

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Neurovědy



MUDr. Hana Mojžišová

Význam antineurálních protilátek u pacientů s farmakorezistentní epilepsií

Significance of neural antibodies in patients with drug refractory epilepsy

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Petr Marusič, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení: Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.12.2023

Hana Mojžišová

.....

Podpis autorky

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Petru Marusičovi, Ph.D. za erudované vedení. Velké poděkování patří RNDr. Jitce Hanzalové za významnou pomoc s laboratorní prací. Rovněž děkuji MUDr. Martinu Elišákovi, Ph.D. a MUDr. Davidu Krýslovi, Ph.D. za podnětné připomínky a konzultace v průběhu studia, a všem kolegům i pacientům z Neurologické kliniky 2. LF UK a FN Motol, kteří mě v průběhu mé práce inspirovali. Poděkování patří i mým zahraničním kolegům doc. Frankovi Leypoldtovi, dr. Justině Dargvainene a Martině Jansen.

Naposledně chci poděkovat svým nejbližším – rodičům doc. RNDr. Martinovi Mojžišovi, Ph.D. a RNDr. Alexandre Mojžišovej, Ph.D., sourozencům a svému drahému partnerovi MUDr. Richardu Bočkovi za trpělivost a oporu v průběhu studia.

Význam antineurálních protilátek u pacientů s farmakorezistentní epilepsií

Abstrakt

Jednou z možných etiologií epilepsie je etiologie autoimunitní, která byla zařazena do klasifikace epilepsií v její poslední revizi publikované v roce 2017 Mezinárodní ligu proti epilepsii. Cílem práce bylo zhodnotit výskyt neurálních autoprotilátek u pacientů s epilepsií a rozšířit diagnostické možnosti, které dosud byly v České republice omezené. Spolu s nizozemskými autory jsme popsali výskyt neurálních autoprotilátek u nizozemských a českých pacientů s fokální epilepsií neznámé etiologie a navrhli jsme skórovací systém k identifikaci pacientů určených prioritně k vyšetření těchto protilátek. V české kohortě pacientů jsme pak hodnotili výskyt protilátek v séru i likvoru pacientů s farmakorezistentní epilepsií, který byl dosud systematicky vyšetřován jen v ojedinělých kohortách. Výsledky obou těchto prací prokázaly nižší výskyt neurálních autoprotilátek, než byl dosud u pacientů s epilepsií popisován, a to díky přísnější metodice s ověřením pozitivních výsledků druhou metodou. Vzhledem k tomu, že neurální autoprotilátky jsou primárně sdružovány s autoimunitními encefalitidami, zkoumali jsme i tuto skupinu včetně hodnocení přítomnosti epileptických záchvatů v klinickém profilu. Spolu se švédskými autory jsme se zabývali proteomikou v likvorovém kompartmentu u pacientů s protilátkami proti NMDAR a LGI1, kde jsme popsali asociaci sirtuinu 2 s paraneoplastickou etiologií encefalidity s protilátkami proti NMDAR. V rámci svého studia jsem zavedla novou metodiku vyšetřování neurálních protilátek na tkáňových řezech potkaních mozků pomocí nepřímé imunohistochemie a popsala kohortu pacientů s klinickým obrazem autoimunitní encefalidity při negativním průkazu neurálních autoprotilátek.

Klíčová slova: autoimunitní encefalitida, farmakorezistentní epilepsie, GAD65, LGI1, neurální autoprotilátky, NMDAR

Significance of neural antibodies in patients with drug refractory epilepsy

Abstract

One possible etiology of epilepsy is autoimmune, which was included in the classification of epilepsies in its latest revision published in 2017 by the International League Against Epilepsy. The aim of this study was to evaluate the prevalence of neural autoantibodies in patients with epilepsy and to expand the diagnostic possibilities in the Czech Republic. Together with the Dutch authors, we described the prevalence of neural autoantibodies in Dutch and Czech patients with focal epilepsy of unknown etiology and proposed a scoring system to identify patients prioritized for testing for these antibodies. In a Czech cohort of patients, we assessed the presence of antibodies in serum and CSF of patients with drug refractory epilepsy. The results of both these studies showed a lower prevalence of neural autoantibodies than previously described in patients with epilepsy, due to a more rigorous methodology with verification of positive results by a second method. Since neural autoantibodies are primarily associated with autoimmune encephalitis, we also investigated this group, including an assessment of the presence of epileptic seizures in the clinical profile. Together with the Swedish authors, we investigated the proteomics in the CSF compartment of patients with antibodies against NMDAR and LGI1 and described the association of sirtuin 2 with the paraneoplastic etiology of NMDAR encephalitis. The methodology of neural autoantibodies assessment on tissue sections of rat brains using indirect immunohistochemistry was newly implemented in the Czech Republic. We have described a cohort of patients with a clinical picture of autoimmune encephalitis when neural autoantibodies were negative.

Keywords: autoimmune encephalitis, drug resistant epilepsy, GAD65, LGI1, neural autoantibodies, NMDAR

Seznam použitých zkratk

ACES – Skóre příznaky a symptomy fokální epilepsie s protilátkami (z anglického Antibodies Contributing to Focal Epilepsy Signs and Symptoms Score)

AIE – Autoimunitní encefalitida

AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazol propionát receptor

ANOVA – Analýza rozptylu

ASM – Protizáchvatové léky (z anglického anti-seizure medication)

CASE – Clinical assessment scale in autoimmune encephalitis

CASPR2 – Contactin associated protein 2

CBA – Cell-based assay

CCL8 – Chemokinový ligand 8 s motivem C-C

CD6 – Molekula CD6

CI – Konfidenční interval (z anglického confidence interval)

CASP8 – Kaspáza 8

CCL22 – Chemokinový ligand s motivem CC 22

CD5 – Molekula CD5

CRMP5/CV2 – Collapsin response mediator protein 5

CXCL10 – Chemokinový ligand 10 s motivem C-X-C 10

CXCL11 – Chemokinový ligand s motivem C-X-C 11

CXCL13 – Chemokinový ligand s motivem C-X-C 13

DPPX/DPP6 – Dipeptidylpeptidase-like protein 6

EDB – Extreme delta brush vzorec v EEG

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

FAS – Fokální záchvaty bez poruchy vědomí

FIAS – Fokální záchvaty s poruchou vědomí

FBDS – Faciobrachiální dystonické záchvaty

FBTCS – Fokální záchvaty přecházejí do bilaterálního tonicko-klonického záchvatu

FCD – Fokální kortikální dysplazie

FLAIR – Fluid attenuation inversion recovery

FRE – Farmakorezistentní epilepsie

FS – Febrilní záchvaty

GABA – γ -aminomáselná kyselina

GABAB-R – γ -aminomáselný receptor B

GABAA-R – γ -aminomáselný receptor A

GAD65 – Dekarboxyláza kyseliny γ -aminomáselné

GFAP – Gliální fibrilární acidický protein

GluR3B – Podjednotka 3 glutamátového AMPA receptoru

GlyR – Glycinový receptor

HEB – Hematoencefalická bariéra

HMGB1 – High-mobility group box 1 protein

HS – Hipokampální skleróza

IgG – Imunoglobuliny G

IgM – Imunoglobuliny M

IFN γ – Interferon gama

ILAE – Mezinárodní liga proti epilepsii (International league against epilepsy)

IL1 β – Interleukin-1 beta

IL7 – Interleukin 7

IL10 – Interleukin 10

IL12B – Interleukin 12B

IL17A – Interleukin 17A

IPI – Iniciální inzult (z anglického initial precipitating injury)

IT – Imunoterapie

IQR – Mezikvartilové rozpětí (z anglického interquartile range)

KS – Kortikosteroidy

Kv1.1 – Člen 1 podrodiny A napěťově řízených draslíkových kanálů

LE – Limbická encefalitida

LGI1 – Leucine-rich Glioma Inactivated protein 1

MCP2 – Matrixová metalopeptidáza 1

miRNA – Mikro ribonukleová kyselina

miR-134 – Mikro RNA 134

miR146a – Mikro RNA 146a

mRS – Modifikovaná Rankinova škála

MOG – Myelin oligodendrocytární protein

MOGHE – Malformace korového vývoje s oligodendroglální hyperplázií

NAbs - Neurální autoprotilátky

NMDAR – N-methyl-D-aspartátový receptor

NCSE – Non-konvulzivní status epilepticus

OCB – Oligoklonální pásy

OR – Poměr šancí (z anglického odds ratio)

PET – Pozitronová emisní tomografie

PCR – Polymerázová řetězová reakce (z anglického polymerase chain reaction)

PNS – Paraneoplastické neurologické syndromy

Qalb – Albuminový index

RAPID skóre – akronym z pěti hodnocených proměnných (Refrakterní status epilepticus, Age (věk) počátku onemocnění ≥ 60 let, Autoprotilátkově negativní pravděpodobná AIE, Infratentoriální léze na MRI, Delay (opoždění) imunoterapie ≥ 1 měsíc)

RE – Rasmussenova encefalitida

RIA – Radioimmunoassay

RNA – Ribonukleová kyselina

RUO – Pro výzkumné účely (z anglického research use only)

SD – Směrodatná odchylka

SE – Status epilepticus

SIRT2 – Sirtuin 2

SOX-1 – Sex determining region Y-box 1

TCS – Tonicko-klonické záchvaty

TLE – Epilepsie temporálního laloku

TNF- α – Tumor necrosis factor alfa

TNF β – Lymfotoxin α

TNFRSF9 – Člen superrodiny receptorů TNF9

TNFSF14 – Člen superrodiny TNF14

TPO – Tyroidální peroxidáza

TWEAK – Člen superrodiny TNF12

VGKC – Komplex proteinů sdružených s napětově řízenými draslíkovými kanály

Obsah

1. Úvod	11
1.1 Epilepsie a zánět	12
1.1.1. Vrozená imunita a adaptivní imunita.....	12
1.1.2. Neurální autoprotilátky.....	14
1.1.3. Protizáchvatové léky a zánět	14
1.1.4. Imunoterapie a epilepsie.....	15
1.2. Epilepsie sdružená s autoimunitou	16
1.2.1 Definice	16
1.2.1.1 Definice Mezinárodní ligy proti epilepsii (ILAE).....	16
1.2.1.2. Adaptace definice ILAE	16
1.2.2. Prevalence epilepsie sdružené s autoimunitou	17
1.2.3. Skórovací systémy	18
1.2.3.1 Antibody prevalence in epilepsy and encephalopathy score (APE2).....	19
1.2.3.2 Antibody prevalence in epilepsy before surgery (APES).....	20
1.2.4. Riziko rozvoje epilepsie po AIE.....	20
1.2.5. Terapie epilepsie sdružené s autoimunitou.....	21
1.2.5.1. Imunoterapie	21
1.2.5.2. Protizáchvatové léky.....	21
1.3. Epileptochirurgie a epilepsie sdružená s autoimunitou	22
1.3.1. Histopatologie.....	22
1.3.2. Výsledky epileptochirurgie u pacientů s epilepsií sdruženou s autoimunitou.....	22
1.4. Diagnostika neurálních autoprotilátek.....	24
1.4.1. Line blot.....	24
1.4.2. Tkáňové řezy k detekci intracelulárních protilátek	25
1.4.3. Cell based assay.....	25
1.4.4. Tkáňové řezy pro detekci protilátek proti povrchovým antigenům	25
1.4.5. Další metody.....	25

1.5. Biomarkery farmakorezistentní epilepsie a epilepsie sdružené s autoimunitou a autoimunitních encefalitid	27
1.5.1. Farmakorezistentní epilepsie	27
1.5.2. Epilepsie sdružená s autoimunitou	27
1.5.3. Autoimunitní encefalitida	28
2. Cíle práce a hypotézy	29
3. Metodika	31
4. Výsledky	32
5. Souhrn jednotlivých studií	33
5.1. Studie č. 1: Skóre příznaky a symptomy fokální epilepsie s protilátkami (z anglického Antibodies Contributing to Focal Epilepsy Signs and Symptoms Score)	33
5.1.1. Metodika	33
5.1.1.1. Pacienti	33
5.1.1.2. Sběr dat	34
5.1.1.3. Laboratorní diagnostika	34
5.1.1.4. Statistická analýza	35
5.1.2. Výsledky	36
5.1.3. Diskuze	41
5.2. Studie č. 2: Nízká prevalence neurálních autoprotilátek v perioperačních vzorcích mozkomíšního moku epileptochirurgických pacientů – multicentrická prospektivní studie	43
5.2.1. Metodika	43
5.2.1.1. Pacienti	43
5.2.1.2. Analýza protilátek	42
5.2.1.3. Statistická analýza	45
5.2.2. Výsledky	45
5.2.2.1. Demografie a klinické charakteristiky	45
5.2.2.2. Skupina pacientů s protilátkami a oligoklonální pásy izolované v likvoru	48

5.2.3. Diskuze	51
5.3. Studie č. 3: Autoimunitní encefalitida s negativitou neurálních autoprotilátek – retrospektivní monocentrická analýza	53
5.3.1. Metodika	53
5.3.1.1. Selektce pacientů	53
5.3.1.2. Sběr dat	54
5.3.1.3. Strategie testování protilátek	55
5.3.1.4. Statistická analýza	56
5.3.2. Výsledky	56
5.3.2.1. Selektce pacientů	56
5.3.2.2. AIE s negativitou neurálních autoprotilátek	57
5.3.2.1.1. Pravděpodobná AIE a definitivní ADEM s negativitou neurálních autoprotilátek	57
5.3.2.1.2. Definitivní autoimunitní limbická encefalitida s negativitou neurálních autoprotilátek	58
5.3.2.1.3. Možná AIE s negativitou neurálních autoprotilátek bez další kategorizace	60
5.3.2.1.4. Příčina úmrtí a souvislost imunoterapie s výsledkem u AIE s negativními protilátkami	60
5.3.3. Diskuze	61
5.4. Studie č. 4: Paraneoplastická autoimunitní encefalitida? Sirtuin 2 u encefalidity s protilátkami proti NMDAR	64
5.4.1. Metodika	64
5.4.1.1 Selektce pacientů	64
5.4.1.2. Proteomická analýza	65
5.4.1.3. Statistická analýza	65
5.4.2. Výsledky	66
5.4.2.1. Proteomické markery u různých skupin pacientů	66
5.4.2.2. Přítomnost tumoru	68

5.4.2.3. Klinické příznaky	69
5.4.2.4. Paraklinická vyšetření.....	70
5.4.2.5. Průběh a outcome onemocnění.....	70
5.4.3. Diskuze	71
6. Souhrnná diskuze.....	73
7. Zhodnocení cílů a hypotéz práce, závěr	76
8. Souhrn.....	77
9. Summary.....	78
10. Literatura	79
11. Přehled publikační činnosti	93
12. Seznam příloh.....	96

1. Úvod

Epilepsie je onemocnění charakterizované dispozicí k opakovaným neprovokovaným epileptickým záchvatům, které postihuje miliony lidí na celém světě (Fisher et al. 2014). Zánět je považován za jeden z faktorů ovlivňující vznik a rozvoj epilepsie, i když jeho přesná role je dosud nejasná a záleží na konkrétním typu tohoto heterogenního onemocnění (Vezzani et al. 2011a). V roce 2017 byla Mezinárodní ligoou proti epilepsii do klasifikace epilepsií zařazena i etiologie *imunitní*, s podskupinou asociovanou s neurálními autoprotiilátkami (NABs) (Scheffer et al. 2017). Neurální autoprotiilátky byly prvně popsány u autoimunitních encefalitid, ale v průběhu let bylo vyzorováno, že se nacházejí i u “oligosymptomatických” forem, kdy dominuje jeden příznak a ostatní nemusí být vůbec klinicky vyjádřeny, např. epilepsie sdružené s autoimunitou, autoimunitní demence či autoimunitní psychóza. Zejména u těchto skupin je důležitá precizní diagnostika výskytu NABs, aby se zabránilo chybnému určení autoimunitní etiologie daného onemocnění na podkladě falešné positivity testů. Disertační práce se zabývá jak diagnostikou neurálních autoprotiilátek, která je nedílnou součástí stanovení diagnózy *epilepsie sdružené s autoimunitou*, tak jejich asociací s autoimunitními encefalitidami, tedy s onemocněním projevujícím se fakultativně epileptickými záchvaty.

1.1 Epilepsie a zánět

Role zánětu u epilepsie je extenzivně zkoumána již dlouhodobě, ale dosud stále panují nejasnosti ohledně jeho role v iktogenezi a epileptogenezi. Výzkumy ukazují, že u různých typů epilepsie je v různé míře angažovaná jak vrozená, tak adaptivní imunita. Na druhou stranu, záchvaty samotné mohou také způsobit zánětlivou reakci a ta pak může ovlivnit jejich další výskyt nebo tíži (Vezzani et al. 2011b).

1.1.1. Vrozená imunita a adaptivní imunita

Chronický zánět může být součástí některých typů epilepsií bez ohledu na počáteční inzult nebo etiologii, a nikoli pouze důsledkem specifické zánětlivé nebo autoimunitní etiologie (Vezzani et al. 2011b). Jak vrozená imunita (tedy cytokiny, granulocyty, makrofágy, mikroglie a další), tak adaptivní imunita (tedy protilátky, T a B lymfocyty) hrají u epilepsie roli.

Mnohé studie ukazují, že u strukturální epilepsie různé etiologie jsou ve srovnání s kontrolní skupinou alterovány hladiny cytokinů a dalších molekul. Nejrobustnější literární údaje popisují elevaci prozánětlivých cytokinů interleukinu 6 (IL 6), interleukinu 1 beta (IL1 β) a tumor necrosis factor alfa (TNF- α) a proteinu High-mobility group box 1 (HMGB1), jak laboratorních zvířat, tak u histopatologických vzorků tkáně lidských mozků získaných v rámci epileptochirurgického výkonu. Podobně je popisována alterace buněčné složky (aktivované mikroglie, přítomnost lymfocytů) v oblasti léze (Vliet et al. 2018, Choi et al. 2009, Maroso et al. 2010, Ravizza et al. 2006, Iyer et al. 2010, Iori et al. 2016, Black et al. 2009, Kumar et al. 2019, Vezzani et Granata 2005). Dále jsou v těchto lézích přítomny reaktivní astrocyty, které také produkují cytokiny a nepřímo tak alterují funkci imunitního systému (Choi et al. 2009, Vezzani et al. 2022).

Výše uvedené IL1 β a HMGB1 aktivují intracelulární signalizační kaskádu, která konverguje na nukleárním transkripčním faktoru NF κ B (Gilmore 2006, Vezzani et al. 2011b). Ten dále reguluje syntézu cytokinů, enzymů a receptorů a moduluje expresi genů zapojených v neurogenezi, buněčné smrti, synaptické reorganizaci a plasticitě (O'Neill et Kaltschmidt 1997). Existují i další signalizační kaskády ovlivňující neuronální excitabilitu a epileptogenezi, jejichž popis však přesahuje rozsah této práce.

Zejména pro HMGB1 existuje množství studií podporujících jeho roli u pacientů s epilepsií. HMGB1 je zvýšeno v neuronech, gliích a buňkách endotelu HEB v lézích u pacientů s FRE i v odpovídajících zvířecích modelech. Hladiny HMGB1 v krvi korelují s patologickými změnami v mozku u zvířecích modelů získané epilepsie (Maroso et al. 2010, Ravizza et al. 2018, Maroso et al. 2010). V recentní studii bylo HMGB1 zvýšeno u pacientů s farmakorezistentní epilepsií ve srovnání s pacienty kompenzovanými na léčbě a zdravými kontrolami a HMGB1 bylo navrženo jako potenciální biomarker farmakorezistence (Walker et al. 2022).

Působením cytokinů na astrocyty či receptory zpětného vychytávání glutamátu dochází ke zvýšení dostupnosti glutamátu na synapsi a tím ke zvýšení excitability (Hu et al. 2000, Bezzi et al. 2001).

Na druhou stranu probíhající epileptické záchvaty mohou narušit integritu hematoencefalické bariéry (HEB), čímž je umožněna propustnost pro periferní buňky imunitního systému a další prozánětlivé molekuly, pro které je standardně HEB nepropustná (Oby et Janigro 2006).

Protilátkám jako součástí adaptivní imunity je věnována rozsáhlá část textu v dalších podkapitolách. Buněčná adaptivní imunita, tedy T a B lymfocyty jsou nejlépe popsány u specifického typu epileptického syndromu – Rasmussenovy encefalitidy (RE). V histopatologických studiích se v různé míře v závislosti na stadiu onemocnění nalézají lymfocytární infiltráty složené z CD4+ i CD8+ lymfocytů (Pardo et al. 2004). Infiltrace fokální kortikální dysplazie typu IIb lymfocyty byla popsána také (Iyer et al. 2010).

Dosud v literatuře probíhá diskuze, nakolik je imunitní reakce u jednotlivých typů epilepsií primární či sekundární a jaký má vliv na iktogenezi či epileptogenezi (Vliet et al. 2018). Zejména v preklinických, ale i klinických studiích se prokazuje efekt některých protizánětlivých terapií na snížení frekvence epileptických záchvatů či zpomalení epileptogeneze (Noe et al. 2013, Vliet et al. 2018).

Podrobný popis role jednotlivých výše uvedených složek imunity přesahuje rozsah disertační práce, a v následujícím textu se budeme dále již zabývat jen rolí NAbů u epilepsie.

1.1.2. Neurální autoprotilátky

Neurální autoprotilátky (také v literatuře označovány jako antineurální protilátky, antineuronální protilátky) jsou biomarkerem autoimunitní encefalitidy (AIE) (Leypoldt et al.

2015a) a některých typů epilepsií sdružených s autoimunitou. Protilátky proti neurálním intracelulárním cílům, např. Hu, amphiphysin byly identifikovány již v druhé polovině dvacátého století (Bien et al. 2007, CORSELLIS et al. 1968, Irani et al. 2011). Většina z těchto protilátek je asociována s malignitou, u které se předpokládá, že iniciuje imunitní odpověď proti nádorovým buňkám a sekundárně zkříženě proti nervovým strukturám. Těto skupině onemocnění asociovaných s protilátkami proti intracelulárním cílům se proto říká paraneoplastické neurologické syndromy (PNS) (Darnell et Posner 2003). Protilátky z této skupiny se nepovažují za přímo patogenní ani se nepředpokládá jejich přímá role v rozvoji záchvatů (iktogenezi), naopak se předpokládá dominantní role T-buněčné imunity (Graus et Dalmau 2019).

Počátkem 21. století došlo k výraznému posunu na poli autoimunitních onemocnění CNS. V asociaci s AIE byly popsány protilátky proti membránovým a synaptickým proteinům neuronů a glií, například N-metyl-D-aspartát receptor (NMDAR), Contactin Associated Protein 2 (CASPR2), Leucine Rich Glioma Inactivated 1 (LGI1) (Dalmau et Graus 2018). Až v 80 % případů (v 33 – 100 % dle typu protilátky), jsou epileptické záchvaty součástí klinického obrazu AIE (Bien et Holtkamp 2017a, Pillai et al. 2016; Geis et al. 2019). Patofyziologie AIE asociovaných s protilátkami proti povrchovým antigenům byla zkoumaná v in vitro i in vivo studiích, a několik z nich prokázalo přímý efekt protilátky na funkci a lokalizaci receptorů a neuronální excitabilitu implikující iktogenezi u AIE (Lalic et al. 2011, Bien et Holtkamp 2017b). Recentně byl vytvořen zvířecí model iktogeneze a epileptogeneze u NMDAR encefalitidy (Wright et al. 2021). Existují také nepřímé modely, například potkaní model iktogeneze u protilátek proti LGI1 zprostředkované bloádou člena 1 subrodiny A napěťově řízených draslíkových kanálů (Kv1.1) dendrotoxinem-K (Baudin et al. 2022).

1.1.3. Protizáchvatové léky a zánět

Protizáchvatové léky (ASM, z anglického anti-seizure medication) mají mimo dobře známé účinky na různé iontové kanály i efekt na zánětlivou složku. Fenytoin (Gómez et al. 2014), karbamazepin (Granata et al. 2011, nDambach et al. 2014, Stienen et al. 2010) a levetiracetam (Kim et al. 2010, Beghi et Shorvon 2011) jsou asociovány s nižšími hladinami prozánětlivých cytokinů nebo aktivovaných mikroglií a mají další předpokládané protizánětlivé vlastnosti ve zvířecích a buněčných modelech (Wilmshurst et al. 2015).

1.1.4. Imunoterapie a epilepsie

Imunomodulační terapie je u některých typů epilepsií používána již dlouho (Vliet et al. 2018). Například u části pacientů byl prokázán efekt adrenokortikotropního hormonu, kortikosteroidů (Wilmshurst et al. 2015), intravenózních imunoglobulinů (Vezzani et Granata 2005, Billiau et al. 2007), a dalších látek (Lagarde et al. 2016). Původně byla imunoterapie používaná hlavně u některých dětských epileptických syndromů, kde ale mechanismus jejího účinku není úplně jasný. V poslední dekádě je tato terapie více užívána u *epilepsie sdružené s autoimunitou* bez ohledu na věk. U autoimunitních encefalitid se imunoterapie zdá výrazně účinnější na redukci záchvatů než podávání ASM (Feyissa et al. 2017). Po měsíci je asi polovina pacientů bez záchvatů, po půl roce více než 70 %. Rituximab se ukazuje být efektivní na redukci záchvatů u pacientů s přetrvávajícími záchvaty po imunoterapii první linie (intravenózní kortikosteroidy, intravenózní imunoglobuliny, plazmaferéza) (Byun et al. 2016). Recentně proběhla studie fáze 2 zkoumající natalizumab u pacientů s farmakorezistentní epilepsií, příznivý efekt však nebyl statisticky signifikantní (French et al. 2021).

1.2. Epilepsie sdružená s autoimunitou

1.2.1 Definice

1.2.1.1 Definice Mezinárodní ligy proti epilepsii (ILAE)

Vzhledem ke skutečnosti, že třetina pacientů s epilepsií je rezistentní vůči dvěma dobře zvoleným a dostatečně dávkovaným ASM (Picot et al. 2008), se hledání autoimunitní etiologie po recentních objevech NAbs stalo velmi atraktivním. V roce 2017 byla Mezinárodní ligoou proti epilepsii (ILAE) revidovaná klasifikace epilepsií, která nově zahrnuje i již zmiňovanou *epilepsii imunitní etiologie* (Scheffer et al. 2017). Tato definice je však z vícero hledisek problematická.

Imunitní epilepsie je v ILAE klasifikaci definována jako taková, která je přímým důsledkem poruchy imunity, u níž jsou záchvaty hlavním příznakem této poruchy a kde existuje důkaz autoimunitně zprostředkovaného zánětu centrálního nervového systému. Jako příklady imunitní epilepsie jsou v tomto článku zmiňovány NMDAR a LGI1 encefalitida. U obou těchto jednotek, pokud epileptické záchvaty vymizí po úspěšném залечení, jde ale podle současného pohledu pouze o *akutní symptomatické záchvaty při encefalitidě*, nikoli o epilepsii, jak bude vysvětleno dále (Steriade et al. 2020a). Imunitní etiologie epilepsie také v původní definici zahrnuje například i steroid-responzivní encefalitidu asociovanou s anti-thyroidálními protilátkami (Li et Li 2019), u které ale dosud nebyla kauzální role těchto protilátek prokázána – role autoimunity není tedy vyjasněna a onemocnění je navíc často diagnostikované chybně (Valencia-Sanchez et al. 2021, Graus et al. 2016).

Další z onemocnění zahrnutých do imunitní etiologie je Rasmussenova encefalitida, onemocnění, které je považováno za zprostředkované T buněčnou imunitou, dosud bez známých asociovaných (a ve vícero studiích replikovaných) protilátek (Rasmussen et al. 1958, Schwab et al. 2009).

1.2.1.2. Adaptace definice ILAE

V roce 2020 byla kategorie imunitní etiologie ILAE revidována a byly vyčleněny dvě jednotky – *epilepsie sdružená s autoimunitou* (autoimmune-associated epilepsy) a *akutní symptomatické záchvaty v rámci autoimunitní encefalidity* (acute symptomatic seizures secondary to autoimmune encephalitis) (Steriade et al. 2020a), kdy se záchvaty vyskytují v akutní / aktivní

fázi encefalitidy. Pokud po zaléčení zánětu záchvaty vymizí, nedochází k rozvoji epilepsie. Na druhé straně může v průběhu akutní fáze encefalitidy dojít k neuronálnímu poškození a je iniciována epileptogeneze, která vyústí v rozvoj epilepsie jako následku AIE – tedy se pak jedná skutečně o *epilepsii sdruženou s autoimunitou* (Tan et al. 2021). Třetí možností je přítomnost NAbs u pacientů s epilepsií bez anamnézy AIE či encefalopatie (Borusiak et al. 2016, Bruijn et al. 2021).

I když neexistuje arbitrární hranice mezi aktivním vzplanutím AIE a jejími následky, je doporučeno pacienty sledovat minimálně jeden rok ke stanovení epilepsie sdružené s autoimunitou jako následku AIE, a to u pacientů s pokračujícími záchvaty či nutností pokračujícího užívání ASM (Geis et al. 2019).

1.2.2. Prevalence epilepsie sdružené s autoimunitou

Velké množství studií zkoumalo prevalenci neurálních autoprotilátek u různých skupin pacientů s epilepsií. V závislosti na typu kohorty a použité definici epilepsie sdružené s autoimunitou byla prevalence protilátek ve velmi širokém rozmezí 3,4 až 36 % (Geis et al. 2019, Bien et Holtkamp 2017a, Brenner et al. 2013a, Iorio et al. 2015, Elisak et al. 2018a, Dubey et al. 2017, Bakpa et al. 2016, Bruijn et al. 2021). Kohorty s vyšší prevalencí byly ve světle novějších dat zřejmě nadhodnoceny. Například, studie z roku 2013 u pacientů s epilepsií neznámé etiologie odhadovala prevalenci NAbs v séru na 11 % (Brenner et al. 2013a). Při bližším pohledu na data a vyloučení všech pacientů s dvojitě-negativními protilátkami proti napěťově řízenému draslíkovému kanálu (VGKC) by byla výsledná prevalence 6,4 %. Dvojitě-negativní protilátky proti VGKC, u kterých není zároveň detekována reaktivita proti LGI1 či CASPR2 (molekul asociovaných s VGKC), jsou považovány za nespecifické a jejich testování se již nedoporučuje (Michael et al. 2020). Další studie z roku 2017 popsala NAbs v séru až u 20 % pacientů s epilepsií neznámé etiologie (Dubey et al. 2017). Obdobně jako výše, po vyloučení pacientů s protilátkami proti VGKC (LGI1 negativní, CASPR2 nebylo testováno) by bylo procento pacientů s pozitivitou NAbs 15 %. Na druhé straně u skupiny pacientů s temporální epilepsií byla nalezena významně nižší prevalence 5 % (Elisak et al. 2018b). Vysoká prevalence u dříve uvedených studií může být také vysvětlena tím, že tyto studie zahrnovaly i *akutní symptomatické záchvaty v rámci autoimunitní encefalitidy*. Na základě analýzy studií do roku 2019 je autoimunitní etiologie epilepsie u dospělé populace odhadována na 7 % (Husari et Dubey 2019, Cabezudo-García et al. 2021b).

Nejčastěji popisované cílové antigeny u epilepsie sdružené s autoimunitou jsou dekarboxyláza kyseliny glutamové 65 (GAD65) a dále glycinový receptor (GlyR), NMDAR, LGI1, CASPR2, gliální fibrilární acidický protein (GFAP), Ma2 a Hu (Cabezudo-García et al. 2021b, Lilleker et al. 2014, Irani et al. 2011, Geis et al. 2019, Carreño et al. 2017a, Li et al. 2021, Iorio et al. 2018, Brenner et al. 2013b, Ekizoglu et al. 2019, Borusiak et al. 2016). Byť mají pacienti s AIE často akutní symptomatické záchvaty jako součást onemocnění, je celková pravděpodobnost rozvoje epilepsie po léčbě AIE nízká, zejména u protilátek proti povrchovým antigenům (Geis et al. 2019, Ilyas-Feldmann et al. 2021, Bruijn et al. 2019). U většiny z nich je riziko <5 %, jen mírně vyšší je u LGI1 encefalitidy a GABAA-R encefalitidy (Pillai et al. 2016, Geis et al. 2019). Navíc je pravděpodobné, že jsou přítomny etnické rozdíly – ve studii asijských pacientů rozvinulo až 23 % pacientů s protilátkami proti NMDAR, LGI1 a GABAB-R epilepsii jako důsledek AIE (Shen et al. 2020).

U pacientů s AIE s protilátkami proti intracelulárním antigenům je riziko rozvoje epilepsie vyšší (Geis et al. 2019, Ilyas-Feldmann et al. 2021). Mezi intracelulární antigeny řadíme i GAD65. Onemocnění asociovaná s GAD65 jsou od většiny AIE odlišné – často probíhají plíživě, bez akutní encefalitické fáze (Malter et al. 2010). Na rozdíl od klinického průběhu je z histopatologických studií zřejmé, že pacienti s GAD65 asociovanou epilepsií procházejí časným aktivním zánětlivým stadiem s přítomností cytotoxických T lymfocytů a plasmatických buněk a s možností terapeutického zásahu. Následně dochází k imunologicky málo aktivnímu či neaktivnímu stádiu kdy již imunoterapie většinou bývá neefektivní (Tröscher et al. 2022).

Třetí skupinou *epilepsií sdružených s autoimunitou* jsou epilepsie autoimunitní etiologie s negativitou protilátek (typickým příkladem je Rasmussenova encefalitida), kdy je předpokládána dominantní role jiné složky imunity, nebo jsou nedostatečné detekční metody na přítomné protilátky (Bien et Holtkamp 2017a, Feyissa et al. 2017).

1.2.3. Skórovací systémy

Vzhledem k nízké prevalenci protilátek v populaci pacientů s epilepsií byly vytvořeny různé skórovací systémy, které mají napomoci ve výběru pacientů, u kterých je vhodné protilátky testovat. Vybrané skórovací systémy jsou popsány níže.

1.2.3.1 Antibody prevalence in epilepsy and encephalopathy score (APE2)

APE2 je starší skórovací systém, který byl sice navržen pro selekci pacientů s epilepsi k testování protilátek, ale nezdá se být vhodný pro pacienty bez akutní encefalitické fáze (Dubey et al. 2018). Jednotlivé položky v rámci skóre se většinou týkají spíše akutní encefalidity než chronických symptomů (např. subakutní alterace vědomí, nově vzniklé epileptické záchvaty, neuropsychiatrické změny, dysautonomie, virové prodromy, faciobrachiální dystonické záchvaty či faciální dyskineze, zánětlivý nálezu v likvoru, MR mozku se známkami encefalidity, Tab. 1). Toto skóre má například nízkou senzitivitu u pacientů s epilepsi s GAD65 protilátkami, kde často akutní fáze chybí (Bruijn et al. 2021).

Tab. 1: APE2 skóre, volně dle Dubey et al (Dubey et al. 2018)

Položka	Hodnota
Nově vzniklá, v průběhu 1 – 6 týdnů progredující kvalitativní porucha vědomí, nebo nově vzniklé epileptické záchvaty	1
Neuropsychiatrické změny; agitovanost, agresivita, emoční labilita	1
Autonomní dysfunkce	1
Virový prodrom (rýma, bolest v krku, subfebrilie)	2, hodnoceno v případě absence malignity do 5 let od vzniku neurologických příznaků
Faciobrachiální dystonické záchvaty (FBDS)	3
Faciální dyskineze	2, hodnoceno v případě nepřítomnosti FBDS
Záchvaty refrakterní na dva ASM	2
Nález v likvoru konzistentní se zánětem (zvýšená bílkovina >500mg/L a/nebo lymfocytární pleocytóza >5 buněk/mm ³)	2
MRI mozku konzistentní s encefalitou (T2/FLAIR hyperintenzita omezená na jednu nebo obě mediální temporální oblasti nebo multifokálně v šedé a/nebo bílé hmotě kompatibilní s demyelinizací nebo zánětem)	2

Malignita diagnostikovaná do 5 let od vzniku neurologických příznaků (s výjimkou karcinomu kůže, bazaliomu, mozkového nádoru, malignity s mozkovou metastázou)	2
--	---

1.2.3.2 Antibody prevalence in epilepsy before surgery (APES)

APES skóre bylo specificky vypracováno pro pacienty s farmakorezistentní epilepsií (FRE), u kterých je zvažován resekcční výkon (Li et al. 2021). Toto skóre má lehce vyšší specificitu i senzitivitu než APE2, ale bohužel většina položek také popisuje symptomy typické pro AIE. Maximální skóre je 16 bodů a je tvořeno následujícími položkami: nově vzniklý status epilepticus nebo kumulace záchvatů nebo subakutně progredující alterace vědomí, farmakorezistence, triáda explozivního počátku symptomů a atypických neuropsychiatrických změn a změn na MRI nebo pozitronové emisní tomografii (PET), PET lobární hypo/hypermetabolismus, dysautonomie či autonomní záchvaty, unilaterální/bilaterální hipokampální skleróza nebo zánětlivé změny na MRI, virové prodromy, anamnéza meningitidy/encefalitidy nejasné etiologie, malignita, FBDS nebo faciální dyskineze, osobní nebo rodinná anamnéza autoimunitního onemocnění, nové fokální příznaky CNS dysfunkce a systémové příznaky (např. ztráta tělesné hmotnosti, hyponatrémie) (Li et al. 2021).

1.2.4. Riziko rozvoje epilepsie po AIE

Vzhledem ke směšování epilepsie sdružené s autoimunitou a výskytu epileptických záchvatů v rámci AIE je obtížné odlišit v literatuře rizikové faktory pro rozvoj epilepsie po AIE. Z dostupných literárních zdrojů jsou pro obě entity rizikové: subakutní začátek, neobvykle vysoká frekvence záchvatů, intraindividuální variabilita semiologie záchvatů nebo multifokalita, anamnéza neoplazie, osobní nebo rodinná anamnéza autoimunitního onemocnění, abnormální nález v mozkomíšním moku, opožděné zahájení imunoterapie (IT), status epilepticus (SE) v anamnéze (Toledano et al. 2014, Shen et al. 2020). V práci, která odlišovala epilepsii od záchvatů v rámci AIE, byly za rizikové faktory považovány záchvaty od počátku rezistentní na terapii ASM, vysoký počet užívaných ASM, perzistující interiktální epileptiformní výboje během dalšího sledování a nedostatečná odpověď na imunoterapii v akutní fázi (Matricardi et al. 2022).

1.2.5. Terapie epilepsie sdružené s autoimunitou

1.2.5.1. Imunoterapie

Imunoterapie se dle literatury ukazuje být efektivní u pacientů s epilepsií asociovanou s NAbs, i když je tuto informaci nutno brát s jistou obezřetností vzhledem k tomu, že část prací zahrnovala pacienty s epileptickými záchvaty v rámci AIE. U 62 až 75 % pacientů došlo k redukci počtu záchvatů o >50 % (Toledano et al. 2014, Iorio et al. 2015, Feyissa et al. 2018, Iorio et al. 2015, Elisak et al. 2018b). Efekt imunoterapie závisí u pacientů s farmakorezistentní epilepsií na typu protilátky. Typickým příkladem skupiny s nízkou odpovědí na imunoterapii jsou GAD65 asociovaná onemocnění (Toledano et al. 2014). Předpokládá se, že tito pacienti prochází nejprve časnou aktivní encefalitickou fází (z histopatologického hlediska), která může trvat několik let. Po této fázi vzniká v důsledku poškození cytotoxickými T-lymfocyty epileptogenní léze v podobě hipokampální sklerózy. Předpokládá se, že důvodem malého účinku IT je její zahájení až v pozdním stadiu, nebo cílení na odstranění protilátek, které pravděpodobně nejsou patogenní. Ukazuje se, že terapie může být účinná pokud dojde k zahájení do 1 až 2 let od počátku příznaků – než dojde k ireverzibilní destrukci mnoha neuronů (Tröscher et al. 2022).

1.2.5.2. Protizáchvatové léky

Modulace protilátkové a buněčné imunity protizáchvatovými léky byla v literatuře popsána s protichůdnými závěry (Feyissa et al. 2017). Ukazuje se, že imunoterapie je superiorní vůči ASM u pacientů s *epilepsií sdruženou s autoimunitou* (Beghi et Shorvon 2011, Bruijn et al. 2019). U malé části pacientů s epilepsií sdruženou s autoimunitou a s AIE byl popsán efekt ASM samotných, bez použití konkomitantní imunoterapie. Efekt u pacientů s AIE se zdá zřetelnější u ASM, jejichž mechanismem účinku je blokáda sodíkových kanálů (Feyissa et al. 2018). Opět je ale nutnost opatrné interpretace těchto dat vzhledem k tomu, že část pacientů měla protilátky se spornou relevancí (dvojitě-negativní VGKC), nebo byla protilátkově negativní (Feyissa et al. 2017).

1.3. Epileptochirurgie a epilepsie sdružená s autoimunitou

1.3.1. Histopatologie

Nejčastější strukturální lézí u pacientů s farmakorezistentní epilepsií podstupujících operaci byla dříve hipokampální skleróza (HS) (Walker 2015), ale v posledních letech se s mírnou převahou stala nejčastější fokální kortikální dysplazie (FCD) (Baud et al. 2018). Ačkoli je FCD považována za vrozenou strukturální abnormalitu, histopatologická analýza vzorků prokázala určitou účast vrozené buněčné imunity a interleukinového systému v oblasti této léze (Ravizza et al. 2006, Choi et al. 2009). Účast imunitního systému byla obdobně prokázána i u HS (Leal et al. 2017). Navíc bylo u HS zjištěno, že i bez průkazu aktivního zánětlivého procesu může u části pacientů jít o následek dříve prodělané limbické encefalitidy (LE). V jedné studii by takto 24 % pacientů zpětně splňovalo diagnostická kritéria definitivní LE a 29 % kritéria možné LE (Bien et al. 2007). V této studii téměř 50 % pacientů s HS mělo pozitivitu NAbs. Kromě toho se HS vyskytovala u 41 – 64 % pacientů s protilátkami proti LGI1 (Rada et al. 2020),(Sonderer et al. 2016c, Finke et al. 2017), hipokampální léze, skleróza nebo atrofie byly přítomny u 20 – 24 % pacientů s CASPR2 (Joubert et al. 2016, Rada et al. 2020, Sonderer et al. 2016a), a u 31 – 62 % pacientů s GAD65 (Rada et al. 2020, Falip et al. 2019, Mäkelä et al. 2018). Přesný podíl imunitních dějů na vzniku a udržování záchvatů a na rozvoji HS je stále nedořešenou otázkou a může zde působit souhra mnoha faktorů.

1.3.2. Výsledky epileptochirurgie u pacientů s epilepsií sdruženou s autoimunitou

V podskupině pacientů s epilepsií temporálního laloku, kteří podstoupili chirurgickou resekci, byl u pacientů s NAbs významně horší outcome operace ve srovnání s pacienty bez protilátek. Vymizení záchvatů bylo například dosaženo pouze u 16 % těch, kteří měli unilaterální hipokampální sklerózu, na rozdíl od obvykle udávaných 70 % v kohortách s negativními protilátkami (Carreño et al. 2017b). Předpokládá se, že pokračující záchvaty mohou být způsobeny bilaterálními funkčními nebo strukturálními lézemi (na základě MRI, EEG a klinických údajů), které jsou u případů s pozitivními protilátkami časté (Kerling et al. 2008, Carreño et al. 2017c). Jiná studie srovnávající pacienty po encefalitidě s kontrolní skupinou přinesla podobné výsledky – méně časté vymizení záchvatů po operaci a záchvaty s těžším průběhem (Steriade et al. 2020b). Vystává pak otázka možnosti přidatné imunomodulační

léčby po epileptochirurgickém výkonu v případech, kdy nedojde k vymizení záchvatů – dosud však pro tuto léčbu neexistují dostatečná data.

1.4. Diagnostika neurálních autoprotilátek

Neurální autoprotilátky lze dělit dle lokalizace cílového antigenu na protilátky proti intracelulárním a povrchovým antigenům. U většiny intracelulárních antigenů se předpokládá dominující patogenní role cytotoxických T buněk a protilátky se považují jen za epifenomén. Na druhé straně stojí protilátky proti povrchovým, tedy synaptickým a membránovým antigenům, kde je prokázána jejich přímá patogenní role (Dalmau et Graus, 2022). Protilátky lze dále dělit dle klinického syndromu – jiné protilátky jsou asociovány se syndromem limbické encefalitidy než s rychle progredujícím mozečkovým syndromem (Abboud et al. 2021). Klinicky obdobný syndrom může být asociován s více protilátkami, a naopak jednotlivá protilátka může způsobovat fenotypově odlišné syndromy. Vzhledem k tomu není u suspekce na AIE doporučeno testovat jednotlivé protilátky, ale naopak testovat panely protilátek a to jak proti intracelulárním, tak proti membránovým a synaptickým antigenům a používat různé metody detekce ke zvýšení senzitivity i specificity (Storstein et al. 2011, Déchelotte et al. 2020). Metody detekce se liší dle typu protilátky.

První skupinou jsou protilátky proti intracelulárním antigenům – ty lze detekovat i metodami, u kterých antigen není v jeho nativní konformaci – vážou se i na lineární epitopy (Ricken et al. 2018). Pro tento účel se používají imunoblotty (Western blot anebo line blot), pro detekci protilátek proti GAD65 také enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) či cell-based assay (CBA) (Muñoz-Lopetegi et al. 2020). Druhou skupinou jsou protilátky proti povrchovým antigenům. Jejich detekce je složitější vzhledem k nutnosti zachovat antigeny v jejich nativní konformaci, a metodika se tedy oproti detekci intracelulárních antigenů liší.

1.4.1. Line blot

Při této technice se používají kity ve formě diagnostických proužků obsahující purifikované proteiny, které jsou inkubovány se vzorkem séra nebo likvoru (Déchelotte et al. 2020). Slouží k detekci protilátek proti konkrétním antigenům, tedy v případě přítomnosti protilátky vůči danému antigenu je zbarven příslušný proužek (Ricken et al. 2018). Poměrně častá je falešná pozitivita, zejména u protilátek proti Yo, CV2 a Ma2 (Déchelotte et al. 2020).

1.4.2. Tkáňové řezy k detekci intracelulárních protilátek

Další metodou pro detekci protilátek proti intracelulárním antigenům jsou paraformaldehydem fixované tkáňové řezy (Ances et al. 2005). Jedná se o velmi tenké řezy tkání (hipokampů, mozečků ale i extraneurální tkáně) laboratorních zvířat, např. potkana, které jsou permeabilizovány, aby byl umožněn průnik protilátek dovnitř buněk (Ricken et al. 2018). Vzorek pacienta je inkubován s tkání a v případě přítomnosti NAbs se tyto navážou v příslušných oblastech. Poté se vzorek promyje, aplikuje se protilátka proti lidskému imunoglobulinu G a dále se aplikují látky, které barevně vizualizují tyto protilátky. U pacienta s přítomností NAbs tedy dochází ke „specifickému“ barvení tkáňového řezu, u negativity dochází k nevýraznému nespecifickému barvení pozadí. Tímto vyšetřením není možné určit konkrétní antigen, vůči kterému se daná protilátka navázala, k tomu slouží výše uvedený line blot. Vyšetření na tkáňových řezech však výrazně zvyšuje senzitivitu, protože zachytí i vzácnější protilátky, a slouží také k verifikaci výsledku na line blotu.

1.4.3. Cell based assay

Jedná se o laboratorně kultivované buňky, do kterých je vložena DNA kódující protein proti kterému detekujeme protilátky, např. NMDAR. Ten pak tyto buňky vystavují na svém buněčném povrchu, a to v zachovalé 3D konformaci. Vazba protilátky je detekována imunofluorescenčně (značenou sekundární protilátkou). Obdobně jako line blot detekuje protilátky proti konkrétním antigenům.

1.4.4. Tkáňové řezy pro detekci protilátek proti povrchovým antigenům

Tyto tkáňové řezy, na rozdíl od předchozích, využívají nefixovanou tkáň, tzn. princip je obdobný, ale povrch buněk není narušen, a tak jsou tyto řezy optimalizovány k detekci protilátek proti povrchovým antigenům (Ances et al. 2005). Nejsou komerčně dostupné, využívají se jen ve výzkumných laboratořích jako „research use only“ (RUO) metoda.

1.4.5. Další metody

Metodika detekce NAbs je širší a zahrnuje další specializované metody detekce, zejména neurální buněčné kultury, imunoprecipitaci a hmotnostní spektrometrii (Ances et al. 2005;

Ricken et al. 2018). Ty však jsou dostupné jen v zahraničních laboratořích a jejich popis přesahuje rozsah této práce.

Závěrem této části lze shrnout, že detekce protilátek je metodologicky komplikovaná a je doporučeno testovat každý typ protilátky (proti intracelulárním i proti povrchovým antigenům) dvěma metodami. V praxi se jedná o line blot v kombinaci s komerčně dostupnými tkáňovými řezy proti intracelulárním antigenům, a CBA v kombinaci s RUO tkáňovými řezy detekujícími povrchové antigeny.

1.5. Biomarkery farmakorezistentní epilepsie a epilepsie sdružené s autoimunitou a autoimunitních encefalitid

Dosud neexistuje laboratorní biomarker, který by byl využíván v široké rutinní klinické praxi u těchto onemocnění. Avšak u všech tří jsou extenzivně zkoumány a v posledních letech bylo popsáno více slibných biomarkerů.

1.5.1. Farmakorezistentní epilepsie

HMGB1 je konstitutivní nehistonový protein vázaný na chromatin, který fyziologicky působí jako DNA chaperon podílející se na transkripci genů, replikaci a opravě DNA (Ravizza et al. 2018). Pacienti s FRE vykazují významně vyšší hladiny HMGB1 v krvi než pacienti s kompenzovaní a zdravé kontroly. HMGB1 rozlišuje s vysokou specificitou a selektivitou pacienty s FRE od pacientů kompenzovaných (Walker et al. 2022). Protilátky proti podjednotce 3 glutamátového AMPA receptoru (GluR3B) byly v minulosti popsány u Rasmussenovy encefalitidy (Rogers et al. 1994). Později se ukázalo, že nejsou pro toto onemocnění specifické ale vyskytují se u části pacientů s epilepsií (Wiendl et al. 2001). Právě protilátky proti GluR3B byly dále zkoumány u epilepsie a ukazují se jako další možný biomarker farmakorezistence. V séru i likvoru pacientů s FRE byly signifikantně vyšší protilátky proti GluR3B v porovnání s pacienty kompenzovanými (Lai et al. 2022). Mikro ribonukleová kyselina (miRNA) je malá nekódující jednořetězcová molekula ribonukleové kyseliny (RNA), která posttranskripčně reguluje genovou expresi prostřednictvím vlivu na messengerovou RNA. Cirkulující hladiny miRNA miR-134 a miR146a jsou signifikantně vyšší u pacientů s FRE s fokálními záchvaty poruchou vědomí ve srovnání s pacienty s příznivou odpovědí na ASM. Zvýšené hladiny miR-134/146a v cirkulaci jsou spojeny s vyšším rizikem FRE a mohly by představovat nové neinvazivní molekulární markery pro zlepšení časné prognózy u pacientů s epilepsií (Leontariti et al. 2020).

1.5.2. Epilepsie sdružená s autoimunitou

Dosud jediným dostupným biomarkerem epilepsie sdružené s autoimunitou jsou právě neurální autoprotiilátky. U Rasmussenovy encefalitidy byly popsány protilátky proti GluR3B jak uvedeno dříve, u kterých bylo později prokázáno, že nejsou pro RE specifické. U dalších typů epilepsie

sdružené s autoimunitou dosud nejsou jednoznačná data ohledně biomarkerů rozlišujících od epilepsie jiné etiologie (Langenbruch et al. 2021, Nass et al. 2021).

1.5.3. Autoimunitní encefalitida

Standardním biomarkerem autoimunitních encefalitid jsou neurální autoprotilátky. U části však přítomny nejsou – tuto skupinu nazýváme autoimunitní encefalidity s negativitou neurálních autoprotilátek. Existují však jiné biomarkery popisující průběh, prognózu AIE a další asociované faktory (Ciano-Petersen et al. 2022). Většina z nich byla popsána u nejčastější NMDAR encefalidity. Hladiny chemokinového ligandu s motivem C-X-C 13 (CXCL13) korelovaly s přítomností relapsů a nedostatečnou odpovědí na imunoterapii, tíží onemocnění a outcome (Leypoldt et al. 2015b, Liba et al. 2016, Kothur et al. 2016). Hladiny chemokinového ligandu s motivem C-X-C 10 (CXCL10) u NMDAR encefalidity jsou asociovány s pleocytózou v mozkomíšním moku, klinickou závažností onemocnění a přítomností relapsů (Liba et al. 2016, Kothur et al. 2016, Liu et al. 2020). Hladiny chemokinového ligandu s motivem CC 22 (CCL22) korelovaly s tíží onemocnění (Liu et al. 2020). Hladina interleukinu IL17A (IL17A) korelovala s tíží onemocnění a s jeho outcome (Zeng et al. 2018). Hladina interleukinu IL10 byla zvýšena jen u paraneoplastických případů a korelovala s tíží onemocnění (Liu et al. 2020).

U ostatních typů AIE byly biomarkery zkoumány méně. U LGI1 encefalidity byly popsány zvýšené hladiny IL17A, které byly asociovány s tíží onemocnění (Levrant et al. 2021). U ostatních encefalitid nelze vzhledem k heterogenitě a malému počtu pacientů vyvodit jednoznačné závěry ohledně zkoumaných biomarkerů (Ciano-Petersen et al. 2022).

2. Cíle práce a hypotézy

Cíl č. 1: Stanovit klinické parametry, které by umožnily určit pacienty indikované k vyšetření neurálních autoprotilátek.

Hypotéza č. 1: Část pacientů s fokální epilepsií neznámé etiologie má ve skutečnosti epilepsii sdruženou s autoimunitou. Na základě klinických charakteristik lze identifikovat pacienty s fokální epilepsií neznámé etiologie, u kterých je testování neurálních autoprotilátek indikované.

Cíl a hypotézu č. 1 zkoumá studie č. 1.

Cíl č. 2: Určit výskyt neurálních autoprotilátek v séru a likvoru u pacientů s farmakorezistentní epilepsií podstupujících epileptochirurgický zákrok. Dalším cílem je u pacientů s farmakorezistentní epilepsií s pozitivitou neurálních autoprotilátek definovat jejich klinické charakteristiky, které by v budoucnosti mohli pomoci v časně identifikaci této skupiny.

Hypotéza č. 2: Neurální autoprotilátky budou pozitivní u více než 5 % pacientů a u části pacientů budou pozitivní pouze v likvoru. Nejčastější budou protilátky proti GAD65. U části pacientů bude na tkáňových řezech detekována přítomnost protilátek proti dosud neidentifikovaným antigenům. Protilátky se budou častěji vyskytovat u pacientů s epilepsií zatím neurčené etiologie, u pacientů s hipokampální sklerózou, a u pacientů bez časných nebo pozdních rizik pro rozvoj epilepsie.

Cíl a hypotézu č. 2 zkoumá studie č. 2.

Cíl č. 3: Určit počet pacientů s autoimunitní encefalitidou jako možnou příčinou epilepsie sdružené s autoimunitou, kteří nemají pozitivní neurální autoprotilátky.

Hypotéza č. 3: Část pacientů s autoimunitní encefalitidou nemá detekovatelné neurální autoprotilátky. U části pacientů protilátky nejsou detekovány, protože nevyužíváme všechny dostupné metody a/nebo nesprávně interpretujeme výsledky jako falešně negativní.

Cíl a hypotézu č. 3 zkoumá studie č. 3.

Cíl č. 4: Určit biomarkery probíhajícího zánětu u autoimunitních encefalitid, které by umožnily odlišit akutní symptomatické epileptické záchvaty jako projev autoimunitní encefalitidy od epilepsie, která je jejím následkem.

Hypotéza č. 4: U části pacientů lze detekovat biomarkery predikující rozvoj či průběh onemocnění.

Cíl a hypotézu č. 4 zkoumá studie č. 4.

3. Metodika

Ve spolupráci s nizozemskými kolegy jsme validovali skóre, dle kterého lze na základě klinických parametrů indikovat vyšetření NAbs. Vzhledem k možné izolované pozitivitě v mozkomíšním moku při negativitě v séru jsme analyzovali mozkomíšní mok na přítomnost NAbs u pacientů s farmakorezistentní epilepsií. Dále jsme analyzovali výskyt epileptických záchvatů u pacientů s autoimunitní encefalitidou a jejich asociaci s biomarkery zánětu. Pro určení potenciálního významu NAbs jako biomarkeru epilepsie sdružené s autoimunitou jsme určovali výskyt encefalitid, které nejsou sdružené s neurálními autoproti látkami.

Použitá metodika je popsána v odpovídajících sekcích u jednotlivých studií a přiložených publikačních výstupech.

4. Výsledky

Výsledky jsou uvedeny v odpovídajících sekcích jednotlivých studií a přiložených publikačních výstupech.

5. Souhrn jednotlivých studií

5.1. Studie č. 1: Skóre příznaky a symptomy fokální epilepsie s protilátkami (z anglického Antibodies Contributing to Focal Epilepsy Signs and Symptoms Score)

5.1.1. Metodika

5.1.1.1. Pacienti

V této prospektivní, multicentrické, observační kohortové studii byli v období od prosince 2014 do prosince 2017 zařazeni dospělí pacienti s fokální epilepsií neznámé etiologie. Pacienti zařazení do této studie byli odesláni do (terciárních) center pro léčbu epilepsie a jejich ošetřující neurologové neměli podezření na AIE. Pacienti byli zařazeni z nizozemských center pro epilepsii, fakultních nemocnic a jedné okresní nemocnice. Zařazeni byly pacienti s epilepsií s dalšími příznaky nebo bez nich, ale bez podezření na encefalitidu. Vylučovací kritérium bylo podezření na AIE. Pacienti s epilepsií se známou infekční, genetickou nebo metabolickou etiologií byli vyloučeni. Pacienti se strukturálními lézemi na MRI při zařazení byli vyloučeni, zatímco pacienti s obrazem hipokampální sklerózy nebo s nálezem hyperintenzity v T2 vážených obrazech (resp. na fluid-attenuated inversion recovery, FLAIR) unilaterálně či bilaterálně vyloučeni nebyli, protože tyto nálezy mohou být asociovány s AIE (Sonderer et al. 2016d).

Pacienti byli rozděleni do 4 skupin: (1) definitivní epilepsie sdružená s autoimunitou, pokud byla v séru a/nebo likvoru detekována známá neurální autoprotlátka potvrzená dvěma metodami detekce; (2) epilepsii pravděpodobně sdruženou s autoimunitou, pokud byla v séru a/nebo likvoru detekována známá neurální autoprotlátka, ale pokud nebyl výsledek potvrzen druhou metodou detekce, nebo pokud byla splněna diagnostická kritéria pro pravděpodobnou AIE s negativitou protilátek (Graus et al. 2016), (3) epilepsii s možnou asociací s autoimunitou, pokud sérum nebo mozkomíšní mok vykazovaly podobné vzorce barvení při vyšetření na tkáňových řezech, ale nebyla detekována žádná známá protlátka; a (4) epilepsii bez asociace s autoimunitou.

5.1.1.2. Sběr dat

Analyzovaná data pacientů obsahovala následující informace: charakteristiku pacienta, epilepsie, přítomnosti klinických příznaků nebo symptomů spojených s autoimunitní etiologií (poruchy paměti, spánku, chování, řeči, hybnosti nebo autonomního systému), předchozí a současnou medikaci (včetně ASM), současnou míru soběstačnosti (dle modifikované Rankinovy škály [mRS] (Swieten et al. 2018)) a výsledcích předchozích pomocných vyšetření, včetně MRI, EEG a analýzy mozkomíšního moku, pokud byly k dispozici. Byla odebrána krev, u části pacientů byl proveden i odběr likvoru. Pacienti byli prospektivně sledováni po dobu 1 roku. Po 1, 4, 8 a 12 měsících od zařazení do studie shromažďoval ošetřující lékař nebo koordinující zkoušející údaje o typu záchvatů, měsíční frekvenci záchvatů, typech používaných ASM a mRS. Konečná diagnóza byla stanovena při poslední kontrole.

5.1.1.3. Laboratorní diagnostika

Všechny vzorky byly screeningově vyšetřeny na tkáňových řezech pro detekci povrchových protilátek, jak bylo popsáno dříve (Ances et al. 2005). Následně byly všechny vzorky s pozitivním nebo sporným výsledkem podrobeny rozsáhlejšímu testování. V závislosti na vzoru barvení a klinickém fenotypu byla použita kombinace laboratorních technik. 1) CBA (Euroimmun, Lübeck, Německo) byly použity k detekci protilátek proti NMDAR, receptoru α amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny (AMPA), receptoru γ -aminomáselné kyseliny B (GABAB-R), LGI1, CASPR2 a GAD65. Protilátky proti GAD65 byly dále testovány pomocí ELISA (Medizym anti-GAD 95, Medipan, Berlín, Německo), aby bylo možné kvantifikovat koncentraci protilátek. K detekci protilátek proti GABAA-R (receptor kyseliny γ -aminomáselného A), GABAB-R, AMPAR a dipeptidyl-peptidase-like proteinu 6 (DPPX) byla použita CBA s živými buňkami jako RUO metoda. Radioimunoassay (RIA; VGKC Antibody Assay RIA, DLD Diagnostika, Hamburg, Německo) byla použita k detekci protilátek proti VGKC a line blot byl použit k detekci protilátek proti intracelulárním antigenům (Hu/Yo/Ri/Tr/amfyfyzin/CV2/Ma1/Ma2; Euroimmun). Hladiny protilátek proti GAD65 v séru byly považovány za relevantní, pokud byla koncentrace ELISA > 10 000 IU/ml. Za pozitivní byly považovány pouze vzorky testované pozitivně jak metodou ELISA, tak s kompatibilním pozitivním barvením na tkáňových řezech (Muñoz-Lopetegi et al. 2020). Kromě toho byly všechny vzorky séra vyšetřeny na přítomnost protilátek proti GlyR pomocí CBA s živými

buňkami (RUO), protože tyto protilátky nelze vizualizovat na tkáňových řezech (Carvajal-González et al. 2014, McKeon et al. 2013). Všechny pozitivní výsledky byly potvrzeny opakovaným vyšetřením daného vzorku. Vzorky, které byly na tkáňových řezech vyhodnoceny jako sporné nebo pozitivní, ale bez známé protilátky, byly podrobeny rozsáhlejšímu testování pomocí imunocytochemie s živými hipokampálními buněčnými kulturami (Ances et al. 2005).

Podskupina pacientů zvažovaných k epileptochirurgickému řešení byla testována pomocí CBA, ELISA a RIA na přítomnost protilátek v rámci standardizovaného protokolu i v případě nepřítomnosti barvení na tkáňových řezech. Kromě toho byli pacienti se skóre Antibodies Contributing to Focal Epilepsy Signs and Symptoms Score (ACES) 2 a více testováni komerčními CBA a ELISA post hoc.

5.1.1.4. Statistická analýza

Pacienti byli rozděleni do 3 skupin na základě výsledků analýzy přítomnosti protilátek na pacienti s: (1) protilátkami zaměřenými proti extracelulárním neuronálním antigenům, (2) s protilátkami proti GAD65 ve vysoké koncentraci a (3) pacienty bez přítomnosti protilátek. Srovnání mezi těmito 3 skupinami bylo provedeno pomocí Fisherova-Freemanova-Haltonova testu, Pearsonova chí-kvadrát testu, případně Kruskalova-Wallisova testu. Pro korekci vícenásobného testování Bonferroniho metodou byly za relevantní považovány pouze hodnoty $p < 0,002$. K vizualizaci skupinových rozdílů byla použita explorativní post hoc analýza pomocí Fisherova exaktního testu a Mannova-Whitneyho U testu. Pacienti s epilepsií s pravděpodobnou nebo možnou asociací s autoimunitou nebyli do analýzy zahrnuti a byli popsáni pouze explorativně. Analýza byla opakována i s přiřazením těchto pacientů do skupiny bez protilátek. K identifikaci nezávislých rizikových faktorů poukazujících na asociaci s autoimunitou byl použit vícerozměrný logistický regresní model. Jako závislá proměnná byla použita přítomnost protilátek. Vyloučili jsme faktor "rodinná anamnéza autoimunitních onemocnění", protože jsme identifikovali informační (tzv. recall) bias (nedostatek spolehlivých informací u mnoha pacientů bez protilátek).

Na základě imputovaných dat byly sestaveny jednorozměrné a vícerozměrné regresní modely. Proměnné s hodnotou $p < 0,007$ v jednorozměrné analýze (korigované na vícenásobné testování) byly zahrnuty do vícerozměrného logistického regresního modelu. Každému rizikovému faktoru byl přiřazen 1 bod pro vytvoření skóre ACES (rozsah = 0 – 6 bodů).

Senzitivita, specificita, pozitivní prediktivní hodnota a negativní prediktivní hodnota byly vypočteny s použitím neimputovaného souboru dat. Procenta byla zobrazena s 95% konfidenčním intervalem (CI) za předpokladu Poissonova rozdělení. Skóre Antibody Prevalence in Epilepsy and Encephalopathy (APE), APE2 a ACES byly porovnány pomocí McNemarova párového testu. K odhadu míry optimismu skóre ACES byla použita interní validace s bootstrappingem. Dále byla použita Firthova logistická regrese.

Externí validace byla provedena na českém souboru 128 pacientů s epilepsií temporálního laloku.(Ances et al. 2005; Elisak et al. 2018b) V této validační kohortě byly vzorky testovány komerčními CBA (NMDAR, AMPAR, GABAB-R, CASPR2, LGI1 (Euroimmun) a line blotem (PNS 11 Line Assay, Ravo Diagnostika, Freiburg, Německo), RIA pro protilátky proti GAD65 (CentAK anti-GAD65 M, Medipan GMBH, Berlin, Německo). Všechny pozitivní a vzorky s nejasným nálezem byly testovány na tkáňových řezech (Kiel, Německo) a metodami CBA, ELISA na tkáňových řezech v Rotterdamu. Všech 6 rizikových faktorů použitých ve skóre ACES bylo v české kohortě získáno z patientských záznamů.

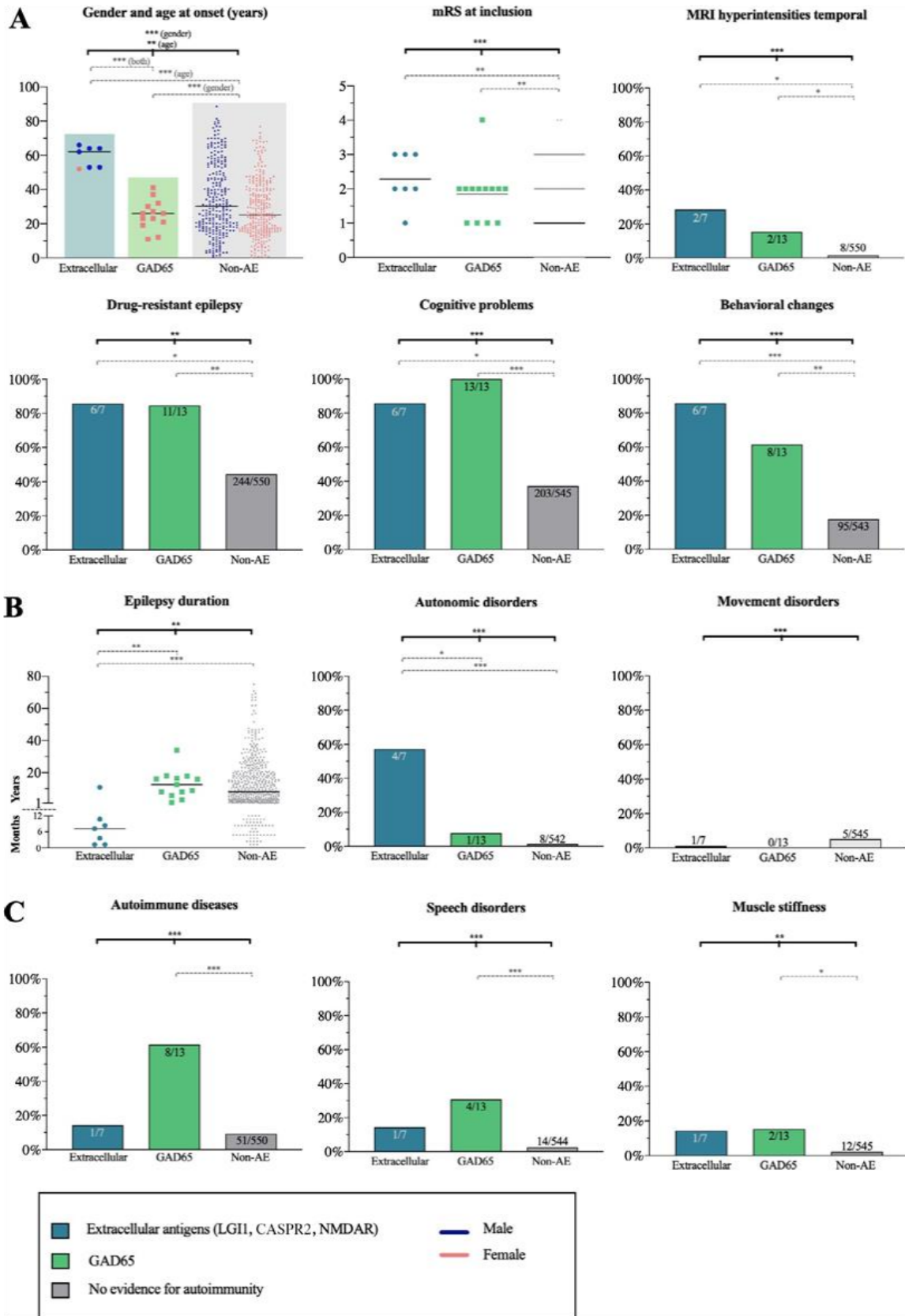
5.1.2. Výsledky

Do studie bylo zařazeno 582 pacientů s mediánem trvání epilepsie osm let (mezikvartilové rozpětí [IQR] 2 – 18), 48% bylo mužského pohlaví, medián věku při zařazení byl 44 let (IQR= 29 – 58). Dvacet pacientů (3,4 %) mělo protilátky, z nichž 13 mělo protilátky proti GAD65, tři proti LGI1, tři proti CASPR2, jeden proti NMDAR. Tři pacienti byli klasifikováni do skupiny pravděpodobné epilepsie sdružené s autoimunitou. Jeden pacient, u kterého byl na tkáňových řezech zjištěn specifický vzor barvení a pacient splňoval kritéria pravděpodobné AIE s negativitou NAbs (Graus et al. 2016), zatímco v séru dalších dvou pacientů byly pomocí CBA zjištěny protilátky proti GlyR. Devět pacientů mělo pozitivní tkáňové řezy, ale nebyla zjištěna žádná známá protilátka (včetně negativní imunocytochemie); tito pacienti byli zařazeni do skupiny pacientů s epilepsií s možnou asociací s autoimunitou. Část vzorků byla testována z důvodu vysokého skóre ACES (ACES \geq 2, n = 82; post hoc testování). U těchto vzorků nebyly nalezeny žádné protilátky.

Při velmi pečlivé analýze klinických dat byly u 19 z 20 pacientů s epilepsií sdruženou s autoimunitou při zařazení do studie přítomny další nenápadné příznaky nebo symptomy encefalitidy/encefalopatie.

Srovnání pacientů s protilátkami proti extracelulárním antigenům (LGI1, CASPR2, NMDAR; $n = 7$), pacientů proti GAD65 ($n = 13$) a pacientů bez protilátek ($n = 550$; Tab. 1) ukázalo, že pacienti s protilátkami (proti extracelulárním antigenům i GAD65) měli častěji farmakorezistentní epilepsii ($p = 0,002$) a uni- nebo bilaterální T2/FLAIR hyperintenzity v mezálímme temporálním laloku ($p < 0,0001$), vyšší mRS při zařazení ($p < 0,0001$) a častěji kognitivní dysfunkci ($p < 0,0001$) a poruchu chování ($p < 0,0001$; Obr. 1). Post hoc analýza ukázala, že pacienti s protilátkami proti extracelulárním antigenům byli při nástupu onemocnění starší, spíše muži, měli kratší dobu trvání epilepsie a častěji měli autonomní příznaky než pacienti s protilátkami proti GAD65 nebo pacienti bez asociace s autoimunitou. Pacienti s vysokou koncentrací protilátek proti GAD65 byly jen ženy, častěji měli další autoimunitní onemocnění, poruchy řeči a svalovou ztuhlost než pacienti s protilátkami proti extracelulárním antigenům nebo bez asociace s autoimunitou.

Osm proměnných vykázalo v jednorozměrné analýze statisticky významnou souvislost s nálezem protilátek: farmakorezistentní epilepsie, autoimunitní onemocnění v anamnéze, porucha chování, kognitivní dysfunkce, svalová ztuhlost, porucha řeči, autonomní symptomy a hyperintenzita v oblasti meziálního temporálního laloku na MRI (viz Tab. 2). Mnohorozměrný model zahrnoval následující faktory: autoimunitní onemocnění v anamnéze, poruchu chování, kognitivní dysfunkci, poruchy řeči, autonomní příznaky a hyperintenzity v oblasti mediální části temporálního laloku na MRI (viz Tab. 2).



Obr. 1: Přehled charakteristik, které se častěji vyskytovaly u pacientů s neurálními autoprotilátkami.

* p mezi 0,05 a 0,005, ** p mezi 0,005 a 0,0001, *** p <0,0001. Horní hodnoty p odpovídají porovnání mezi skupinami s protilátkami a bez asociace s autoimunitou. Dolní hodnoty p (přerušovaná čára) vizualizují post hoc analýzu. (A) Faktory, které se významně lišily mezi pacienty s epilepsií sdruženou s autoimunitou a bez. (B) Faktory, které se lišily mezi skupinou s protilátkami proti extracelulárním antigenům a skupinou bez. (C) Faktory, které se lišily mezi skupinou s protilátkami proti GAD65 a skupinou bez. V pořadí podle výskytu jsou na ose y uvedeny: (1) roky (věk začátku onemocnění), (2) kumulativní procenta (všechny sloupcové grafy), (3) měsíce a roky (0 – 12, resp. 1 – 80; délka trvání epilepsie).

V externí (české) validační kohortě (128 pacientů) s epilepsií temporálního laloku mělo 7 pacientů NAb (5,5 %, ve srovnání s 3,4 % v nizozemské kohortě, $p = 0,30$). Statistika C (konkordance) pro externí validační kohortu byla 0,92, což ukazuje, že (celková) diskriminační výkonnost je ve validační kohortě podobná.

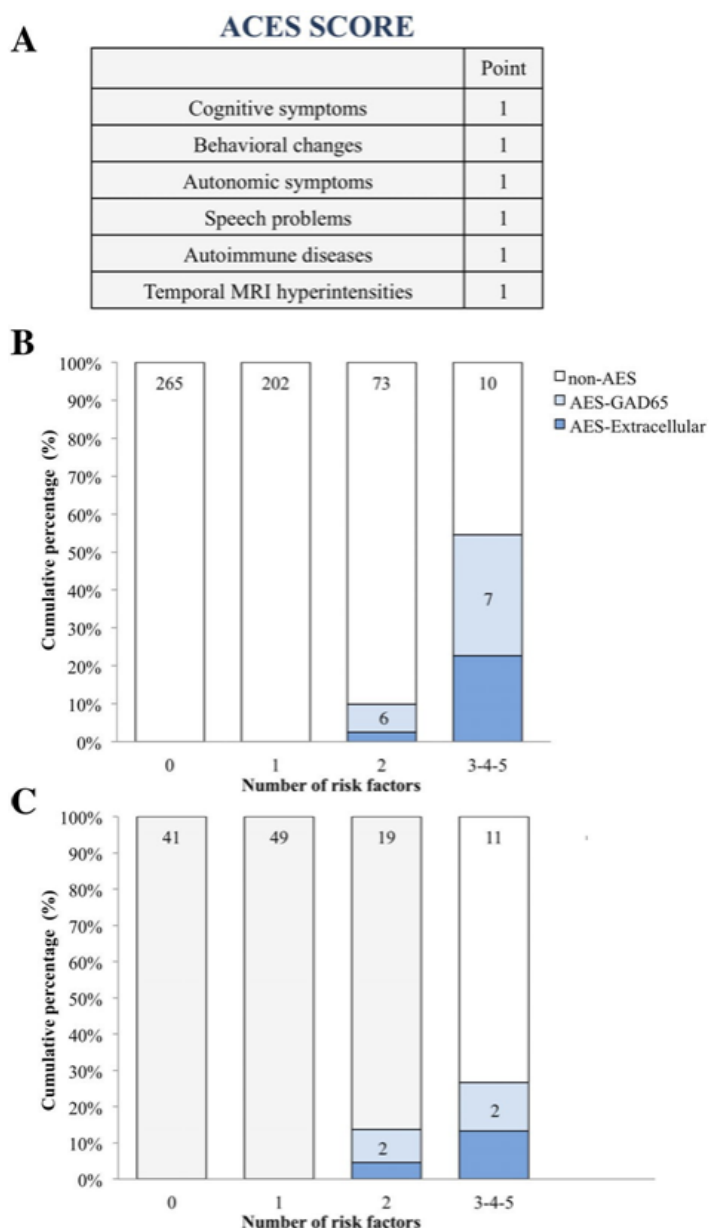
Rizikovými faktory pro imunitní etiologii byly hyperintenzity temporálně na MRI (poměr šancí [odds ratio, OR] = 255,3, 95% CI = 19,6 – 3332,2, $p < 0,0001$), autoimunitní onemocnění (OR = 13,31, 95% CI = 3,1 – 56,6, $p = 0,0005$), změny chování (OR 12,3, 95% CI = 3,2 – 49,9, $p = 0,0003$), autonomní příznaky (OR = 13,3, 95% CI = 3,1 – 56,6, $p = 0,0005$), kognitivní dysfunkce (OR = 30,6, 95% CI = 2,4 – 382,7, $p = 0,009$) a porucha řeči (OR = 9,6, 95% CI = 2,0 – 46,7, $p = 0,005$). Každý z faktorů měl hodnotu 1 bodu a ACES skóre ≥ 2 mělo 100 % senzitivitu a 84,9 % specificitu pro detekci epilepsie sdružené s autoimunitou.

Tab. 2 Výsledky jednorozměrné a mnohorozměrné analýzy

V tabulce jsou uvedeny pouze údaje pacientů s autoimunitní etiologií záchvatů ($n = 20$) a bez průkazu autoimunity ($n = 550$). ^aUvedená čísla pocházejí z kohortních dat po imputaci.

	Jednorozměrná analýza		Mnohorozměrná analýza	
	OR (95% CI) ^a	p^a	Korigovaný OR (95% CI) ^a	p^a
Farmakorezistentní epilepsie	7,1 (2,1 – 24,5)	0,002	-	-
Autoimunitní onemocnění	8,2 (3,2 – 20,7)	<0,0001	13,3 (3,1 – 56,6)	0,0005
Porucha chování	11,0 (4,1 – 29,3)	<0,0001	12,6 (3,2 – 49,9)	0,0003
Kognitivní dysfunkce	31,8 (4,4 – 229,9)	0,001	30,6 (2,4 – 382,7)	0,009
Ztuhlost svalů	7,3 (1,9 – 28,7)	0,004	-	-
Porucha řeči	12,8 (4,1 – 40,0)	<0,0001	9,6 (2,0 – 46,7)	0,005
Autonomní příznaky	22,1 (6,4 – 75,5)	<0,0001	23,3 (3,8 – 143,3)	0,001
Temporální hyperintenzity MRI	16,9 (4,6 – 62,1)	<0,0001	255,3 (19,6 – 3332,2)	<0,0001

Srovnání skóre ACES (obou kohort) s dříve publikovaným skóre APE/APE2 ukázalo, že skóre APE/APE2 odhalilo 8 z 10 pacientů s autoprotilátkami proti extracelulárním proteinům a 7 ze 17 pacientů s protilátkami proti GAD65. Všechna skóre vykazovala dobré výsledky u pacientů s krátkou anamnézou epilepsie, ale skóre ACES mělo lepší výsledky u pacientů s chronickou epilepsií ($p = 0,0015$, Obr. 2).



Obr. 2: Pacienti s epilepsií sruženou s autoimunitou rozdělení podle skóre ACES. Počty pacientů podle skóre ACES (A) jsou uvedeny jak pro nizozemskou kohortu (B), tak pro českou validační kohortu (C). Jsou uvedeny pouze údaje pacientů s protilátkami zaměřenými proti extracelulárním antigenům, proti GAD65 a bez průkazu autoimunity. Čísla ve sloupcových diagramech odpovídají počtu pacientů každé specifické skupiny. Všichni pacienti s ACES skóre ≥ 2 bez asociace s autoimunitou byli testováni komerčními CBA a post hoc ELISA a všichni byli negativní.

5.1.3. Diskuze

V této prospektivní multicentrické kohortové studii jsme prokázali, že malá, ale významná část pacientů s fokální epilepsií neznámé etiologie má neurální autoprotilátky. Téměř všichni tito pacienti měli nerozpoznané příznaky encefalitidy. Identifikace těchto pacientů je zásadní, protože záchvaty lépe reagují na imunoterapii než na ASM – u všech pacientů s protilátkami proti extracelulárním proteinům došlo po imunoterapii k vymizení záchvatů. Pro rozpoznání pacientů s epilepsií sdruženou s autoimunitou jsme zavedli a na validační kohortě validovali jednoduché klinické skóre, které lékařům pomáhá při výběru pacientů, u nichž by měl být proveden screening na přítomnost NAbs.

V této studii byly neurální autoprotilátky nalezeny u 3,4 % pacientů, zatímco jiné studie popisují vyšší počet > 10 % (Brenner et al. 2013b, Dubey et al. 2017). Nejdůležitějším faktorem vysvětlujícím tento rozpor je rozdíl ve výběru pacientů. Pacienti zahrnutí do naší studie byli odesláni do center pro epilepsii neurology, kteří neměli podezření na AIE u těchto pacientů. Při zpětném pohledu měla většina pacientů nenápadné příznaky nebo symptomy AIE, ale tyto příznaky nebyly rozpoznány jako související s AIE. Například nespavost, svalová ztuhlost nebo mírné kognitivní problémy byly často považovány za vedlejší účinky ASM. Kromě toho byli pacienti zařazeni do skupiny epilepsie sdružené s autoimunitou pouze tehdy, pokud byly protilátky prokázány dvěma metodami. V menší prospektivní kohortě pacientů s epilepsií temporálního laloku byly zjištěny stejné protilátky jako v této studii (Elisak et al. 2018b), zatímco jiní detekovali větší variabilitu protilátek (Brenner et al. 2013b, Dubey et al. 2017). V některých studiích chyběla konfirmace nálezu pozitivivity protilátek druhou metodou, ačkoli při screeningu velkých kohort je konfirmace nezbytnou nutností, aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům. Předchozí studie popisují také protilátky s diskutabilní rolí, včetně nízké koncentrace protilátek proti GAD65 a dvojité negativní protilátky proti VGKC, které jsou dnes většinou považovány za klinicky irelevantní (Sonderen et al. 2016b, Lang et al. 2017).

U našich pacientů byly přítomny protilátky proti LGI1, CASPR2 a GAD65. Klinický průběh v těchto případech může být delší a méně progresivní a diagnóza je pravděpodobněji opožděna nebo přehlédnuta než u pacientů s jasnou encefalitidou (Irani et al. 2010, Sonderen et al. 2016d, Sonderen et al. 2016a). Přestože klinické fenotypy spojené s těmito protilátkami mohou být méně závažné, imunoterapie je lepší než ASM (Bruijn et al. 2019, Muñoz-Lopetegi et al. 2020), což činí stanovení správné diagnózy včasné fázi důležitým. Na rozdíl od pacientů s protilátkami

proti LGI1 nebo CASPR2 nebyl žádný z pacientů s protilátkami proti GAD65 po imunoterapii bez záchvatů. Nicméně u poloviny léčených pacientů bylo pozorováno dlouhodobé snížení frekvence záchvatů až o 95 %, doprovázeno snížením titru protilátek v séru.

Při použití cut-off hodnoty 2 pro skóre ACES byli identifikováni všichni pacienti s pozitivními protilátkami, ale u 14 % pacientů bylo vyšetření protilátek neprůkazné. Skóre by se proto nemělo používat k diagnostice epilepsie sdružené s autoimunitou, ale jako vodítko pro výběr pacientů pro screening protilátek.

Faktory zahrnuté do skóre ACES se částečně překrývají s faktory použitými ve skóre APE/APE2 (Dubey et al. 2017, Dubey et al. 2019). Nicméně téměř 70 % pacientů s epilepsií s absencí jasného akutního encefalitického stadia by nebylo pomocí APE/APE2 identifikováno. Právě ACES skóre je schopno identifikovat i tuto skupinu.

Limitace této studie je malý počet pacientů s pozitivními protilátkami. Proto byla provedena externí validace v druhé, nezávislé, zahraniční kohortě, která ukázala obdobný výkon ACES skóre. Dalším omezením bylo použití pouze séra u většiny pacientů. Ačkoli je sérum vysoce citlivé pro testování protilátek proti LGI1 (Sonderen et al. 2016d), CASPR2 (Sonderen et al. 2016a), GAD65 (Coevorden-Hameete et al. 2019) a GABAB-R (Coevorden-Hameete et al. 2019), je méně citlivé pro screening protilátek proti NMDAR (Gresa-Arribas et al. 2014) nebo AMPAR (McCracken et al. 2017).

5.2. Studie č. 2: Nízká prevalence neurálních autoprotilátek v perioperačních vzorcích mozkomíšního moku epileptochirurgických pacientů – multicentrická prospektivní studie

5.2.1. Metodika

5.2.1.1. Pacienti

Do studie byli zahrnuti všichni pacienti podstupující resekční operaci epilepsie, kteří souhlasili s účastí a jejichž epilepsie nebyla způsobena mozkovým nádorem. Žádný z pacientů neměl anamnézu limbické encefalidity. Do studie jsme zařadili dospělé pacienty ze tří epileptochirurgických center v České republice – z Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, z Nemocnice Na Homolce v Praze a z Fakultní nemocnice Motol v Praze. Analyzovali jsme anamnézu, EEG, video-EEG, neuropsychologické vyšetření, MR mozku a předem definovaný soubor položek: věk na počátku onemocnění, věk v době operace, rodinná anamnéza epilepsie, rizik pro rozvoj epilepsie v anamnéze (perinatální hypoxie, febrilní záchvaty, anamnéza úrazu hlavy nebo infekce CNS), typ(y) a frekvence všech záchvatů, anamnéza tonicko-klonických záchvatů (TCS) a status epilepticus (SE), výskyt a typ aury, výskyt multimodální aury, tj. alespoň dvou typů aury (v rámci jednoho záchvatu nebo jako různé typy záchvatů) (Steriade et al. 2018), podávaná léčba (ASM, imunoterapie). Resekovaná tkáň byla zpracována a posouzena zkušeným patologem podle současných doporučení pro komplexní neuropatologické vyšetření (Blümcke et al. 2016). Pacienti, u nichž byl v histopatologické vyšetření resekované tkáně detekován nádor, byli z finální kohorty vyloučeni.

Outcome byl hodnocen po dvou letech od operace dle ILAE klasifikace. U pacientů s kratší dobou sledování byly údaje o outcome zaznamenány také. Outcome dle ILAE 1 a 2 byly hodnoceny jako příznivý, 3 a více jako nepříznivý (Wieser et al. 2001).

5.2.1.2. Analýza protilátek

Během operace byl odebrán likvor a sérum. Vzorky likvoru byly odebrány před vlastní resekcí mozkové tkáně ze subdurálního prostoru. Odběr neměl žádný vliv na samotný zákrok. U pacientů byla provedena cytologická analýza (počet leukocytů a erytrocytů) a/nebo biochemické

vyšetření (albumin, imunoglobuliny, IgG index, oligoklonální pásy). Všechny vzorky byly poté uchovávány v alikvotech zmrazených při -80 °C až do další analýzy.

Protilátky byly testovány čtyřmi metodami dle doporučení (Bien et Holtkamp 2017a, Graus et al. 2016): 1) Line blot (PNS 11 Line assay, ravo diagnostika, Freiburg, Německo), který detekuje protilátky proti Hu, Yo, Ri, CV2/CRMP5, amphiphysin, Ma1, Ma2, SOX1, GAD65, Tr a Zic4. 2) CBA (Autoimmune Encephalitis Mosaic 1, EUROIMMUN, Lübeck, Německo), který detekuje protilátky proti NMDAR, CASPR2, AMPAR1/2, LGI1, GABAB-R. 3) tkáňové řezy pro detekci NAbS proti intracelulárním antigenům (Neurology Mosaic 8 IIFT, EUROIMMUN, Lübeck, Německo) – vzorky s pozitivními nebo hraničními výsledky byly zaslány do referenční laboratoře (Labor Stöcker, Lübeck, Německo) ke confirmaci. 4) V zahraniční laboratoři (Institut klinické chemie, Kiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Německo) bylo provedeno vyšetření na tkáňových řezech mozku potkanů pomocí nepřímé tkáňové imunohistochemie na řezech vhodných pro detekci protilátek proti povrchovým protilátkám (Lancaster et al. 2010). Všechny vzorky, které byly pozitivní na tomto vyšetření byly dále testovány pomocí 1) CBA z buněk buněčné linie HEK293T transfekovaných plazmidem kódujícím GABAA-R, GlyR, dopaminový receptor 2 (DR2), metabotropní glutamátový receptor 5 (mGluR5), neurexin3 α a IgLON5 na fixovaných CBA, a AMPAR na živých CBA k vyhledání těchto charakterizovaných autoprotilátek a 2) nepřímých imunofluorescenčních testů s použitím živých, nepermeabilizovaných neurálních kultur hipokampu potkana jak bylo popsáno dříve, k identifikaci předpokládaného barvení povrchu neuronálních buněk (Ances et al. 2005, Coevorden-Hameete et al. 2016). U vzorků pozitivních na protilátky proti GAD65 metodou line blot či na tkáňových řezech byly navíc stanoveny titry pomocí ELISA (Medizym antiGAD M, Medipan GmbH, Dahlewitz, Německo).

Případy s (1) nálezy na CBA vzorků séra bez potvrzení positivity v likvoru a/nebo na tkáňových řezech, (2) nález na tkáňových řezech v likvoru bez potvrzení na CBA nebo v testu nepřímé imunofluorescence na živých hipokampálních neuronech nebo (3) s hraniční nebo nízkou pozitivitou v line blotu v séru bez potvrzení na tkáňových řezech a považované za nesouvisející s klinickým obrazem (např. hraniční pozitivita protilátek proti Yo pouze na line blotu) byly označeny jako negativní (Déchelotte et al. 2020).

5.2.1.3. Statistická analýza

Deskriptivní statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Minitab (verze 21.2, 2022). Data byly pro spojité proměnné vyjádřeny jako průměr (směrodatná odchylka) pokud se jednalo o normální rozdělení, nebo jako medián (mezikvartilové rozpětí) pokud rozdělení nebylo normální, nebo jako procenta či rozpětí pro kategoriální proměnné. Porovnání dvou skupin pacientů s epilepsií bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu pro kategoriální proměnné a Mannova-Whitneyho testu pro spojité neparametrické proměnné. Hladina významnosti byla stanovena na $p = 0,05$ s Bonferroniho korekcí pro vícenásobné testování.

5.2.2. Výsledky

5.2.2.1. Demografie a klinické charakteristiky

Do studie jsme zařadili 86 pacientů. Deset pacientů bylo vyřazeno na základě 1) nedostatku vzorků mozkomíšního moku ($n=2$) nebo 2) histopatologické diagnózy nádoru ($n=8$). Do konečného souboru tak bylo zařazeno celkem 76 pacientů. Věk pacientů při vzniku záchvatů byl 14 ± 11 let a průměrná doba od stanovení diagnózy do epileptochirurgického výkonu byla 21 ± 13 let. 69 % pacientů mělo epilepsii temporálního laloku, 61 % mělo v anamnéze TCS a 11 % mělo v průběhu onemocnění SE. Téměř polovina pacientů měla před vlastní operací provedeny předchozí intrakraniální zákroky (intrakraniální EEG explorační, termokoagulace, předchozí resekční operace).

Demografické údaje, charakteristiky epilepsie a nálezy v mozkomíšním moku jsou uvedeny v Tabulkách 3 – 5. Sedmdesát čtyři procent pacientů mělo lezionální MR. Zánětlivé změny v likvoru (např. pleocytóza) bylo obtížné hodnotit kvůli kontaminaci krví, ale přítomnost oligoklonálních pásov izolovaně v likvoru byla zjištěna u 6,6 % pacientů.

Při histologickém vyšetření byla jednoznačná strukturální etiologie zjištěna v 90,8 % případech. Z nich 53 % mělo fokální kortikální dysplazii, 36 % hipokampální sklerózu. Glióza byla zjištěna u 10 % pacientů. Žádný z pacientů neměl výrazné leukocytární infiltráty v mozkovém parenchymu, perivaskulární kumulaci lymfocytů nebo granulomatózní či infiltruující destrukci cév. U 8 % pacientů se vyskytovalo komorbidní autoimunitní onemocnění a jeden pacient měl nádor mimo CNS.

Celkově byl outcome klasifikovaný podle ILAE po dvou letech od operace příznivý u 24/35 (69 %) pacientů u kterých byl dostupný.

Tab. 3: Klinické charakteristiky, MRI, EEG, histopatologie

‡jedna pacientka podstoupila změnu pohlaví z mužského na ženské. †1 pacient měl HS a fokální gliózu temporálního pólu, 1 pacient měl HS a malformaci korového vývoje s oligodendroglíální hyperplazií (MOGHE). *V temporálním laloku nebyla přítomnost hipokampální sklerózy a přidružené FCD I považována za duální patologii a byla hodnocena jako FCD IIIa (Blümcke et al. 2011). Zkratky: M - muži, Ž - ženy, CI - interval spolehlivosti

Proměnná	Počet pacientů (%)
Pohlaví (M:Ž)	34 : 42‡ (45 % žen)
Věk při stanovení diagnózy (průměr, 95 % CI)	14 ± 2
Věk při operaci (průměr, 95 % CI)	35 ± 2
MRI	
Nelezionální (%)	19/74 (26 %)
Lezionální (%)	55/74 (74 %)
Histopatologie	
Malformace korového vývoje (n, (%))	34 (45 %)
FCD	31/34 (91 %)
Typ I	13/31 (42 %)
Typ II	13/31 (42 %)
Typ III	5/31 (16 %)
Skleróza hipokampu (%)	25 (33 %)

Typ (Blümcke et al. 2013)	typ I 73 %, II 23 %, III 4 % (hodnoceno u 22)
Duální patologie (%)*†	2 (3 %)
Gliová jizva (%)	7 (9 %)
Negativní histologie (%)	7 (9 %)
Cévní malformace (%)	1 (1 %)
Současné autoimunitní onemocnění (%)	6 (8 %)
Imunoterapie (%)	2/75 (3 %)
Nádor mimo CNS (% , typ)	1/74 (1 %, karcinoid apendixu)
Jiné příznaky (změna chování; dysautonomie; porucha řeči; kognitivní deficit) (n, typ (%))	36 (47 %); 1/75 (1 %); 7/75 (9 %); 11/75 (15 %)

Tab. 4: Charakteristika epilepsie

†IPI z anglického initial precipitating injury (febrilní záchvaty, perinatální poranění, meningitida/encefalitida, traumatické poranění mozku). *Předchozí invazivní zákrok: intrakraniální EEG explorace, termokoagulace, předchozí resekční operace.

Proměnná	Počet pacientů (%)
Epilepsie spánkového laloku (%)	53/75 (67%)
Epilepsie frontálního laloku (%)	15/75 (20%)
Epilepsie zadní kůry (%)	8/75 (11%)
Předchozí intrakraniální zákrok* (%)	36 (47%)
ASM v době operace (medián; rozmezí; IQR) ASM celkem (medián; rozmezí; IQR)	2 (1 – 5; 1) (hodnoceno u 75) 5 (1 – 14; 5) (hodnoceno u 69)
Tonicko-klonické záchvaty v anamnéze (%)	46/75 (61%)
Status epilepticus v anamnéze (%)	8 (11%)

Záchvatové dny za měsíc (medián; rozmezí; IQR)	6 (1 – 30, 22) (hodnoceno u 74)
IPI† nebo pozitivní rodinná anamnéza (%)	38/75 (51%)

Tab. 5: Výsledky analýzy CSF

Vzor II: dva nebo více oligoklonálních páسů v likvoru, které nejsou přítomny v séru. Vzor IV: dva nebo více identických oligoklonálních páсů v likvoru a séru. *Výsledky cytologie a biochemie CSF byly často kontaminovány krví (odběr během operace) a znemožňovaly nám analyzovat přítomnost pleocytózy nebo zvýšené bílkoviny.

Proměnná*	Hodnota (počet vzorků s analýzou)
Počet leukocytů [na 3 mm ³] (medián (rozmezí; IQR))	14 (0 – 960; 52) (35)
Počet erytrocytů [na 3 mm ³] (medián (rozmezí; IQR))	8960 (2 – 124000; 19 840) (29)
Albumin [mg/l] (medián (rozmezí; IQR))	587 (83 – 4240; 682) (71)
Oligoklonální páсy (vzor II)	5/71 (7%)
Oligoklonální páсy (vzor IV)	3/71 (4%)

5.2.2.2. Skupina pacientů s protilátkami a oligoklonální páсy izolované v likvoru

Analyzovali jsme podskupinu pacientů, u nichž byly detekovatelné NAbS nebo byl zjištěn zánětlivý nález v mozkomíšním moku. Za ukazatel zánětu jsme považovali pouze přítomnost oligoklonálních páсů izolované v likvoru, nikoli pleocytózu, protože ve většině vzorků byl v důsledku kontaminace krví pozorován perioperačně zvýšený počet leukocytů. Výsledky testování autoprotilátek jsme považovali za specifické pouze tehdy, pokud byly potvrzeny konfirmačním testováním (tkáňové řezy při pozitivitě CBA a naopak), např. nález CASPR2 na CBA by byl považován za specifický pouze tehdy, pokud by byl potvrzen na tkáňových řezech. Ze všech vyšetřovaných pacientů měl jeden (1,3 %) protilátky proti GAD65 v mozkomíšním moku a séru zjištěné jak line blotem, tak na tkáňových řezech; titr byl stanoven metodou ELISA – 7166 IU/ml v likvoru a 439 140 IU/ml v séru. Tyto dva vzorky byly z technických důvodů odebrány s odstupem několika měsíců, takže protilátkový index (AI) nebylo možné spočítat (viz

Tab. 6). Tomuto pacientovi bylo v době vzniku záchvatů 26 let a měl 13 letou anamnézu onemocnění. Na MR byl nález popsán jako nelezionální, ale při histopatologickém vyšetření byla zjištěna FCD IIIa (FCD I s hipokampální sklerózou). Outcome byl u tohoto pacienta příznivý (výsledné skóre na stupnici ILAE 1).

Za zmínku stojí, že osm pacientů mělo pozitivní CBA nebo vyšetření na tkáňových řezech nepotvrzené jinou technikou (3 CASPR2, 1 NMDAR, 4 neznámý vzor barvení bez positivity primárních neurálních kultur). Jak již bylo zmíněno, tito byli hodnoceni jako bez asociace s autoimunitou, kromě jednoho, který byl také součástí skupiny s pozitivitou OCB izolovaně v likvoru.

U pěti pacientů byly v testovaných vzorcích přítomny OCB izolovaně v likvoru. Pacienti byli v době diagnózy ve věku 2, 12, 15, 15 a 25 let a mezi diagnózou a epileptochirurgickým výkonem byl interval 27, 7, 19, 19 a 9 let. Tři z nich měli v histopatologickém vyšetření nález FCD a všichni měli nepříznivý pooperační outcome. Jeden pacient měl hipokampální sklerózu a jeden pacient měl negativní histopatologický nález, u obou byl outcome příznivý.

Tab. 6: Pacienti s neurálními autoprotilátkami nebo oligoklonálními pásy izolované v likvoru

^a Předchozí invazivní zákrok: resekce, invazivní stereotaktické EEG monitorování, termolese. ^b Příznivý výsledek byl definován jako výsledek na ILAE Outcome Scale 1-2 body, nepříznivý při skóre 3-6 bodů. ^c skóre po méně než dvou letech. ^d měřeno metodou ELISA. ^e rovněž protilátky proti CASPR2 v titru 1:10 v séru. Zkratky: pt - pacient; dg – diagnóza, surg – operace, F – frontální, T – temporální, FAS – fokální záchvaty bez poruchy vědomí, FIAS – fokální záchvaty s poruchou vědomí, FBTCs – fokální až bilaterální tonicko-klonické záchvaty, FS – febrilní záchvaty

Pacient/ pohlaví	Věk (dg; operace)	Nález (likvor/ sérum)	Nález na MRI	Lokalizace operace	PIP ^a	Histologie	AI (IT); nádor	Typ záchvatu	Rizikové faktory	ASM v době operace [celkem]	Outcome ^b (ILAE)
1/M	26; 39	GAD65 ^d (CSF 7166 IU/ml sérum 439 140 IU/ml)	ne- lezionální	T vlevo	ano	FCD IIIa	0 (0) ; 0	FIAS, FAS	0	2 [4]	příznivý (1) ^c
2/M	15; 34	OCB (2,0)	FCD	T vlevo	ano	negativní; předchozí operace: FCD Ib	0 (0) ; 0	FIAS	0	4 [8]	nepříznivý (4)
3/Ž	2; 29	OCB (4,1)	FCD	F right	ne	FCD IIb	0 (0) ; 0	FAS, FIAS	FS	3 [10]	nepříznivý (5)
4/M	25; 34	OCB (3,0)	FCD	T vlevo	ne	FCD Ia	kožní masto- cytoza (0) ; 0	FAS, FIAS	0	2 [6]	nepříznivý (4)
5/Ž	15; 34	OCB (2,0)	ne-lesioná lní	T right	ano	negativní	0 (0) ; 0	FAS, FBTCs	0	3 [7]	příznivý (1)
6 ^e /Ž	12; 19	OCB (6,0)	zvětšená amygdala	T right	ano	HS	0 (0) ; 0	FIAS, FBTCs (12)	0	2 [2]	příznivý (1)

5.2.3. Diskuze

Mezi naše hlavní zjištění patří, že (1) u pacientů s farmakorezistentní fokální epilepsií byly u 90,8 % z nich histopatologicky zjištěny strukturální změny. Více než 50 % z nich mělo fokální kortikální dysplazii a kolem $\frac{1}{3}$ hipokampální sklerózu. U žádného z těchto pacientů nebyli histopatologicky nalezeny zánětlivé změny svědčící o aktivním zánětu. (2) Celkový výskyt neurálních autoprotilátek svědčících pro epilepsii sdruženou s autoimunitou byl nízký (jeden pacient, 1,3 %). Tento pacient měl v likvoru a séru protilátky proti GAD65 s titry specifickými pro GAD65 sdružená onemocnění, přičemž epilepsie temporálního laloku spojená s GAD65 je dobře literárně definovaná (Muñoz-Lopetegi et al. 2020). Nemůžeme však vyloučit kontaminaci likvoru protilátkami ze séra v důsledku kontaminace likvoru krví, protože AI index nebyl k dispozici (sérum a likvor byly kvůli technickým problémům odebrány s odstupem několika měsíců). Zajímavé je, že tento pacient měl v histopatologickém vyšetření fokální kortikální dysplazii a hipokampální sklerózu (tedy se jednalo FCD IIIa), která nebyla identifikována na MRI. Jeho outcome byl příznivý, což by spíše odpovídalo tomu, že FCD je "pravou" etiologií epilepsie a GAD65 protilátky jsou pouhým "epifenomémem". (3) Dalších pět pacientů (6,6 %) mělo oligoklonální pásy izolovaně v likvoru, což je nález, který by mohl ukazovat na přítomnost chronického zánětu v likvoru. Za zmínku stojí, že tři z nich měli FCD a všichni měli nepříznivý outcome operace. Jedna z možných interpretací je, že přetrvávající chronický zánět v likvoru by mohl být negativním prediktorem výsledku po operaci epilepsie, nicméně k potvrzení tohoto pozorování je zapotřebí dalšího výzkumu na větším souboru pacientů. (4) U osmi pacientů (10,5 %) jsme zjistili pozitivní nálezy v některých testech na protilátky, které se ale nepodařilo jednoznačně reprodukovat v konfirmačních testech. I když je možné, že naše přísná kritéria vedla k nesprávnému zařazení některých nálezů mezi falešně negativní, rozhodli jsme se chybovat na straně senzitivity, abychom získali konzervativní odhad prevalence. Bez konfirmačního testování protilátek a histologie by náš odhad činil u 17,1 % epilepsii sdruženou s autoimunitou, což je údaj připomínající předchozí pozorování v jiných kohortách pacientů s epilepsií používajících méně přísná kritéria.

Obecně lze říci, že roli zánětu u epilepsie a konkrétně u FRE mohou vysvětlit dvě alternativní (nikoli však vzájemně se vylučující) hypotézy. Za prvé, AIE mohla vést k sekundárním změnám v různých mozkových strukturách, které jsou základem zvýšené excitability a epileptogeneze.

Zadruhé, opakovaná záchvatová aktivita by mohla sama o sobě vyvolat – primárně vrozený a případně sekundárně adaptivní – zánět/imunitní reakci v CNS, což mohlo následně urychlit mechanismy epileptogeneze. Naše pozorování pacienta s protilátkami proti GAD65 v likvoru a séru a FCD IIIa na histopatologii by podporovalo spíše druhou hypotézu. Mohli bychom spekulovat, že vrozená kortikální malformace byla příčinou dlouhotrvající FRE a spustila sekundární rozvoj autoimunity zaměřené proti GAD65 což by mohlo opět ovlivnit průběh onemocnění u tohoto pacienta.

Naše studie má několik limitací. Jednou z nich je velikost našeho souboru. Při interpretaci výsledků je také třeba vzít v úvahu způsob odběru vzorků mozkomíšního moku a séra. Domníváme se však, že metoda použitá pro odběr vzorků likvoru neovlivnila testování protilátek, stejně jako přítomnost OCB izolovaně v likvoru. Speciální histopatologické metody (specifické imunobarvení) mimo standardní protokol nebyly použity. Při koncipování studie jsme však na základě dostupných údajů o epileptochirurgii v České republice předpokládali, že náš soubor bude příliš heterogenní, a tedy příliš malý na to, abychom se mohli zabývat rozdíly ve složkách vrozené nebo adaptivní imunity u různých typů lézí.

Souhrnně lze říci, že v této prospektivní kohortě chirurgicky léčených pacientů s FRE nebyla pozorována žádná relevantní pozitivita protilátek, kromě jednoho pacienta s pozitivitou protilátek proti GAD65 v séru i mozkomíšním moku s přítomností FCD v histopatologii. U tohoto pacienta považujeme tento nález za nález s nejasným vztahem k FRE. Na rozdíl od mnoha jiných studií jsme nezařadili nespecifické protilátky, jako jsou protilátky proti TPO, ani ty, které nebyly potvrzeny dvěma metodami. Nízká prevalence positivity protilátek v této vysoce selektované skupině chirurgických pacientů s fokální epilepsií by však neměla být interpretována jako důkaz proti provádění testování NAbs u pacientů s FRE obecně.

5.3. Studie č. 3: Autoimunitní encefalitida s negativitou neurálních autoprotilátek – retrospektivní monocentrická analýza

5.3.1. Metodika

5.3.1.1. Selekce pacientů

Do studie byli zahrnuti všichni pacienti, jejichž vzorky séra a/nebo mozkomíšního moku byly na našem pracovišti testovány na přítomnost neurálních autoprotilátek v období od října 2011 do prosince 2020 (N = 2612). Po vyloučení pacientů z externích pracovišť a dětských (mladších 18 let) pacientů (Cellucci et al. 2020) byla k dispozici dokumentace 2250 pacientů. Data pacientů byly podrobeny analýze s aplikací dříve publikovaných diagnostických kritérií (Graus et al. 2016). Pacienti splňující kritéria možné AIE s negativitou NAbs byli analyzováni dále.

Kritéria pro *možnou* AIE s negativitou neurálních autoprotilátek zahrnovala (1) subakutní vznik poruchy pracovní paměti, poruchy vědomí nebo psychiatrických příznaků a (2) alespoň jeden z: nový fokální deficit, záchvaty nevysvětlitelné dříve známou epilepsií, pleocytózu v likvoru nebo známky na MRI svědčící pro encefalitidu. Kritéria pro *pravděpodobnou* AIE s negativitou NAbs zahrnovala (1) subakutní vznik poruchy pracovní paměti, poruchy vědomí nebo psychiatrických příznaků a (2) alespoň dvě z: a) MRI abnormality podporující diagnózu autoimunitní encefalitidy, b) pleocytóza v likvoru, OCB izolovaně v likvoru nebo zvýšený IgG index nebo c) mozková biopsie se zánětlivými změnami. Kritéria pro *definitivní* ADEM zahrnovala (1) první multifokální klinickou příhodu z CNS s předpokládanou zánětlivou demyelinizační příčinou s encefalopatií, kterou nelze vysvětlit horečkou; (2) difuzní, špatně ohraničené, velké (>1 – 2 cm) léze převážně v bílé hmotě na MRI; a (3) žádné nové klinické nebo MRI nálezy po 3 měsících od začátku příznaků. Diagnostická kritéria pro *definitivní* autoimunitní limbickou encefalitidu (LE) (s negativními NAbs) zahrnovala: (1) subakutní vznik poruchy pracovní paměti, epileptických záchvatů nebo psychiatrických příznaků; (2) bilaterální abnormality na MRI mozku (zvýšení intenzity signálu v T2 vážených sekvencích) v oblasti mediálních temporálních laloků; a (3) alespoň jedno z: pleocytóza v likvoru nebo EEG s abnormální aktivitou zahrnující temporální lalok(y).

5.3.1.2. Sběr dat

Předdefinovaný soubor sbíraných dat zahrnoval demografické údaje (věk, pohlaví), příznaky poruchy pracovní paměti, poruchy vědomí, psychiatrické příznaky, epileptické záchvaty, kognitivní deficit (v jiných oblastech než pracovní paměť) a fokální zánikové CNS příznaky (např. extrapyramidové, cerebelární, paréza končetin) (Balu et al. 2019). Modified Rankin Scale a Clinical Assessment Scale in Autoimmune Encephalitis (CASE) skóre (Lim et al. 2019) v různých časových bodech byly retrospektivně hodnoceny z dostupné zdravotní dokumentace (během hospitalizace, při propuštění, v prvních 9 měsících po vzniku příznaků, při poslední kontrole lékařem nebo telefonicky pro mRS, na kontrole lékařem pro CASE). Zlepšení nebo zhoršení skóre mRS a CASE bylo definováno změnou o 1 nebo více bodů jak při propuštění (počáteční zlepšení/zhoršení), tak při poslední kontrole (trvalé zlepšení/zhoršení), stabilizace pokud nedošlo ke změně skóre. Zlepšení nezávislé na imunoterapii, bylo definováno jako minus 1 nebo více bodů v mRS a CASE u pacienta, který nedostával imunomodulační léčbu. Skóre RAPID (akronym z pěti skórovaných proměnných) bylo rovněž retrospektivně zaznamenáno u každého pacienta s dostupnými údaji, přičemž hodnoty 0 – 1 byly uvedeny jako prediktivní pro dobrý outcome (mRS 0 – 2) a 2 – 5 jako prediktivní pro špatný outcome (mRS 3 – 6) (Lee et al. 2022). U všech pacientů byly zaznamenány případné autoimunitní komorbidní onemocnění.

U všech pacientů byla provedena MRI mozku, EEG a vyšetření mozkomíšního moku. Elektroencefalografické nálezy byly klasifikovány podle přítomnosti fokálního (uni- nebo bilaterálního) nebo difuzního zpomalení, epileptiformní aktivity a elektrografických záchvatů včetně nekonvulzivního status epilepticus (NCSE). Hodnotilo se první EEG zaznamenané na našem pracovišti a předchozí EEG na externím pracovišti, pokud bylo k dispozici. Nálezy na MRI byly rozděleny na LE (T2/FLAIR zvýšení intenzity signálu omezeno na jeden nebo oba mediální temporální laloky) nebo multifokální (mnohočetné léze v bílé a/nebo šedé hmotě kompatibilní s demyelinizací nebo zánětem). Analýza mozkomíšního moku zahrnovala všechna standardní likvorologická vyšetření. Nález v likvoru byl klasifikován jako abnormální v přítomnosti některého z následujících znaků: pleocytóza (>4 buňky/ μl), zvýšená bílkovina (rozmezí podle věku), albumin (rozmezí podle věku), imunoglobuliny G (IgG) (> 40 mg/l), imunoglobuliny M (IgM) ($> 1,3$ mg/l), zvýšený albuminový index (QAIB $> 9,9$), intratekální syntéza IgG na základě IgG indexu a/nebo

přítomnost oligoklonálních pásů při izoelektrické fokusaci izolovaně v likvoru. Pokud bylo provedeno více lumbálních punkcí, byly počet leukocytů v mozkomíšním moku a oligoklonální pásy vybrány ze vzorku s jejich nejvyšším počtem.

AIE byla považována za paraneoplastickou, pokud byl ± 5 let od stanovení diagnózy AIE diagnostikován maligní nádor (Graus et al. 2004), nebo došlo k nedávné progresi dříve dobře kontrolované malignity. Hranice pro časně a pozdní podání IT byla stanovena na 28 dní od začátku příznaků (Titulaer et al. 2013, Ances et al. 2005).

5.3.1.3. Strategie testování protilátek

Vzorky pacientů (sérum a mozkomíšní mok) byly rutinně testovány pomocí komerčně dostupných testových souprav: CBA (Autoimmune Neurology Mosaic 1, EUROIMMUN, Lubeck, Německo, testující NMDAR, AMPAR1 a 2, CASPR2, LGI1, GABAB-R) a line blotem (PNS11 Line assay, ravo Diagnostika, Freiburg, Německo, protilátky proti Hu, Yo, Ri, CV2/CRMP5, amphiphysin, Ma1 a 2, SOX1, GAD65, Tr/DNER a Zic4 nebo EUROLINE PNS 12 Ag, EUROIMMUN, Lubeck, Německo, uvedené antigeny a navíc recoverin, *PKC γ* a titin).

Případy s hraničním nebo nízkým stupněm pozitivitu na line blotu ve vzorku séra považované za nesouvisející s klinickým obrazem (např. protilátky proti Yo u muže s LE) byly považovány za protilátkově negativní. (Déchelotte et al. 2020) Všechny vzorky byly uchovávány v alikvotech v -80 °C až do další analýzy. Pacienti, kteří neměli k dispozici vzorky séra a/nebo likvoru (získané během aktivní fáze onemocnění) pro další testování, byli ze studie vyloučeni. Vzorky od všech pacientů, kteří splnili kritéria alespoň možné AIE s negativitou NAbs, byly během studie dále testovány pomocí (1) CBA na nepermeabilizovaných živých buňkách HEK293T transfekovaných myelin oligodendrocytárním proteinem (MOG) (Alexa 564 konjugovaný anti-human IgG H + L) pro detekci protilátek proti MOG v séru (Höftberger et al. 2014) a (2) tkáňových řezů metodou nepřímé tkáňové imunohistochemie na řezech mozku potkanů jako screeningové testy na vzácné autoprottilátky, jak bylo popsáno dříve (Lancaster et al. 2010). Tyto testy (a testy uvedené níže) byly provedeny v Neuroimunologické laboratoři Institutu klinické chemie v Kielu, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Německo. Všechny vzorky s pozitivním výsledkem na tkáňových řezech byly dále testovány pomocí (1) CBA na buňkách HEK293T transfekovaných plazmidem kódujícím GABAAR, GlyR, DR2, mGluR5, neurexin3 α a IgLON5 na fixovaných buňkách, a AMPAR na živých buňkách

k detekci charakterizovaných vzácných autoprotilátek a (2) přímých imunofluorescenčních testů s použitím živých nepermeabilizovaných neurálních kultur hipokampu potkana (jak bylo popsáno dříve) k identifikaci předpokládaného barvení povrchu neurálních buněk (Ances et al. 2005, Coevorden-Hameete et al. 2016).

Pro tuto studii jsme vzorky klasifikovali jako pozitivní na neznámou neurální autoprotilátku pouze tehdy, pokud bylo přítomno (1) barvení hippocampu na tkáňových řezech (v séru a/nebo likvoru) a zároveň (2) pozitivita vzorku při vyšetření na živých embryonálních neurálních kulturách.

5.3.1.4. Statistická analýza

Deskriptivní statistická analýza byla provedena pomocí softwaru Minitab (verze 21.2, 2022). Spojité proměnné byly vyjádřeny jako průměr (směrodatná odchylka, SD) v případě normálního rozdělení nebo jako medián (rozmezí) pokud se testováním normality prokázalo, že rozdělení není normální, a kategorické proměnné jako procenta nebo rozmezí. Porovnání dvou skupin bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu pro kategoriální proměnné. Hladina významnosti byla stanovena na $p = 0,05$.

5.3.2. Výsledky

5.3.2.1. Selekcce pacientů

Z 2 250 pacientů bylo 62 (2,8 %) klasifikováno jako AIE s pozitivitou protilátek. U 57 z nich (92 %) byly protilátky detekovány pomocí komerčně dostupných testů (NMDAR encefalitida $n = 19$, LGI1 encefalitida $n = 18$, CASPR2 encefalitida $n = 5$, GAD65 encefalitida $n = 3$, Ma2 encefalitida $n = 3$, Hu encefalitida $n = 2$, AMPAR encefalitida $n = 1$, GABAB-R encefalitida $n = 1$ a encefalitida s více autoprotilátkami $n = 5$). Dvacet pět z nich (40 %) mělo fenotyp LE s podporujícím nálezem na MRI mozku. Zbývajících 5 pacientů s pozitivitou protilátek (8 %) mělo NAbs detekovány v likvoru a/nebo séru pouze při komplexním testování během této studie, což vedlo k překlasifikování na AIE s pozitivitou protilátek. Dva z těchto pěti vstoupili do diagnostického algoritmu jen jako možná AIE s negativitou NAbs bez další subkategorizace pomocí diagnostického algoritmu. Z těchto 5 pacientů měl jeden protilátky proti GlyR v séru a 4 měli necharakterizované neurální protilátky proti povrchovým antigenům na tkáňových řezech potvrzené na nepermeabilizovaných, živých primárních embryonálních neurálních kulturách ($n = 1$ likvor, $n = 1$ likvor a sérum, $n = 2$ pouze v séru). U dalších dvou pacientů byly

hraniční pozitivní nálezy při vyšetření protilátek proti MOG pomocí CBA (titr 1:40 a 1:80, mezní hodnota 1:160) považovány za nespecifické. Žádný pacient neměl v séru protilátky MOG ve vysokém titru. (Reindl et al. 2020) Další 2 (0,1 %) pacienti byli klasifikováni jako Hashimotova encefalopatie a jeden pacient byl vyloučen z důvodu nedostupnosti vzorků k další analýze.

5.3.2.2. AIE s negativitou neurálních autoprotílátek

Pokud se zaměříme na AIE s negativitou NAbs, 25 (1,1 %) pacientů splnilo kritéria možné AIE (35 % ze 72 pacientů v kombinované kohortě pacientů s pozitivními a negativními protilátkami). Z nich 10 (0,4 % z hodnocených pacientů) bylo dále klasifikováno jako pravděpodobná AIE s negativitou NAbs (n = 5, 50 %), definitivní akutní diseminovaná encefalomyelitida (ADEM) (n = 1, 10 %) nebo definitivní autoimunitní LE (n = 4, 40 %) (Graus et al. 2016).

5.3.2.1.1. Pravděpodobná AIE a definitivní ADEM s negativitou neurálních autoprotílátek

Pět pacientů (tři ženy) s mediánem věku 67 let (42 – 67) splňovalo kritéria pravděpodobné AIE a jeden pacient byl klasifikován jako definitivní ADEM. Všichni pacienti měli polysymptomatický průběh. Porucha vědomí byla přítomna u 6, psychiatrické příznaky u 4, ztráta paměti u 4 a epileptické záchvaty u 3 pacientů. Jeden pacient měl anamnézu status epilepticus. Kognitivní deficit (jiné domény než postižení paměti) byl u 5 pacientů a 4 měli jiné příznaky. Časový interval mezi prvním projevem a stanovením diagnózy byl v mediánu 14 dní (rozmezí 2 – 100).

Všichni pacienti měli abnormální MRI mozku. Čtyři pacienti měli multifokální asymetrické subkortikální demyelinizační léze, jeden z nich (pacient č. 5) měl kortikální sycení gadolнием. Protilátky proti MOG nebyly detekovány v žádném z jejich sér. Pouze jeden z těchto pacientů měl při kontrole stabilní klinický a MRI nález, splňující kritéria pro definitivní ADEM. Všichni čtyři pacienti měli pozdní věk nástupu onemocnění (> 60 let), který je považován za atypický pro ADEM.

Likvor byl ve všech případech abnormální. Všichni pacienti měli zvýšený počet leukocytů v mozkomíšním moku, medián 29 buněk na mm³ (rozmezí 7 – 1280). Pozitivní IgG index byl v likvoru byl u 4/6 a dva nebo více oligoklonálních páسů izolovaně v likvoru u 5/6 pacientů. U pěti pacientů byl proveden onkoscreening; u všech byl negativní.

Všichni pacienti byli léčeni imunoterapií. Dva z nich dostali IT do 4 týdnů od vzniku příznaků. Všichni byli léčeni intravenózními kortikosteroidy a čtyři (67 %) z nich dostali další léčbu (n = 1 plazmaferéza, n = 1 rituximab, n = 3 cyklofosfamid a n = 1 azathioprin).

Při poslední kontrole se stav tří pacientů zlepšil a tři pacienti (3/5 s pravděpodobnou AIE) zemřeli. Při posuzování závažnosti AIE dle skóre CASE se u všech tří pacientů, u kterých došlo ke zlepšení podle mRS, zlepšil i CASE. Pouze jeden pacient byl sledován po dobu nejméně 2 let; jeho skóre RAPID bylo diskordantní s mRS (nízké skóre RAPID odpovídalo nízkému skóre mRS (Lee et al. 2022) a naopak).

5.3.2.1.2. Definitivní autoimunitní limbická encefalitida s negativitou neurálních autoprotilátek

Čtyři pacienti (dvě ženy) s mediánem věku 45,5 roku (rozmezí 27 – 60) splnili kritéria pro definitivní autoimunitní LE. Všichni pacienti měli polysymptomatický průběh. Psychiatrické příznaky se vyskytly u čtyř pacientů, porucha paměti u tří pacientů, záchvaty u tří pacientů a porucha vědomí u jednoho pacienta. Žádný z pacientů neměl v anamnéze status epilepticus. Kognitivní deficit (jiné domény než postižení paměti) byl zjištěn u jednoho pacienta a dva pacienti měli jiné příznaky. Časový interval mezi prvním projevem a stanovením diagnózy dosáhl mediánu 59 dní (rozmezí 20 – 254).

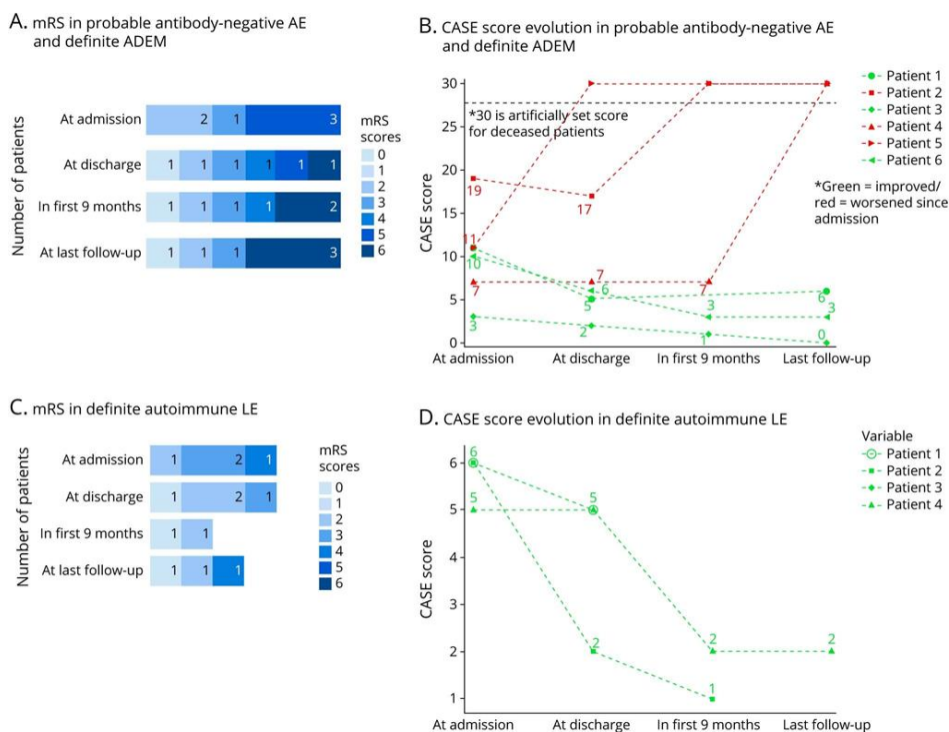
MRI byla u všech čtyř pacientů dle definice abnormální (s bilaterálními lézemi omezenými na mediální temporální laloky).

Likvor byl ve všech případech abnormální. Všichni pacienti měli zvýšený počet leukocytů v mozkomíšním moku; v jednom případě však nebyl přesný počet buněk k dispozici. Zbývající tři pacienti měli 23, 40 a 80 buněk na mm³. Index IgG byl ve všech případech negativní a v jednom případě byly přítomny dva nebo více oligoklonálních pásů izolovaně v likvoru.

Jedna pacientka měla již známý nádor (karcinom prsu bez generalizace), další dva pacienti měli negativní onkoscreening a u jednoho nebyl screening proveden.

Dva pacienti dostávali IT – oba jak intravenózní kortikosteroidy tak další léčbu (n = 1 intravenózní imunoglobuliny, n = 1 azathioprin). Dva pacienti IT nedostali; oba se zlepšili, i když dostatečná doba sledování (68 měsíců) byla jen u jednoho z nich.

Medián doby sledování u pěti pacientů (kteří byli dimitováni z nemocnice) byl 15 měsíců (rozmezí 5 – 70). Medián mRS pacientů byl 4,5 při dimisi (rozmezí 2 – 5), 3,5 při propuštění (rozmezí 1 – 6), 3,5 po 9 měsících (rozmezí 0 – 6) a 4,5 při poslední kontrole (rozmezí 0 – 6). Medián doby sledování těchto pacientů byl 39,5 měsíce (rozmezí 0 – 68). Medián mRS pacientů byl při přijetí 3 (rozmezí 2 – 4), při propuštění 2 (rozmezí 1 – 4), po 9 měsících 1,5 (n = 2, rozmezí 1 – 2) a při poslední kontrole 2 (n = 3, rozmezí 1 – 4). Při poslední kontrole (n = 3) došlo v porovnání s přijetím ke zlepšení u jednoho pacienta, u jednoho zůstal nálezn stabilní a u jednoho došlo ke zhoršení. Při posuzování závažnosti AIE podle snížení skóre CASE došlo u všech čtyř pacientů ke zlepšení (viz Obr. 3). Tři pacienti byli sledováni po dobu nejméně 2 let; skóre RAPID bylo ve dvou případech konkordantní s mRS a v jednom případě diskordantní.



Obr. 3: mRS a CASE skóre u pravděpodobné AIE nebo ADEM s negativními protilátkami (A-B) a definitivní autoimunitní LE (C-D)

5.3.2.1.3. Možná AIE s negativitou neurálních autoprotilátek bez další kategorizace

Analyzovali jsme také pacienty, kteří měli možnou AIE, ale nespĺňovali žádné z dalších diagnostických kritérií. Jednalo se o 17 pacientů, ale u dvou z nich byla po komplexním

vyšetřením zjištěna pozitivita protilátek. Tuto skupinu tedy tvořilo 15 pacientů, medián věku byl 62 let (24 – 82) a 53 % tvořily ženy. MRI mozku byla abnormální u sedmi (47 %) pacientů. Zánětlivý likvor byl u celkem pěti (33 %) pacientů. Pleocytóza byla přítomna u čtyř pacientů. IgG index a oligoklonální pásy byly měřeny u 14 pacientů – IgG index byl pozitivní u jednoho a oligoklonální pásy izolovaně v likvoru u dvou pacientů. U žádného z pacientů nebyla provedena biopsie mozku. U sedmi ze 13 pacientů s provedeným onkoscreeningem byla zjištěna malignita. Devět (60 %) pacientů bylo léčeno IT – všichni intravenózními kortikosteroidy. U 3 (33 %) pacientů byla použita další imunoterapie (intravenózní imunoglobuliny n=1, cyklofosfamid n = 1 a azathioprin n = 1). U sedmi z léčených pacientů (78 %) došlo k počátečnímu zlepšení a u tří ze 6 pacientů s dalším sledováním k trvalému zlepšení. Deset pacientů (67 %) zemřelo.

5.3.2.1.4. Příčina úmrtí a souvislost imunoterapie s výsledkem u AIE s negativními protilátkami

Dále jsme analyzovali kombinovanou kohortu pravděpodobné AIE, definitivní ADEM a definitivní autoimunitní LE s negativitou NAb s hlediska pravděpodobnosti zlepšení u podskupiny pacientů léčených další nesteroidní IT (tedy terapie, kdy byli kromě steroidů použity i další léky), celkové úmrtnosti, příčiny úmrtí a jejího vztahu k nádoru, encefalitidě nebo infekci. Nepozorovali jsme rozdíly v pravděpodobnosti zlepšení u pacientů s nesteroidní IT nebo bez ní (s 2/6, bez 1/2, $p = 1,0$, Fisherův exaktní test).

Pouze u jedné pacientky s definitivní autoimunitní LE byla zjištěna potenciální paraneoplastická etiologie (karcinom prsu diagnostikovaný 4 měsíce před rozvojem AIE). Tato pacientka přežila s mRS 4 při poslední kontrole.

Celkem 3/10 pacientů zemřelo (30 %). Úmrtnost byla vyšší u pacientů s pravděpodobnou AIE (60 %, 3/5, žádný z nich neměl diagnostikován nádor) ve srovnání s žádným pacientem s definitivní autoimunitní LE (0/4, $p = 0,4$, Fisherův exaktní test). Všechna tři úmrtí byla považována za související s encefalitidou.

5.3.3. Diskuze

V našem článku popisujeme klinický obraz, terapii, outcome, mortalitu a příčinu úmrtí u retrospektivní monocentrické kohorty 10 pacientů s AIE s negativitou neurálních autoprotilátek. Naše hlavní zjištění jsou následující (1) 14 % pacientů klasifikovaných jako autoimunitní encefalitida byly skutečně negativní na protilátky, a to i po komplexním testování. Pět pacientů (2 z nich pouze jako možná AIE) původně považovaných za protilátkově negativních bylo po použití komplexní protilátkové diagnostiky překvalifikováno na protilátkově pozitivní, což podtrhuje význam komplexních testovacích strategií. (2) Většina pacientů s AIE s negativitou protilátek byla starší (medián věku 60 let pro celý soubor), bez jasné převahy pohlaví. (3) Souběžné malignity nebyly časté (12,5 % vyšetřených pacientů). (4) Většina pacientů (80 %) byla léčena intravenózními kortikosteroidy a 60 % těchto pacientů dostalo navíc další IT. U 50 % pacientů léčených IT došlo při poslední kontrole ke zlepšení. Nepozorovali jsme však rozdíly v odpovědi na léčbu mezi pacienty s nesteroidní IT (podávanou jako přídatná léčba k steroidní terapii) nebo bez ní. (5) Outcome byl lepší u pacientů klasifikovaných jako definitivní autoimunitní LE s negativními NAbs než u pacientů s pravděpodobnou AIE s negativními protilátkami. To bylo způsobeno především vyšší celkovou mortalitou u pacientů s pravděpodobnou AIE (60 % vs 0 %). Příčinou úmrtí byla u všech pacientů morbidita spojená s encefalitidou.

Za zmínku stojí, že 4/10 pacientů mělo na MRI multifokální demyelinizaci v bílé hmotě (v jednom případě také kortikální) spolu s fokálními neurologickými příznaky a encefalopatií. V době stanovení diagnózy byl nálezn na MRI u všech čtyř pacientů kompatibilní s ADEM, nicméně u tří pacientů došlo ke zhoršení stavu, takže nespĺňovali současná kritéria ADEM vyžadující absenci nového klinického nebo MRI zhoršení po 3 měsících. Kromě toho 2/4 pacientů během několika měsíců zemřeli, což je pro ADEM rovněž netypické. Zda se u nich jednalo primárně o onemocnění s protilátkami proti gliím (ADEM), nebo o určitý překryv neuronální a gliální autoimunity, zůstává nejasné (Titulaer et al. 2014).

Do diagnostického algoritmu bylo zařazeno 17 pacientů, kteří byli kategorizováni jako možná AIE s negativitou protilátek, ale u kterých nebyla provedena další subkategorizace. Přestože je potřeba být při analýze této heterogenní skupiny opatrný, rozhodli jsme se vyšetřit i tyto pacienty. Jak již bylo zmíněno, dva z nich měli při komplexním testování pozitivní protilátky, a

proto byli přehodnoceni jako protilátkově pozitivní. Za zmínku stojí, že používaný diagnostický algoritmus od Grause a kolegů (Graus et al. 2016) nedoporučuje vzorky této skupiny pacientů testovat ve výzkumné laboratoři. Tito pacienti by tedy byli při striktním dodržování algoritmu přehlédnutí. Zbývajících 15 pacientů mělo často nádory (54 % vyšetřených pacientů) a mnoho z nich profitovalo z IT (78 % alespoň přechodně).

Nezjistili jsme významné rozdíly ve výsledcích pacientů léčených nesteroidní imunosupresí ve srovnání s pacienty, kteří byli léčeni pouze kortikosteroidy. Toto pozorování by nemělo být považováno za důkaz nedostatečných imunomodulačních účinků nesteroidní léčby u pacientů s AIE s negativitou protilátek. Spíše by mělo varovat před léčbou pacientů "univerzálním způsobem," protože ne všichni pacienti mohou potřebovat intenzivní imunosupresi a dokonce u části dochází ke spontánnímu zlepšení bez terapie (Najjar et al. 2011, Sanchez et al. 2021) (jak bylo také pozorováno u dvou pacientů z našeho souboru). Proto je potřeba u těchto, často starších pacientů individualizovat terapii na základě daného syndromu, klinického nálezu a přidružených komorbidit, zejména přidružených nádorů. Přestože menší procento našich pacientů mělo nádory (10 %), je třeba pečlivě zvážit paraneoplastickou etiologii, zejména u definitivní autoimunitní LE (25 % mělo přidružené nádory). Pacienti zemřeli na progresivní encefalitidu a následnou morbiditu a imobilitu vedoucí k infekčním komplikacím, což je dobře známo u protilátkově pozitivních paraneoplastických syndromů, např. syndromu s protilátkami proti Hu (Dalmau et al. 1992). Imunoterapie mohla hrát roli i v infekčních komplikacích. U imunoterapie je třeba věnovat maximální pozornost výběru a délce léčby, zejména u starších pacientů a paraneoplastické etiologie, u nichž je nebezpečí na obou stranách: nebezpečná může být jak nadměrná imunosupresivní léčba, tak nedostatečná léčba.

Hlavní předností naší případové série je komplexní strategie testování včetně screeningu pomocí tkáňové imunohistochemie, která vedla k odhalení 5 pacientů jako protilátkově pozitivních (tři pravděpodobné, dva pouze možné AIE dle kritérií), kteří by jinak byli považováni za protilátkově negativní a značně zkreslili naše data. Závěrem lze říci, že naše studie nastiňuje klinický obraz AIE s negativitou NAbs, upozorňuje na značnou mortalitu a zdůrazňuje význam komplexního vyšetření protilátek v případech s podezřením na AIE, a to i u pacientů, kteří nesplňují kritéria pravděpodobné AIE s negativitou NAbs, ale mají splněno 1 ze 2 kritérií zánětu (zánětlivý nález v likvoru nebo na MRI). Zejména u pacientů bez jasné odpovědi na imunoterapii první linie mohou výsledky testů na protilátky silně ovlivnit další rozhodování o

případné agresivnější léčbě (Maniscalco et al. 2021). Kromě toho by testování protilátek ve výzkumných laboratořích mohlo vést k odhalení nových protilátek. Pro budoucí studie AIE s negativitou protilátek navrhujeme, aby bylo do testování neurálních autoprotilátek zahrnuto i testování na tkáňových řezech.

5.4. Studie č. 4: Paraneoplastická autoimunitní encefalitida? Sirtuin 2 u encefalitidy s protilátkami proti NMDAR

5.4.1. Metodika

5.4.1.1 Selekce pacientů

Do studie bylo zařazeno 28 pacientů s AIE (14 s NMDAR, 14 s LGI1 encefalitou) a 30 kontrol. Všichni pacienti byli vyšetřeni a léčeni v letech 2013 – 2022 na Neurologické klinice 2. LF UK a FN Motol, Praha, Česká republika. Zařazení pacienti měli typické klinické příznaky pro NMDAR nebo LGI1 encefalitu s pozitivním testem na přítomnost protilátek proti NMDAR (v likvoru, část také zároveň v séru) nebo LGI1 (v séru) pomocí komerčně dostupných CBA. Vzorky pacientů byli testovány i na další protilátky pomocí line blotu a v některých případech i vyšetřením na tkáňových řezech. Pacienti splňovali diagnostická kritéria buď pro definitivní NMDAR encefalitu, nebo pro definitivní autoimunitní LE s protilátkami proti LGI1.

V rámci standardních postupů byly vzorky mozkomíšního moku studovaných pacientů zamraženy na -80 °C a uloženy v biobance Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol. Bylo analyzováno 35 vzorků mozkomíšního moku pacientů s NMDAR encefalitou a 23 vzorků mozkomíšního moku pacientů s LGI1 encefalitou. U každého pacienta byl k dispozici jeden nebo více vzorků odebraných v různé době v průběhu onemocnění. Vzhledem k retrospektivnímu designu této studie nebyly vzorky odebírány u každého pacienta ve stejnou dobu. První analyzovaný vzorek byl však vždy odebrán na počátku onemocnění, obvykle při stanovení diagnózy, a poslední vzorek byl obvykle odebrán v průběhu remise. U obtížněji léčitelné NMDAR encefalitidy bylo obvykle k dispozici více vzorků odebraných v průběhu onemocnění. Ve skupině pacientů s LGI1 byl první a poslední vzorek odebrán při diagnóze, resp. při remisi.

Osoby v kontrolní skupině odpovídaly věkem a pohlavím pacientům s AIE (věk při odběru vzorku \pm 2 roky) a byly vybrány buď z biobanky Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, nebo z biobanky Neurologické kliniky Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Švédsko. Všechny subjekty v kontrolní skupině byly vyšetřeny neurologem se specializací a všechny měly normální nález v mozkomíšním moku (včetně všech standardních vyšetření, jako je počet buněk, celková bílkovina, albumin,

IgG, IgM, IgA, albuminový index, IgG index, IgM index a izoelektrická fokusace). Kontrolní subjekty byly pacienti z následujících skupin: ortopedičtí pacienti v průběhu elektivního ortopedického výkonu, pacienti s idiopatickou obrnou lícního nervu a pacienti s lumbosakrální radikulopatií.

Po výběru byly všechny vzorky mozkomíšního moku od pacientů a kontrol převezeny certifikovanou přepravní společností na suchém ledu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do Sahlgrenské univerzitní nemocnice v Göteborgu, kde byly skladovány za stejných podmínek ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) až do doby proteomické analýzy.

5.4.1.2. Proteomická analýza

Všechny vzorky likvoru byly analyzovány pomocí panelu Olink Target 96 Inflammation, který využívá technologii proximity extension assay (Assarsson et al. 2014). Panel analyzuje 92 proteinů současně v každém vzorku. Analyzované proteiny v tomto panelu jsou spojeny se zánětlivými onemocněními a/nebo biologickými procesy zánětu. Především se jedná o chemokiny a cytokiny. Použitý test je tzv. dual recognition immunoassay se dvěma shodnými protilátkovými sondami připojenými ke specifickým oligonukleotidům DNA. Protilátkové sondy se vážou na specifický cílový protein v roztoku svými příslušnými vazebnými místy pro antigen současně. To způsobí hybridizaci obou oligonukleotidů DNA na každé ze sond protilátek v důsledku blízkosti po navázání, čímž se mezi sondami vytvoří antigenně specifický dvouřetězcový "čárový kód" DNA. Tento "čárový kód" DNA lze poté amplifikovat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), jejíž výsledky lze poté převést na číselnou hodnotu míry exprese cílového proteinu v analyzovaném vzorku.

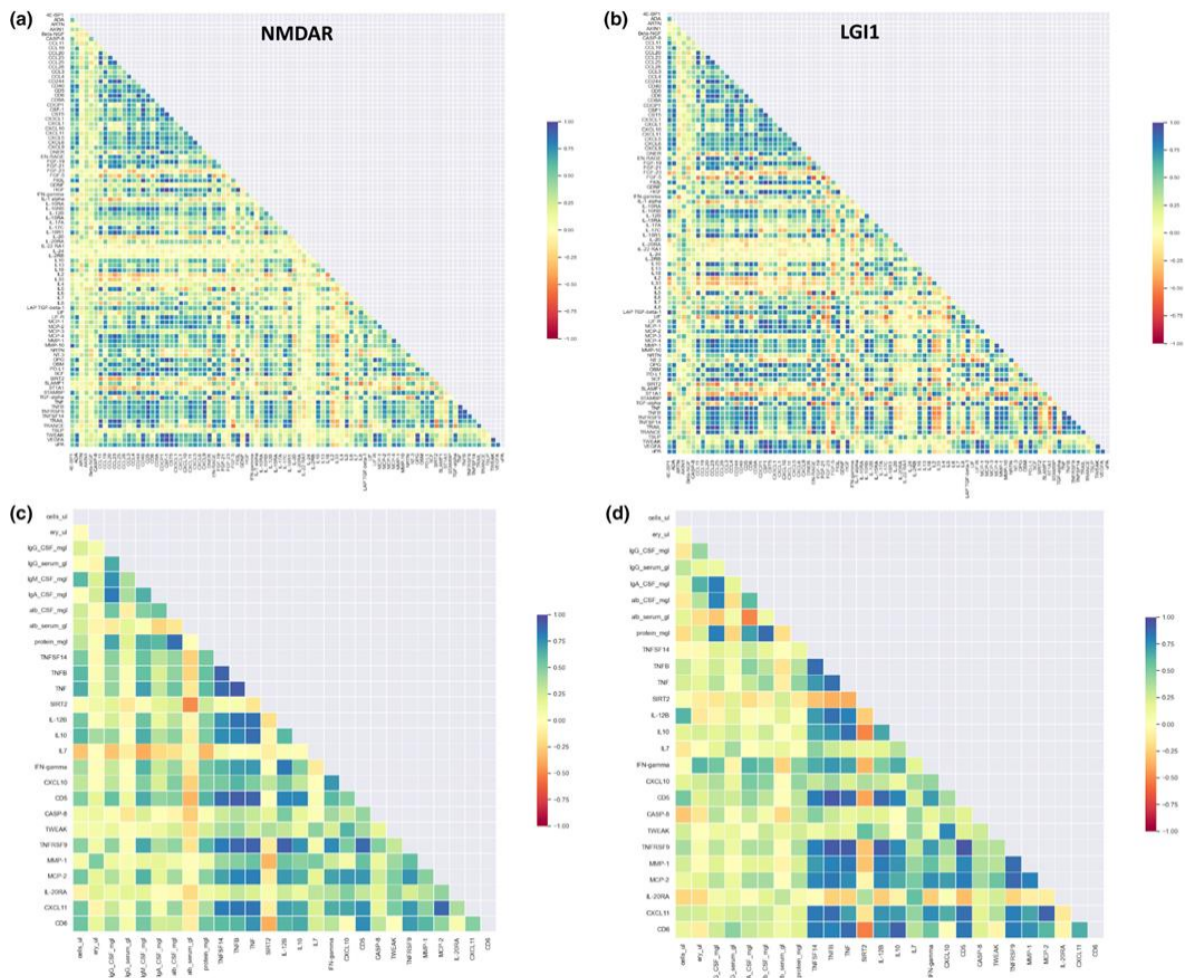
5.4.1.3. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu DATAtab a Pandas. Pro porovnání parametrických údajů mezi skupinami (např. NMDAR vs. LGII vs. kontroly) byla použita analýza rozptylu (ANOVA) a Welchova ANOVA s počátečním Leveneho testem shody rozptylů a post-hoc testy zahrnujícími Bonferroniho post-hoc testy, Scheffého metoda a výpočet Fisherova nejmenšího významného rozdílu. Pro srovnání dvou skupin byl použit dvouvýběrový t-test s Leveneho testem rovnosti rozptylů a výpočtem 95% CI. Pro výpočet korelace mezi proměnnými byla použita Pearsonova korelační analýza.

5.4.2. Výsledky

5.4.2.1. Proteomické markery u různých skupin pacientů

Přehled 92 biomarkerů zkoumaných u pacientů s NMDAR encefalitidou a LGI1 encefalitidou a jejich interindividuální korelace viz Obr. 4. Při porovnání pacientů s kontrolami odpovídajícími věku a pohlaví se statisticky významně lišily následující biomarkery: člen superrodiny TNF 14 (TNFSF14), lymfotoxin α (TNF β), tumor necrosis factor (TNF; známý také jako TNF α), sirtuin 2 (SIRT2), interleukin 12B (IL12B), interleukin 10 (IL10), interleukin 7, interferon gama (IFN γ), chemokinový ligand 10 s motivem C-X-C (CXCL10), molekula CD5 (CD5), kaspáza 8 (CASP8), člen superrodiny TNF 12 (TWEAK), člen superrodiny receptorů TNF 9 (TNFRSF9), matrixová metalopeptidáza 1, chemokinový ligand 8 s motivem C-C (CCL8; známý také jako MCP2), podjednotka alfa receptoru pro interleukin 20, chemokinový ligand s motivem C-X-C 11 (CXCL11) a molekula CD6 (CD6). Tyto biomarkery byly dále hodnoceny z hlediska asociace s klinickými proměnnými.



Obr. 4: Korelační matice (Pearsonova korelační analýza)

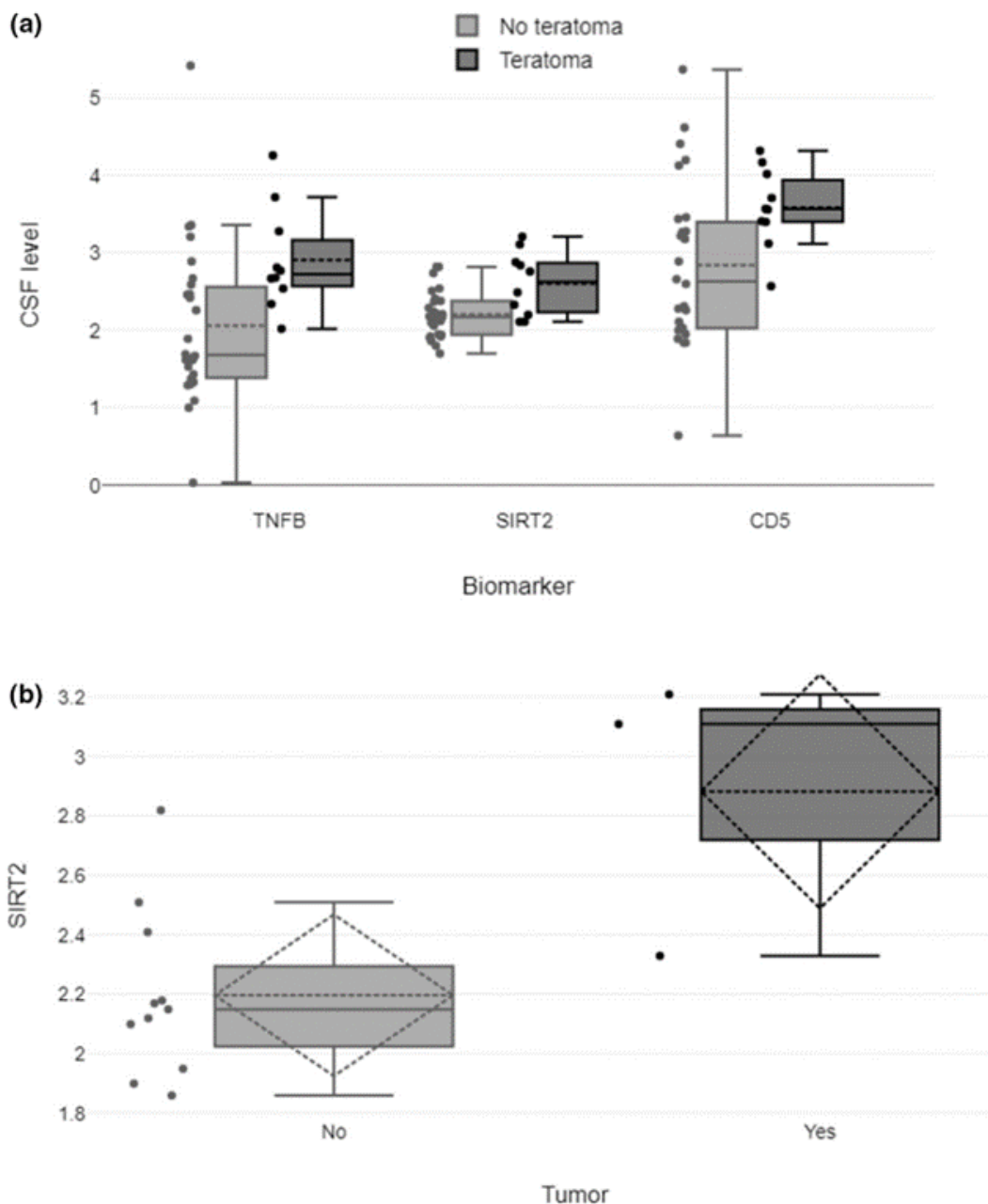
Teplotní mapa (heatmap) ukazuje negativní korelaci pomocí teplých barev (tj. červenými odstíny) a pozitivní korelaci pomocí studených barev (tj. modrými odstíny). (a) Korelační matice mezi zkoumanými zánětlivými biomarkery u pacientů s NMDAR encefalitidou. (b) Korelační matice mezi zkoumanými zánětlivými biomarkery u pacientů s LGI1 encefalitidou. (c) Korelační matice mezi standardní analýzou likvoru a zánětlivými biomarkery ukazující významné rozdíly mezi pacienty s NMDAR encefalitidou a kontrolami – znázorněna negativní korelace mezi SIRT2 a sérovým albuminem. d) Korelační matice mezi standardní analýzou likvoru a zánětlivými biomarkery u pacientů s LGI1 encefalitidou, která ukazuje významné rozdíly mezi pacienty a kontrolami.

Významné korelace s věkem při nástupu a věkem při odběru vzorků byly pozorovány u SIRT2 (pacienti s NMDAR encefalitidou: $r = 0,39$, p [oboustranný (z anglického two-tailed) t-test] = 0,018), CASP8 (pacienti s LGI1 encefalitidou: $r = 0,44$, p [oboustranný] = 0,042) a CD6 (pacienti s NMDAR encefalitidou: $r = 0,33$, p [oboustranný] = 0,049). Ve skupině pacientů s encefalitidou LGI1 byl zjištěn významný rozdíl v hladinách IL 10 u mužů oproti ženám

(dvouvýběrový t-test [předpokládané stejné rozptyly]: $t = -2,12$, $df = 20$, p [oboustranný] = 0,047).

5.4.2.2. Přítomnost tumoru

Ve skupině s LGI1 encefalitou byly všechny případy neparaneoplastické. U tří pacientů s NMDAR encefalitou byly zjištěny ovariální teratomy. Tři biomarkery vykazovaly významnou korelaci s přítomností teratomu: TNF β , SIRT2 a CD5. V případě SIRT2 (nikoliv CD5 a TNF β) byl rozdíl mezi pacienty s teratomem a bez něj statisticky významný, i když se bral v úvahu pouze první vzorek likvoru každého pacienta (SIRT2 bez nádoru: průměr = 2,2, SD = 0,29 vs. s nádorem: průměr = 2,88, SD = 0,48; dvouvýběrový t-test [předpokládané stejné rozptyly]: $t[12] = -3,23$, $p = 0,007$, 95% CI = -1,15 až -0,22). Byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace mezi přítomností teratomu a hladinou SIRT2 (r statistika v bodově biseriální korelaci (rpb) = 0,66, $n = 14$, $p = 0,011$). Mezi hladinami SIRT2 v po sobě jdoucích vzorcích u jednotlivých pacientů nebyly signifikantní rozdíly. Byla však zjištěna pozitivní korelace mezi SIRT2 a věkem při začátku onemocnění (rpb = 0,66, $n = 36$, $p = 0,011$) a věkem při odběru vzorku (rpb = 0,39, $n = 36$, $p = 0,018$).



Obr. 5: Biomarkery s významnou asociací s teratomem u pacientů s NMDAR encefalitou

(a) TNF β , SIRT2 a CD5 vykazují významně vyšší hladiny u paraneoplastické NMDAR encefalidity (spojené s teratomem ovarií). (b) Hladina SIRT2 ve vzorku likvoru z prvního odběru u pacientů s NMDAR encefalitou (bez nádoru a s nádorem).

5.4.2.3. Klinické příznaky

Asociace mezi klinickými příznaky a hladinami biomarkerů byly komplexní. Ve skupině s NMDAR encefalitou byly následující markery spojeny s absencí klinických epileptických

záchvatů (tj. jejich hladiny byly významně vyšší u pacientů bez záchvatů): TNFSF14, TNF, IL12B, IFN γ , CXCL10. Ve stejné skupině byly hladiny TNFSF14 a TWEAK signifikantně nižší u pacientů s epileptickým statem v době odběru.

Následující markery byly spojeny s poruchou kognice (tj. jejich hladiny byly významně vyšší u pacientů s poruchou kognitivních funkcí): TNF β , IL10, CXCL10, MCP2, CXCL11.

5.4.2.4. Paraklinická vyšetření

Mezi jednotlivými biomarkery a standardní analýzou likvoru (leukocyty, erytrocyty, celková bílkovina, albumin, IgG, IgM) existovaly významné korelace, zejména ve skupině s NMDAR encefalitidou. Hladiny SIRT2 však nevykazovaly statisticky signifikantní korelaci s ostatními nálezy v likvoru. Ve skupině s NMDAR encefalitidou existovala mírná negativní korelace mezi sérovým albuminem a hladinami SIRT2 v likvoru ($r[34] = -0,49$, $p = 0,002$).

Mezi abnormalitami na MRI a žádným ze studovaných biomarkerů nebyla zjištěna významná korelace. Ve skupině s NMDAR encefalitidou vyšší hodnota SIRT2 v prvním zkoumaném vzorku korelovala s přítomností generalizované delta aktivity (bodové biseriální korelace: $rpb = 0,56$, $n = 14$, $p = 0,036$) a vzorce extreme delta brush (EDB)(Schmitt et al. 2012) (bodové biseriální korelace: $rpb = 0,78$, $n = 14$, $p = 0,001$) na kterémkoli EEG provedeném v průběhu onemocnění. Kromě toho výskyt extreme delta brush (ale ne generalizované delta aktivity) koreloval s hladinami CASP8 a CD6 v prvním zkoumaném vzorku (bodové biseriální korelace CASP8: $rpb = 0,55$, $n = 14$, $p = 0,039$; bodové biseriální korelace CD6: $rpb = 0,6$, $n = 14$, $p = 0,022$). V podskupině s encefalitidou LGI1 byl výskyt elektrografických záchvatů na kterémkoli EEG negativně korelován s hladinami TNFSF14 (bodové biseriální korelace: $rpb = -0,57$, $n = 13$, $p = 0,044$) i CASP8 (bodové biseriální korelace: $rpb = -0,72$, $n = 13$, $p = 0,006$).

5.4.2.5. Průběh a outcome onemocnění

U pacientů s NMDAR encefalitidou byla zjištěna vysoká pozitivní korelace mezi délkou hospitalizace a hladinami SIRT2 ($r[34] = 0,55$, $p < 0,001$). Korelace s délkou hospitalizace byla pozorována také u TNFSF14, TNF β a IL10. Podobné korelace nebyly ve skupině s LGI1 encefalitidou pozorovány. Většina pacientů v obou skupinách měla při poslední kontrole dobrý outcome (mRS = 0 u deseti pacientů s NMDAR encefalitidou a devíti pacientů s LGI1 encefalitidou). Ve skupině pacientů s NMDAR encefalitidou nedošlo k žádnému úmrtí; tři pacienti měli při poslední kontrole mRS = 1 a jeden pacient mRS = 2. Ve skupině s encefalitidou LGI1 došlo k jednomu úmrtí, tři pacienti měli mRS = 2 a jeden pacient měl při poslední kontrole

mRS =3. Malé počty pacientů v každé podskupině znemožnili analýzu významu hladin biomarkerů pro výsledný outcome.

5.4.3. Diskuze

Spolehlivé biomarkery diagnózy, aktivity onemocnění, etiologie a outcome AIE by umožnily přizpůsobit imunomodulační léčbu individuálním potřebám pacienta a také zlepšit detekci přidružených malignit. V této studii jsme zvolili proteomický přístup k identifikaci potenciálně klinicky relevantních biomarkerů u pacientů s NMDAR a LGII encefalitidou. Od roku 2014 se test Olink proximity extension assay používá jako výzkumný nástroj v onkologii, imunologii a neurologii. Autoimunitní onemocnění nervového systému a neurodegenerativní onemocnění patří mezi nejčastěji studované oblasti využívající proteomiku (Mariotto et al. 2019, Nissen et al. 2021, Constantinescu et al. 2017).

Nevýhodou multiplexního testu je, že pro některé proteiny může být nutné zahrnout velké skupiny subjektů, aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům (Carlyle et al. 2022). Proto je naše výsledky nutno interpretovat opatrně a konfirmovat je na větších souborech.

Pomocí této proteomické metody jsme identifikovali několik zajímavých biomarkerů zánětu u AIE a vyhodnotili jejich vztah ke klinickým proměnným. Z identifikovaných biomarkerů je nejzajímavější SIRT2, protože jsme objevili pozitivní korelaci mezi jeho hladinami v likvoru a přítomností ovariálního teratomu u NMDAR encefalidity. Tato korelace je přítomna i v případě, že se vezme v úvahu pouze první dostupný vzorek likvoru u každého pacienta.

SIRT2 je členem rodiny sedmi sirtuinů, vysoce konzervovaných intracelulárních regulačních molekul, které se podílejí na mnoha buněčných procesech, včetně stárnutí, metabolické regulace, genomické stability, nádorového růstu, zánětu a neurodegenerativních onemocnění (Haigis et Sinclair 2010, Wang et al. 2019). Nachází se v mnoha orgánech, včetně mozku (Gomes et al. 2015), kde je hojně exprimována neurony i oligodendrocyty (Harting et Knöll 2010). SIRT2 je považován za protizánětlivou molekulu (Pais et al. 2013) a bylo prokázáno, že jeho inhibice zvyšuje protinádorovou T-buněčnou imunitu (Hamaidi et al. 2020). Kromě toho může SIRT2 u některých typů nádorů působit jako nádorový supresor (Kim et al. 2011), zatímco jiné studie popisují proonkogenní vlastnosti SIRT2.

Úloha SIRT2 u teratomů (bez asociace s AIE) a teratomů spojených s paraneoplastickou NMDAR encefalitidou není známa. Není jasné, zda je zvýšení SIRT2 v likvoru pozorované u paraneoplastické NMDAR encefalidity způsobeno mechanismy uvnitř nebo vně CNS.

Hypotézu o původu SIRT2 z CNS spíše než o jeho transportu přes HEB může podpořit absence korelace mezi hladinami SIRT2 a známkami dysfunkce HEB. Na druhou stranu byla zjištěna významná negativní korelace mezi hladinami SIRT2 v likvoru a sérovým albuminem. Zajímavé je, že pacienti s vyššími hladinami SIRT2 byli spíše starší, měli delší dobu hospitalizace ($r = 0,55$, $p = <0,001$) a měli prognosticky nepříznivé EEG nálezy (např. EDB). Nižší hladiny sérového albuminu u těchto pacientů tedy mohou být spojeny s delším a závažnějším průběhem onemocnění. Hladiny SIRT2 v likvoru se v následujících vzorcích u jednotlivého pacienta významně nelišily, což podporuje jeho roli jako potenciálního biomarkeru spojeného s okultní neoplazií.

U NMDAR encefalitidy bylo zjištěno více korelací mezi klinickými proměnnými a hladinami biomarkerů v likvoru než u LGI1 encefalitidy. Zajímavé je, že přítomnost epileptických záchvatů, včetně status epilepticus, byla spojena spíše s nižšími hladinami zánětlivých biomarkerů. V případě status epilepticus při odběru vzorků byly hladiny TNFSF14 a TWEAK významně nižší u pacientů s NMDAR encefalitou a TNF β byl významně nižší u pacientů s LGI1 encefalitou ve srovnání s kontrolami. Zda je relativní snížení těchto markerů příčinou či důsledkem status epilepticus, nebo náhodným nálezem, je třeba ještě objasnit.

Naše studie má několik důležitých limitací. Počet pacientů v obou skupinách byl malý, což mělo za následek velmi malé podskupiny při analýze mnoha korelací. Design studie byl retrospektivní, takže nebylo možné kontrolovat načasování odběru vzorků u jednotlivých pacientů. V době prvního odběru likvoru již většina pacientů dostávala nějakou formu léčby, nejčastěji intravenózní kortikosteroidy, což mohlo ovlivnit naše výsledky. Průběh onemocnění byl u jednotlivých pacientů velmi variabilní (zejména u pacientů s NMDAR encefalitou), u některých pacientů vyžadoval eskalaci IT a intenzivní péči, zatímco u jiných byl mírnější.

Souhrnně lze říci, že SIRT2 v likvoru se zdá být slibným biomarkerem paraneoplastické etiologie u NMDAR encefalitidy a měl by být dále zkoumán. Dalšími potenciálně užitečnými klinickými biomarkery paraneoplastické etiologie u NMDAR encefalitidy byli TNF β a CD5. Ve skupině pacientů s LGI1 encefalitou nebyla mezi biomarkery a klinickými proměnnými pozorována žádná souvislost s přímým klinickým uplatněním.

6. Souhrnná diskuze

Disertační práce se zabývala tématem neurálních autoprotilátek u pacientů s farmakorezistentní epilepsií. Práce zkoumaly protilátky jak u pacientů s epilepsií, tak u autoimunitních encefalitid, jejichž oligosymptomatická forma nemusí být podchycena v časném stádiu a pacienti mohou být poprvé zachyceni až ve stádiu epilepsie sdružené s autoimunitou. Pro správné pochopení významu NAb je důležité do hloubky porozumět jejich diagnostice. Proto bylo součástí studia také zavedení nové experimentální metody diagnostiky v České republice – vyšetření protilátek na tkáňových řezech.

Pro poskytování zdravotní péče je důležitá otázka správné preselekce skupiny pacientů u kterých je vhodné protilátky testovat, nejen abychom snížili výskyt falešně pozitivních výsledků, ale i z hlediska farmakoekonomického. Na téma faktorů asociovaných s autoimunitou u pacientů s fokální epilepsií neznámé etiologie se soustředila studie č. 1. Vytvořili a validovali jsme jednoduché skóre složené z 6 charakteristik, dle kterého lze na základě klinických parametrů indikovat vyšetření neurálních autoprotilátek. Jedná se o: kognitivní deficit, poruchu řeči, dysautonomii, hyperintenzity v meziálních temporálních lalocích na FLAIR sekvencích MRI, poruchu chování, anamnézu autoimunitního onemocnění. Toto skóre mělo lepší senzitivitu než dosud užívané APE2 skóre, a to zejména u pacientů s protilátkami proti GAD65.

U části autoimunitních encefalitid asociovaných s NAb lze jejich přítomnost detekovat jen v mozkomíšním moku. Vzhledem k této možné izolované pozitivitě protilátek v likvoru i u pacientů s epilepsií sdruženou s autoimunitou jsme se rozhodli zaměřit na skupinu pacientů s farmakorezistentní epilepsií indikovanou k resekčnímu výkonu, kde odběr likvoru mohl proběhnout perioperačně – tomu se věnovala studie č. 2. V naší skupině jsme zachytili nižší prevalenci protilátek, než bylo dosud uváděno v literatuře. Při použití přísných kritérií, která vylučují starší studie, jež zahrnovaly protilátky proti VGKC anti-LGI1/CASPR2 negativní, protilátky proti TPO a ANA jako pozitivní nálezy protilátek, byly publikovány pouze dvě relevantní studie zaměřené na podskupinu pacientů s farmakorezistentní epilepsií a přítomnost protilátek v likvoru. Jedna z těchto studií popisovala malou kohortu osmi případů – u žádného z nich nebyly zjištěny protilátky v séru nebo likvoru (KABAY et al. 2022). Druhá zahrnovala 27 pacientů s farmakorezistentní epilepsií temporálního laloku (TLE) neznámé etiologie a uváděla 14 (51,9 %) případů s pozitivními protilátkami (Cabezudo-García et al. 2021a). Procento pacientů s epilepsií s pozitivitou protilátek může být v této studii přehnané – buď v

důsledku zahrnutí nerelevantních protilátek, nebo pacientů s akutními symptomatickými záchvaty v rámci AIE. Naproti tomu náš soubor zahrnoval všechny pacienty s fokální FRE indikované k operaci a nebyl selektován s ohledem na typ a etiologii epilepsie (kromě vyloučení nádorů). Byli zahrnuti i pacienti se strukturálními lézemi, jako je malformace korového vývoje, což mohlo snížit procento případů pozitivních na protilátky. Mnoho případů FCD je však MR-negativních a léze se prokáže až histopatologicky (Wang et al. 2013) a je tedy pravděpodobné, že by tito pacienti byli zahrnuti do kohort studujících protilátky u epilepsie “s neznámou” etiologií.

Za účelem identifikace pacientů s pozitivními protilátkami mezi pacienty s FRE, kteří jsou kandidáty resekce, bylo navrženo skóre APES. Podle našeho názoru nemusí toto skóre identifikovat všechny pacienty, protože zahrnuje mnoho položek, které je obtížné s jistotou skórovat (např. virový prodrom před nástupem epilepsie). V původní studii, která navrhla APES, byla prevalence positivity protilátek u pacientů s FRE neznámé příčiny 8 %. Pro náš soubor by to znamenalo, že mezi 32 případy, které splňovaly přísná kritéria pro FRE neznámé etiologie (tj. žádné strukturální léze kromě HS), by měli být dva pacienti s pozitivitou protilátek, zatímco my jsme identifikovali pouze jeden případ s pozitivitou protilátek proti GAD65 s nejasným vztahem těchto protilátek k rozvoji epilepsie. To sice může být způsobeno malým počtem pacientů, ale může to také naznačovat nadhodnocení pomocí skóre APES.

Vzhledem k rostoucímu povědomí o možné autoimunitní etiologii se při předoperačním vyšetření stále častěji provádí hodnocení možné asociace s autoimunitou. U pacientů, u nichž se taková etiologie potvrdí, se epileptochirurgický zákrok často odkládá, nebo je dokonce kontraindikován. Tato preselekce mohla přispět k tomu, že v našem souboru byl jen jeden pacient s pozitivními protilátkami. Nicméně v rutinní praxi jsme většinou vyšetřovali NAbs u pacientů s epilepsií pouze komerčně dostupnými metodami, o kterých je známo, že mají nižší citlivost.

Pro určení potenciálního významu NAbs jako biomarkeru epilepsie sdružené s autoimunitou a při zavádění metody detekce na tkáňových řezech jsme se v rámci studie č. 3 zaměřili na skupinu autoimunitních encefalitid, které nejsou sdružené s NAbs. Jedním z důležitých výstupů této studie i pro pacienty s epilepsií sdruženou s autoimunitou je pozorování, že část pacientů při nedostatečně komplexním testování může být klasifikována do skupiny s negativitou protilátek. Vzhledem k tomu, že skupina protilátkově negativních autoimunitních epilepsií není krom Rasmussenovy encefalitidy dobře definována (na rozdíl od AIE s negativitou protilátek v našem

a dalších člancích), je komplexní protilátková diagnostika s cílem odhalení protilátek u pacientů s negativním vyšetřením na komerčních testech pro praxi velmi důležitá. Než budou k dispozici jiné biomarkery pro epilepsii sdruženou s autoimunitou než autoprotiátky, jeví se jejich precizní diagnostika jako jediné řešení aplikovatelné v klinické praxi.

Potenciálními biomarkery autoimunitních encefalitid a jejich asociací s klinickými proměnnými včetně přítomnosti záchvatů a status epilepticus se zabývala studie č. 4. Pomocí proteomické analýzy jsme identifikovali sirtuin 2 jako potenciální biomarker paraneoplastické etiologie. Vzhledem k retrospektivnímu designu studie a absenci prospektivního sledování u všech pacientů nebylo možno u většiny pacientů rozlišit, zda detekované epileptické záchvaty byly v rámci aktivní AIE, nebo se již jednalo o rozvinutou epilepsii sdruženou s autoimunitou. Vzhledem k tomu, že u NMDAR a LGI1 encefalitidy při dobře vedené léčbě jen malé procento pacientů rozvine epilepsii sdruženou s autoimunitou (Geis et al. 2019), by naše kohorta musela být výrazně větší a dlouhodobě sledována, abychom jsme byli toto schopni spolehlivě hodnotit. V této studii jsme se proto zabývali jen přítomností epileptických záchvatů a status epilepticus v akutním stadiu onemocnění. Přítomnost epileptických záchvatů, včetně status epilepticus, byla spojena spíše s nižšími než vyššími hladinami zánětlivých biomarkerů. V případě status epilepticus při odběru vzorků byly hladiny TNFSF14 a TWEAK významně nižší u pacientů s NMDAR encefalitidou a TNF β byl významně nižší u pacientů s LGI1 encefalitidou ve srovnání s kontrolami. Zda je relativní snížení těchto markerů příčinou či důsledkem status epilepticus, nebo náhodným nálezem, je třeba ještě objasnit.

7. Zhodnocení cílů a hypotéz práce, závěr

Cílem disertační práce bylo studovat neurální autoprotilátky u pacientů s FRE. Vzhledem k jejich asociaci s autoimunitními encefalitidami jsme se zaměřili i na tuto skupinu a zejména na skupinu, u které není přítomnost protilátek běžnými metodami prokazatelná.

Cílem první studie bylo zlepšit diagnostiku epilepsií sdružených s autoimunitou vytvořením skóre k identifikaci pacientů, u nichž je testování protilátek indikované. Toto skóre má zejména u skupiny s protilátkami proti GAD65 dobrou senzitivitu, která u dosud zavedených skóre nebyla dostatečná. Skóre se podařilo validovat na nezávislé kohortě našich pacientů.

Cílem druhé studie bylo posoudit prevalenci NAbs v multicentrické národní prospektivní kohortě pacientů s farmakorezistentní epilepsií, kteří podstoupili epileptochirurgický zákrok, s využitím komplexní klinické, sérologické a histopatologické analýzy. V našem souboru byla jen u jednoho pacienta prokázána přítomnost specifických protilátek proti GAD65, které vzhledem k průběhu onemocnění a histopatologickému nálezu mohly být ale pouhý epifenomén a autoimunita nemusela ani u tohoto pacienta hrát významnou roli. Vzhledem k tak nízkému zachytu jsme pak nebyli schopni analyzovat a porovnávat jednotlivé podskupiny této kohorty, nicméně naše práce zásadním způsobem upozornila na riziko nadhodnocení autoimunitní etiologie epilepsie při použití méně robustní metodiky stanovení autoprotilátek.

Cílem třetí studie bylo identifikovat pacienty s AIE s negativitou NAbs, kteří jsou dosud v literatuře popisováni jen vzácně a jsou považováni za relativně heterogenní skupinu. Naším cílem bylo popsat klinické rysy, spouštěcí faktory, léčbu a outcome u této skupiny. Analýzou rozsáhlého souboru pacientů testovaných na našem pracovišti na přítomnost protilátek vzhledem k striktním diagnostickým kritériím selektovali jen malou skupinu pacientů. Její velikost znemožnila jinou než deskriptivní analýzu, jak je u vzácných onemocnění časté. Práce poukázala na možnost falešné negativity autoprotilátek při použití nedostatečné metodiky k jejich stanovení.

Cílem čtvrté studie bylo identifikovat biomarkery související s klinickým obrazem, prognózou, asociací s tumory a asociací s epileptickými záchvaty v rámci klinického obrazu u pacientů s NMDAR a LGI1 encefalitou. V této práci se podařilo identifikovat marker paraneoplastické etiologie, ale nebyl nalezen žádný marker, který by predikoval protražované epileptické záchvaty v rámci akutního stádia AIE či následný rozvoj epilepsie.

8. Souhrn

Cílem disertační práce bylo studovat neurální autoprotilátky u pacientů s farmakorezistentní epilepsií a zlepšit protilátkovou diagnostiku v České republice.

První studie vytvořila skóre pro selekci pacientů s fokální epilepsií neznámé etiologie vyžadujících vyšetření NAbs. Skóre pozůstává z šesti jednoduchých bodů, je dobře klinicky aplikovatelné a má vysokou senzitivitu u pacientů s GAD65 asociovaným autoimunitním postižením CNS narozdíl od dříve publikovaných skóre.

Druhá studie měla za cíl identifikovat protilátky jak v séru, tak v likvoru u pacientů s farmakorezistentní epilepsií podstupujících resekci mozkové tkáně. Protilátky (proti GAD65) byly přítomny pouze u jednoho pacienta (1,3 %). U pacientů s oligoklonálními pásy izolovaně v likvoru byl průběh méně příznivý. Práce poukázala na riziko nadhodnocení autoimunitní etiologie epilepsie při použití méně robustní metodiky stanovení autoprotilátek.

Třetí studie se zabývala AIE s negativitou NAbs, k čemu využila komplexní diagnostiku protilátek včetně detekce na tkáňových řezech, která byla v České republice doktorandkou zavedena. Práce významně rozšířila dosud publikovanou literaturu na toto téma.

Čtvrtá studie hledala potenciální biomarkery pro diagnostiku AIE a jejich asociaci s klinickým obrazem. Byla zjištěna asociace sirtuinu 2 v likvoru s paraneoplastickou etiologií u NMDAR encefalidity. U NMDAR encefalidity byl nalezen biomarker asociován s absencí epileptických záchvatů a to TNFSF14, TNF, IL12B, IFN γ , CXCL10, naopak hladiny TNFSF14 a TWEAK byly signifikantně nižší u pacientů s epileptickým statem v době odběru. Tyto biomarkery bude dále možné testovat ve studiích s většími kohortami pacientů.

Závěrem lze konstatovat, že práce splnila kladené cíle a výsledky byly publikovány v impaktovaných časopisech v prvním kvartilu. V rámci studia byla v Česku nově zavedena metodika detekce neurálních autoprotilátek pomocí nepřímé imunohistochemie na tkáňových řezech, která významně zpřesní diagnostiku onemocnění sdružených s neurálními autoprotilátkami.

9. Summary

The aim of this dissertation was to study neural autoantibodies in patients with drug resistant epilepsy and to improve antibody diagnostics in the Czech Republic.

The first study established a score for selection of patients with focal epilepsy of unknown etiology requiring neural autoantibody testing. The score consists of six simple items and is well clinically applicable. Furthermore, it has high sensitivity in patients with GAD65-associated immunity in contrast to previously published scores.

The second study aimed to identify antibodies in both serum and CSF of patients with drug-resistant epilepsy undergoing brain tissue resection. Antibodies (against GAD65) were present in one patient (1.3%). In patients with oligoclonal bands isolated in the CSF, the course was less favorable. This work highlighted the risk of overestimating the autoimmune etiology of epilepsy using less robust methods for autoantibody testing.

The third study looked at AIE with neural autoantibody negativity, using comprehensive antibody diagnostics, including detection on rat brain tissue sections, which was introduced in the Czech Republic for the first time and is currently an established experimental method. The work significantly extended the previously published literature on this topic.

The fourth study searched for potential biomarkers for the diagnosis of AIE and their association with the clinical picture. An association of sirtuin 2 in the CSF with paraneoplastic etiology in NMDAR encephalitis was found. In NMDAR encephalitis, the biomarkers associated with the absence of epileptic seizures were found to be TNFSF14, TNF, IL12B, IFN γ , CXCL10, whereas TNFSF14 and TWEAK levels were significantly lower in patients with status epilepticus at the time of sampling. These biomarkers can be further tested in studies with larger patient cohorts.

In conclusion, the study met its objectives and the results were published in first-quartile impacted journals. The study introduced a new methodology for detection of neural autoantibodies using indirect immunohistochemistry on tissue sections into the Czech Republic, which will significantly improve the accuracy of diagnosis of CNS diseases associated with neural autoantibodies.

10. Literatura

1. Abboud H, Probasco JC, Irani S, Ances B, Benavides DR, Bradshaw M, et al. Autoimmune encephalitis: proposed best practice recommendations for diagnosis and acute management. *J Neurology Neurosurg Psychiatry*. 2021;92(7):757–68.
2. Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, Liebeskind DS, Voloschin A, Houghton DJ, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain*. 2005;128(8):1764–77.
3. Assarsson E, Lundberg M, Holmquist G, Björkstén J, Thorsen SB, Ekman D, et al. Homogenous 96-Plex PEA Immunoassay Exhibiting High Sensitivity, Specificity, and Excellent Scalability. *Plos One*. 2014;9(4):e95192.
4. Dalmau, Josep et Graus, Francesc. Autoimmune encephalitis and related disorders of the central nervous system. New York, NY: Cambridge University Press, 2022. ISBN 9781108696722.
5. Bakpa OD, Reuber M, Irani SR. Antibody-associated epilepsies: Clinical features, evidence for immunotherapies and future research questions. *Seizure*. 2016;41:26–41.
6. Balu R, McCracken L, Lancaster E, Graus F, Dalmau J, Titulaer MJ. A score that predicts 1-year functional status in patients with anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology*. 2019;92(3):e244–52.
7. Baud MO, Perneger T, Rácz A, Pensel MC, Elger C, Rydenhag B, et al. European trends in epilepsy surgery. *Neurology*. 2018;91(2):e96–106.
8. Baudin P, Whitmarsh S, Cousyn L, Roussel D, Lecas S, Lehongre K, et al. Kv1.1 channels inhibition in the rat motor cortex recapitulates seizures associated with anti-LGI1 encephalitis. *Prog Neurobiol*. 2022;213:102262.
9. Beghi E, Shorvon S. Antiepileptic drugs and the immune system. *Epilepsia*. 2011;52(s3):40–4.
10. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, Clercq ED, et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*. 2001;4(7):702–10.
11. Bien CG, Holtkamp M. “Autoimmune Epilepsy”: Encephalitis with Autoantibodies for Epileptologists. *Epilepsy Curr*. 2017a;17(3):134–41.

12. Bien CG, Urbach H, Schramm J, Soeder BM, Becker AJ, Voltz R, et al. Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2007;69(12):1236–44.
13. Billiau AD, Witters P, Ceulemans B, Kasran A, Wouters C, Lagae L. Intravenous Immunoglobulins in Refractory Childhood-Onset Epilepsy: Effects on Seizure Frequency, EEG Activity, and Cerebrospinal Fluid Cytokine Profile. *Epilepsia*. 2007;48(9):1739–49.
14. Black JA, Liu S, Waxman SG. Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*. 2009;57(10):1072–81.
15. Blümcke I, Aronica E, Miyata H, Sarnat HB, Thom M, Roessler K, et al. International recommendation for a comprehensive neuropathologic workup of epilepsy surgery brain tissue: A consensus Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2016;57(3):348–58.
16. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013;54(7):1315–29.
17. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia*. 2011;52(1):158–74.
18. Borusiak P, Bettendorf U, Wiegand G, Bast T, Kluger G, Philippi H, et al. Autoantibodies to neuronal antigens in children with focal epilepsy and no prima facie signs of encephalitis. *European J Paediatr Neurology Ejpnl Official J European Paediatr Neurology Soc*. 2016;20(4):573–9.
19. Brenner T, Sills GJ, Hart Y, Howell S, Waters P, Brodie MJ, et al. Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy. *Epilepsia*. 2013a;54(6):1028–35.
20. Bruijn MAAM, Bastiaansen AEM, Mojzisova H, Sonderen A, Thijs RD, Majoie MJM, et al. Antibodies Contributing to Focal Epilepsy Signs and Symptoms Score. *Ann Neurol*. 2021;89(4):698–710.

21. Bruijn MAAM de, Sonderen A van, Coevorden-Hameete MH van, Bastiaansen AEM, Schreurs MWJ, Rouhl RPW, et al. Evaluation of seizure treatment in anti-LGI1, anti-NMDAR, and anti-GABABR encephalitis. *Neurology*. 2019;92(19).
22. Byun JI, Lee ST, Jung KH, Sunwoo JS, Moon J, Lim JA, et al. Effect of Immunotherapy on Seizure Outcome in Patients with Autoimmune Encephalitis: A Prospective Observational Registry Study. *Plos One*. 2016;11(1):e0146455.
23. Cabezudo-García P, Ciano-Petersen NL, Mena-Vázquez N, Ortega-Pinazo J, Postigo-Pozo MJ, García-Martín G, et al. Prevalence of Neural Autoantibodies in Paired Serum and Cerebrospinal Fluid in Adult Patients with Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsy of Unknown Etiology. *J Clin Medicine*. 2021a;10(21):4843.
24. Cabezudo-García P, Mena-Vázquez N, Ciano-Petersen NL, García-Martín G, Estivill-Torrús G, Serrano-Castro PJ. Prevalence of Neural Autoantibodies in Epilepsy of Unknown Etiology: Systematic Review and Meta-Analysis. *Brain Sci*. 2021b;11(3):392.
25. Carlyle BC, Kitchen RR, Mattingly Z, Celia AM, Trombetta BA, Das S, et al. Technical Performance Evaluation of Olink Proximity Extension Assay for Blood-Based Biomarker Discovery in Longitudinal Studies of Alzheimer's Disease. *Front Neurol*. 2022;13:889647.
26. Carreño M, Bien CG, Asadi-Pooya AA, Sperling M, Marusic P, Elisak M, et al. Epilepsy surgery in drug resistant temporal lobe epilepsy associated with neuronal antibodies. *Epilepsy Res*. 2017a;129:101–5.
27. Carvajal-González A, Leite MI, Waters P, Woodhall M, Coutinho E, Balint B, et al. Glycine receptor antibodies in PERM and related syndromes: characteristics, clinical features and outcomes. *Brain*. 2014;137(8):2178–92.
28. Cellucci T, Mater HV, Graus F, Muscal E, Gallentine W, Klein-Gitelman MS, et al. Clinical approach to the diagnosis of autoimmune encephalitis in the pediatric patient. *Neurology - Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2020;7(2):e663.
29. Choi J, Nordli DR, Alden TD, DiPatri A, Laux L, Kelley K, et al. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *J Neuroinflamm*. 2009;6(1):38.
30. Ciano-Petersen NL, Muñoz-Castrillo S, Birzu C, Vogrig A, Farina A, Villagrán-García M, et al. Cytokine dynamics and targeted immunotherapies in autoimmune encephalitis. *Brain Commun*. 2022;4(4):fcac196.

31. Coevorden-Hameete MH van, Bruijn MAAM de, Graaff E de, Bastiaansen DAEM, Schreurs MWJ, Demmers JAA, et al. The expanded clinical spectrum of anti-GABABR encephalitis and added value of KCTD16 autoantibodies. *Brain*. 2019;142(6):1631–43.
32. Coevorden-Hameete MH van, Titulaer MJ, Schreurs MWJ, Graaff E de, Smitt PAES, Hoogenraad CC. Detection and Characterization of Autoantibodies to Neuronal Cell-Surface Antigens in the Central Nervous System. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:37.
33. Constantinescu R, Krýsl D, Andrén K, Asztély F, Bergquist F, Zetterberg H, et al. Cerebrospinal fluid markers of neuronal and glial cell damage in patients with autoimmune neurologic syndromes with and without underlying malignancies. *J Neuroimmunol*. 2017;306:25–30.
34. Corsellis J, Goldberg GJ, Norton AR. “Limbi encephalitis“ and its association with carcinoma. *Brain*. 1968;91(3):481–96.
35. Dalmau J, Graus F. Antibody-Mediated Encephalitis. *New Engl J Medicine*. 2018;378(9):840–51.
36. Dalmau J, Graus F, Rosenblum M k., Posner JB. Anti-Hu-Associated Paraneoplastic Encephalomyelitis/Sensory Neuronopathy A Clinical Study of 71 Patients. *Medicine*. 1992;71(2):59–72.
37. Dambach H, Hinkerohe D, Prochnow N, Stienen MN, Moinfar Z, Haase CG, et al. Glia and epilepsy: Experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. *Epilepsia*. 2014;55(1):184–92.
38. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic Syndromes Involving the Nervous System. *New Engl J Medicine*. 2003;349(16):1543–54.
39. Déchelotte B, Muñoz-Castrillo S, Joubert B, Vogrig A, Picard G, Rogemond V, et al. Diagnostic yield of commercial immunodots to diagnose paraneoplastic neurologic syndromes. *Neurology - Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2020;7(3):e701.
40. Dubey D, Alqallaf A, Hays R, Freeman M, Chen K, Ding K, et al. Neurological Autoantibody Prevalence in Epilepsy of Unknown Etiology. *Jama Neurol*. 2017;74(4):397.
41. Dubey D, Kothapalli N, McKeon A, Flanagan EP, Lennon VA, Klein CJ, et al. Predictors of neural-specific autoantibodies and immunotherapy response in patients with cognitive dysfunction. *J Neuroimmunol*. 2018;323(JAMA Ophthalmol. 136 4 2018 April):62–72.
42. Dubey D, Pittock SJ, McKeon A. Antibody Prevalence in Epilepsy and Encephalopathy score: Increased specificity and applicability. *Epilepsia*. 2019;60(2):367–9.

43. Ekizoglu E, Baykan B, Sezgin M, Erdag E, Gundogdu-Unverengil G, Vanlı-Yavuz EN, et al. Follow-up of patients with epilepsy harboring antiglycine receptor antibodies. *Epilepsy Behav.* 2019;92:103–7.
44. Elisak M, Krysl D, Hanzalova J, Volna K, Bien CG, Leypoldt F, et al. The prevalence of neural antibodies in temporal lobe epilepsy and the clinical characteristics of seropositive patients. *Seizure.* 2018a;63:1–6.
45. Falip M, Rodriguez-Bel L, Castañer S, Sala-Padró J, Miro J, Jaraba S, et al. Hippocampus and Insula Are Targets in Epileptic Patients With Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies. *Front Neurol.* 2019;9:1143.
46. Feyissa AM, Chiriboga ASL, Britton JW. Antiepileptic drug therapy in patients with autoimmune epilepsy. *Neurology Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2017;4(4):e353.
47. Feyissa AM, Lamb C, Pittock SJ, Gadoth A, McKeon A, Klein CJ, et al. Antiepileptic drug therapy in autoimmune epilepsy associated with antibodies targeting the leucine-rich glioma-inactivated protein 1. *Epilepsia Open.* 2018;3(3):348–56.
48. Finke C, Prüss H, Heine J, Reuter S, Kopp UA, Wegner F, et al. Evaluation of Cognitive Deficits and Structural Hippocampal Damage in Encephalitis With Leucine-Rich, Glioma-Inactivated 1 Antibodies. *Jama Neurol.* 2017;74(1):50.
49. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55(4):475–82.
50. French JA, Cole AJ, Faught E, Theodore WH, Vezzani A, Liow K, et al. Safety and Efficacy of Natalizumab as Adjunctive Therapy for People With Drug-Resistant Epilepsy: A Phase 2 Study. *Neurology.* 2021;97(18):e1757–67.
51. Geis C, Planagumà J, Carreño M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. *J Clin Investigation.* 2019;129(3):926–40.
52. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006;25(51):6680–4.
53. Gomes P, Outeiro TF, Cavadas C. Emerging Role of Sirtuin 2 in the Regulation of Mammalian Metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(11):756–68.
54. Gómez CD, Buijs RM, Sitges M. The anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 β and TNF- α expression in rat hippocampus. *J Neurochem.* 2014;130(6):770–9.

55. Granata T, Cross H, Theodore W, Avanzini G. Immune-mediated epilepsies. *Epilepsia*. 2011;52(s3):5–11.
56. Graus F, Dalmau J. Paraneoplastic neurological syndromes in the era of immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;1.
57. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurology Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(8):1135.
58. Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, et al. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurology*. 2016;15(4):391–404.
59. Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurology*. 2014;13(2):167–77.
60. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu Rev Pathology Mech Dis*. 2010;5(1):253–95.
61. Hamaidi I, Zhang L, Kim N, Wang MH, Iclozan C, Fang B, et al. Sirt2 Inhibition Enhances Metabolic Fitness and Effector Functions of Tumor-Reactive T Cells. *Cell Metab*. 2020;32(3):420-436.e12.
62. Harting K, Knöll B. SIRT2-mediated protein deacetylation: An emerging key regulator in brain physiology and pathology. *Eur J Cell Biol*. 2010;89(2–3):262–9.
63. Höftberger R, Sepulveda M, Armangue T, Blanco Y, Rostásy K, Calvo AC, et al. Antibodies to MOG and AQP4 in adults with neuromyelitis optica and suspected limited forms of the disease. *Mult Scler J*. 2014;21(7):866–74.
64. Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC. Cytokine Effects on Glutamate Uptake by Human Astrocytes. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7(3):153–9.
65. Husari KS, Dubey D. Autoimmune Epilepsy. *Neurotherapeutics*. 2019;1–18.
66. Ilyas-Feldmann M, Prüß H, Holtkamp M. Long-term seizure outcome and antiseizure medication use in autoimmune encephalitis. *Seizure*. 2021;86:138–43.
67. Iori V, Frigerio F, Vezzani A. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;26:118–23.
68. Iorio R, Assenza G, Tombini M, Colicchio G, Marca GD, Benvenga A, et al. The detection of neural autoantibodies in patients with antiepileptic-drug-resistant epilepsy predicts response to immunotherapy. *Eur J Neurol*. 2015;22(1):70–8.

69. Iorio R, Damato V, Evoli A, Gessi M, Gaudino S, Lazzaro VD, et al. Clinical and immunological characteristics of the spectrum of GFAP autoimmunity: a case series of 22 patients. *J Neurology Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(2):138.
70. Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain*. 2010;133(9):2734–48.
71. Irani SR, Bien CG, Lang B. Autoimmune epilepsies. *Curr Opin Neurol*. 2011;24(2):146–53.
72. Iyer A, Zurolo E, Spliet WGM, Rijen PCV, Baayen JC, Gorter JA, et al. Evaluation of the innate and adaptive immunity in type I and type II focal cortical dysplasias. *Epilepsia*. 2010;51(9):1763–73.
73. Joubert B, Saint-Martin M, Noraz N, Picard G, Rogemond V, Ducray F, et al. Characterization of a Subtype of Autoimmune Encephalitis With Anti-Contactin-Associated Protein-like 2 Antibodies in the Cerebrospinal Fluid, Prominent Limbic Symptoms, and Seizures. *Jama Neurol*. 2016;73(9):1115.
74. Kabay SC, Tüzün E, Akdag G, Çetiner M, Ayas S, Karaman HIÖ, et al. Cerebrospinal Fluid and Serum Autoantibodies in Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsies: Case Series. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2022;000.
75. Kerling F, Blümcke I, Stefan H. Pitfalls in diagnosing limbic encephalitis – a case report. *Acta Neurol Scand*. 2008;118(5):339–42.
76. Kim HS, Vassilopoulos A, Wang RH, Lahusen T, Xiao Z, Xu X, et al. SIRT2 Maintains Genome Integrity and Suppresses Tumorigenesis through Regulating APC/C Activity. *Cancer Cell*. 2011;20(4):487–99.
77. Kim JE, Choi HC, Song HK, Jo SM, Kim DS, Choi SY, et al. Levetiracetam inhibits interleukin-1 β inflammatory responses in the hippocampus and piriform cortex of epileptic rats. *Neurosci Lett*. 2010;471(2):94–9.
78. Kothur K, Wienholt L, Mohammad SS, Tantsis EM, Pillai S, Britton PN, et al. Utility of CSF Cytokine/Chemokines as Markers of Active Intrathecal Inflammation: Comparison of Demyelinating, Anti-NMDAR and Enteroviral Encephalitis. *Plos One*. 2016;11(8):e0161656.
79. Kumar P, Chan DWS, Lim A, Paleja B, Ling S, Yun LL, et al. Pro-inflammatory, IL-17 pathways dominate the architecture of the immunome in pediatric refractory epilepsy. *Jci Insight*. 2019;4(8):e126337.

80. Lagarde S, Villeneuve N, Trébuchon A, Kaphan E, Lepine A, McGonigal A, et al. Anti-tumor necrosis factor alpha therapy (adalimumab) in Rasmussen's encephalitis: An open pilot study. *Epilepsia*. 2016;57(6):956–66.
81. Lai Q, Li Q, Li X, Wang H, Zhang W, Song X, et al. GluR3B Antibody Was a Biomarker for Drug-Resistant Epilepsy in Patients With Focal to Bilateral Tonic-Clonic Seizures. *Front Immunol*. 2022;13:838389.
82. Lalic T, Pettingill P, Vincent A, Capogna M. Human limbic encephalitis serum enhances hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal cell synaptic transmission. *Epilepsia*. 2011;52(1):121–31.
83. Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, et al. Antibodies to the GABAB receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurology*. 2010;9(1):67–76.
84. Lang B, Makuch M, Moloney T, Dettmann I, Mindorf S, Probst C, et al. Intracellular and non-neuronal targets of voltage-gated potassium channel complex antibodies. *J Neurol, Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(4):353.
85. Langenbruch L, Wiendl H, Groß C, Kovac S. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid (CSF) findings in seizures and epilepsy with and without autoimmune-associated disease. *Seizure*. 2021;91:233–43.
86. Leal B, Chaves J, Carvalho C, Rangel R, Santos A, Bettencourt A, et al. Brain expression of inflammatory mediators in Mesial Temporal Lobe Epilepsy patients. *J Neuroimmunol*. 2017;313:82–8.
87. Lee WJ, Lee HS, Kim DY, Lee HS, Moon J, Park KI, et al. Seronegative autoimmune encephalitis: clinical characteristics and factors associated with outcomes. *Brain*. 2022;145(10):3509–21.
88. Leontariti M, Avgeris M, Katsarou M, Drakoulis N, Siatouni A, Verentzioti A, et al. Circulating miR-146a and miR-134 in predicting drug-resistant epilepsy in patients with focal impaired awareness seizures. *Epilepsia*. 2020;61(5):959–70.
89. Levraut M, Bourg V, Capet N, Delourme A, Honnorat J, Thomas P, et al. Cerebrospinal Fluid IL-17A Could Predict Acute Disease Severity in Non-NMDA-Receptor Autoimmune Encephalitis. *Front Immunol*. 2021;12:673021.
90. Leypoldt F, Armangue T, Dalmau J. Autoimmune encephalopathies. *Ann Ny Acad Sci*. 2015a;1338(1):94–114.

91. Leypoldt F, Höftberger R, Titulaer MJ, Armangue T, Gresa-Arribas N, Jahn H, et al. Investigations on CXCL13 in Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis: A Potential Biomarker of Treatment Response. *Jama Neurol.* 2015b;72(2):180–6.
92. Li J, Li F. Hashimoto’s Encephalopathy and Seizure Disorders. *Front Neurol.* 2019;10:440.
93. Li Y, Tymchuk S, Barry J, Muppidi S, Le S. Antibody Prevalence in Epilepsy before Surgery (APES) in drug-resistant focal epilepsy. *Epilepsia.* 2021;62(3):720–8.
94. Liba Z, Kayserova J, Elisak M, Marusic P, Nohejlova H, Hanzalova J, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: the clinical course in light of the chemokine and cytokine levels in cerebrospinal fluid. *J Neuroinflamm.* 2016;13(1):55.
95. Lilleker JB, Biswas V, Mohanraj R. Glutamic acid decarboxylase (GAD) antibodies in epilepsy: Diagnostic yield and therapeutic implications. *Seizure.* 2014;23(8):598–602.
96. Lim J, Lee S, Moon J, Jun J, Kim T, Shin Y, et al. Development of the clinical assessment scale in autoimmune encephalitis. *Ann Neurol.* 2019;85(3):352–8.
97. Liu J, Liu L, Kang W, Peng G, Yu D, Ma Q, et al. Cytokines/Chemokines: Potential Biomarkers for Non-paraneoplastic Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis. *Front Neurol.* 2020;11:582296.
98. Mäkelä KM, Hietaharju A, Brander A, Peltola J. Clinical Management of Epilepsy With Glutamic Acid Decarboxylase Antibody Positivity: The Interplay Between Immunotherapy and Anti-epileptic Drugs. *Front Neurol.* 2018;9:579.
99. Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol.* 2010;67(4):470–8.
100. Maniscalco GT, Manzo V, Napolitano M, Ranieri A, Renna R, Servillo G, et al. Autoimmune encephalitis: A retrospective monocentric experience. *Mult Scler Relat Dis.* 2021;55:103191.
101. Mariotto S, Gajofatto A, Zuliani L, Zoccarato M, Gastaldi M, Franciotta D, et al. Serum and CSF neurofilament light chain levels in antibody-mediated encephalitis. *J Neurol.* 2019;266(7):1643–8.
102. Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med.* 2010;16(4):413–9.

103. Matricardi S, Casciato S, Bozzetti S, Mariotto S, Stabile A, Freri E, et al. Epileptic phenotypes in autoimmune encephalitis: from acute symptomatic seizures to autoimmune-associated epilepsy. *J Neurology Neurosurg Psychiatry*. 2022;93(11):1194–201.
104. McCracken L, Zhang J, Greene M, Crivaro A, Gonzalez J, Kamoun M, et al. Improving the antibody-based evaluation of autoimmune encephalitis. *Neurology Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2017;4(6):e404.
105. McKeon A, Martinez-Hernandez E, Lancaster E, Matsumoto JY, Harvey RJ, McEvoy KM, et al. Glycine Receptor Autoimmune Spectrum With Stiff-Man Syndrome Phenotype. *JAMA Neurol*. 2013;70(1):44–50.
106. Michael S, Waters P, Irani SR. Stop testing for autoantibodies to the VGKC-complex: only request LGI1 and CASPR2. *Pract Neurology*. 2020;20(5):377–84.
107. Muñoz-Lopetegi A, Bruijn MAAM de, Boukhrissi S, Bastiaansen AEM, Nagtzaam MMP, Hulsenboom ESP, et al. Neurologic syndromes related to anti-GAD65: Clinical and serologic response to treatment. *Neurology - Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2020;7(3):e696.
108. Najjar S, Pearlman D, Zagzag D, Devinsky O. Spontaneously Resolving Seronegative Autoimmune Limbic Encephalitis. *Cogn Behav Neurol*. 2011;24(2):99–105.
109. Nass RD, Akgün K, Dague KO, Elger CE, Reichmann H, Ziemssen T, et al. CSF and Serum Biomarkers of Cerebral Damage in Autoimmune Epilepsy. *Front Neurol*. 2021;12:647428.
110. Nissen MS, Ryding M, Nilsson AC, Madsen JS, Olsen DA, Halekoh U, et al. CSF-Neurofilament Light Chain Levels in NMDAR and LGI1 Encephalitis: A National Cohort Study. *Front Immunol*. 2021;12:719432.
111. Noe FM, Polascheck N, Frigerio F, Bankstahl M, Ravizza T, Marchini S, et al. Pharmacological blockade of IL-1 β /IL-1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2013;59:183–93.
112. Oby E, Janigro D. The Blood–Brain Barrier and Epilepsy. *Epilepsia*. 2006;47(11):1761–74.
113. O’Neill LAJ, Kaltschmidt C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*. 1997;20(6):252–8.
114. Pais TF, Szegő ÉM, Marques O, Miller-Fleming L, Antas P, Guerreiro P, et al. The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation. *Embo J*. 2013;32(19):2603–16.

115. Pardo CA, Vining EPG, Guo L, Skolasky RL, Carson BS, Freeman JM. The Pathology of Rasmussen Syndrome: Stages of Cortical Involvement and Neuropathological Studies in 45 Hemispherectomies. *Epilepsia*. 2004;45(5):516–26.
116. Picot M, Baldy-Moulinier M, Daurès J, Dujols P, Crespel A. The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: A population-based study in a Western European country. *Epilepsia*. 2008;49(7):1230–8.
117. Pillai SC, Mohammad SS, Hachohen Y, Tantsis E, Prelog K, Barnes EH, et al. Postencephalitic epilepsy and drug-resistant epilepsy after infectious and antibody-associated encephalitis in childhood: Clinical and etiologic risk factors. *Epilepsia*. 2016;57(1):e7–11.
118. Rada A, Birnbacher R, Gobbi C, Kurthen M, Ludolph A, Naumann M, et al. Seizures associated with antibodies against cell surface antigens are acute symptomatic and not indicative of epilepsy: insights from long-term data. *J Neurol*. 2020;1–11.
119. Rasmussen T, Olszewski J, Lloyd-Smith D. Focal seizures due to chronic localized encephalitis. *Neurology*. 1958;8(6):435–435.
120. Ravizza T, Boer K, Redeker S, Spliet WGM, Rijen PC van, Troost D, et al. The IL-1beta system in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neurobiol Dis*. 2006;24(1):128–43.
121. Ravizza T, Terrone G, Salamone A, Frigerio F, Balosso S, Antoine DJ, et al. High Mobility Group Box 1 is a novel pathogenic factor and a mechanistic biomarker for epilepsy. *Brain Behav Immun*. 2018;72:14–21.
122. Reindl M, Schanda K, Woodhall M, Tea F, Ramanathan S, Sagen J, et al. International multicenter examination of MOG antibody assays. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2020;7(2):e674.
123. Ricken G, Schwaiger C, Simoni DD, Pichler V, Lang J, Glatter S, et al. Detection Methods for Autoantibodies in Suspected Autoimmune Encephalitis. *Front Neurol*. 2018;9:841.
124. Rogers S, Andrews P, Gahring L, Whisenand T, Cauley K, Crain B, et al. Autoantibodies to glutamate receptor GluR3 in Rasmussen's encephalitis. *Science*. 1994;265(5172):648–51.
125. Sanchez CV, Theel E, Binnicker M, Toledano M, McKeon A. Autoimmune Encephalitis After SARS-CoV-2 Infection: Case Frequency, Findings, and Outcomes. *Neurology*. 2021;97(23):e2262–8.

126. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512–21.
127. Schmitt SE, Pargeon K, Frechette ES, Hirsch LJ, Dalmau J, Friedman D. Extreme delta brush. *Neurology*. 2012;79(11):1094–100.
128. Schwab N, Bien CG, Waschbisch A, Becker A, Vince GH, Dornmair K, et al. CD8+ T-cell clones dominate brain infiltrates in Rasmussen encephalitis and persist in the periphery. *Brain*. 2009;132(5):1236–46.
129. Shen C, Fang G, Yang F, Cai M, Zheng Y, Fang W, et al. Seizures and risk of epilepsy in anti-NMDAR, anti-LGI1, and anti-GABABR encephalitis. *Ann Clin Transl Neur*. 2020;7(8):1392–9.
130. Sonderen A van, Ariño H, Petit-Pedrol M, Leypoldt F, Körtvélyessy P, Wandinger KP, et al. The clinical spectrum of Caspr2 antibody–associated disease. *Neurology*. 2016a;87(5):521–8.
131. Sonderen A van, Schreurs MWJ, Bruijn MAAM de, Boukhrissi S, Nagtzaam MMP, Hulsenboom ESP, et al. The relevance of VGKC positivity in the absence of LGI1 and Caspr2 antibodies. *Neurology*. 2016b;86(18):1692–9.
132. Sonderen A van, Thijs RD, Coenders EC, Jiskoot LC, Sanchez E, Bruijn MAAM de, et al. Anti-LGI1 encephalitis. *Neurology*. 2016c;87(14):1449–56.
133. Steriade C, Britton J, Dale RC, Gadoth A, Irani SR, Linnoila J, et al. Acute symptomatic seizures secondary to autoimmune encephalitis and autoimmune-associated epilepsy: Conceptual definitions. *Epilepsia*. 2020a;61(7):1341–51.
134. Steriade C, Jehi L, Krishnan B, Morita-Sherman M, Moosa ANV, Hantus S, et al. Perisylvian vulnerability to postencephalitic epilepsy. *Clin Neurophysiol*. 2020b;131(8):1702–10.
135. Steriade C, Moosa ANV, Hantus S, Prayson RA, Alexopoulos A, Rae-Grant A. Electroclinical features of seizures associated with autoimmune encephalitis. *Seizure*. 2018;60:198–204.
136. Stienen MN, Haghikia A, Dambach H, Thöne J, Wiemann M, Gold R, et al. Anti-inflammatory effects of the anticonvulsant drug levetiracetam on electrophysiological properties of astroglia are mediated via TGFβ1 regulation: Levetiracetam on astroglial physiological properties. *Brit J Pharmacol*. 2010;162(2):491–507.

137. Storstein A, Monstad SE, Haugen M, Mazengia K, Veltman D, Lohndal E, et al. Onconeural antibodies: Improved detection and clinical correlations. *J Neuroimmunol.* 2011;232(1–2):166–70.
138. Swieten JC van, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, Gijn J van. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke.* 2018;19(5):604–7.
139. Tan TH, Perucca P, O’Brien TJ, Kwan P, Monif M. Inflammation, ictogenesis, and epileptogenesis: An exploration through human disease. *Epilepsia.* 2021;62(2):303–24.
140. Titulaer MJ, Höftberger R, Iizuka T, Leypoldt F, McCracken L, Cellucci T, et al. Overlapping demyelinating syndromes and anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Ann Neurol.* 2014;75(3):411–28.
141. Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangué T, Glaser C, Iizuka T, et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurology.* 2013;12(2):157–65.
142. Toledano M, Britton JW, McKeon A, Shin C, Lennon VA, Quek AML, et al. Utility of an immunotherapy trial in evaluating patients with presumed autoimmune epilepsy. *Neurology.* 2014;82(18):1578–86.
143. Tröscher AR, Mair KM, Juan LV de, Köck U, Steinmaurer A, Baier H, et al. Temporal lobe epilepsy with GAD antibodies: neurons killed by T cells not by complement membrane attack complex. *Brain J Neurology.* 2022
144. Valencia-Sanchez C, Pittock SJ, Mead-Harvey C, Dubey D, Flanagan EP, Lopez-Chiriboga S, et al. Brain dysfunction and thyroid antibodies: autoimmune diagnosis and misdiagnosis. *Brain Commun.* 2021;3(2):fcaa233.
145. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2011a;7(1):31–40.
146. Vezzani A, Granata T. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. *Epilepsia.* 2005;46(11):1724–43.
147. Vezzani A, Ravizza T, Bedner P, Aronica E, Steinhäuser C, Boison D. Astrocytes in the initiation and progression of epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2022;18(12):707–22.
148. Vliet EA, Aronica E, Vezzani A, Ravizza T. Review: Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. *Neuropath Appl Neuro.* 2018;44(1):91–111.

149. Walker LE, Sills GJ, Jorgensen A, Alapirtti T, Peltola J, Brodie MJ, et al. High-mobility group box 1 as a predictive biomarker for drug-resistant epilepsy: A proof-of-concept study. *Epilepsia*. 2022;63(1):e1–6.
150. Walker MC. Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. *Semin Neurol*. 2015;35(03):193–200.
151. Wang Y, Yang J, Hong T, Chen X, Cui L. SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. *Ageing Res Rev*. 2019;55:100961.
152. Wang ZI, Alexopoulos AV, Jones SE, Jaisani Z, Najm IM, Prayson RA. The pathology of magnetic-resonance-imaging-negative epilepsy. *Modern Pathol*. 2013;26(8):1051–8.
153. Wiendl H, Bien CG, Bernasconi P, Fleckenstein B, Elger CE, Dichgans J, et al. GluR3 antibodies; Prevalence in focal epilepsy but no specificity for Rasmussen’s encephalitis. *Neurology*. 2001;57(8):1511–4.
154. Wieser HG, Blume WT, Fish D, Goldensohn E, Hufnagel A, et al. Proposal for a New Classification of Outcome with Respect to Epileptic Seizures Following Epilepsy Surgery. *Epilepsia*. 2001;42(2):282–6.
155. Wilmschurst JM, Gaillard WD, Vinayan KP, Tsuchida TN, Plouin P, Bogaert PV, et al. Summary of recommendations for the management of infantile seizures: Task Force Report for the ILAE Commission of Pediatrics. *Epilepsia*. 2015;56(8):1185–97.
156. Wright SK, Rosch RE, Wilson MA, Upadhyya MA, Dhangar DR, Clarke-Bland C, et al. Multimodal electrophysiological analyses reveal that reduced synaptic excitatory neurotransmission underlies seizures in a model of NMDAR antibody-mediated encephalitis. *Commun Biology*. 2021;4(1):1106.
157. Zeng C, Chen L, Chen B, Cai Y, Li P, Yan L, et al. Th17 cells were recruited and accumulated in the cerebrospinal fluid and correlated with the poor prognosis of anti-NMDAR encephalitis. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2018;50(12):1266–73.

11. Přehled publikační činnosti

1. Původní vědecké práce, které jsou podkladem disertační práce:

a) s IF

de Bruijn M, Bastiaansen AE, **Mojziso**va H, van Sonderen A, Thijs R, Majoie M, Rouhl R, van Asseldonk T; van Donselaar C, Wirtz P, Vinke A, van Coevorden-Hameete M, de Vries JM, Muñoz Lopetegi A, Roozenbeek B, Elisak M, Marusic P, Leypoldt F, Nagtzaam M, Hulsenboom E, de Graaff E, Schreurs M, Sillevis Smitt P, Titulaer MJ. The Antibodies Contributing to focal Epilepsy Signs and symptoms (ACES) score. *Annals of Neurology*. 2021. IF (2021): 11.274

Mojzisova H, Elisak M, Krysl D, Hanzalova J, Kalina A, Petrzalka M, Dolezalova I, Cervenka M, Cvikova B, Lesko R, Sroubek J, Sochurkova D, Hemza J, Brichtova E, Dargvainiene J, Vojtech Z, Brazdil M, Wandinger KP, Leypoldt F, Marusic P. Low prevalence of neural autoantibodies in perioperative CSF samples of epilepsy surgery patients - a multicenter prospective study. *Epilepsia*. 2024 - currently in review (minor revision). IF (2022): 5.6

Stevens-Jones O, **Mojziso**va H, Elisak M, Constantinescu R, Hanzalova J, Axelsson M, Krysl D. Paraneoplastic or not? Sirtuin 2 in anti-N-methyl-d -aspartate receptor encephalitis. *Eur J Neurol*. 2023. IF (2023): 5.1

Mojžišová H, Krýsl D, Hanzalová J, Dargvainiene J, Wandinger KP, Leypoldt F, Elišák M, Marusič P. Antibody-Negative Autoimmune Encephalitis: A Single-Center Retrospective Analysis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2023. IF (2022): 8.8

b) bez IF: 0

2. Původní vědecké práce, které souvisí s tématem disertační práce, ale nejsou jejím podkladem:

a) s IF:

Mojžišová H, Elišák M, Hanzalová J, Petrzalka M, Marusič P. Autoimunitní encefalitidy s negativitou neurálních protilátek – klinické charakteristiky a možnosti detekce protilátek. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* 2020. IF (2020): 0,35

Tietz A, Angstwurm K, Baumgartner T, Doppler K, Elišák M, Franke A, Geis Ch/Wickel J, Golombeck K, Handreka R, Kaiser R, Kaufmann M, Kraft A, Krämer M, Lewerenz J, Lieb W, Malter M/Madlener M, Melzer N, **Mojžišova H**, Möller P, Pfefferkorn T, Rostásy K, Schnegelsberg M, Siebenbrodt K, Sühs K-W, Thaler FS, Wandinger KP, Leypoldt F, Kuhlenbäumer G. Genome-wide association study identifies two new loci associated with anti-NMDAR encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021. IF (2021) 11,360

b) bez IF:

Mojžišová H, Elišák M, Hanzalová J, Krýsl D, Marusič P. Autoimunitní meningoencefalitida asociovaná s anti-GFAP protilátkami - kazuistika. *Neurol. praxi*. 2023;24(2):155-157.

Mojžišová H, Elišák Martin, Ph.D., Marusič Petr. Laboratorní biomarkery - antineurální protilátky u autoimunitních onemocnění CNS. *Neurol. praxi*. 2023;24(3):200-205.

3. Původní vědecké práce in extenso bez vztahu k tématu disertace.

a) s IF

Petržalka M, Meluzínová E, **Mojžišová H**, Libertínová J, Ročková P, Němá E, et al. Effectiveness of natalizumab extended interval dosing in multiple sclerosis patients. *Cesk Slov Neurol N*. 2020. IF (2020): 0,35

Libertinova J, Meluzinova E, Nema E, Rockova P, Elisak M, Petrzalka M, **Mojzisova H**, Hammer J, Tomek A, Marusic P. Elevated D-dimer as an immediate response to alemtuzumab treatment. *Multiple Sclerosis Journal* 2020. IF (2020): 6,312

Petržalka M, Meluzínová E, Libertínová J, **Mojžišová H**, Hanzalová J, Ročková P, Elišák M, Kmetonyová S, Šanda J, Sobek O, Marusič P. IL-2, IL-6 and chitinase 3-like 2 might predict early relapse activity in multiple sclerosis. *PLOS ONE*. 2021. IF (2021): 3,752

b) bez IF

Mojžišová H, Elišák M. Profil pacienta se sekundárně progresivní RS - jakého pacienta směřovat do centra. *Neurol. praxi* 2021; 22(5): 398-402.

Elišák M, **Mojžišová H**, Tomek A. Autoimunitní onemocnění s dominujícím postižením bílé hmoty mozku. *Neurol. praxi*. 2023;24(3):180-186.

4. Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních.

11/2019 - ústní prezentace na téma “Autoimunitní encefalitidy s negativitou neurálních protilátek”, Československý neurologický kongres 2019, Praha

5/2022 - ústní prezentace na téma “GFAP astrocytopatie v diferenciální diagnóze aseptické meningoencefalitidy”, 20. Jedličkovy neuroimunologické a likvorologické dny, Praha

6/2023 - ústní prezentace na téma “Autoimunitní encefalitidy s negativitou neurálních auto-protilátek” European Academy of Neurology Congress, Budapešť, Maďarsko

12. Seznam příloh

de Bruijn M, Bastiaansen AE, **Mojziso**va H, van Sonderen A, Thijs R, Majoie M, Rouhl R, van Asseldonk T; van Donselaar C, Wirtz P, Vinke A, van Coevorden-Hameete M, de Vries JM, Muñoz Lopetegi A, Roozenbeek B, Elisak M, Marusic P, Leypoldt F, Nagtzaam M, Hulsenboom E, de Graaff E, Schreurs M, Silleviss Smitt P, Titulaer MJ. The Antibodies Contributing to focal Epilepsy Signs and symptoms (ACES) score. *Annals of Neurology*. 2021.

Mojzisova H, Elisak M, Krysl D, Hanzalova J, Kalina A, Petrzalka M, Dolezalova I, Cervenka M, Cvickova B, Lesko R, Sroubek J, Sochurkova D, Hemza J, Brichtova E, Dargvainiene J, Vojtech Z, Brazdil M, Wandinger KP, Leypoldt F, Marusic P. Low prevalence of neural autoantibodies in perioperative CSF samples of epilepsy surgery patients - a multicenter prospective study. *Epilepsia*. 2024 - currently in review (minor review)

Stevens-Jones O, **Mojziso**va H, Elisak M, Constantinescu R, Hanzalova J, Axelsson M, Krysl D. Paraneoplastic or not? Sirtuin 2 in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Eur J Neurol*. 2023.

Mojžišová H, Krýsl D, Hanzalová J, Dargvainiene J, Wandinger KP, Leypoldt F, Elišák M, Marusič P. Antibody-Negative Autoimmune Encephalitis: A Single-Center Retrospective Analysis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2023.