

Д-р Карен Лорис Мануелян

**СУБЕПИДЕРМАЛНИ АВТОИМУННИ БУЛОЗНИ
ДЕРМАТОЗИ С ЛИНЕАРНО ОТЛАГАНЕ НА IgG
ПО БАЗАЛНАТА МЕМБРАНА:
КЛИНИЧНИ, ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНИ И
ИМУНОСЕРОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: Доц. Снежина Василева, д.м.

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ: Д-р Косара Дреновска, д.м.

НАУЧНО ЖУРИ:

Проф. д-р Любка Митева, д.м.

Проф. д-р Невена Борова, д.м.н.

Проф. д-р Димитър Господинов, д.м.н.

Доц. д-р Евгения Христатијева, д.м.

Доц. д-р Снежина Василева, д.м.

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ:
ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ

СОФИЯ, 2014 г.

Дисертационният труд е написан на 147 стандартни печатни страници и е онагледен с 24 фигури, 32 таблици и 1 приложение. Библиографията включва 213 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрения съвет на Катедрата по дерматология и венерология при Медицински Факултет, Медицински Университет – София. и е насочен за защита към Катедра по дерматология и венерология, Медицински факултет, Медицински университет, София.

Публичната защита ще се състои на 04 юни 2014 г. в аудиторията на Катедра по дерматология и венерология, Медицински факултет, Медицински университет – София, бул. “Св. Г. Софийски” 1, гр. София.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Катедра по дерматология и венерология, Медицински факултет, Медицински университет – София, бул. “Св. Г. Софийски” 1, гр. София.

Съдържание:

Често използвани съкращения (4 стр.)

1. Въведение (5 стр.)
2. Цел и задачи (7 стр.)
3. Материал и методи (8 стр.)
 - 3.1 Материал (8 стр.)
 - 3.2 Клинични методи (10 стр.)
 - 3.3 Лабораторни методи (11 стр.)
4. Резултати (19 стр.)
 - 4.1 Епидемиологично проучване (19 стр.)
 - 4.2 Клинични проучвания (21 стр.)
 - 4.3 Лабораторни изследвания (25 стр.)
 - 4.4 Софтуерна разработка (35 стр.)
 - 4.5 Качество на живот при пациенти с пемфигоид (36 стр.)
5. Обсъждане (38 стр.)
 - 5.1 Епидемиологичен анализ (38 стр.)
 - 5.2 Клинични проучвания (39 стр.)
 - 5.3 Лабораторни изследвания (40 стр.)
 - 5.4 Клинико-лабораторни корелации (49 стр.)
 - 5.5 Паранеопластичен булозен пемфигоид – проучване на специфичността на автоантителата чрез Western blot и ELISA BP180-NC16A (49 стр.)
 - 5.7 Качество на живот при пациенти с пемфигоид (50 стр.)
6. Заключение (51 стр.)
7. Изводи (52 стр.)
8. Приноси (54 стр.)
9. Публикации и участия по темата на дисертацията (56 стр.)

Често използвани съкращения:

АИБД	Автоимунни булозни дерматози
БМ	Базална мембрана
ДЕГ	Дермо-епидермална граница
ДИФ	Директна имунофлуоресценция
ИИФ	Индиректна имунофлуоресценция
ИИФ SSS	ИИФ върху сепарирана кожа (salt-split skin)
ККВБ	Клиника по кожни и венерически болести
сАИБД	Субепидермални автоимунни булозни дерматози
BP	Булозен пемфигоид (Bullous pemphigoid)
BPAG1	Антиген 1 на булозния пемфигоид (Bullous pemphigoid antigen 1)
BPAG2	Антиген 2 на булозния пемфигоид (Bullous pemphigoid antigen 2)
BSLE	Булозен системен lupus erythematosus (Bullous systemic lupus erythematosus)
Col VII	Колаген VII (Collagen VII)
DLQI	Дерматологичен индекс за качество на живот (Dermatology Life Quality Index)
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
ELISA	Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (Enzyme-linked immunosorbent assay)
LAD	Линеарна IgA дерматоза (Linear IgA dermatosis)
LPP	Lichen planus pemphigoides
MMP	Пемфигоид на мукозните мембрани (Mucous membrane pemphigoid)
PG	Пемфигоид на бременните (Pemphigoid gestationis)
PV	Pemphigus vulgaris
WB	Имуноблот (Western blot)

1. Въведение

Понятието субепидермални автоимунни булозни дерматози (сАИБД) обединява хетерогенна група от придобити заболявания, медирани от автоантитела срещу антигени в състава на базално-мембранната зона. В резултат на тяхното действие последва загуба на основни структурни връзки между епидермиса и дермата и формиране на субепидермален мехур. Таргетните антигени при различните заболявания от тази група са локализиращи в хемидесмосомите (булозен пемфигоид), lamina lucida (пемфигоид на мукозните мембрани, линейна IgA дерматоза) или закотвящите фибрили (epidermolysis bullosa acquisita). Тези редки страдания се характеризират с тежко протичане, хронично-рецидивиращ ход и често неблагоприятна прогноза по отношение на преживяемостта и качеството на живот.

В реалната клинична среда, уточняването на диагнозата при пациенти с булозни ерупции, особено тези с придобити автоимунни булозни дерматози, често се забавя с месеци или дори години след появата на първите симптоми. Субепидермалните автоимунни булозни дерматози показват редица сходства помежду си, а някои клинични форми не могат да бъдат разграничени без провеждане на специализирани лабораторни изследвания. Така например, генерализираната форма на epidermolysis bullosa acquisita и линейната IgA дерматоза, могат да наподобят класическия клиничен фенотип на булозния пемфигоид, но имат различна прогноза, показват характерни асоциации и изискват специфичен терапевтичен подход.

Рутинните хистологични и имунофлуоресцентни методи могат да разрешат само част от диференциално диагностичните проблеми, разкривайки настъпилите в епидермиса имунопатологични процеси и видовата специфичност на патогенните антитела, но се оказват недостатъчни за изясняване на точните патогенетични механизми и специфичните таргетни антигени при тези заболявания.

През последните години разбирането за автоимунните булозни дерматози претърпя бурно развитие, паралелно с разработването на нови по-прецизни диагностични методи като ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), имуноблот, имунопреципитация и др. Разкриването на разнообразни таргетни антигени, към които са насочени патогенните автоантитела, доведе не само до по-добри възможности за отдиференциране между отделните заболявания, а и до въвеждане на нови нозологични единици като р200-пемфигоид, р105-пемфигоид и анти-ламнин-332 пемфигоид.

Еволюцията в представите за автоимунните булозни дерматози и разширяването на диагностичните възможности обуславят интереса ни към тези заболявания и са предпоставка за задълбочени проучвания върху патогенетичните механизми и клинично-морфологичните особености в хода на протичане на автоимунните процеси. Увеличаването на познанията ни в тази сфера е важна предпоставка за утвърждаване на информиран и професионален подход в помощ на пациентите.

2. Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат епидемиологията, клиничко-морфологичния и имунологичен спектър на субепидермалните автоимунни булозни дерматози с отлагане на IgG по хода на базалната мембрана в българската популация и чрез приложението на съвременни диагностични методи за установяване на специфичност на антителата, да се утвърди работещ алгоритъм за тяхното диагностициране.

За постигане на тази цел са разработени следните задачи:

- Задача 1:** Проучване на епидемиологичните, демографски и клиничко-морфологични особености при пациенти с линейно отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана.
- Задача 2:** Проучване на специфичността на антителата при различните видове пемфигоид, посредством приложение на съвременни имунологични методи.
- Задача 3:** Изследване на корелацията между клинични белези, имуофлуоресцентни и имуносерологични находки, съгласно съвременната нозологична номенклатура при болни с пемфигоид.
- Задача 4:** Създаване на алгоритъм за диагностика на сАИБД, интегриращ класическите и нови диагностични техники.
- Задача 5:** Проучване на специфичността на автоантителата при паранеопластичен булозен пемфигоид.
- Задача 6:** Изследване на корелацията между клинични белези и параклинични белези като периферна еозинофилия и нива на тотален серумен IgE.
- Задача 7:** Проучване на качеството на живот при пациенти с пемфигоид.

3. Материал и методи

3.1 Материал

Изследваната група се състои от 112 пациенти, диагностицирани в Клиниката по кожни и венерически болести (ККВБ) към Александровска болница, София, през периода 2010-2013 г. Критерий за включване е наличието на линейно отлагане на IgG и/или C3 по хода на базалната мембрана при директна имунофлуоресценция. От групата са изключени пациентите, при които отлагането на антитела от клас IgA е по-изразено от това на антитела от клас IgG. Включени са пациенти с установен IgA по БМ, в случаите, когато се наблюдава по-интензивно отлагане на IgG. В изследването на паранеопластичен пемфигоид са включени серуми на пациенти, хоспитализирани в клиниката преди 2010 г., които не са част от основната група от 112 болни.

3.1.1 Клинико-морфологични проучвания

Клинико-морфологичните проучвания обхващат 92 пациенти (58 жени и 34 мъже), хоспитализирани в ККВБ. Касае се за пациенти с булозно-ерозивни или други промени, съвместими клинично със сАИБД, с различна степен на засягане на кожата и/или лигавичните повърхности.

Останалите 20 болни са пациенти на други дерматологични звена в страната, откъдето е изпращан биопсичен материал за провеждане на директна имунофлуоресценция. При тези пациенти клинико-морфологичният анализ се базира на информацията от придружаващата документация.

При 40 пациенти с булозен пемфигоид е попълнен въпросник за определяне на дерматологичен индекс за качество на живот (DLQI).

3.1.2 Лабораторни проучвания

Таблица 1. Проведени лабораторни и клинични проучвания

Метод	Брой пациенти	Брой изследвания
Директна имунофлуоресценция	112	136
Хистологично изследване	95	95
Клинико-морфологичен анализ	92	92
ИИФ върху сепарирана кожа	89	165
ИИФ върху хранопровод	79	125
БИОCHIP	75	75
ELISA BP180-NC16A	49	49
ELISA тотален IgE	46	75
DLQI	40	40
ДИФ върху сепарирана кожа	30	30
Имуноблот	14	14
БИОCHIP Col VII	13	13

При всички хоспитализирани пациенти (95 на брой), е проведено рутинно хистологично изследване като задължителна диагностична процедура. Изследването е извършено в отделение по дерматохистопатология и имунохистохимия към ККВБ.

В Направление за имунофлуоресцентна диагностика са изследвани 136 директни имунофлуоресценции (112 пациенти), изработени по рутинна методика. При 24 пациенти е проведено повече от едно изследване. При 12 пациенти с негативна индиректна имунофлуоресценция или липса на серум (пациенти, хоспитализирани в други клиници) е проведена директна имунофлуоресценция върху сепарирана кожа.

Проведени са общо 125 рутинни индиректни имунофлуоресценции (79 пациенти) върху субстрат от хранопровод. При 98 от тях изследваният материал е серум, а при 27 мехурна течност. При 89 пациенти е проведена ИИФ на сепарирана с 1 М NaCl кожа.

Чрез BP180-NC16A ELISA са изследвани 49 пациенти.

Чрез ELISA е изследван тотален IgE в 75 серума на 46 пациенти.

Чрез ИИФ върху комбинирана ВІОСНІР мозайка са изследвани 76 серума на 75 пациенти. Чрез ИИФ върху ВІОСНІР с трансфектирани клетки са изследвани 13 серума за наличие на специфични антитела срещу колаген тип VII.

Чрез имуноблот за специфичност на антителата са изследвани 14 пациенти.

3.2 Клинични методи

3.2.1 Метод за анализ на анамнестичните данни и клиничната картина.

Използван е предварително структуриран въпросник, който се попълва от лекаря и се състои от три части. Първата включва паспортни данни – име, дата и място на раждане, ръст и тегло на пациента. Във втората се отбелязват анамнестични данни относно ход на протичане на заболяването, субективни оплаквания, придружаващи заболявания, прием на медикаменти и фамилна анамнеза. Третата част отчита морфологичните особености на заболяването, включително локализация на болестните изменения, засягане на устна, очна, генитална и УНГ лигавици, вид, брой и разположение на патологичните лезии.

Проучването е проведено с информираното съгласие на интервюираните пациенти.

3.2.2 Документален метод.

Извършено е набиране на първична информация чрез анализ на документи, включващи история на заболяването, епикриза, фиш за имунофлуоресцентно изследване и предоставена от пациента медицинска документация.

3.2.3 Метод за анализ и оценка на влиянието на заболяването върху качеството на живот – въпросник DLQI – Dermatology Life Quality Index (AY Finlay, GK Khan).

Дерматологичният индекс за качеството на живот е предназначен за употреба при пациенти над 16-годишна възраст. Попълването се извършва от самия болен, който отговаря на 10 въпроса. Използван е официалният превод на въпросника на български език.

Всеки въпрос носи определен брой точки. DLQI се изчислява чрез сумиране на резултатите на всеки въпрос, което води до максимум 30 и минимум 0. Колкото по-висок е резултатът, толкова по-нарушено е качеството на живот. DLQI може също да бъде показан като процент от максималния резултат от 30 точки.

3.2.4 Метод за диагностика на булозния пемфигоид по четири клинични критерии (L Vaillant et al.).

Използвани са четири валидирани клинични критерии за диагностика на булозния пемфигоид, включващи липса на атрофични цикатрикси, липса на засягане в областта на главата и шията, липса на лигавично засягане и възраст над 70 години. Пациенти, при които се открива линейно отлагане на IgG по базалната мембрана и които покриват 3 от 4 критерия се определят като клинично типичен булозен пемфигоид.

3.3 Лабораторни методи

3.3.1 Метод за хистологично изследване.

Хистологичното изследване е провеждано рутинно в лабораторията по хистология към ККВБ. Материалът за

изследване се получава от рѣба на свежа кожна или лигавична лезия. При стерилни условия, след локална подкожна анестезия (lidocain) се извършва пѣнч-биопсия (d=4mm). След фиксиране във формалин (40% разтвор на формалфехид), препаратите за изследване се изработват по стандартна техника чрез включване в парафин, нарязване на микротом, фиксиране върху предметни стѣкла и оцветяване с хематоксилин-еозин. Резултатите се отчитат при наблюдение под светлинен микроскоп на увеличение: x10, x20, x40.

3.3.2 Метод за идентифициране на имунореактанти, отложени *in vivo* в тѣканите - директна имунофлуоресценция (ДИФ).

ДИФ е провеждана рутинно върху биопсия от перилезионален кожен или лигавичен участѣк в близост до свежа лезия. Биопсията се получава при условия, идентични с описаните за хистологично изследване. Материалът се обработва до 48h след получаването. Изработват се срези с дебелина 5 μ върху предметни стѣкла. Стѣклата се инкубират със заешки античовешки IgG, IgA, IgM, C3 серуми и нормален кози античовешки IgG.

Отчитането на резултатите се извършва не по-късно от 24h след приготвянето на препаратите, в тѣмно помещение, с флуоресцентен микроскоп (Olympus) на увеличение x10, x20, x40 или x100 (имерсия).

3.3.3 Метод за откриване на автоантитела в серум и мехурна течност - индиректна имунофлуоресценция (ИИФ).

Изследване на серум. Венозна кръв без антикоагулант се центрофугира за 5min (центрофуга T 30, Janetzki, 200 g, 1000 оборота).

Качествено изследване (ИИФ). За качествено изследване серума на пациента се разрежда непосредствено преди провеждане на техниката в съотношение 1:20 с PBS.

Количествено изследване (ИИФ). За определяне титъра на антителата непосредствено преди провеждане на техниката се правят падащи разреждания на серума в съотношение 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, рядко до 1:1280.

Серумите са изследвани върху следните субстрати:

Субстрат от хранопровод. Субстратът се получава от трупен донор при транспортиране на материала във физиологичен разтвор. Със скалпел се оформят парченца с размер 5x5 mm, които се включват в tissue-embedding medium (Miles) и от тях се приготвят криостатни срези (криостат Leika), подобно на биопсичния материал за ДИФ.

Субстрат от сепарирана с 1 M NaCl кожа. За субстрат се използва нормална човешка кожа, получена при мастектомия или други хирургични интервенции. Кожата се нарязва на парченца с диаметър приблизително 0,5 cm, които се инкубират в 5 ml разтвор на NaCl. След инкубацията, върху по върхността на кожата се извършва леко триене, при което с фин инструмент епидермисът се отделя от дермата. Така приготвеният субстрат се замразява по рутинния метод и се подготвят криостатни срези с дебелина 4-6µm.

Подготвените стъкла се накапват със серума на болния и се инкубират за 30 min на тъмно във влажна камера, следва измиване в PBS, инкубиране с FITC-конюгиран античовешки анти-IgG, отново двукратно измиване в PBS и монтиране на стъклата в буфериран глицерин по начина, описан за ДИФ.

При всички случаи на ИИФ изследваният серум се сравнява със сигурно положителна и сигурно отрицателна контрола, изследвани паралелно.

Резултатите се считат до 24 h след приготвянето на препаратите, на тъмно, с флуоресцентен микроскоп (Olympus) на увеличение x10, x20, x40 или x100 (имерсия).

Изследване на мехурна течност. Материалът се получава при стерилни условия от здрава мехурна лезия, която се разрушава чрез убождане с игла. Мехурната течност се събира с

пипета и изследва при същите условия и върху същите субстрати, както серума.

Съхранение на материалите. Отделеният серум се отпипетира в erpendorff-епруветки и в случай, че не се изследва незабавно, се съхранява при -20°C . Избягва се неколкочратно замразяване и размразяване поради опасност от загуба на активността на антителата. Серумите на всички изследвани болни се съхраняват в продължение на няколко години при -70°C . Субстратите се съхраняват върху предметните стъкла при -30°C .

3.3.4 Метод за изследване на антитела срещу BP180 (NC 16A) в серум - ELISA.

Циркулиращи антитела срещу BP180 се изследват в серума чрез ELISA метод, който използва като антиген бактериален рекомбинантен протеин BP180-NC16A (NC - noncollagenous 16A) (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, Japan и Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany).

Серумите за изследване предварително се подготвят, като се разреждат с комерсиален разтворител, съдържащ се в кита. Следва инкубация с антигена, натоварен в кладенчетата на плаките. След четирикратни измивания с т. нар. разтвор за измиване следва инкубация за 1h с конюгат – фабрично произведено моноклонално анти-IgG човешко антитяло, конюгирано с пероксидаза. След нови четирикратни измивания в кладенчетата на плаката се накапва субстрат на пероксидазата, с който се инкубира 30min. Реакцията се спира със сярна киселина. За положителна и отрицателна контрола се използват фабрично произведени калибратори. След спиране на получената колориметрична реакция, резултатите се отчитат на спектрофотометър (ELISA-reader) с дължина на вълната 450 nm. Измерва се оптичната плътност (DO – optical density). Получените стойности се преизчисляват за всяка проба (серум) с

помощта на специална формула, предоставена от производителя, която дава краен резултат в мерни единици U/ml.

Техниката при кита на Euroimmun не се отличава съществено от гореописаната. Инкубационните периоди са по кратки (съответно 30 мин, 30 мин и 15 мин) и се използват 3 калибратора.

Граничната стойност за положителните резултати при кита на Medical & Biological Laboratories Co. е 9 U/ml, като индексите < 9 U/ml граница се считат за негативни, съгласно препоръката на производителя. При Euroimmun граничната стойност е 20 U/ml.

3.3.5 Метод за изследване на антитела при автоимунни булозни дерматози – Dsg1, Dsg3, SSS, BP230, BP180, хранопровод, Col VII; BIOCHIP.

Комерсиалният тестови кит (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany) е създаден специално за *in vitro* определяне на човешки антитела в серум или плазма. Комбинации от различни субстрати се инкубират с разреден серум. При положителна реакция, специфични антитела от клас IgA, IgG и IgM се свързват с антигените. По време на втората стъпка, свързаните антитела се оцветяват с флуоресцентно маркирани анти-човешки антитела.

Пригответените за изследване серуми се разреждат 1:10 с PBS-Tween, наличен в тестовия кит. Върху всяко реакционно поле на реагентната табла се накапва разреден серум. Инкубацията започва, след като върху таблата се постави предметното стъкло на биочипа. Процесът се извършва на стайна температура и продължава 30 min, след което биочипът се измива с PBS-Tween. Върху почистена реагентна табла се накапва флуоресцентно маркиран анти-човешки глобулин. Следва нова инкубация с предметното стъкло на биочипа за 30 min и измиване с PBS-Tween. Биочипът се поставя върху покривно стъкло, предварително обработено с embedding

medium, и се отчита на флуоресцентен микроскоп. Резултатите се сравняват с една отрицателна и две положителни контроли.

3.3.6 Метод за изследване на тотален IgE в серум и мехурна течност - ELISA.

Стойностите на тотален IgE в серум и мехурна течност се изследват чрез ELISA метод, който използва поликлонални антитела срещу човешки IgE (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany).

Техниката е подобна гореошосаната при изследване на антитела срещу BP180 с ELISA.

Граничната стойност за положителните резултати зависи от възрастта на пациента, като за лица над 16 години е 100 IU/ml. Индексите < 100 IU/ml граница се считат за негативни, съгласно препоръката на производителя.

3.3.7 Метод за характеризирание на серумни автоантитела - Western blot (Towbin H, Staehelin T, Gordon J, 1979).¹

Анализът е извършен в Лабораторията по клинична и експериментална имунопатология, Болница Charles Nicolle, Rouen, Франция (Laboratoire d'Immunopathologie Clinique et Expérimentale, Hôpital Charles Nicolle, CHU, Rouen, France). За източник на епидермални антигени е използвана нормална човешка кожа, получена след мамопластики. Методът съдържа следните стъпки: кожата се сепарира чрез инкубация в 1,0 М

1. Проучването е извършено в колаборация с проф. R. Ghohestani, Lyon, Франция, впоследствие директор на лаборатория по Имунодерматология, Клиника по Дерматология и Кожна Биология, Jefferson Institute по Молекулярна Медицина, Филадельфия, САЩ; Лаборатория по Имунопатология, Болница Charles Nicolle, Rouen, Франция; "Institute de recherche sur la peau", Болница Saint-Louis, Париж, Франция.

NaCl и отделеният епидермис се лизира в разтвор, съдържащ протеазни инхибитори. Вертикалната електрофореза на протеините се извършва в полиакриламиден гел 4% и 6%. Мембраната се нарязва на лентички, които се инкубират с изследваните серуми за 2h при непрекъснато разклащане. Следва трикратно измиване, добавяне на конюгат - моноклонално мише античовешко IgG (G1-G4) (Sigma), ново трикратно измиване и инкубация на лентичките с козе анти-мише IgG-биотин (Caltag). Като последна стъпка се добавя разрежена стрептавидин-алкална фосфатаза (Caltag). Реакцията става видима след три измивания с реактив NBT/BCIP. За контроли се използват комерсиални моноклонални антители (PROGEN) срещу съответните епидермални антигени или човешки серуми, приети за положителни контроли.

Отчитането на резултатите се извършва чрез сравняване молекулните тегла на пептидите с комерсиални маркери за молекулни тегла, депозиращи в гела, и със серумите-контроли. Всички резултати се интерпретират според клиничната картина при болния.

3.3.8 Метод за съхранение на резултатите от изследванията.

Резултатите от ДИФ и ИИФ се записват върху фиша, придружаващ биопсията, журнала на лабораторията по имунофлуоресценция при ККВБ, фиша, предназначен за личната документация на болния, както и в електронна таблица. Резултатите от ELISA и BIOCHIP изследвания се записват в отделни журнали и в електронната таблица.

Фотодокументиране се извършва посредством фотоприставка (Olympus) към флуоресцентния микроскоп (Olympus).

В процеса на работа беше изградена специализирана компютърна софтуерна система за създаване на база данни от резултатите при проведените изследвания.

3.3.9 Методи за статистическа обработка на експерименталните данни.

Данните бяха въведени и обработени със статистическия пакет SPSS v.16.0. При отделните анализи са използвани различни нива на значимост, при които се отхвърля нулевата хипотеза – $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$.

Бяха приложени следните методи:

- **Дескриптивен анализ** – честотното разпределение на разглежданите признаци е представено в таблици. Изчислени са производни статистически величини и обобщаващи числови характеристики: медиана, стандартно отклонение, дисперсия, коефициент на корелация, средна и максимална стохастична грешка.
- **Графичен анализ** – визуално са демонстрирани получените резултати.
- **Непараметричен метод за проверка на хипотези Хи-квадат** - методът изисква да бъдат спазени следните изисквания по отношение на данните – броят на наблюдаваните единици не трябва да е по-малък от 50; не трябва да има теоретични честоти по-малки или равни на 1; ако има теоретични честоти по-ниски от 5, те не трябва да са повече от 20% от всички клетки. Клетки от таблицата, в които честотите са равни на 0, трябва да бъдат предварително отстранени. Емпиричната характеристика на хипотезата се изчислява по формула:

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{(f_{ij} - \hat{f}_{ij})^2}{\hat{f}_{ij}}$$

- Проверка на хипотеза за значимост на разлика между относителни дялове. Извършено е оценяване на максимално допустима стойност на изследваната разлика при конкретни данни, еквивалентна на максималната стохастична грешка.

4. Резултати

4.1 Епидемиологично проучване

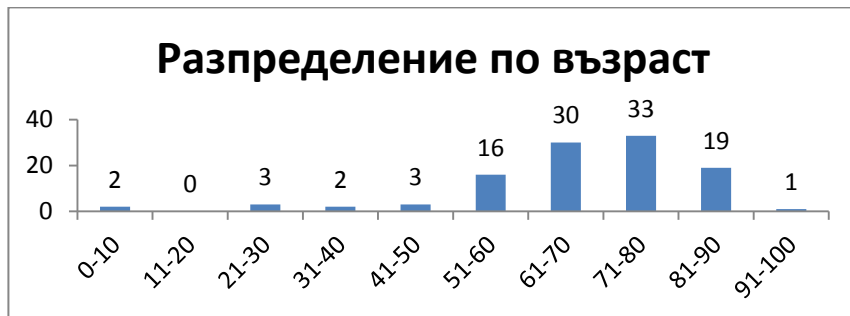
Епидемиологичното проучване включва периода между януари 2010 г. и март 2013 г. и обхваща 112 пациенти с клинична картина, съвместима със сАИБД, диагностицирани в Клиниката по дерматология и венерология, Медицински университет, София. Критерий за включване в изследваната група е наличие на линейно отлагане на IgG и/или С3 по хода на базалната мембрана при директна имунофлуоресценция. При преобладаващо отлагане на IgA по БМ пациентите не се включват в настоящия труд.

За периода на проучването новооткритите случаи са 84% (94 болни) от общия брой, като останалите 16% (18 болни) са повторно хоспитализирани при рецидив на заболяването.

Жените в изследваната група представляват 60% (67 болни), а мъжете 40% (45 болни) при съотношение жени:мъже 1,5:1.

Средната възраст на начало на симптомите при пациентите от изследваната група е 70 г. (median) и варира от 1 г. до 92 г., като 90,8% от болните са на възраст над 50 г.

Фигура 1. Разпределение на пациентите от изследваната група по възраст



При пациенти с водещи оплаквания от страна на лигавиците, съотношението жени към мъже е 12:1, а средната възраст 67,5 г.

След разделяне на заболяванията на отделни нозологични единици чрез диагностичен алгоритъм от специализирани лабораторни изследвания, могат да бъдат сравнени половото разпределение и средната възраст при болни с доказан ВР и ММР (Таблица 2).

Таблица 2. ВР и ММР – разпределение по пол и средна възраст

	жени:мъже	средна възраст
ВР (n=65)	1,16:1	72
ММР (n=10)	9:1	62,5

n – брой пациенти

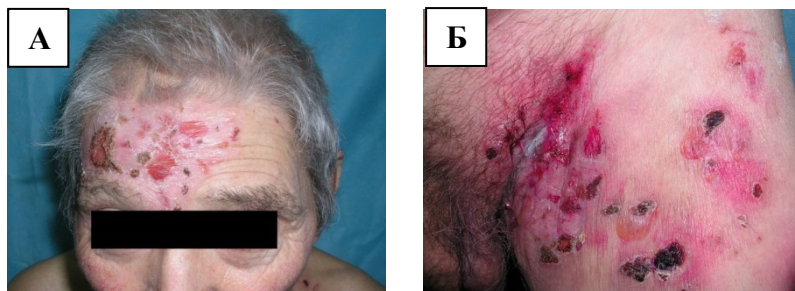
Не се наблюдава диспропорционално струпване на пациенти, родени в определен регион.

Извършено е ретроспективно проучване на документацията, което показва, че за същия период (януари 2010 г. – март 2013 г.) в Направление по имунофлуоресцентна диагностика към Кожна клиника на Александровска болница са новодиагностицирани 135 пациенти с пемфигус (срещу 94 с линейно IgG). Средната възраст в тази група е 57 години, а съотношението жени към мъже е 1,9:1 (89/46).

От поява на първите симптоми до постъпване в клиниката и поставяне на диагнозата изминават средно 5 месеца и половина. При пациентите с кожно засягане този период е 4 месеца. При тези с предимно лигавични изменения, времето до поставяне на диагноза нараства на 11 месеца, като в 45% от случаите периодът е по-дълъг от една година.

При повечето пациенти от изследваната група не се установява непосредствен провокиращ фактор за отключване на аутоимунното заболяване. При един болен булозната дерматоза се предшества от изгаряне от II степен в областта на челото, в резултат на директен контакт на кожата с пламъците на огъня от запалени стърнища (Фигура 2). Около един месец след заздравяване на лезиите в засегнатата област, първоначално в рамките на образувания цикатрикс, а впоследствие и по кожата на тялото и крайниците, се появяват напрегнати були, преминаващи в болезнени ерозии.

Фигура 2. Единични ерозии, покрити на места с хеморагични корусти в рамките на атрофичен цикатрикс вследствие на термично изгаряне (А) и були върху еритемо-едемна кожа в по кожата на бедрата и ингвиналните гънки (Б)



4.2 Клинични проучвания

4.2.1 Общ клинично-морфологичен анализ

Клинично-морфологичните проучвания обхващат 92 пациенти (58 жени и 34 мъже), диагностицирани и лекувани в Клиника по дерматология и венерология, Медицински университет, София, през периода 2010-2013 г. При всички тях се открива отлагане на IgG и/или C3 по хода на базалната мембрана.

Клиничната картина в групата на хоспитализираните пациенти, при които е извършен детайлен клиничко-морфологичен анализ (n=92) варира значително с различна степен на засягане на кожата и лигавиците.

Фигура 3. Засягане на кожа и лигавици при сАИБД с отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана



При 28 от пациентите (30,43%) в изследваната група се наблюдава засягане на видимите лигавици, като в 14 случая това е водещият клиничен белег на заболяването. При 5 пациенти е засегната повече от една лигавица.

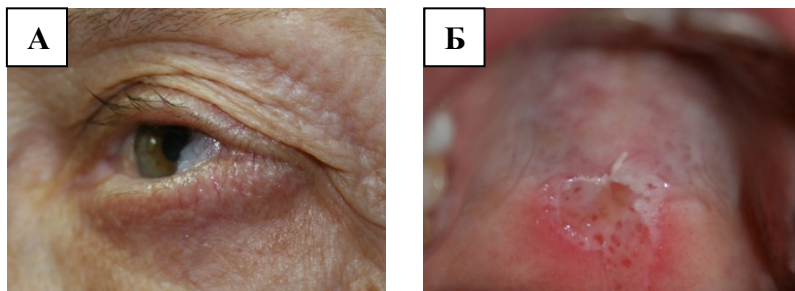
Таблица 3. Лигавично засягане в изследваната група от 92 болни

Засегнатата лигавица	n	%*	%**	мъже		жени	
				n	%	n	%
орална	24	26,08%	85,71%	6	25%	18	75%
генитална	4	4,35%	4,29%	-	-	3	100%
очна	4	4,35%	14,29%	1	25%	3	75%
УНГ	3	3,26%	10,71%	-	-	3	100%
Общо	28	30,43%	100%	6	21,43%	22	78,57%

* - процент от всички анализирани болни

** - процент от всички болни с лигавично засягане

Фигура 4. Засягане на очна (А) и орална (Б) лигавица при ММР



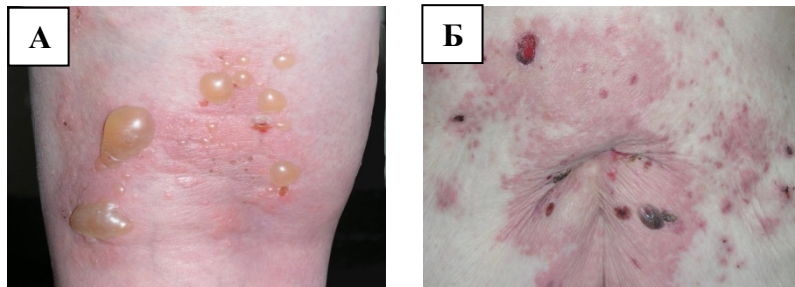
Всички болни с доминиращо лигавично засягане са от женски пол. При 14 пациенти водещи са оплакванията от страна на кожата, но паралелно с тях се наблюдават и изменения по лигавицата. При 64 пациенти (69,57%) не се наблюдава лигавично засягане.

В деня на хоспитализацията, от всички 81 пациенти с кожно засягане, при 80 се наблюдават ексудативни обривни

елементи – везикули и/или були. При една пациентка обривът се изразява в дисеминирани уртикариални папули без образуване на мехури. Разпространението и вида на патологичните кожни лезии показват индивидуални особености и изграждат спектър от комбинации между различни обривни елементи, включващи були, везикули, ерозии, корусти, уртикариални лезии, екскориации, милиуми, цикатрикси, постлезионални хипер- и хипопигментации и др.

При 60 от пациентите с кожни оплаквания се наблюдава дисеминиран обрив, при 18 болни лезиите са ограничени и обхващат по-малки участъци от кожата в повече от една област, а при трима пациенти обривът е локализиран. Броят на булозните елементи също варира от множество (44 пациенти), през ограничен брой (14 пациенти) до единични везикули и/или були (22 пациенти).

Фигура 5. ВР - напрегнати були и везикули, еритем и уртикоподобни лезии в задколянна ямка (А) и еритем, ерозии и корусти в умбиликална област (Б)



Най-често се засяга кожата в следните области на тялото:

- Долни и/или горни крайници – 72 пациенти
- Трункус – 70 пациенти
- Глава/шия – 29 пациенти

При двама болни кожните изменения са локализирани единствено върху кожата на долните крайници, а при седем се

наблюдава обхващане на участъци от горни и долни крайници, без лезии по трункуса.

Състоянието на перибулозната кожа е отчетено при 69 болни и показва различни характеристики:

Таблица 4. Перибулозна кожа

Перибулозна кожа	n	%
Непроменена	20	28,99%
Променена:	49	71,01%
Еритемна	19	27,54%
Уртикариална	30	43,47%

Атрофични лезии се наблюдават при 5-ма пациенти, също при толкова се откриват милиуми.

Сърбежът е най-постоянният субективен белег на заболяването. За различен по интензивност сърбеж съобщават 60 болни:

- Умерен сърбеж – 17 болни
- Интензивен сърбеж – 37 болни
- Непоносим сърбеж – 6 болни

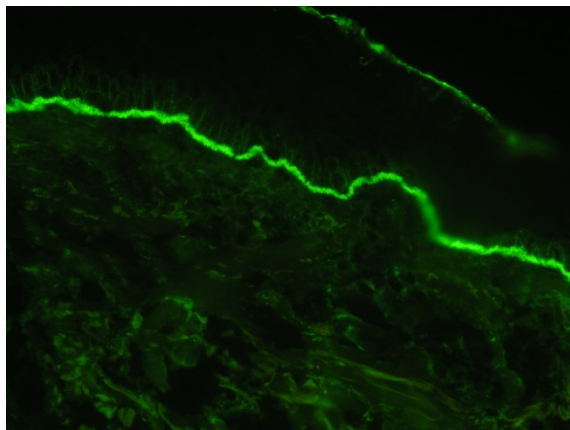
4.3 Лабораторни изследвания

4.3.1 Директна имунофлуоресценция (ДИФ) – анализ на отложените имунореагенти спрямо клинични и серологични характеристики

Изследвани са 136 директни имунофлуоресценции (112 пациенти), изработени по рутинна методика. При всички 112

пациенти се наблюдава линейно отлагане на имунореагенти по хода на базалната мембрана (Таблица 5).

Фигура 6. ДИФ - линейно отлагане на IgG по базалната мембрана



Наличието на IgG и/или C3 е включващ критерий и се открива при всички пациенти, но наред с това съществуват редица комбинации с отложени антитела от класове IgA и IgM.

Интензитетът на светене при ДИФ е отчитан по тристепенна скала (един, два и три плюса). В 52% от случаите е установено по-изразено отлагане на C3, в 21% на IgG, а в 27% интензитетът на светене на IgG и C3 е приблизително еднакъв.

Таблица 5. Честота на отлагане на имунореагенти в изследваната група

Имунореагенти	брой пациенти	%
IgG	103	91,96%
C3	104	92,86%
IgA	12	10,71%
IgM	5	4,46%

Направен е анализ с цел откриване на клинично-лабораторна корелация между преобладаващата имунореактивност при ДИФ и клинични белези като ливачно засягане и вид на перилезионална кожа. Не се откриват статистически значими разлики в имунофлуоресцентната находка при клинично разграничените групи:

При 12 пациенти с липсващ серум или негативни серологични изследвания, е извършена ДИФ върху сепарирана кожа. При 6 от тях се наблюдава епидермално, а при останалите 6 – смесено епидермално и дермално отлагане на IgG.

4.3.2 Индиректна имунофлуоресценция

При 79 пациенти са проведени общо 125 рутинни индиректни имунофлуоресцентни изследвания върху субстрат от хранопровод, като циркулиращи анти-базалномембранны антитела се откриват при 51 пациенти. При 51 пациенти се откриват циркулиращи антитела, а при 28 такива не се установяват. За изследваната група се изчислява чувствителност на метода от 64,6%.

В 98 от проведените ИИФ, изследваният материал е серум, а при 27 – мехурна течност. В 30 от серумите се установяват високи титри антитела (1:320 или 1:640), но корелация между отчетените титри и активността на заболяването не се наблюдава.

При 24 пациенти е проведена ИИФ едновременно с материал от серум и мехурна течност, взети в един и същ момент от хоспитализацията. При 22 от 24 пациенти (91,66%) се наблюдава корелация в качествено определяне на ИИФ с материал от серум и мехурна течност.

ИИФ SSS

След първоначална селекция на пациентите чрез ДИФ, индиректната имунофлуоресценция върху субстрат от сепарирана с 1 M NaCl кожа е използвана като първа стъпка в

изготвения диагностичен алгоритъм. Провеждана е върху субстрат, приготвен по стандартен за лабораторията метод или върху сепарирана кожа като част от ВІОСНІР панела.

Чрез ИИФ SSS са изследвани 86 пациенти (Таблица 6). Най-честата находка е отлагане на ІgG по епидермалната страна на мехура:

Таблица 6. ИИФ върху сепарирана кожа

	n	%
Епидермално отлагане	67	77,9%
Дермално отлагане	5	5,8%
Смесено отлагане	4	4,7%
Отрицателна ИИФ на сепарирана кожа	10	11,6%

При изследването на 100 серума са проведени едновременно индиректна имунофлуоресценция върху хранопровод и върху сепарирана кожа (Таблица 7). ИИФ SSS показва по-висока чувствителност от ИИФ върху субстрат от хранопровод.

Таблица 7. Сравнение между ИИФ върху субстрат от хранопровод и сепарирана кожа

	ИИФ хранопровод (+)	ИИФ хранопровод (-)	Общо
ИИФ SSS (+)	62	13	75
ИИФ SSS (-)	5	20	25
Общо	67	33	

4.3.3 ELISA BP180

Чрез BP180-NC16A ELISA са изследвани 51 серума на 49 пациенти. При 16 от пациентите е използван ELISA кит на Medical & Biological Laboratories Co., а при 33 кит на Euroimmun.

При 23 (46.9%) от болните се установяват антитела срещу BP180. Резултатите вероятно показват по-ниска от реалната чувствителност на метода, поради факта, че чрез ELISA селектирано са изследвани всички серуми, при които не са открити циркулиращи антитела чрез ИИФ върху тетрамерен рекомбинантен BP180 (BIOCHIP) като първоначален скриниращ метод.

4.3.4 BIOCHIP

Чрез BIOCHIP са изследвани 76 серума на 75 пациенти (Фигура 7, Таблица 8).

Фигура 7. ИИФ върху тетрамерен рекомбинантен BP180 (А) и трансфектирани клетки с BP230 (Б) като част от BIOCHIP панела

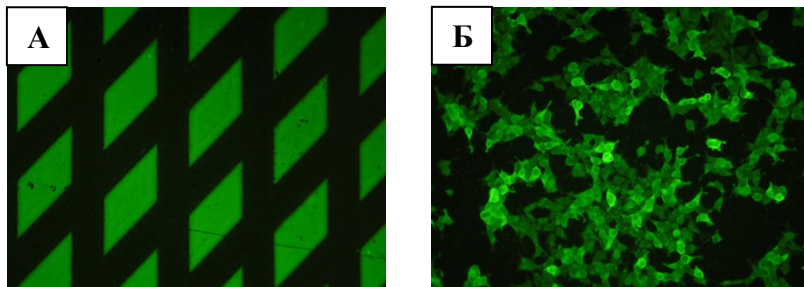


Таблица 8. Резултати от изследване на различни субстрати с ВЮСНІР

Субстрат	положителен		негативен	
	n	%	n	%
Хранопровод	37	49,33%	38	50,67%
SSS	67	89,33%	8	10,67%
епидермален тип	61	81,33%	-	-
дермален тип	4	5,33%	-	-
смесен тип	2	2,67%	-	-
BP180	44	58,67%	31	41,33%
BP230	12	16%	63	84%
Desmoglein 1	0	0%	75	100%
Desmoglein 3	0	0%	75	100%

n – брой пациенти

Чрез ИИФ върху трансфектирани с колаген VII клетки са изследвани 13 пациенти. Положителен резултат е отчетен при двама от тях.

4.3.5 Сравнение в чувствителността на различните методи

Чрез ВЮСНІР са изследвани серумите на 9 от 12 болни, при които рутинната индиректна имунофлуоресценция върху хранопровод и ИИФ SSS, провеждана по стандартна технология на лабораторията, са негативни. При 5 от 9 негативни на рутинна ИИФ пациенти, чрез ВЮСНІР се открива положителна находка.

ИИФ върху субстрат от сепарирана кожа е почувствителна като част от ВЮСНІР панела, в сравнение със стандартния метод, използван в лабораторията.

Обратна е зависимостта при изследването върху субстрат от хранопровод. От 65 изследвани серума, при рутинния метод положителни са 43, а чрез ВЮСНІР – 34 серума.

Високата чувствителност на ИИФ върху сепарирана кожа при ВЮСНІР изследването се потвърждава от факта, че сепарираната кожа е положителна при всички останали 68

изследвани серума. При изследването с ВІОСНІР се наблюдава 100% корелация между резултатите върху сепарирана кожа и всички положителни резултати върху субстратите за ВР180, ВР230 и/или маймунски хранопровод. В нито един случай на положителен резултат върху друг субстрат, не се наблюдава отрицателен резултат върху сепарирана кожа.

При серумите, изследвани с ELISA ВР180 кит на Medical & Biological Laboratories Co., резултатите над 9 U/ml се считат за положителни. При 15 от тези пациенти е извършено и изследване за ВР180 с ВІОСНІР. При четирима от пациентите с положителна ВР180-NC16A ELISA в ниски стойности (10, 18, 21, 21 U/ml), резултатът при изследването с ВІОСНІР е негативно.

При изследваните с ELISA ВР180 кит на Euroimmun, резултати над 20 U/ml се считат за положителни. При 22 от пациентите в тази група е извършено изследване с ВР180 на ВІОСНІР. При четирима от пациентите със стойности на антителата срещу ВР180-NC16A ELISA между 25 и 40 U/ml, изследването с ВІОСНІР е негативно.

4.3.6 Диагностичен алгоритъм

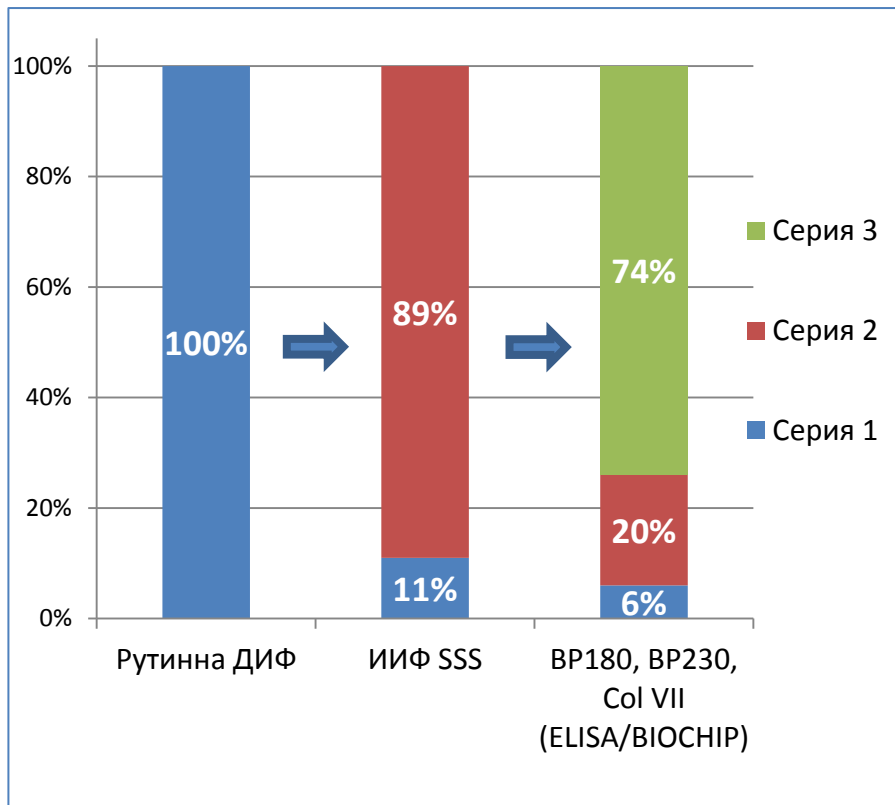
Чрез адаптиран алгоритъм за диагностициране на сАИБД с отлагане на IgG и или С3 по базалната мембрана, включващ ДИФ, ИИФ и ДИФ върху сепарирана кожа, ВР180-NC16a ELISA и ВІОСНІР изследванията, пациентите от изследваната група са диагностицирани както следва:

Таблица 9. Разпределение на всички болни от изследваната група по диагнози след провеждане на алгоритъм от специализирани имунофлуоресцентни и имуносерологични тестове

Заболяване	брой пациенти
Булозен пемфигоид	53
Пемфигоид на мукозните мембрани	7
Анти-ламинин-332 пемфигоид, анти-p200 пемфигоид?	3
Пемфигоид с неизвестен антиген (негативни за ВР180 и ВР230)	15
Пемфигоид с неизвестен антиген (епидермален тип върху ИИФ SSS, без определяне на специфичност на антителата)	14
Epidermolysis bullosa acquisita	2
Негативни на всички имуносерологични методи (неизследвани на ДИФ SSS)	5
Неуточнени сАИБД с отлагане на IgG и/или С3 по базалната мембрана	13
Общо:	112

Фигура 8 показва хронологичното развитие на диагностичния процес след провеждането на различните изследвания. При 83 пациенти са извършени ДИФ, ИИФ върху сепарирана кожа, както и минимум едно от имуносерологични изследвания за определяне на специфични антитела. След завършване на алгоритъма, при 61 от тях диагнозата е подкрепена с откриване на антитела, насочени срещу специфични таргетни антигени на БМ (серия 3), при 17 лабораторната диагноза се базира на установяване на епидермален, дермален или смесен тип свързване на антителата върху субстрат от сепарирана кожа, при отрицателни специфични тестове (серия 2). При 5 от пациентите всички имуносерологични проби са отрицателни и диагнозата се основава на резултата от ДИФ (серия 1). При 94% от случаите, изпълняването на алгоритъма води до по-прецизна диагноза.

Фигура 8. Прецизност на диагностиката на сАИБД в хронология на провеждане на различни по специфичност методи за изследване



4.3.7 Параклинични изследвания

При 55 пациенти е изследван броят на еозинофилите в периферна кръв. При 22 (40%) от тях се наблюдава периферна еозинофилия.

Чрез ELISA за определяне на нивата на тотален IgE са изследвани 45 пациенти. Стойности над 100 IU/ml, които се считат за повишени се откриват при 37 пациенти (82%).

Не се откриват статистически значими корелации между периферна еозинофилия и повишен IgE в серума, както между параклиничните показатели и клинични белези като вид на перилезионалната кожа и сърбеж.

4.3.8 Паранеопластичен пемфигоид – проучване на специфичността на автоантителата чрез Western blot (WB) и BP180-NC16A ELISA

Проучването обхваща общо 44 пациенти с отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана и клинична диагноза пемфигоид, разделени в две групи: 10 пациенти с асоциирана неоплазма и 34 пациенти без данни за такава. Спектърът на подлежащите злокачествени заболявания включва предимно карциноми с разнообразен произход (9 болни) и 1 случай на менингеом.

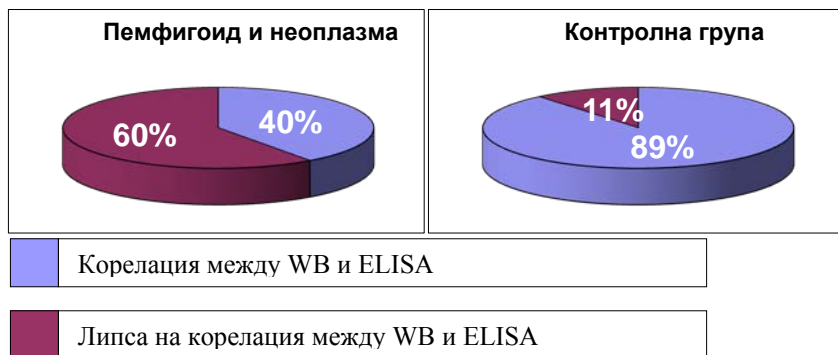
Проведената ИИФ върху субстрат от сепарирана кожа, показва сравними резултати в двете изследвани групи по отношение на реактивността на серумните антитела с епидермалната, дермална или и двете страни на изкуствената була. Процентът на положителни серуми е подобен в двете групи, като липсват достоверни различия и в пропорцията на епидермален, дермален или смесен тип антитела.

Освен чрез ИИФ, специфичността на анти-БМЗ антителата е изследвана при всеки от пациентите паралелно чрез минимум още един от двата метода – имуноблот или ELISA BP180, или и с двата едновременно.

Посредством имуноблот (WB) са изследвани серумите на 14 пациенти с отлагане на IgG и/или C3 по БМ и клинична диагноза пемфигоид. От тях 5 са пациенти с доказана подлежаща неоплазма, а останалите 9 – с доказан пемфигоид без данни за злокачествено заболяване, които са включени в контролната група.

Посредством BP180-NC16A ELISA са изследвани серумите на 44 пациенти, от които 10 са с придружаващо неопластично състояние, а останалите 34, които са без данни за такова, служат за контролна група.

Фигура 9. Корелация между WB и ELISA



В контролната група се наблюдава много по-висока корелация между резултатите от изследването с имуноблот и ELISA.

В групата на паранеопластичен пемфигоид много често се наблюдават негативен резултат при изследването с имуноблот и реактивност срещу антигени, различни от BP180.

4.4 Софтуерна разработка

В процеса на работа беше създадена софтуерна система за въвеждане на резултатите от проведените специализирани изследвания и изграждане на дигитална база данни на имунофлуоресцентна лаборатория. Системата позволява улеснено и детайлно въвеждане на паспортни данни за пациента, както и на резултатите от ДИФ (Фигура 10), ИИФ, ИИФ SSS, ELISA BP180-NC16A и BIOCHIP. Заложена е функционалност, която дава възможност за хронологичен преглед на всички изследвания, проведени при даден пациент.

Фигура 10. Електронна форма за въвеждане на резултатите от ДИФ

The screenshot shows a software application window titled "ДИФ" (Direct Immunofluorescence). The window contains the following elements:

- Header:** "Директна имунофлуоресценция (ДИФ)"
- Form Fields:**
 - Номер (Number): []
 - Дата (Date): []
 - Днешна дата (Today's Date): []
 - Клиника (Clinic): []
 - ИЗ номер (IZ number): []
- Епидермис (Epidermis) Section:**
 - интерцелуларно (ICS) (intercellular):
 - IgG
 - IgA
 - IgM
 - C3
 - нуклеарно (Nuc) (nuclear):
 - IgG
 - IgA
 - IgM
 - C3
 - цитоплазмено (Cyt) (cytoplasmic):
 - IgG
 - IgA
 - IgM
 - C3
- Дермо-епидермална зона (BMZ) (Dermato-epidermal zone) Section:**
 - линеарно (linear):
 - грануларно (granular):
 - IgG:
 - IgA:
 - IgM:
 - C3:
 - фибрин (fibrin):
- Спонтанна була (Spontaneous bulla) Section:**
 - епидермално (epidermal):
 - дермално (dermal):
 - смесено (mixed):
- IgG serration Section:**
 - n:
 - u:
- Папили (Pap) (Papillae) Section:**
 - IgG:
 - IgA:
 - IgM:
 - C3:
 - фибрин:
- Buttons:**
 - Изчисти избора (Clear selection): [Red button]
 - Негативно изследване (Negative result): [Orange button]
 - Добави резултата (Add result): [Green button]
- Бележки (Remarks):** [Empty text area]

4.5 Качество на живот при пациенти с пемфигоид

Резултатите за всички, попълнили въпросника, показват средна стойност на индекса от 12. Според инструкциите за тълкуване на резултатите от DLQI, този резултат означава, че булозният пемфигоид има „много голям ефект върху живота” на пациентите в изследваната група.

Булозният пемфигоид има „много голям ефект върху живота на пациента” в 10 от 40 случая в изследваната група. При 12 изследвани, ефектът се определя като „умерен”, а при 9

болни като „малък“. Девет от пациентите са отбелязали отговори, които показват „*изключително голям ефект*“ на заболяването върху живота.

Средните резултати за всяка категория са както следва:

Таблица 10. DLQI – резултати по категории

<i>Категория</i>	<i>Въпроси</i>	<i>Резултат*</i>	<i>Засягане**</i>
Симптоми и чувства	1 и 2	4,1	68%
Ежедневни дейности	3 и 4	2,9	48%
Свободно време	5 и 6	1,3	22%
Работа и училище	7	1,6	53%
Лични взаимоотношения	8 и 9	1,5	25%
Лечение	10	0,9	30%

*осреднен резултат в точки за категорията

**осреднен процент от максималния брой точки за категорията

5. Обсъждане

В резултат на проведените клинично-лабораторни проучвания при пациентите от изследваната група, се очертават някои епидемиологични, клинични и имунологични характеристики на сАИБД с отлагане на IgG и/или C3 по хода на базалната мембрана у нас.

5.1 Епидемиологичен анализ

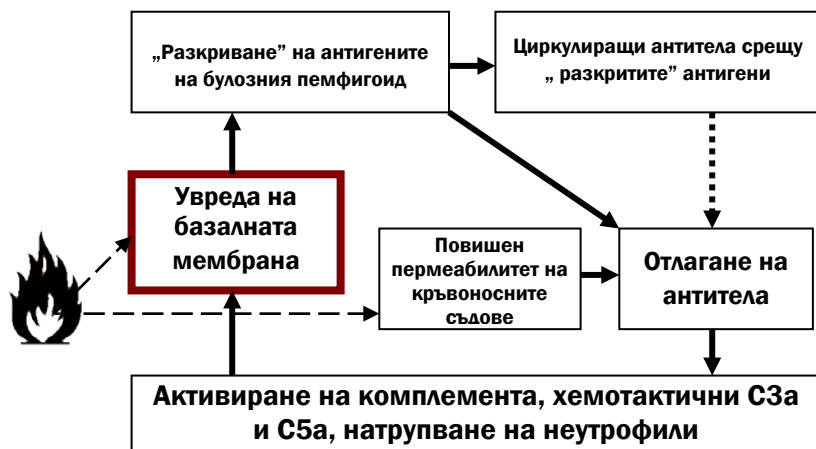
По време на тригодишния период на дисертацията (януари 2010 – март 2013 г.), в Направление за имунофлуоресцентна диагностика на Кожна клиника към Александровска болница, са новодиагностицирани 136 пациенти с пемфигус, спрямо 94 с линейно отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана. Подобно съотношение не е типично за страните от Западна Европа, където заболяванията от групата на пемфигоида са с традиционно по-голяма честота от пемфигуса. За тази особеност в епидемиологията на АИБД в България роля играят разнообразни фактори. Наблюдаваме повишена заболеваемост от пемфигус при индивиди от ромски произход. Такава закономерност липсва сред болните със субепидермални булозни дерматози. За по-ниска регистрирана честота на пемфигоида вероятно допринася лечението на една част от болните с това заболяване в амбулаторни условия, без преди това да са извършени необходимите диагностични процедури.

Засягането в по-голяма степен на женския пол съответства на литературните данни от други страни. Друга особеност на българската популация е сравнително по-ранното начало на заболяването.

При описания пациент, развил булозна ерупция след изгаряне на кожата, диагнозата пемфигоид бе потвърдена по категоричен начин чрез установяване на характерните за заболяването отложени *in vivo* в кожата и циркулиращи анти-базалномембранни антитела, чиято специфичност бе анализирана и чрез ELISA BP180. Първоначалната поява на булозните лезии в

областта, засегната от термичната травма, както и краткия времеви интервал от четири седмици между двете събития, дават основание да предполагаваме, че се касае за ВР, индуциран от изгаряне. Патогенетичният механизъм, по който ВР се развива върху термично, механично или химично увредена кожа е показан на Фигура 11.

Фигура 11. Предполагам патогенетичен механизъм при ВР, индуциран от изгаряне



5.2 Клинични проучвания

Резултатите от проведените наблюдения съвпадат с общоприетите схващания за клиниката и протичането на заболяванията от групата на пемфигоид. Клиничната картина при изследваната група включва разнообразни съчетания между отделните видове обривни елементи, които при всеки пациент показват различия в разпространението си и оформят клиничния спектър на субепидермалните аутоимунни булозни дерматози с отлагане на IgG и/или С3 по БМ в българската популация.

Най-често болестта се изявява с дисеминиран полиморфен обрив, представен от еритем, уртикоподобни лезии и различен брой

напрегнати були с големина над 1 см, разположени върху променена кожа, обхващащи трункус и крайници без закономерност в засягането на флексорни или екстензорни повърхности. Мехурите преминават в ерозии и крусти, което създава картина на еволютивен полиморфизъм. Най-постоянно субективно оплакване е различният по интензивност сърбеж (74% от пациентите с кожно засягане), а при разкъсване на булозните лезии пациентите съобщават за парене или болка. Описаният клиничен фенотип съответства на утвърдените представи за протичане на най-разпространената сАИБД – булозния пемфигоид, но също така и на инфламаторните форми на останалите заболявания от групата (EBA, LAD).

Повече от 98% от пациентите постъпват в болница за диагностично уточняване след възникването на булозните лезии, показва колко затруднено е поставянето на клинична диагноза в ранните стадии на заболяванията от тази група. Пациентите в пребулозен стадий на булозния пемфигоид често биват третирани емпирично в амбулаторни условия за дерматит, хронична уртикария и др. Поставянето на точна диагноза в изследваната група средно се забавя средно с повече от четири месеца, а понякога и с повече от година. Булозният пемфигоид винаги трябва да влиза в диференциално-диагностично съображение при възрастни хора с наличие на хроничен сърбеж и/или уртикариални лезии, резистентни на терапия с антихистамини.

Още по-големи са затрудненията при изолирано засягане на лигавиците, когато диагнозата в изследваната група се поставя средно 11 месеца след появата на първоначалните симптоми, като в 45% този период е по-дълъг от една година.

5.3 Лабораторни изследвания

5.3.1 Рутинни (ДИФ, ИИФ върху хранопровод)

При постъпване на пациент с клинично съмнение за автоимунна булозна дерматоза, в ККВБ се извършват рутинно хистологично изследване и ДИФ, както и ИИФ върху субстрат от

хранопровод. ДИФ е задължителен метод от изключително значение за потвърждаване на диагнозата, който доказва наличие и видова специфичност на патогенните антитела на мястото на осъществяване на болестотворното им действие. По този начин АИБД се разделят на две големи групи според реактивността на антителата към десмозомални или базално-мембранни антигени. Първите се установяват при епидермалните, а вторите при субепидермалните АИБД, които са обект на настоящото проучване. Специфичната имунофлуоресцентна находка при *dermatitis herpetiformis*, както и по-изразеното отлагане на антитела от клас IgA при LAD, допълнително правят възможно отдиференцирането чрез ДИФ на тези две заболявания от останалите сАИБД.

ДИФ превъзхожда серологичните изследвания по чувствителност, тъй като е едностъпален и не зависи от наличието на циркулиращи автоантитела. При взимане на биопсичен материал от видимо незасегнатата перилезионална кожа, се избягват фалшиво отрицателни резултати.

Възможностите на рутинната ДИФ в разграничаването между сАИБД с линейно отлагане на имунореагенти по базалната мембрана, са ограничени до установяване на видовата специфичност на антителата и отдиференциране между заболяванията с отлагане на IgG и тези с IgA реактивност срещу структури на БМ, включително IgA медиран автоимунитет срещу колаген VII. Чрез ДИФ не може да бъде извършена прецизна диференциална диагноза между множеството нозологични единици, включени в групата на сАИБД с отлагане на IgG по БМ. Същото се отнася и за рутинния метод за извършване на ИИФ върху субстрат от хранопровод.

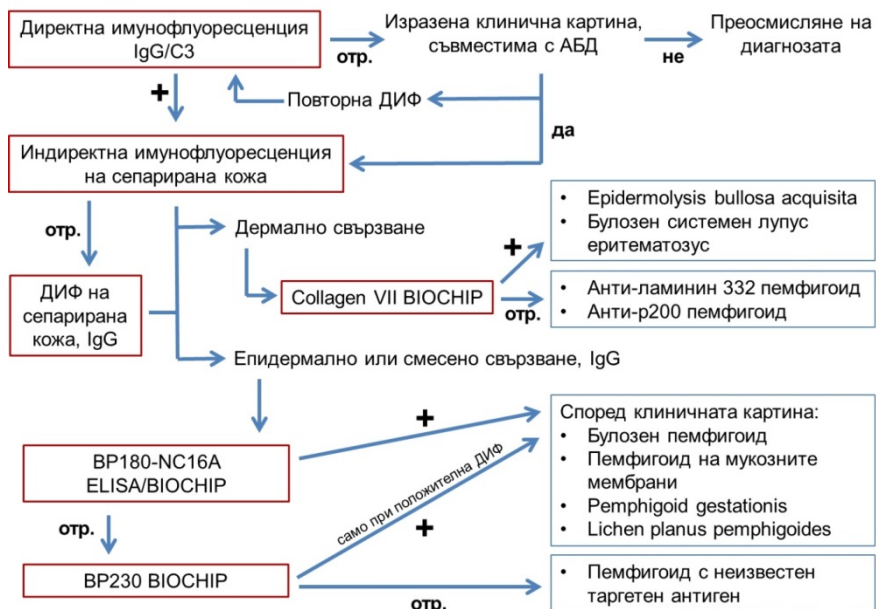
5.3.2 Диагностичен алгоритъм

Поради ограничените възможности на гореизброените методи, в рамките на дисертацията беше създаден алгоритъм за диагностика на субепидермалните автоимунни дерматози с отлагане на IgG и/или C3 по хода на базалната мембрана, в който

са включени имунофлуоресцентни и имуносерологични методи, допълващи рутинно използваните в Направление за имунофлуоресцентна диагностика на Кожна клиника (Фигура 12). Алгоритъмът е адаптиран към провежданите в България изследвания, като за основа е използван алгоритъм за диагностика на булозен пемфигоид, разработен от Zillikens и Schmidt. Основната цел на въвеждането му е чрез достъпните диагностични средства да се постави прецизна диагноза и при максимален брой пациенти да се установи към кои таргетни антигени са насочени специфичните антитела.

Провеждането и анализът на резултатите от множеството разнообразни диагностични тестове изисква алгоритмичен подход поради факта, че диагностиката на аутоимунните булозни дерматози е комплексен и многостепенен процес на информационен синтез.

Фигура 12. Алгоритъм за диагностика на сАИБД с линейно отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана



Алгоритъмът е адаптиран за диагностика на субепидермалните АИБД с отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана.

В единични случаи при изразена клинична картина, съвместима с АИБД и силно клинично съмнение, се провежда ИИФ и при отрицателна ДИФ. В представената група не са включени такива пациенти.

Диагностичният процес при изследваната група от пациенти включва следните стъпки:

1. След положителна ДИФ се отчита резултатът от ИИФ на сепарирана с 1 mol/L NaCl кожа. Изследването осигурява допълнителна възможност за диференциране между субепидермалните булозни дерматози. При разцепването в областта на базалната мембрана, антигените на пемфигоида остават свързани с епидермалната част (покрив) на изкуствено създадения мехур, докато дермалната част (под) съдържа ламинин (основен антиген при анти-ламинин пемфигоид) и колаген VII (основен антиген при ЕВА и BSLE).
2. При дермално свързване на ИИФ върху сепарирана кожа, се извършва изследване с БИОСНIP мозайка върху субстрат от трансфектирани клетки за откриване на антитела срещу колаген VII. При положителен резултат и липса на данни за системен лупус еритематозус, се поставя диагноза epidermolysis bullosa acquisita. При негативен БИОСНIP за колаген VII, според клиничната картина се обсъждат анти-r200 пемфигоид или анти-ламинин-332 пемфигоид, а при анамнестични или клинични подозрения, пациентите се насочват към общ скрининг за неоплазия.
3. При отрицателна ИИФ на сепарирана кожа е уместно да се проведе ДИФ върху сепарирана кожа. Изследването има изключително висока чувствителност, която в някои проучвания достига до 100%. Резултатите се интерпретират съответно на тези при ИИФ. В изследваната група от 112 пациенти, ДИФ върху сепарирана кожа е провеждана в някои случаи при неналичен серум или негативна ИИФ SSS.

4. Епидермално или смесено епидермално-дермално свързване при ИИФ върху сепарирана кожа е характерно за пемфигоид. С цел доказване на специфичните антитела срещу антиген 2 на булозния пемфигоид (BP180), се извършва ELISA BP180 или ИИФ върху рекомбинантен тетрамерен BP180 (BIOCHIP). При положителен резултат, според клиничната картина се поставя една от следните диагнози – булозен пемфигоид, ММР (предимно лигавично засягане), pemphigoid gestationis (при бременни) или lichen planus pemphigoides (при наличие на лезии, характерни за lichen planus). В изследваната група липсват пациенти с PG или LPP.
5. При невъзможност за откриване на антитела срещу BP180, се взимат под внимание резултатите от изследването за антитела срещу BP230. В комбинация с положителната ДИФ, наличието на анти-BP230 антитела е достатъчно, за да се постави диагноза пемфигоид.
6. При пациенти, в серума на които не се откриват антитела срещу BP180 и BP230, при позитивна ДИФ и епидермално или смесено отлагане при ИИФ или ДИФ на сепарирана кожа, се поставя диагноза пемфигоид с неизвестен таргетен антиген. В тази група за поставяне на по-прецизна диагноза е необходимо да бъдат извършени допълнителни изследвания (имуноблот, имуноелектронна микроскопия).

След проведена директна имунофлуоресценция бе обособена група от 112 пациенти с отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана, клинично съвместими със субепидермална булозна дерматоза – пемфигоид или epidermolysis bullosa acquisita.

Следвайки изготвения алгоритъм, пациентите бяха разделени на подгрупи според резултатите от имунофлуоресцентните и имуносерологични изследвания (виж Таблица 9 на стр. 32).

При 80 пациенти, проведените специализирани изследвания в рамките на изработения алгоритъм, доведоха до подобряване на диагностиката, в сравнение с информацията, която бихме получили при прилагане единствено на рутинните

ДИФ и ИИФ. При 62 от тези болни (77,5%) бяха открити специфични антитела, насочени към BP180, BP230 или колаген VII. По този начин категорична диагноза булозен пемфигоид беше поставена при 53 пациенти, при седем болни с характерно лигавично засягане се установи пемфигоид на мукозните мембрани, а при двама пациенти се постави диагноза *epidermolysis bullosa acquisita*.

С наличните диагностични лабораторни методи, при 15 пациенти с епидермално отлагане на имунореагенти при ИИФ на сепарирана кожа, не бяха установени автоантитела чрез ELISA/БИОСНIP. За поставяне на прецизна диагноза в тези случаи е уместно да се търсят антитела срещу фрагменти на BP180 извън NC16A, срещу $\alpha\beta4$ интегрин и други антигени на базалната зона, чрез диагностични методи като имуноблот, имунопреципитация и индиректна имуоелектронна микроскопия. При 12 от тези пациенти се наблюдава клиничен фенотип на BP, а при трима – на MMP.

При двама пациенти най-вероятната диагноза е анти-p200 пемфигоид, а при един вероятно се касае за анти-ламинин-332 пемфигоид.

Интересен е фактът, че 4 от 6 негативни на ИИФ SSS и ELISA BP180 пациенти са с изолирано лигавични лезии.

Високата степен на съответствие между резултатите от ИИФ върху материал от серум и мехурна течност показва, че при невъзможност за взимане на кръв от пациента, евакуирането на течност от булозните лезии предоставя подходящ биологичен материал за провеждане на ИИФ.

Резултатите от изпълнението на алгоритъма ясно показват, че клиничното разграничаване между различните сАИБД е крайно несигурно. Особен проблем представлява поставянето на диагнозата *epidermolysis bullosa acquisita* по клинични белези.

Показателен е случай на 5 годишно дете (Фигура 13) с дисеминиран полиморфен обрив, обхващащ обширни участъци от кожата на трункуса и крайниците, съставен от еритемни плаки и були, които преминават в ерозии и крусти. Поради ранната възраст, при детето се постави клинична диагноза LAD. При

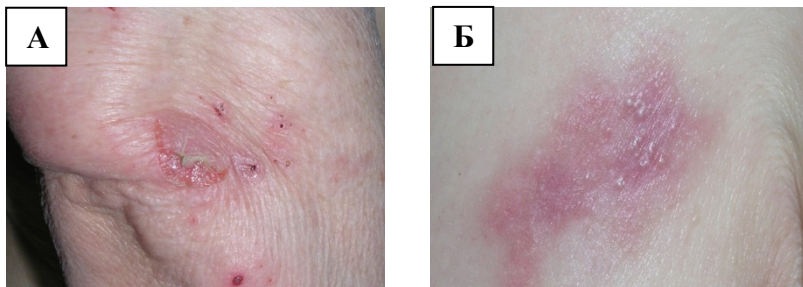
проведената директна имуофлуоресценция се установи отлагане на IgG (+++), IgM (+) и C3 (+++) по базалната мембрана, което доведе до промяна на работната диагноза на булозен пемфигоид. Последва изследване с ИИФ на сепарирана кожа, при което се отчете дермално свързване на циркулиращите антитела. Финалната диагноза epidermolysis bullosa acquisita беше поставена след положителен резултат от проведеното изследване с ВІОСНІР за антитела срещу колаген VII.

Фигура 13. Множество фигурирани ануларни лезии по долни крайници с перловидни везикуло-булозни изменения в периферията при дете с ЕВА



Наблюдава се и обратният сценарий – при пациенти с клинична диагноза ЕВА се откриват антитела срещу ВР180 и се поставя диагноза булозен пемфигоид. Такъв е случаят при болна с характерни механобулозни изменения по екстензорните повърхности на крайниците, преминаващи с образуване на милиуми (Фигура 14). ИИФ на сепарирана кожа показва епидермален тип отлагане, а ELISA ВР180 е положителна, поради което се поставя диагноза булозен пемфигоид.

Фигура 14. Пемфигоид с клиника, наподобяваща механобулозна форма на ЕВА. А – механобулозна лезия в лакътна област, Б – милиуми в стернална област



5.3.3 Диагностична стойност на отделните методи

5.3.3.1 ИИФ SSS

След проведените от нас изследвания, се установи, че ИИФ върху сепарирана кожа показва по-висока чувствителност от ИИФ върху хранопровод, което е в съответствие с литературните данни. Отрицателно е изследването при 10 болни, което показва, че ИИФ не може да бъде използвана като скриниращ метод, заместващ ДИФ.

Основно предимство на ИИФ върху сепарирана кожа е получаването на допълнителна информация за локализацията на отложените антитела, като по този начин се улеснява избора на антигенно-специфични методи като VP180-NC16A ELISA, ИИФ върху трансфектирани с VP230 или Col VII клетки и ИИФ върху рекомбинантен тетрамерен VP180 (BIOCHIP). Тези преимущества на метода го превръщат в една от най-важните стъпки при диагностиката на САИБД, която трябва да влиза в съображение при всички пациенти с линейно отлагане на антитела по БМ.

5.3.3.2 ELISA BP180

BP180-NC16A ELISA е твърде специфичен метод, за да бъде използван за самостоятелен скрининг на всички пациенти със сАИБД. Според получените резултати, уместно е изследването да се извършва при всички пациенти с установено епидермално или смесено отлагане на IgG по базалната мембрана, с цел откриване на специфични антитела. Използването му е оправдано и при негативен резултат от ИИФ върху сепарирана кожа, което се потвърждава от четирите случая, в които диагнозата се поставя чрез ELISA при липса на находка на ИИФ SSS.

При изпълнението на ELISA метода не се изисква високоспециализирана техника като флуоресцентен микроскоп, поради което тя може да бъде провеждана и в по-малки лаборатории.

5.3.3.3 BIOCHIP

BIOCHIP панелът осигурява сравнително бърз и стандартизиран начин за ИИФ изследване на голям брой серуми върху субстрати от хранопровод и сепарирана кожа, като същевременно с това дава възможност да се установят специфични антитела срещу BP180, BP230, дезмоглеин 1 и дезмоглеин 3. Поради тези си предимства, методът вероятно може да се използва за по-общ скрининг при всички автоимунни булозни дерматози, включително пемфигус вулгарис, но не може да бъде алтернатива на директната имунофлуоресценция, тъй като изследването е отрицателно върху всички субстрати при 9 от изследваните серуми на пациенти с линейно отлагане на IgG и/или C3 при ДИФ. В допълнение, както вече беше споменато, нашите резултати показват, че за откриване на антитела срещу BP180 NC16A съществува по-чувствителен метод, а именно ELISA. Резултатите съвпадат с описаните в литературата при подобни проучвания.

5.4 Клинико-лабораторни корелации

При интерпретацията на данните от специализираните изследвания бяха използвани показателите с утвърдена диагностична стойност. Наред с тях, на анализ бяха подложени и находки, които не се считат за специфични за определено заболяване. Потърсени бяха корелации между клиничните прояви на заболяванията от групата на сАИБД и лабораторните резултати от имунофлуоресцентните и имуносерологичните изследвания.

Получените резултати потвърдиха общото впечатление, че съществуват параклинични и лабораторни находки, характерни за всички сАИБД, при които обаче не се открива корелация със специфични клинични белези. Поради тази причина, въпросните показатели са от второстепенно значение, не могат да бъдат използвани като прогностични белези и вероятно нямат важна диагностична стойност.

5.5 Паранеопластичен булозен пемфигоид – проучване на специфичността на автоантителата чрез Western blot и ELISA BP180-NC16A

Негативната ИИФ се счита от някои автори като критерий за паранеопластичен пемфигоид. Резултатите от нашето проучване не потвърждават това наблюдение, като в 8 от 10 случая чрез ИИФ се откриват анти-БМЗ антитела в серумите на пациентите. Все пак, в един от случаите ИИФ е отрицателна, а ELISA BP180 показва високи стойности на антитела.

Резултатите от изследването на серуми на пациенти с пемфигоид чрез имуноблот потвърждават, че методът има значителен принос за диференциалната диагноза на автоимунните булозни дерматози. При 9 от изследваните чрез WB 14 случая с пемфигоид, изследването подкрепи първоначално поставената диагноза, определена на базата на клиника, хистологични и ИФ-изследвания. Само един от тези случаи е в групата на пациентите с пемфигоид и асоциирана неоплазма. Останалите 8 случая са в контролната група пациенти

с пемфигоид без подлежащо злокачествено заболяване. Това наблюдение поставя въпроса за евентуалната разлика в специфичността на антителата в серумите на пациентите от двете групи. Наблюдаваните от нас атипични находки и негативни резултати (5 случая) вероятно се дължат на конформационни промени в епитопите на пемфигоидните антигени. В тези случаи WB не е подходящ метод за диагноза и самостоятелното му приложение не осигурява 100% идентифициране на подозирания антиген. От друга страна WB изисква скъпа техника и реактиви, а неговата многоетапност би могла да опорочи крайния резултат поради възможност от грешки на различните нива. В зависимост от природата на епитопите на търсения антиген следва да се избере метод с най-висока вероятност за достоверен резултат.

Такъв високо-специфичен и чувствителен метод е ELISA BP180 с рекомбинантен антиген 2 на булозния пемфигоид с молекулно тегло 180 kDa.

5.6 Качество на живот при пациенти с пемфигоид

Средната стойност на DLQI от 12 в изследваната група показва, че булозният пемфигоид има *„много голям ефект върху живота“* на пациентите. Резултатът изглежда логичен с оглед на факта, че се касае за хоспитализирани болни, което предполага сравнително тежко засягане на кожата, нарушаване на нормалния работен ритъм, влияние върху психиката на пациента поради постъпването в болница и редица други фактори.

В наблюдаваната група от пациенти, булозният пемфигоид има най-голям ефект върху категории *„симптоми и чувства“* и *„работа и училище“*, но няма нито една област от изследваните в проучването, която да не е засегната в голяма степен от заболяванията.

6. Заключение

Субепидермалните автоимунни булозни дерматози с отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана, представляват хетерогенна група от различни нозологични единици, между които съществуват редица клинично припокриващи се форми. Разграничаването между отделните заболявания на базата на клинични белези е изключително трудно и създава предпоставка за диагностични грешки.

С развитието на медицинската наука бяха въведени съвременни специфични и чувствителни техники, които позволяват постигане на високи диагностична точност и сигурност. Въпреки това, изследването на всеки пациент с всички налични лабораторни методи отнема ценно технологично време и ресурс, не е икономически оправдано и може да се приеме за „грешка на изкуството“. По-правилен е алгоритмичният подход, при който първоначално се прилагат по-малко специфични, но по-чувствителни методи. При тях се очаква положителен резултат в най-голям брой от проведените изследвания, а получената информация допринася за по-конкретна насоченост на последващия диагностичен процес. В подкрепа на това заключение са резултатите от проведените проучвания, които показват, че директната имунофлуоресценция остава задължителен метод за изследване на сАИБД, който не може да бъде заменен изцяло от имуносерологичните изследвания. От друга страна, рутинните ДИФ и ИИФ не са достатъчни, за да покрият високите съвременни изисквания за добра медицинска практика. В допълнение към този „златен стандарт“, за първи път в България бяха използвани техники за доказване на специфични антитела, насочени срещу известни антигени в зоната на БМ като ВРАG1, ВРАG2 и Col VII. Въведеният диагностичен алгоритъм спомага за изясняване на диагнозата при максимален брой пациенти със сАИБД, като интегрира класическите и модерни методи. Обогащването му като предмет на бъдещи проучвания е продължаващ процес и задължително условие за успех в динамичния свят на медицинската наука.

7. Изводи

1. В българската популация булозният пемфигоид е най-честото заболяване (76,5%) в групата на сАИБД с отлагане на IgG и/или C3 по БМ.
2. Общо в изследваната група се засягат двата пола в съотношение жени:мъже 1,5:1, предимно във възрастта над 60 години. В сравнение с ВР, при ММР се засягат по-млади хора (средно 62 с/у 72 г.) и се установява 8 пъти по-често засягане на женския пол.
3. Разграничаването между отделните нозологични единици в изследваната група, единствено по клинични белези, е трудно и несигурно поради съществуването на сходни форми на заболяванията. Особен проблем представлява клиничната диагноза на epidermolysis bullosa acquisita.
4. Липсва значима корелация между дефинирани клинични находки (лигавично засягане, наличие на възпалителни промени в перibuлозна кожа, атрофия и милиуми) и резултатите от лабораторните параклинични, имунофлуоресцентни и имуносерологични изследвания.
5. Не съществува самостоятелен практически достъпен метод, който да може да замести всички останали и да послужи като последен и абсолютен стандарт при диагностиката на сАИБД. Необходим е последователен подход и комплексен анализ на информацията, получена при провеждането на различни имунофлуоресцентни и имуносерологични изследвания, за да постигне оптимална ефективност и сигурност на диагностиката.
6. Потвърждава се основната роля на директната имунофлуоресценция като основен метод за установяване на имунореагенти по базалната мембрана.
7. ИИФ върху сепарирана кожа може да достигне чувствителност от 89%, с което значително превъзхожда рутинната ИИФ върху субстрат от хранопровод ($p < 0.01$). Мехурната течност може да се използва като алтернатива на серум при невъзможност за взимане на кръвна проба.

8. ИИФ SSS е от съществено значение за отграничаване на отделните нозологични единици, като дава възможност за насочено използване на по-специфичните тестове като ELISA и BIOCHIP.
9. Серологичните изследвания като ELISA BP180-NC16A и BIOCHIP не могат самостоятелно да служат като надеждна алтернатива на ДИФ, тъй като все още покриват малка част от разнообразните антитела при сАИБД. Въпреки това, при добра селекция на изследваните пациенти, тези методи осигуряват висока специфичност и сигурност за откриване на антитела при пемфигоид и ЕВА.
10. След базичен подбор чрез ДИФ, най-висока чувствителност (93%) при имуносерологична диагностика на сАИБД, с достъпните в България методи, може да се постигне чрез ИИФ върху сепарирана кожа и последващо селектирано изследване чрез BP180-NC16A ELISA и Col VII BIOCHIP.
11. При съчетание на пемфигоид и неоплазма се наблюдават повече атипични находки и негативни резултати при изследване с имуноблот, в сравнение с пемфигоид без неоплазма. В тези случаи WB не е подходящ метод за диагноза и самостоятелното му приложение не осигурява 100% идентифициране на подозирания антиген. Почувствителен метод при тази асоциация е BP180-NC16A ELISA.
12. Булозният пемфигоид, като основен представител на изследваната група, има много голям ефект върху качеството на живот на пациентите, оказвайки негативно влияние върху ежедневните дейности, работа и учение, свободното време и личните взаимоотношения. Налага се изводът, че е от изключителна важност да се обръща внимание не само на обективните клинични данни, а и на субективните усещания на болните.

8. Приноси

Приоритетни научни приноси с оригинален характер

1. За първи път у нас, чрез приложение на разнообразни диагностични методи, се провежда комплексно клиничко-лабораторно проучване с цел отдиференциране на различните нозологични единици в групата на сАИБД, медирани от антибазалномемранни антитела от клас IgG.
2. За първи път у нас се анализират резултатите от изследване чрез ИИФ на сепарирана кожа при контингент от болни със сАИБД.
3. За първи път у нас върху кохорта от пациенти се провежда ELISA BP180-NC16A за установяване на специфични антитела при пемфигоид.
4. За първи път у нас се провежда ИИФ с комбинирана ВЮСНР мозайка – експериментален комбиниран метод за откриване на антитела при АИБД върху шест субстрата.
5. За първи път у нас се провежда ИИФ върху трансфектирани с Col VII клетки за откриване на антитела при ЕВА.
6. За първи път у нас чрез ELISA са изследвани нивата на тотален IgE в серума на болни с пемфигоид.
7. За първи при български пациенти, чрез имуноблот се провежда проучване на специфичността на антителата при паранеопластичен пемфигоид.
8. Изследвано е качеството на живот при пациенти със сАИБД.

Приноси с потвърдителен и теоретичен характер

1. Проучен е епидемиологичният спектър на субепидермалните автоимунни булозни дерматози, медирани от антитела от клас IgG, в България.
2. Извършен е задълбочен клиничен анализ на сАИБД в българската популация. Получените данни са обработени

- в търсене на корелация между клиничните особености и лабораторните находки.
3. Извършено е сравнение между чувствителността на различните имунофлуоресцентни и имуносерологични методи в диагностиката на сАИБД.
 4. Описани са редки клинични случаи на пемфигоид, индуциран от изгаряне, пемфигоид след приложение на перметрин, скабиес крустоза като усложнение от имуносупресивна терапия при пациент с ВР, ЕВА в детска възраст.

Приноси с научно-приложен характер

1. Създаден е алгоритъм за диагностика на субепидермалните автоимунни дерматози с отлагане на IgG и/или C3 по хода на базалната мембрана, адаптиран към провежданите в България имунофлуоресцентни и имуносерологични изследвания.
2. Разработена е специализирана компютърна софтуерна система за създаване на база данни от резултатите на проведените изследвания.

9. Публикации и участия по темата на дисертацията

Публикации по темата на дисертацията:

1. Autoimmune blistering diseases as systemic diseases. S. Vassileva, K. Drenovska, K. Manuelyan. Clinics in Dermatology 2013. Published online 25 November 2013, Accepted Manuscript.
2. Пемфигоид – булозен, цикатризиращ и пемфигоид на бременните. К. Мануелян, К. Дреновска, С. Василева. Медикарт 2013; 3; 49-52.
3. Паранеопластичен булозен пемфигоид – проучване на специфичността на автоантителата чрез Western blot и ELISA ВР180 NC16А. К. Дреновска, К. Мануелян, Е. Петрова, С. Василева. Дерматология и венерология 2012; 1: 42-47.
4. Булозен пемфигоид индуциран от изгаряне. Мануелян К., Дреновска К., Василева С. Дерматология и венерология 2012; 2: 69-76.

Участия по темата на дисертацията на научни форуми:

1. Антивирусен хуморален имунен статус при пациенти с автоимунни булозни дерматози. Железова Г, Л. Церовска, Л. Йочева, С. Василева, К. Мануелян, К. Дреновска, Г. Матеев. XI Национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, София, 9-11 май 2013.
2. Автоимунни булозни дерматози в детска възраст. Мануелян К., Дреновска К., Василева С. Бургаска педиатрична конференция, Бургас, 15-16 сеп 2012.
3. Паранеопластичен булозен пемфигоид – проучване на специфичността на автоантителата чрез Western blot и ELISA ВР180 NC16А. К. Мануелян, К. Дреновска, С. Василева. VI Пролетни варненски дерматологични дни, Златни пясъци, 19-22 апр 2012.

4. Булозен пемфигоид, индуциран от термично изгаряне. Мануелян К., Присадашка К., Балабанова М., Дреновска К., Дурмишев Л., Етугов Д., Негенцова З., Попов Я., Василева С. XX конференция Софийски дерматологични дни, София, 03-05 ное 2011.
5. Two cases of epidermolysis bullosa acquisita. Manuelyan K, Drenovska K, Vassileva S. X International Congress of Medical Sciences (ICMS), Sofia, Bulgaria, 12-15 May 2011.
6. Дисеминирана пруригиозна ерупция при пациент с булозен пемфигоид. К. Мануелян, К. Дреновска, Л. Дурмишев, З. Негенцова, Я. Попов, В. Броцилова, Г. Казандзис, С. Василева. XIX конференция Софийски дерматологични дни, София, 04-06 ное 2010.