER, G SIMON, A IVES, G GUARDA, A SO, MA MORRIS a M HOFER, 2013. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome is linked to dysregulated monocyte IL-1beta production. *J Allergy Clin Immunol* [online]. roč. 131, č. 6, s. 1635–1643. ISSN 1097-6825. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2012.07.043

KROL, P, M BOHM, V SULA, P DYTRYCH, R KATRA, D NEMCOVA a P DOLEZALOVA, 2013. PFAPA syndrome: clinical characteristics and treatment outcomes in a large single-centre cohort. *Clin Exp Rheumatol* [online]. roč. 31, č. 6, s. 980–987. ISSN 0392-856X. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24237762

LANTTO, U, P KOIVUNEN, T TAPIAINEN, V GLUMOFF, P HIRVIKOSKI, M UHARI a M RENKO, 2015. Microbes of the tonsils in PFAPA (Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis and Adenitis) syndrome - a possible trigger of febrile episodes. *APMIS*. roč. 123, č. 6, s. 523–9.

LARSEN, N, GJ OLSEN, BL MAIDAK, MJ MCCAUGHEY, R OVERBEEK, TJ MACKE, TL MARSH a CR WOESE, 1993. The ribosomal database project. *Nucleic acids research* [online]. roč. 21, č. 13, s. 3021–3023. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/22.17.3485

MARSHALL, GS, KM EDWARDS, J BUTLER a A R LAWTON, 1987. Syndrome of periodic fever, pharyngitis, and aphthous stomatitis. *J Pediatr* [online]. roč. 110, č. 1, s. 43–46. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(87)80285-8

MCDERMOTT, MF a I AKSENTIJEVICH, 2002. The autoinflammatory syndromes. *Current opinion in allergy and clinical immunology* [online]. roč. 2, s. 511–516. ISSN 1528-4050. Dostupné z: doi:10.1097/00130832-200212000-00006

PADEH, S, N BREZNIAK, D ZEMER, E PRAS, A LIVNEH, P LANGEVITZ, A MIGDAL, M PRAS a JH PASSWELL, 1999. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome: clinical characteristics and outcome. *J Pediatr* [online]. roč. 135, č. 1, s. 98–101. ISSN 0022-3476. Dostupné z: doi:10.1016/s0022-3476(99)70335-5

PERIDIS, S, G PILGRIM, E KOUDOUMNAKIS, I ATHANASOPOULOS, M HOULAKIS a K PARPOUNAS, 2010. PFAPA syndrome in children: A meta-analysis on surgical versus medical treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* [online]. roč. 74, č. 11, s. 1203–1208. ISSN 1872-8464. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijporl.2010.08.014

STOJANOV, S, S LAPIDUS, P CHITKARA, H FEDER, JC SALAZAR, TA FLEISHER, MR BROWN, KM EDWARDS, MM WARD, RA COLBERT, HW SUN, GM WOOD, BK BARHAM, A JONES, I AKSENTIJEVICH, R GOLDBACH-MANSKY, B ATHREYA, KS BARRON a DL KASTNER, 2011. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) is a

disorder of innate immunity and Th1 activation responsive to IL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* [online]. roč. 108, č. 17, s. 7148–7153. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1103681108

THOMAS, KT, HM FEDER JR., AR LAWTON a KM EDWARDS, 1999. Periodic fever syndrome in children. *J Pediatr* [online]. roč. 135, č. 1, s. 15–21. ISSN 0022-3476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(99)70321-5

VALENZUELA, PM, A ARAYA, CI PÉREZ, X MAUL, C SERRANO, C BELTRÁN, PR HARRIS a E TALESNIK, 2013. Profile of inflammatory mediators in tonsils of patients with periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA) syndrome. *Clinical rheumatology* [online]. roč. 32, č. 12, s. 1743–9. ISSN 1434-9949. Dostupné z: doi:10.1007/s10067-013-2334-z

8. SEZNAM PUBLIKACÍ

8.1 Publikace k tématu dizertační práce s impact faktorem

KROL, P, M BOHM, V SULA, P DYTRYCH, R KATRA, D NEMCOVA a P DOLEŽALOVA, 2013. PFAPA syndrome: clinical characteristics and treatment outcomes in a large single-centre cohort. *Clin Exp Rheumatol* [online]. roč. 31, č. 6, s. 980–987. (IF 2.724)

DYTRYCH, P, P KROL, M KOTROVA, D KUZILKOVA, P HUBACEK, L KROL, R KATRA, O HRUSAK, Z KABELKA, P DOLEŽALOVA, T KALINA a E FRONKOVA, 2015. Polyclonal, newly derived T cells with low expression of inhibitory molecule PD-1 in tonsils define the phenotype of lymphocytes in children with Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis and Adenitis (PFAPA) syndrome. *Mol Immunol*. roč. 65, č. 1, s. 139–47. (IF 2.973)

HOFER, M, P PILLET, MM COCHARD, S BERG, P KROL, I KONE-PAUT, D RIGANTE, V HENTGEN, J ANTON, R BRIK, B NEVEN, I TOUITOU, D KAISER, A DUQUESNE, C WOUTERS a M GATTORNO, 2014. International periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome cohort: Description of distinct phenotypes in 301 patients. *Rheumatology (United Kingdom)* [online]. roč. 53, č. 6, s. 1125–1129. (IF 4.435)

8.2 Publikace k tématu dizertační práce bez impact faktoru

KRÓL P a P DOLEŽALOVÁ, 2013. Recidivující febrilie u dětí. *Pediatr. praxi*. roč. 14, č. 4, s. 221-224.

KRÓL P a DOLEŽALOVÁ P, 2011. Horečka jako hlavní projev nemoci. *Pediatr. praxi*. roč. 12, č. 2, s. 111-114.

DOLEŽALOVÁ P a P KRÓL, 2010. Recidivující horečky u dětí. *VOX Paediatricae*. roč. 10, č. 3, s.16-20.

KRÓL P, KATRA R, DOLEŽALOVÁ P, 2009. Syndromy periodických horeček. *Čes.-slov. Pediat.* roč. 64, č. 10, s. 480-487

8.3 Publikace bez vztahu k dizertační práci s impact faktorem

NISTALA K, VARSANI H, WITTKOWSKI H, VOGL T, KROL P, SHAH V, MAMCHAOUI K, BROGAN PA, ROTH J, WEDDERBURN LR, 2013. Myeloid related protein induces muscle derived inflammatory mediators in juvenile dermatomyositis. *Arthritis Res Ther.* roč. 15, č. 5, s. R131. (IF 4.120)

DOLEZALOVA P, PRICE-KUEHNE FE, OZEN S, BENSELER SM, CABRAL DA, ANTON J, BRUNNER J, CIMAZ R, O'NEIL KM, WALLACE CA, WILKINSON N, ELEFThERIOU D, DEMIRKAYA E, BOHM M, KROL P, LUQMANI RA, BROGAN PA, 2013. Disease activity assessment in childhood vasculitis: development and preliminary validation of the Paediatric Vasculitis Activity Score (PVAS). *Ann Rheum Dis.* roč. 72, č. 10, s. 1628-33. (IF 9.270)

FMARTIN N, KROL P, SMITH S, MURRAY K, PILKINGTON CA, DAVIDSON JE, WEDDERBURN LR: Juvenile Dermatomyositis Research Group, 2011. A national registry for juvenile dermatomyositis and other Paediatric idiopathic inflammatory myopathies: 10 years' experience: the Juvenile Dermatomyositis National (UK and Ireland) Cohort Biomarker Study and Repository for Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Rheumatology (Oxford).* roč. 50, č. 1, s. 137-45. (IF 4.435)

MARTIN N, KROL P, SMITH S, BEARD L, PILKINGTON CA, DAVIDSON J, WEDDERBURN LR: Juvenile Dermatomyositis Research Group, 2012. Comparison of children with onset of juvenile dermatomyositis symptoms before or after their fifth birthday in a UK and Ireland juvenile dermatomyositis cohort study. *Arthritis Care Res (Hoboken).* roč. 64, č. 11, s. 1665-72. (IF 4.039)

8.4 Publikace bez vztahu k dizertační práci bez impact faktorů

KRYŠTŮFKOVÁ O, HULEJOVÁ H, KRÓL P, PAVELKA K, ŠENOLT L, VENCOVSKÝ J, 2011. Elevation of NK a NKT cells in patients with rheumatoid arthritis after rituximab therapy. *Rheumatologia.* roč. 25, č.1, s. 21-27.