

OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

PATOFYZIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE AUTOIMUNITNÍCH PUCHÝŘNATÝCH KOŽNÍCH CHOROB

Autor: MUDr. Jana Krabcová

Autoimunitní puchýřnaté choroby jsou závažná a chronicky probíhající onemocnění sliznic a kůže s neznámou etiologií. Jsou charakterizovány tvorbou specifických protilátek proti adhezivním molekulám v epidermis nebo v oblasti tzv. dermoepidermální junkce. Vazba protilátek na cílové struktury vede v dané oblasti k poruše adheze a ke vzniku puchýře. Detekce autoprottilátek vázaných v tkáni či cirkulujících v séru je základem diagnostiky autoimunitních puchýřnatých chorob.

Stávající klasické laboratorní metody umožňují diagnostiku bulózního pemphigoidu (BP), která však není schopná zachytit definitivně a s jistotou nemocné, kde klinický obraz lékaři nabízí možnost podezření na některé z autoimunitních puchýřnatých chorob. Tato skutečnost zahrnuje široké pole možností ve zkoumání a popisu nových diagnostických markerů, které mohou vést ke zvýšení senzitivity při zachování vysoké specifity. Výzkum autorky je zaměřen na charakterizaci dalších diagnostických markerů u pacientů s verifikovanou diagnózou BP, které mohou být součástí klasického screeningu, a pomoci tak při diagnostice nejednoznačných případů a následně i nastavit nejvhodnější léčebný postup. Cílem bylo tedy stanovení nových markerů, a tak doplnit klasické vyšetřovací metody, které jsou v dnešní době rutinně při diagnóze používány.

U bulózního pemphigoidu jsou typické specifické protilátky produkované proti hemidesmosomálním antigenům BP180 a BP230, které spojují bazální keratinocyty a bazální membránu. Diagnóza je založená na pozitivitě minimálně dvou specifických markerů - histologický průkaz, detekce tkáňově vázané protilátky frakce imunoglobulinu G a C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány epidermis metodou přímé imunofluorescence, detekce cirkulujících protilátek frakce imunoglobulinu G pomocí nepřímé imunofluorescence na opičím či králičím jícnu nebo na tkáňovém substrátu štěpeném 1mol/l NaCl, detekce antigenů BP180/BP230 pomocí enzymových imunoesejí. Klinický obraz doplňuje stanovení správné diagnózy.

Další diagnostickou metodou, která byla v 70. letech 20. století využívána pouze k úzké diagnostice *pemphigoid gestationis* (dříve známý jako *herpes gestationis*) je tzv. komplement fixační test (*herpes gestationis factor test*), nikdy však nebyla využita pro diagnostiku větší skupiny nemocných s bulózním pemphigoidem. Komplement fixační test autorka užívala u vzorku 300 pacientů s prokázanou diagnózou bulózního pemphigoidu a 136 negativních kontrol ke

zjištění, zda může být tato metoda využita také k diagnostice jiných puchýřnatých chorob než jen *pemphigoid gestationis*.

Nepřímá imunofluorescence je standardní diagnostickou metodou bulózního pemphigoidu, jejíž senzitivita je relativně nízká. U pacientů s bulózním pemphigoidem je známo, že subtypy imunoglobulinu G hrají důležitou roli (imunoglobulin G1-3 jako komplement fixační protilátky, imunoglobulin G4 nefixuje komplement). Práce se tedy zaměřila i na detekci jednotlivých subtypů protilátky (konkrétně IgG1, IgG3, IgG4) u 64 pacientů s verifikovanou diagnózou bulózního pemphigoidu, kteří byli ale negativní dle klasické nepřímé imunofluorescence. Výzkum jednotlivých subtypů protilátky IgG metodou nepřímé imunofluorescence nebyl dosud v literatuře popsán.

Komplement fixační test by tak mohl být zařazen mezi klasické diagnostické markery bulózního pemphigoidu a pomoci ve správné diagnostice u sérologicky rozporuplných případů. Detekce jednotlivých subtypů protilátky imunoglobulinu G1, G3, G4 a jejich kombinace pomocí metody nepřímé imunofluorescence na opičím jícnu by mohla zlepšit diagnostiku u pacientů s bulózním pemphigoidem a ne zcela jednoznačným sérologickým nálezem. Metoda CFT užitá v případě diagnostiky AIBD nezávisí na množství antigenů či komplementu samotného, protože pacientská séra nejsou ovlivněna vlastním systémem komplementu, a podíl externě dodaného komplementu a externích antigenů není zcela standardizován. Průkaz positivity CFT u pacientů s BP probíhá pomocí vizualizace komplementové podložky C3, která je navázána na bazální membránu tkáňového substrátu SSS. Proto je tento postup schopen detekovat jen protilátky cílené specificky proti bazální membráně v oblasti DEJ a to s vysokou mírou specificity.

Součástí tohoto posudku je předkládaná výše uvedená práce MUDr. Jany Krabcové ve vázané formě s příloženým autoreferátem disertační práce. Rozsah práce je 102 stran. Práce je členěna do 9 částí včetně seznamu referenční literatury, použitých zkratk a příloh. Po úvodu a charakteristice současného stavu poznání jsou jasně definovány cíle práce a hypotézy s použitou metodikou, následují vlastní výsledky a diskuze se závěrem. Disertační práce je vypracována pečlivě po stránce obsahové a je doplněna 16 obrázky (4 obrázky, 12 fotografií klinických i mikroskopických), 1 sloupcovým grafem a 8 tabulkami (součást vlastního textu). Tato obrazová a fotografická dokumentace vykazuje jednotný kód a napomáhá rychlé orientaci v datech, upřesňuje a doplňuje vhodně výslednou analýzu autora. Citace referenční literatury jsou uvedeny v dostatečném množství (103 referencí). Jejich časová proporcionalita je v pořádku.

Pomocí metody CFT testovala autorka hluboce zmražená séra od 300 pacientů BP, jejichž diagnóza byla stanovena pozitivitou minimálně 2 dalších laboratorních metod. Ve výzkumném souboru se jednalo konkrétně o 151 mužů a 149 žen s průměrným věkem 76,9

let. Krev byla odebrána jen od těch nemocných, kde byla s jistotou stanovena diagnóza bulózního pemphigoidu a kterým do analýzy nebyla nasazena žádná celková či lokální imunosupresivní terapie. Diagnóza byla postavena na specifickém klinickém obraze v kombinaci s minimálně 2 dalšími pozitivními metodami (histologie, DIF, IIF na opičím nebo králičím jícnu či SSS, detekcí BP180 a BP230 pomocí ELISA). Jako kontrolní skupina byla použita séra od 136 pacientů, konkrétně se jednalo o 52 mužů, 84 žen s průměrným věkem 60,2 let. Kontrolní séra byla použita od pacientů s podezřením na AIBD dle klinického obrazu, kde vlastní diagnóza BP byla pomocí klasických diagnostických metod vyloučena.

Při IIF detekci jednotlivých subtypů IgG protilátek autorka testovala celkem 64 pacientů s BP (31 mužů, 33 žen) v průměrném věku 75,8 let a 43 kontrolních sér od pacientů (10 mužů, 33 žen) ve věku průměrně 52,8 let. Všechna BP séra byla dle předchozích výsledků negativní metodou klasické IIF na opičím či králičím jícnu. Dle výsledků pilotní studie (testy senzitivity a specifity) vybrán opičí jícen.

Výzkum prokázal, že CFT vykazuje vysokou senzitivitu (71,7 %) se zachováním 100% specifity, tímto se nepříliš liší od ostatních sérologických metod. Nicméně v kombinaci s dalšími metodami (IIF na opičím či králičím jícnu, BP180/ BP230 ELISA) ukázal CFT rostoucí senzitivitu až na 95,3 % bez současného snížení specifity, která zůstává na 100 %. V neposlední řadě byla metoda CFT schopna diagnostikovat 30–50 % pacientů s BP, kteří byli negativní pomocí ostatních sérologických metod. Zařazení CFT mezi ostatní metody lze užít jako sekundární screeningovou metodu, kdy klasická IIF na opičím či králičím jícnu nebo na SSS je negativní, dochází k zvýšení senzitivity o 10-15 % a to detekcí průměrně 50 % BP protilátek, které jsou nedetekovatelné pomocí klasické IIF. CFT může být zařazen vedle klasických sérologických metod mezi ostatní senzitivní diagnostické testy. CFT může být důležitou metodou u pacientů, kteří jsou buď negativní či se nacházejí v šedé zóně použitím ostatních sérologických metod, DIF či histologického rozboru. Zlatým standardem může být CFT použitý jako sekundární konfirmační test u sérologicky nejednoznačných případů.

Stanovení jednotlivých subtypů protilátky IgG hraje roli v imunopatologii BP s predominancí IgG1 a IgG4 a může pomoci při přesnější diagnostice BP. Kombinací všech 3 subtypů protilátek (koktejl IgG1, IgG3, IgG4) senzitivita vzrostla 48,4 %. Specifita dosáhla tak u všech jednotlivých protilátek 100 %, v případě koktejlu ze všech 3 subtypů (IgG1, IgG3 a IgG4) 97,7 %. Autorka dochází k závěru, že IgG3 není predominantní protilátka při diagnostice BP, může být však použita jako součást koktejlu všech IgG. Použití dvojstupňového testu (klasická IIF s následnou IIF s využitím detekce jednotlivých IgG

subtypů u pacientů falešně negativních při klasické IIF) může být doporučeno jako doplňková standardní metoda na BP případech, kde selhala klasická IIF.

Téma i použité metodologie jsou vhodné a odpovídají současným poznatkům o problematice.

Z hlediska typu celé studie je nevýhodou, že byla limitována retrospektivním původem sběru dat. V některých případech tedy nebylo možné provést správnou korelaci mezi diagnostickými daty a klinickým obrazem daného pacienta.

Další faktory, které mohly ovlivnit výsledky této studie, byly dle možností eliminovány i zvoleným statistickým hodnocením a vyšetřením v jedné certifikované laboratoři.

Poznámky oponenta k práci a dotazy:

VĚCNÁ A POUZE FORMÁLNÍ DOPLNĚNÍ TEORETICKÉHO ÚVODU

Str. 26 – endemický pemphigus není latinský výraz, stejně jako Senear-Usher syndrom (i str. 33) – bez kurzívy.

Str. 75 – obr. č. 15 by bylo vhodnější v českém jazyce, související tabulka č. 5 nad ním je v češtině.

Str. 80 - eosinem, nikoliv eoseinem

Str. 84 – poslední odstavec: termíny klinických jednotek v latinském jazyce kurzívou

KOREKCE FAKTŮ TEORETICKÉ ČÁSTI

Str. 34 – Paraneoplastický pemphigus - Diagnostika PNP se může zakládat také na imunofluorescenčním vyšetření, konkrétně se jedná o **pozitivní reakci IgG metodou IIF použitím krysího žlučníku jako substrátu**, který je bohatý na plakiny (a **přechodného epitelu močového měchýře krysa**).

Str. 40 - Diagnóza BP je založená na pozitivitě minimálně dvou specifických markerů – histologický průkaz, detekce tkáňově vázané protilátky imunoglobulinu G (IgG) a C3 složky komplementu v oblasti BM epidermis metodou **přímé imunofluorescence (DIF profil depozit má tvar vroubkovaného písmene „u“ v případech EBA, zatímco vroubkovaný**

profil ve tvaru písmene „n“ je typický pro bulózní pemphigoid), detekce cirkulujících protilátek IgG pomocí nepřímé imunofluorescence.

Str. 47 – Dermatitis herpetiformis (DH) - Střevní problematika je zpočátku ukryta, může se ale projevovat typickými symptomy, jako jsou bolesti břicha.. **nemocní s DH obvykle nevykazují klinické symptomy GIT onemocnění (týká se i textu na str. 48).**

IgA protilátky rozpoznají epidermální transglutaminázu a zkříženě reagují s tkáňovou transglutaminázou (tTG) - **genetická predispozice přecitlivělosti** s příjmem stravy bohaté **na gluten** vede k **formaci IgA protilátek proti tkáňové transglutamináze** (tTG; TG 2, marker pro CD) ve střevě. **Tyto protilátky pak zkřížené reagují s epidermální transglutaminázou** (e-TG, TG 3, vysoce strukturálně /64%/ homologní s tTG, udržuje integritu str. corneum). **Depozita IgA a epidermálních TG komplexů pak způsobí vznik lezí v papilární dermis u DH.**

Str. 63 - Vzhledem k tomu, že v ČR není velké centrum pro diagnostiku puchýřnatých onemocnění, bylo náročné najít kliniku, kde se shromažďují pacienti s podezřením na AIBD. **Již více než 50 let jsou v České republice 2 centra – FN Hradec Králové a FN Brno.**

DOTAZY:

1. Lze z tabulky č. 7 vyvodit, že nejvyšší senzitivity bychom, dosáhli při kombinaci vyšetření DIF, koktejem IgG IIF a detekcí BP180 ELISA ? **Měl by sled těchto uvedených metod doporučen jako nejcitlivější algoritmus diagnostiky?**
2. Snažíme-li se o dosažení co nejvyšší senzitivity v diagnostice bulózního pemphigoidu u **sérologicky** ne zcela jasných případů, jaký postup navrhuje? (užití CFT, detekci na základě identifikace subtypů IgG či obě metody?).
3. Vedle diagnózy anti-laminin 332 MMP, který je spojován s maligními nemocemi, jsou u bulózního pemphigoidu produkované protilátky proti hemidesmozomálním antigenům BP180 (BPAG2, kolagen XVII), které jsou též asociovány s možnou paraneoplasíí. Názory různých autorů se v otázkách paraneoplasie u bulózního pemphigoidu liší i z důvodů faktu věkové skupiny postižených (vyšší incidence tumorů ve vyšším věku). **Doporučujete screening tumoru u všech (i pozitivita anti-**

BP 230 kd) pacientů s potvrzenou diagnózou bulózního pemphigoidu? Viz i při interpretaci vašich výsledků: „**Většina BP sér (57 z 64 - 89 %) a kontrolní séra byla negativní pro BP 230 ELISA. Dále 34 z 64 BP sér (53 %) a žádná kontrola bylo pozitivních pro BP180 ELISA.**“

4. **Senzitivita klasické či tradiční IIF na opičím jícnu** se pohybuje v rozmezí 60-80 % (Di Zengo G et al., 2012, Sárdy M et al., 2013). Senzitivita tradiční IIF na opičím jícnu se nachází na hodnotě 73,2 % dle předchozích studií (Sárdy M et al., 2013). Jak je text červeně označený autorkou vnímán? Ve smyslu „čili“ ? (či může významově působit ve smyslu „nebo“?)

Závěrečné hodnocení:

Svou disertační práci prokázala autorka vazbu vědecké činnosti na klinickou praxi. Práce rozšiřuje významně poznatky o přesné diagnostice těchto klinicky závažných onemocnění. Autorka prokázala i znalosti problematiky v publikaci s impact faktorem týkající se dané problematiky. MUDr. Jana Krabcová tedy prokázala předpoklady samostatné vědecké práce. Předkládaná disertační práce je srozumitelná, splňuje požadavky kladené na disertační práci a je aktuální. Z výše uvedeného proto doporučuji příslušné komisi 1. LF UK ke kladnému přijetí.

V Hradci Králové 3. 2. 2020

doc. MUDr. Miloslav Salavec, CSc.
Klinika nemocí kožních a pohlavních
FN a LF UK v Hradci Králové