О. М. Клімова¹,
Л. А. Дроздова¹,
О. В. Лавінська¹,
Д. В. Мінухін²,
О. М. Кудрєвич³

¹ ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМНУ», м. Харків

² Кафедра хірургії № 1 Харківського національного медичного університету

³ Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна

© Колектив авторів

ДОЦІЛЬНІСТЬ ТИМЕКТОМІЇ У МОЛОДИХ ПАЦІЄНТІВ З ТИМУСНЕЗАЛЕЖНОЮ МІАСТЕНІЄЮ ЗА НАЯВНОСТІ БІОМАРКЕРІВ, ХАРАКТЕРНИХ ДЛЯ ПАЦІЄНТІВ З ТИМОМАМИ

Резюме. *Мета* — визначення інтегральних і диференціальних міастогенних біомаркерів у пацієнтів з тимуснезалежною і тимусзалежною міастенією для вибору тактики лікування.

Матеріали і методи. Було обстежено 138 пацієнтів з тимуснезалежною (М — міастенія без змін тимусу) і тимусзалежною (МГ — міастенія на тлі гіперплазії тимусу, МТ — міастенія на тлі тимоми) міастенією. Використовували методи імуноферментного аналізу, спектрофотометрії, світлової та люмінесцентної мікроскопії.

Результати та їх обговорення. Виявлено взаємозв'язок клінічних фенотипів міастенії з варіантами диплотипів лейкоцитарних антигенів HLA: у молодих пацієнтів з тимуснезалежною міастенією (М) виявили високу гетерогенність генотипічних маркерів HLA-DR (DR1, DR2, DR3, DR5, DR7). Пацієнти із тимусзалежною міастенією (МТ) мали обмежену кількість дипло- і гаплотипів HLA DR2 і HLA DR7. Наявність гаплотипів HLA DR2 і HLA DR7 та певні зміни комплексу біомаркерів (наявність антиядерних антитіл, зміна показників вродженого імунітету та гуморальної сенсibilізації), у частини молодих пацієнтів з М прогресування захворювання призводило до розвитку міастенії на тлі тимоми (МТ) в старшому віці.

Висновки. Прогноз прогресування міастенії і розвитку ремісії може бути здійснений за допомогою геномних (наявність певних гаплотипів HLA-DR) і молекулярних біомаркерів (наявність антиядерних антитіл ANA, зміна різних фракцій молекул середньої молекулярної маси, циркулюючих імунних комплексів), які можуть застосовуватись для вибору тактики лікування.

Ключові слова: міастенія, гіперплазія тимусу, тимома, антиядерні антитіла.

Вступ

Міастенія — автоімунне нервово-м'язове захворювання, в основі якого лежить автоагресія гуморального імунітету у відношенні елементів нервово-м'язових синапсів і клітинних структур м'язових волокон [1]. Міастенія проявляється у вигляді прогресуючої м'язової слабкості через порушення синаптичної передачі між нервовим закінченням і м'язом. Серед всіх автоімунних захворювань міастенія займає особливе місце у зв'язку з тим, що механізми її розвитку тісно пов'язані з патологічними змінами тимусу [3, 4]. Гетерогенність клінічних форм міастенії залежить від безлічі патогенетичних механізмів, які лежать в основі цього мультифакторіального автоімунного захворювання [9, 10]. Дебют захворювання у молодих пацієнтів із тимуснезалежною міастенією (М) характеризується невисоким ступенем тяжкості. Для міастенії є типовим хронічний плин захворювання з періодичними загостреннями та ремісіями, а також можливим розвитком тяжких станів —

кризів [3]. Прогресування міастенії може призводити до формування різних типів тимусзалежної міастенії (асоційованої з гіперплазією тимусу (МГ) і на тлі тимоми (МТ)) у пацієнтів у старшому віці, коли оперативне втручання мало ефективне, і часто супроводжується ускладненнями і летальним результатом [8]. Сучасні підходи до лікування міастенії визначаються стандартним лікуванням і включають антихолінестеразні препарати, кортикостероїди, плазмозаміну, хірургічне лікування [5]. Видалення тимусу — мішені автоімунної агресії не завжди дозволяє уникнути антихолінестеразних препаратів, а іноді призводить до розвитку міастенічних і холінергічних кризів. Лікування міастенії ефективно не завжди (тільки у 45 % пацієнтів), і актуальним є пошук нових підходів до діагностики та персоніфікованого підходу до лікування за допомогою визначення інтегральних і диференціальних маркерів, що характеризують центральні і периферичні механізми втрати автотолерантності.

Мета досліджень

Визначення інтегральних і диференціальних міастогенних біомаркерів у пацієнтів з тимуснезалежною і тимусзалежною міастенією для вибору тактики лікування.

Матеріали та методи досліджень

Обстежили 138 хворих (вік від 13 до 70 років) з різними клінічними фенотипами міастенії: М – тимуснезалежна міастенія ($n = 47$), МТ – тимусзалежна міастенія на тлі тимоми ($n = 52$), МГ – тимусзалежна міастенія на тлі гіперплазії тимусу ($n = 39$). Постановку діагнозу здійснювали на підставі визначення м'язової слабкості і патологічної м'язової стомлюваності, декремент-тесту – М-відповіді при ритмічній стимуляції, і з урахуванням тимчасової оборотності клінічних і електроміографічних (ЕМГ) змін при проведенні прозеринової проби. Оцінювали можливу асоціацію наявності гапło- і диплотипів лейкоцитарних антигенів другого класу HLA-DR з різними клінічними фенотипами міастенії. Виявлення різних HLA-DR фенотипів проводили методом комплементзалежної цитотоксичності за допомогою панелі типу-ючих сироваток HLA DR1, DR2, DR3, DR5, DR7, DR52. Концентрацію антитіл до $\alpha 1$ - і $\alpha 7$ -субодиниць нікотинових ацетилхолінових рецепторів (НАХР) в сироватці крові і наявність $\alpha 7$ -субодиниць НАХР в мітохондріях (в біоптатах тимуса і тимоми) визначали методом ІФА [7].

Для виявлення сироваткових антиядерних антитіл (ANA) використовували скринінговий мультиспецифічний тест, що виконується методом непрямого імуноферментного аналізу (ІФА).

При отриманні позитивного результату скринінгового обстеження пацієнтів за допомогою ІФА, на другому етапі для виявлення молекулярної мішені сироваткових специфічних антиядерних антитіл проводили непрямий імунофлуоресцентний аналіз з використанням МКАТ, мічених FITC і скелець з біочіповими реакційними зонами, поверхня яких вкрита субстратом: HEp-2 (епітеліальні клітини раку гортані людини) і криостатних зрізів печінки приматів (Набір реактивів EUROIMMUN, Німеччина). Специфічність світіння оцінювали за допомогою мікроскопу Olympus BX53 (Японія).

Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові оцінювали спектрофотометрично після інкубації сироваткових зразків в боратному буфері і поліетиленгліколі (ПЕГ) при кімнатній температурі, що призводило до преципітації ЦІК на ПЕГ. Вимірювання оптичної щільності проводили спектрофотометрично на СФ-46 (Росія, Ломо) при довжині хвилі 450 нм.

Вміст молекул середньої молекулярної маси (МСММ) визначали за екстинкцією при до-

вжинах хвиль 238 нм, 254 нм, 260 нм і 280 нм по методиці Н. І. Габрієляна [6].

Для підвищення інформативності даного методу використовували розрахунок коефіцієнтів, які дозволяють оцінити метаболічний компенсаторний потенціал та ступінь ендогенної інтоксикації: пептидно/нуклеотидний коефіцієнт ($K_{238/260}$), коефіцієнти ароматичності ($K_{238/280}$) та розподілу ($K_{280/254}$).

Метод вивчення фагоцитарної активності нейтрофілів заснований на кількісному визначенні поглинальної і перетравлюючої здібності нейтрофілів по відношенню до *Saccharomyces cerevisiae*. Розраховували фагоцитарний індекс (ФІ) – відсоток нейтрофілів, що беруть участь в фагоцитозі, від загальної їх кількості; фагоцитарне число (ФЧ) – середня кількість мікроорганізмів, поглинутих одним нейтрофілом (частка від ділення загальної кількості спожитих антигенів на число клітин, що вступили в фагоцитоз) і індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ) – коефіцієнт фагоцитарного числа, який характеризує перетравлюючу здатність фагоцитів.

Результати досліджень та їх обговорення

В якості геномних маркерів у пацієнтів із різними видами міастенії досліджували лейкоцитарні антигени HLA DR II класу, що представляють собою рецепторні маркерні білки, які розпізнають чужорідні антигени і здійснюють імуногенетичний контроль за допомогою зміни щільності експресії рецепторів на клітинній поверхні. Було показано, що у молодих пацієнтів з тимуснезалежною міастенією (М) виявляється висока гетерогенність генотипічних маркерів HLA-DR – DR1, DR2, DR3, DR5, DR7. Пацієнти з тимусзалежною міастенією (МТ) мали тільки дипло- і гаплотипи HLA DR2 і HLA DR7. Наявність гаплотипів HLA DR2 і HLA DR7 у частини молодих пацієнтів з М при прогресуванні захворювання призводило до розвитку міастенії на тлі тимоми (МТ) в старшому віці [2, 8].

Автоантитіла до нікотинових ацетилхолінових рецепторів нервово-м'язового синапсу (НАХР) є основними патогенетичними факторами втрати автотолерантності у хворих на міастенію [5]. Нами було досліджено наявність автоантитіл до різних структурних субодиниць НАХР і поєднано, що автоантитіла до $\alpha 7$ -субодиниці НАХР виявлені тільки у 20 % молодих пацієнтів з тимуснезалежною міастенією (М), і у всіх літніх пацієнтів з тимусзалежною міастенією (МТ), що свідчить про подібність механізмів втрати автотолерантності в цих групах [8, 10]. Виходячи з того, що структурно-функціональні зміни тимусу при тимусзалежній міастенії можуть бути наслідком

порушення механізмів формування центральної автотолерантності в тимусі, було визначено наявність НАХР на мітохондріях тимоцитів. Виявили чотириразове підвищення вмісту субодиниці $\alpha 7$ НАХР в мітохондріях клітин тимом. Тобто, рецептори НАХР в мітохондріях тимоцитів є додатковим фактором формування центрального механізму втрати автотолерантності у пацієнтів з тимуснезалежною міастенією (М) і пацієнтів з тимусзалежною міастенією на тлі тимоми (МТ).

У якості диференціальних специфічних маркерів досліджували антиядерні антитіла АНА, які виявили тільки у пацієнтів з тимусзалежною міастенією старшої вікової групи (МТ), які в 4 рази перевищували контроль (ІФА-метод) (рис. 1).

Рис. 1. Концентрація антиядерних антитіл АНА у пацієнтів з тимуснезалежною (М) і тимусзалежною міастенією (МГ, МТ)

Для визначення мішені автоантитіл були проведені додаткові дослідження методом імунофлуоресцентної мікроскопії, що дозволяють візуалізувати специфічні мішені в клітинному ядрі. Були виявлені АНА до центромер хромосом (рис. 2). Спостерігали характерний тип світіння антитіл до хромосомних центромерів: тип гранул невеликого розміру (46 або 92 центромери на ядро). Гранули були рівномірно розподілені в ядрі інтерфазних клітин, тоді як у мітотичних клітинах вони утворювали стрічкоподібну структуру – одну в метафазі (на рис. 2а «1») або дві паралельні в анафазі (на рис. 2а «2»).

Рис. 2. Автоантитіла до центромер хромосом у пацієнта К. з тимою (а) і до центромерного білку F (CTNPF) у пацієнта Н. з тимою (б). Забарвлення FITC стандартних антигенних субстратів Нер-2 після взаємодії із сироватковими антитілами

Також у частини пацієнтів з МТ виявлено строкату ядерну картину різної інтенсивності з найбільш сильним забарвленням в фазі G2 і слабким забарвленням в G1 (рис. 2б), що вказує на присутність автоантитіл до центромерного білка F. Центромери позитивні тільки в прометафазі й метафазі. Навколишня цитоплазма мітотичних клітин дифузно забарвлена. Автоантитіла до хромосомних центромерів в метафазі виявлялися тільки в групі МТ. Крім того в групі пацієнтів з тимомами зустрічались АНА до центросомного білку ахроматинового веретена – NuMa і антигену MSA-2 волокон мітотичного веретена, до гістонів і білків цитоскелету.

Дослідження вмісту МСММ показало значне підвищення пептидної ($\lambda=254$), нуклеотидної ($\lambda=260$) фракцій і фракції ароматичних хроматофорів ($\lambda=280$) у пацієнтів групи МТ, у яких виявлено антиядерні антитіла до центромер хромосом. За наявності АНА до центросомного білку ахроматинового веретена NuMa у пацієнтів з тимомами спостерігається високий рівень олігопептидної фракції ($\lambda=238$) МСММ. Також у цих пацієнтів значно підвищений рівень пептидно-нуклеотидного коефіцієнту. Високий рівень ароматичної фракції МСММ спостерігається за наявності у пацієнтів антиядерних антитіл до антигену MSA-2 волокон мітотичного веретена та антитіл до гістонів. Концентрація циркулюючих імунних комплексів підвищена у всіх групах, однак в групі МТ концентрація ЦІК була максимальною і становила $(189,0 \pm 9,7)$ од. Е, що майже в 2 рази перевищує референтні значення – $(98,3 \pm 21,1)$ од. Е.

Методом світлової мікроскопії визначали фагоцитарну активність нейтрофільних гранулоцитів: ступінь хемотаксису, адгезії і ендочитозу. Встановлено, що фагоцитарний індекс, що характеризує поглинаючу властивість нейтрофілів, був на рівні референтних значень в групах М і МТ, тоді як в групі МГ даний показник був знижений і становив $(77,04 \pm 8,1) \%$. Про ефективність фагоцитозу судили по кінцевій перетравлюючій здібності нейтрофілів, яку визначали величиною індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ). Даний показник в усіх обстежених групах був нижче контролю, мінімальне значення ендочитозу нейтрофілів виявили в групі з МТ $(1,04 \pm 0,21)$. Недостатність перетравлюючої здібності нейтрофілів може призводити до негативних наслідків, якщо нейтрофіли з неперетравленими антигенами мігрують в різні тканини організму, підвищуючи імуногенність антигенів цих тканин.

Висновки

Виявлено маркери різних клінічних фенотипів міастенії, які можуть бути використані в

діагностичному алгоритмі для молодих пацієнтів з тимуснезалежною міастенією (М) і для пацієнтів старшого віку з тимусзалежною міастенією (МТ) при прогресуванні захворювання для прогнозу і вибору тактики комплексного лікування. При визначенні змін комплексу біомаркерів (наявність певних гаплотипів HLA-DR, антиядерних антитіл, показників вродженого імунітету та гуморальної сенсibiliзації) у

молодих пацієнтів з тимуснезалежною міастенією (М), аналогічних біомаркерам при тимусзалежній міастенії (МТ), доцільним алгоритмом є виконання тимектомії при дебюті захворювання в 1-2 роки, оскільки при проведенні хірургічного втручання у пацієнтів старшого віку часто спостерігаються ускладнення (міастенічні та холінергічні кризи, кровотечі, синдром верхньої порожнистої вени).

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Бардаков СН, Живолупов СА, Баранцевич ЕР, Захаров МВ, Самарцев ИН. Современные представления о рациональной диагностике и лечении приобретенной миастении. Часть 1: диагностика. Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. 2016; 23; 2: 20-26. .
2. Бойко ВВ, Климова ЕМ, Кудревич АН. Лечение миастении с учетом иммунофизиологических фенотипов. Харьков: Издательство Шейниной ЕВ. 2008.424с.
3. Смолин АИ. Современные аспекты клиники и диагностики миастении. Сибирский медицинский журнал. 2013; 3: 12-15.
4. Харченко ВП, Саркисов ДС, Ветшев ПС и др. Болезни вилочковой железы. Харьков: Триада-Х. 1998. 232.
5. Farmakidis C, Pasnoor M, Dimachkie MM, Barohn RJ. Treatment of Myasthenia Gravis. Neurol. Clin. 2018; 36(2): 311-337. doi:10.1016/j.ncl.2018.01.011
6. Gabrielian NI, Savostyanova OA. Indicative test for the diagnosis of septic processes. Laboratornoe delo. 1997; 2: 79-80.
7. Gergalova GL, Lehmus OJ, Skok MV. Possible effect of activation of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in the mitochondrial membrane on the development of apoptosis. Neurophysiology. 2011; 43(3): 195-197. doi:10.1007/s11062-011-9203-7
8. Klimova EM, Bozhkov AI, Boyko VV, Drozdova LA, Lavinskaya EV, Skok MV. Endogenic cytotoxic compounds and formation of the clinic forms of myasthenia. Translational Biomedicine. 2016; 7,3,84: 1-16. doi: 10.21767/2172-0479.100084
9. Klimova EM, Lavinskaya EV, Minukhin DV, Syrovaya AO, Drozdova LA, Samoilova AP, Makarov VV, Makarov VA, Lukiyanova LV. On Forming Central and Peripheral Markers of Self-Tolerance Loss in Diverse Clinical Myasthenic Phenotypes. Der Pharmacia Lettre. 2017; 9(6): 8-17. http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html
10. Klimova EM, Minuchin DV, Drozdova LA, Lavinskaya EV, Kordon TI, Kalashnykova YV. Features of self-tolerance loss in patients with different clinical phenotypes of myasthenia. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2018; 9(4): 561-567. doi:10.15421/021884

REFERENCES

1. Bardakov SN, Zhivolupov SA, Barantsevich ER, Zaharov MV, Samartsev IN. Sovremennyye predstavleniya o rationalnoy diagnostike i lechenii priobretennoy miastenii. Chast 1: diagnostika. Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova. 2016; 23; 2: 20-26. [In Russia]
2. Bojko VV, Klimova EM, Kudrevich A.N. Lechenie miastenii s uchetom immunofiziologicheskikh fenotipov. Khar'kov: Publishing House Sheinina EV. 2008; 424 p. [In Russia].
3. Smolin AI. Sovremennyye aspekty kliniki i diagnostiki miastenii. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. 2013; 3: 12-15. [In Russia].
4. Harchenko VP, Sarkisov DS, Vetshev PS i dr. Bolezni vilochkovoy zhelezyi. Harkov: Triada-H. 1998. 232. [In Russia].
5. Farmakidis C, Pasnoor M, Dimachkie MM, Barohn RJ. Treatment of Myasthenia Gravis. Neurol. Clin. 2018; 36(2): 311-337. doi:10.1016/j.ncl.2018.01.011
6. Gabrielian NI, Savostyanova OA. Indicative test for the diagnosis of septic processes. Laboratornoe delo. 1997; 2: 79-80.
7. Gergalova GL, Lehmus OJ, Skok MV. Possible effect of activation of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in the mitochondrial membrane on the development of apoptosis. Neurophysiology. 2011; 43(3): 195-197. doi:10.1007/s11062-011-9203-7
8. Klimova EM, Bozhkov AI, Boyko VV, Drozdova LA, Lavinskaya EV, Skok MV. Endogenic cytotoxic compounds and formation of the clinic forms of myasthenia. Translational Biomedicine. 2016; 7,3,84: 1-16. doi: 10.21767/2172-0479.100084
9. Klimova EM, Lavinskaya EV, Minukhin DV, Syrovaya AO, Drozdova LA, Samoilova AP, Makarov VV, Makarov VA, Lukiyanova LV. On Forming Central and Peripheral Markers of Self-Tolerance Loss in Diverse Clinical Myasthenic Phenotypes. Der Pharmacia Lettre. 2017; 9(6): 8-17. http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html
10. Klimova EM, Minuchin DV, Drozdova LA, Lavinskaya EV, Kordon TI, Kalashnykova YV. Features of self-tolerance loss in patients with different clinical phenotypes of myasthenia. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2018; 9(4): 561-

ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ
ТИМЭКТОМИИ
У МОЛОДЫХ ПАЦИЕНТОВ
С ТИМУСНЕЗАВИСИМОЙ
МИАСТЕНИЕЙ ПРИ
НАЛИЧИИ БИОМАРКЕРОВ,
ХАРАКТЕРНЫХ
ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ
С ТИМОМАМИ

*Е. М. Климова,
Л. А. Дроздова,
Е. В. Лавинская,
Д. В. Минухин,
А. Н. Кудревич*

Реферат. *Цель* — оценка наличия специфических маркеров у пациентов с тимуснезависимой и тимусзависимой миастенией для выбора тактики лечения.

Материалы и методы. Обследовали 138 пациентов с тимуснезависимой (М — миастения без изменений тимуса) и тимусзависимой (МГ — миастения на фоне гиперплазии тимуса, МТ — миастения на фоне тимомы) миастенией для выбора тактики лечения. Использовали методы иммуноферментного анализа, спектрофотометрию, световую и люминесцентную микроскопию.

Результаты и их обсуждение. Выявлена взаимосвязь клинических фенотипов миастении с вариантами диплотипов лейкоцитарных антигенов HLA: у молодых пациентов с тимуснезависимой миастенией (М) выявили высокую гетерогенность генотипических маркеров HLA-DR (DR1, DR2, DR3, DR5, DR7). Пациенты с тимусзависимой миастенией (МТ) имели ограниченное количество дипло- и гаплотипов HLA DR2 и HLA DR7. Наличие гаплотипов HLA DR2 и HLA DR7 и изменения комплекса биомаркеров (наличие антиядерных антител, изменение показателей врожденного иммунитета и гуморальная сенсibilизация), у части молодых пациентов с М при прогрессировании заболевания приводило к развитию миастении на фоне тимомы (МТ) в старшем возрасте.

Выводы. Прогноз прогрессирования миастении и развития ремиссии может быть осуществлен с помощью геномных (наличие определенных гаплотипов HLA-DR) и молекулярных биомаркеров (наличие антиядерных антител ANA, изменение разных фракций молекул средней молекулярной массы, циркулирующих иммунных комплексов), которые могут быть применены для выбора тактики лечения.

Ключевые слова: *миастения, гиперплазия тимуса, тимома, антиядерные антитела.*

ADVISABILITY OF
THYMECTOMY IN
YOUNG PATIENTS WITH
THYMUS-INDEPENDENT
MYASTHENIA GRAVIS
IN THE PRESENCE
OF BIOMARKERS SPECIFIC
FOR PATIENTS WITH
THYMOMA

*E. M. Klimova,
L. A. Drozdova,
E. V. Lavinskaya,
D. V. Minukhin,
A. N. Kudrevich*

Summary. *The aim* is to assess the presence of specific markers in patients with thymus-independent and thymus-dependent myasthenia gravis for choosing treatment tactics.

Materials and methods. The presence of specific markers was assessed in 138 patients with thymus-independent (M – myasthenia gravis without thymus changes) and thymus-dependent (MH – myasthenia gravis with thymus hyperplasia, MT – myasthenia gravis with thymoma) for the choice of treatment tactics. We used methods of enzyme immunoassay, spectrophotometry, light and fluorescence microscopy.

Results and discussion. The relationship between the clinical phenotypes of myasthenia gravis and the variants of HLA leukocyte antigen diplotypes was revealed: in young patients with thymus-independent myasthenia gravis (M), a high heterogeneity of the genotypic markers HLA-DR (DR1, DR2, DR3, DR5, DR7) was observed. Patients with thymus-dependent myasthenia (MT) had only the HLA DR2 and HLA DR7 diplo- and haplotypes. The presence of HLA DR2 and HLA DR7 haplotypes and certain changes in the complex of biomarkers (anti-nuclear antibodies, innate immunity and humoral sensitization) in some young patients with M with disease progression led to the development of myasthenia gravis with thymoma (MT) at an older age.

Conclusions. The prognosis of the progression of myasthenia gravis and the development of remission can be made using genomic (the presence of certain HLA-DR haplotypes) and molecular (anti-nuclear antibodies ANA, different fractions of medium molecular weight peptides, circulating immune complexes) biomarkers, that can be used for the choice of treatment tactics.

Key words: *myasthenia, thymus hyperplasia, thymoma, antinuclear antibodies.*