

Oponentský posudek doktorské dizertační práce

MUDr. Martina Elišáka

„Epileptogeneze u encefalitid sdružených s autoprotilátkami“

Doktorská disertační práce ve studijním oboru Neurověd se zabývá úlohou neuronálních protilátek v epileptogenezi včetně jejich vztahu ke klinickým parametrům. Jde o vysoce aktuální téma, neboť s rozvojem molekulárně biologických metod je možné stanovení autoprotilátek proti antigenním terčům v jejich přirozené konformaci v membránách buněk. Toto se zdá stěžejní v diagnostice autoprotilátek, které jsou asociovány s autoimunitními onemocněními centrálního nervového systému.

Předložená práce má 86 stránek a 3 přílohy, které tvoří tři stěžejní práce MUDr. Elišáka. Je adekvátně rozčleněna, přičemž kohorty pacientů, metody i výsledky jsou srozumitelně prezentovány. O podrobném seznámení autora se studovanou problematikou svědčí literární odkazy, které zahrnují 123 citací.

V úvodu je čtenář na 30 stránkách seznámen s problematikou epilepsie a autoimunitních encefalitid (AE), jejich diagnostickými kritérii, metodami detekce autoprotilátek, jejich významem a rozdělením ve vztahu ke klinickým syndromům a terapeutické odpovědi na imunosupresivní léčbu. Dále rozvíjí možné mechanismy vzniku epilepsie ve vztahu k autoprotilátkám a vymezením pojmu autoimunitní epilepsie. V úvodu nalezneme 7 tabulek a jeden obrázek.

Do vlastní studie byly zařazeny dvě kohorty - jednou byla monocentrická kohorta pacientů s epilepsií temporálního laloku a druhou byla kohorta pacientů s fokální epilepsií neznámé etiologie v rámci multicentrické studie. V první kohortě z 224 testovaných pacientů bylo zařazeno do hodnocení 163 subjektů, u kterých bylo dále provedeno testování s klinickými parametry ve vztahu k neurálním protilátkám a hodnocení nálezů na MR mozku. V této kohortě byl výskyt autoprotilátek 5 % (8 ze 163). V klinických parametrech byly signifikantně odlišné pouze přítomnost dalšího autoimunitního onemocnění a vyšší věk při počátku nemoci u subjektů s autoprotilátkami. Dále autor uvádí další charakteristiky ve vztahu k pozitivním pacientům (nálezy v likvoru a další). Komentuje také efekt imunoterapie u daných subjektů. V její účinnosti však bude hrát roli i délka onemocnění a načasování terapie. U druhé multicentrické studie bylo využito i tkáňových řezů (TBA) pro stanovení autoprotilátek s doplněním o cell-based assay (CBA). V této studii bylo vyšetřeno 582 pacientů s nálezem autoprotilátek u 3,4 % (n= 20). Při porovnání séropozitivní a séronegativní kohorty byl zaznamenán významná přítomnost kognitivního deficitu a vyššího stupně funkčního postižení dle Rankinovy škály. Kapitola výsledků dále obsahuje 4 tabulky s charakteristikou pacientů a výsledky statistického srovnání.

V diskuzi Dr. Elišák shrnuje výsledky a zdůrazňuje vysoký výskyt epileptických záchvatů u autoimunitních epilepsií, přičemž jejich etiopatogeneze je multifaktoriální. Zmiňuje také nejednotné používání termínů, což může být ovlivněno i samotným faktem, že akutní symptomatické záchvaty bývají projevem autoimunitní encefalidity, ale mohou být i jejich důsledkem. Tato komplexní práce poukazuje na přítomnost neurálních protilátek u některých pacientů s epilepsií. Dále také na možnosti ovlivnění záchvatů imunoterapií u části z nich. Různé typy autoprotilátek jsou sdruženy s různými syndromy a odlišnou odpovědí na imunoterapii. Mezi nejčastěji detekované protilátky patřily: protilátky proti glutamát dekarboxyláze, LGI1 a CASPR2. Dobře prozkoumané protilátky ve vztahu k epilepsii (NMDAR Abs) byly z hodnocení vyloučeny. Jsou diskutována i doporučení imunoterapie pro dané autoprotilátky ve vztahu k jejich senzitivitě a prokázané odpovědi na terapii. V závěru diskuze MUDr. Elišák neopomíjí také možnost výskytu séronegativní autoimunitní epilepsie a

potřebu výzkumu dalších biomarkerů pro vyloučení nebo potvrzení autoimunitní epilepsie. Diskuze je doplněna o MR nález rozvoje atrofie hipokampu u limbické encefalitidy s pozitivitou AMPA protilátek. Jedním z bodů diskuze je také případná imunoterapie, nicméně vzhledem k tomu, že ze studie byli vyřazeni pacienti s jiným, než dominantním příznakem epilepsie byla indikována pouze terapie kortikosteroidy bez užití jiných imunosupresiv. Autor práce se také zamýšlí nad problematikou pozitivitu autoproti látek ve vztahu k indikaci epileptochirurgických zákroků.

Připomínky:

- V úvodu na straně 30 je obrázek tkáňového řezu potkana a cell-based assay s pozitivitou „anti-LGI1“. Měl by zde být uveden základní popis: zvětšení, typ sekundárních protilátek – konjugát (např. anti-hIgG-FITC?), ředění séra atd.
- V tabulce 6 v úvodní části je přehled zkoumaných protilátek ve vztahu k autoimunitní epilepsii. Jsou jmenovány protilátky proti CASPR2 s předpokládanou pozitivitou séra u AE v hodnotě 1:128. Nicméně práce Biena C.G. (Anti-contactin-associated protein-2 encephalitis: relevance of antibody titres, presentation and outcome) spíše doporučuje použití titrů 1:200. Tato hodnota pak ovlivňuje dále i práci Dr. Elišáka
- V části metodika je popisováno, že v té době nebyla v ČR dostupná metodika konfirmace autoproti látek na TBA u AE, což není úplně pravda. Některé laboratoře využívaly/využívají nefixované tkáně (zejména mozeček, firmy Euroimmun) s detekcí nepřímou imunofluorescencí, spíše vzhledem k obtížnosti interpretace, vysokému pozadí, finanční náročnosti a horší interpretovatelnosti, většina laboratoří již využívá jen imunoblotty a CBA. TBA je prakticky jedna z prvních metod detekce autoproti látek. Je faktem, že imunohistochemické metody u TBA se v rutinních laboratořích nepoužívají.
- V části metodické jsou převzaty titry protilátek proti CASPR2 – originální práce Biena C.G však využívá jiných sekundárních protilátek, než jsou originálně v diagnostickém komerčním kitu, což může ovlivnit výsledky. V práci (i publikované) by mělo být uvedeno, které sekundární protilátky jsou použity. Je také vhodné použít k vlastnímu ověření nastavení cut-off value vlastní kontroly jiných autoimunitních onemocnění.
- U části 3.3 je tvrzení, že protilátky proti GlyR nemohou být vizualizovány pomocí TBA – dle mé zkušenosti je to možné na tkáňových řezech míchy.
- Možné je vznést drobné připomínky formálního charakteru k některým termínům: pokud je možné použít termín koncentrace, titry atd., je to přesnější než označení „hladiny“. Dále označení anti-LGI1 neříká nic o třídě imunoglobulinů (může to být prakticky i IgA, IgM protilátka). Také předpona *anti-* by se měla spíše používat, pokud jsou používány protilátky mezidruhově, např. myší protilátka proti lidskému imunoglobulinu, zde je předpona *anti-* na místě.
- V metodice bych doporučovala alespoň základní zmínku o laboratorních protokolech stanovení autoproti látek, např. zda se používaly sekundární protilátky od poskytovatele kitu nebo byly nahrazeny apod.

V souvislosti s předloženou prací mám následující otázky:

- Jak se v současné klinické praxi postupuje v rámci indikace stanovení neurálních protilátek u suspektních autoimunitních epilepsií?
- V čem autor vidí největší úskalí v použití TBA v klinické praxi. Zda na zahraničním pracovišti byly nálezy na TBA nebo CBA hodnoceny 2 nezávislými hodnotiteli?

- Proč u pacientů s protilátkami proti CAPSR2, který je exprimován i v periferním nervovém systému, nevidíme žádné klinické postižení, popř. zda se zvažovalo i doplnění EMG vyšetření u těchto pacientů?

Studie přináší originální výsledky, které mají klinický dopad. Byly publikovány v impaktovaném časopise, monocentrická studie týkající se prevalence autoprotilátek u epilepsie temporálního laloku v časopise s IF = 2,765. V tomto článku je MUDr. Elišák prvním autorem. Je rovněž spoluautorem v multicentrické studii zabývající se epileptochirurgickými výkony u pacientů s rezistentní epilepsií a pozitivitou některých z neurálních autoprotilátek (IF 2,178). MUDr. Elišák také projevil schopnost začlenit se do mezinárodních výzkumných týmů.

Dizertační práce prokazuje předpoklady MUDr. Martina Elišáka k samostatné tvořivé vědecké práci a splňuje požadavky k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem. Práci doporučuji k obhajobě.

MUDr. Petra Nytrová, Ph.D.

V Praze 31. 8. 2020