

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ

Д-Р КАРЕН ЛОРИС МАНУЕЛЯН

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

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.

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ:
ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ

СОФИЯ, 2014 г.

Съдържание:

Често използвани съкращения (3 стр.)

1. Въведение (4 стр.)
2. Литературен обзор (6 стр.)
 - 2.1 Исторически данни (6 стр.)
 - 2.2 Устройство на дермо-епидермалната зона (9 стр.)
 - 2.3 сАИБД с отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана (12 стр.)
 - 2.4 Диагностика на сАИБД (31 стр.)
 - 2.5 Обобщение (42 стр.)
3. Цел и задачи (43 стр.)
4. Материал и методи (44 стр.)
 - 4.1 Материал (44 стр.)
 - 4.2 Клинични методи (46 стр.)
 - 4.3 Лабораторни методи (49 стр.)
5. Резултати (60 стр.)
 - 5.1 Епидемиологично проучване (60 стр.)
 - 5.2 Клинични проучвания (63 стр.)
 - 5.3 Лабораторни изследвания (69 стр.)
 - 5.4 Софтуерна разработка (88 стр.)
 - 5.5 Качество на живот при пациенти с пемфигоид (89 стр.)
6. Обсъждане (92 стр.)
 - 6.1 Епидемиологичен анализ (92 стр.)
 - 6.2 Клинични проучвания (96 стр.)
 - 6.3 Лабораторни изследвания (98 стр.)
 - 6.4 Клинико-лабораторни корелации (115 стр.)
 - 6.5 Софтуерна разработка (116 стр.)
 - 6.6 Паранеопластичен булозен пемфигоид – проучване на специфичността на автоантителата чрез Western blot и ELISA BP180-NC16A (117 стр.)
 - 6.7 Качество на живот при пациенти с пемфигоид (119 стр.)
7. Заключение (124 стр.)
8. Изводи (125 стр.)
9. Приноси (127 стр.)
10. Приложения (129 стр.)
11. Литература (130 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, медиирани 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 локализирани в хемидесмозомите (булозен пемфигоид), lamina lucida (пемфигоид на мукозните мембрани, линеарна 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 линеарната 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), имуоблот, имуопреципитация 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-пемфигOID, р105-пемфигOID и анти-ламинин-332 пемфигOID.

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 клинико-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. Литературен обзор

2.1 Исторически данни

Автоимунните булозни дерматози (АИБД) са „древни“ заболявания, представата за които еволюира с развитието на медицинската наука. Въвеждането на нови диагностични методи, чрез които се установяват специфични таргетни антигени, води до обогатяване на нозологията чрез непрекъснато ѝ разделяне на по-малки единици. В миналото, като основен е използван описателният метод в медицината, който по естествен начин класифицира случаи с близки сходства в клиничната картина като принадлежащи към една и съща болестна единица. Приложението на съвременните молекулярни техники дава възможност за разграничаване по патогенетични белези на заболявания, които показват високо клинично сходство.

Терминът *пемфигоид* произхожда от *pemphigus*, който от своя страна се свързва с името на известния френския лекар François Boissier de la Croix de Sauvages и неговия труд *Nosologia methodica*, издаден през 1763 г.^{1,2} Счита се, че именно Boissier de Sauvages латинизира гръцкия термин *pemphygos*³ (*pemphix* – мехур). Авторите преди него използват предимно *febris bullosa* (латински), *febris pemphigoides* (съчетание от латински и гръцки), или още по-ранното гръцко наименование *πυρετοί πεμφίζώδεις* (*pyretoî pemphigodes*), което датира от времето на Хипократ⁴. След Gilibert (1813 г.⁵), Savary (1814 г.⁶) проследява подробно историята на пемфигуса. Той е първият, усъмнил се, че хипократовата *febris pemphigodes* не е еднозначна с разбирането на понятието *pemphigus* на неговите съвременници⁷. От времето на Хипократ, през Гален до Boissier de Sauvages и дори Savary, с понятието *пемфигус* са означавани всички булозни и пустулозни състояния на кожата и лигавиците:

pemphigus acutus febrilis gravis, pemphigus epidemicus neonatorum, pemphigus congenitus/traumaticus (epidermolysis bullosa), pemphigus benignus/recidivans (pemphigoid), pemphigus hystericus, pemphigus leprosus, pemphigus syphiliticus. Базирайки се на хистопатологични наблюдения, през 1943 г., Civate разделя интраепидермалните от субепидермалните булозни дерматози, въвеждайки хистопатологичния термин акантолиза. За първи път *булозният пемфигоид* е описан като самостоятелно заболяване, различно от *pemphigus vulgaris* през 1953 г. от Lever, който отбелязва, че акантолизата е характерна единствено за интраепидермалните автоимунни дерматози.⁸ Lever наблюдава субепидермален мехур при пациентите с *pemphigus vulgaris chronicus*, какъвто липсва при тези с *pemphigus vulgaris acutus* и въвежда названието *доброкачествен булозен пемфигус*, като за първи път използва термина *булозен пемфигоид*, разделяйки заболяването от *dermatitis herpetiformis*⁹. По своята етимологична същност, понятието булозен пемфигоид е плеоназъм (повторение, използване на сходни по значение думи).

Първото публикувано съобщение за *цикатризиращ пемфигоид* вероятно е направено от Wichmann през 1794 г. Важна роля в класификацията на очния цикатризиращ пемфигоид играят Thost и Foster. През 1957 г. Brunsting и Perry описват различен вариант на цикатризиращ пемфигоид, локализиран върху кожата в областта на главата и шията, при който лигавиците се засягат по-рядко (*Brunsting-Perry цикатризиращ пемфигоид*). Според консенсусно решение от 2001 г., на база на клинични и имунохистопатологични находки, цикатризиращият пемфигоид се преименува на *пемфигоид на мукозните мембрани* (Mucous membrane pemphigoid, MMP), със или без кожно засягане.¹⁰

Пемфигоидът на бременните жени е описан още от Bunel през 1811 г., а по-късно и от Ferdinand von Hebra през 1868 г. За първи път Milton нарича заболяването *herpes gestationis*, а Russel и Thorne публикуват подробно клинично описание през 1957 г.¹¹

Бърз напредък в разбирането и класификацията на автоимунните булозни дерматози се постига в средата на 60-те години на XX век, след

въвеждането на имунофлуоресцентната микроскопия в дерматологията от Beutner¹² и Jordan¹³. Използването на директна (ДИФ) и индиректна (ИИФ) имунофлуоресценция позволява да се открият таргетните антигени на автоантителата при АИБД, както и да се определи груповата принадлежност на тези антитела (IgG, IgA, IgM). Използвайки тези методи Van der Meer през 1969 г. диференцира *dermatitis herpetiformis* от булозния пемфигоид.¹⁴ Chorzelski и колектив установяват отлагането на IgA по базалната мембрана (БМ) при *линеарната IgA булозна дерматоза*, отделяйки я като самостоятелна нозологична единица.

Lichen planus pemphigoides е описан като самостоятелно заболяване за първи път от Karosi през 1892 г., който го нарича *lichen ruber pemphigoides*¹⁵. През 1923 г. Strauss разглежда в детайли характерните клинични и хистопатологични белези на заболяването¹⁶. Специфичните имунофлуоресцентни находки при LPP са документирани от Souteygrand през 1981 г.¹⁷.

Epidermolysis bullosa acquisita (ЕБА) е описана за първи път от Elliott преди повече от 100 години¹⁸ като придобита форма, подобна клинично на наследствената дистрофична *epidermolysis bullosa*, където наследствен дефект в гена, кодиращ колаген VII предизвиква нестабилност на закотвящите фибрили и лесна ранимост на кожата. През 1971 г. Roenick¹⁹ въвежда първите диагностични критерии за ЕБА. Чрез електронна микроскопия Nieboer разграничава заболяването от ВР, като демонстрира отлагания на IgG в или под *lamina densa* при ЕБА²⁰.

През 80-те години на XX век два нови диагностични методи обогатяват диагностиката на автоимунните булозни дерматози – имуноблот и индиректна имунофлуоресценция върху сепарирана с 1,0 М NaCl кожа. Въвеждането на имуноблота води до откриване на нови нозологични единици като *анти-епилигрин цикатризиращ пемфигоид* (АЕСР), *IgA-ЕБА*, *p105* и *p200 пемфигоид*, както и до установяване на таргетните антигени на булозния пемфигоид (BP180²¹ и BP230²²), линеарната IgA булозна дерматоза (LAD-1²³) и *epidermolysis bullosa acquisita* (колаген VII²⁴).

През 1992 г., Domloge-Hultsch и колектив идентифицират ламинин-5 като таргетен антиген при АЕСР, по-късно наречен анти-*ламинин-332 пемфигойд* на мукозните мембрани.²⁵ Година по-късно Chan публикува съобщение за нова булозна дерматоза с автоантитела срещу протеин с молекулно тегло 105 kDa²⁶, която клинично наподобява токсичната епидермална некролиза. През 1996 г. Zillikens описва 5 пациенти с анти-p200 пемфигойд²⁷, с клинична картина подобна на ВР и LAD. Единични случаи са описани с автоимунитет към епиплакин^{28,29} и протеин с тегло 168 kDa (*168-kDa pemphigoid*). Спектърът на антигените се обогатява допълнително, след като при няколко пациенти с пемфигойд и бъбречна недостатъчност се откриват автоантитела срещу $\alpha 5$ веригата на колаген тип IV в lamina densa.^{30, 31}

В последните години нови диагностични методи улесняват по-бързата и точна диагноза на заболяванията от групата на пемфигойда. Ензимно-свързаният имуносорбентен анализ позволява качествено и количествено идентифициране на циркулиращи антитела, насочени срещу определени таргетни антигени. Съществуват комерсиални ELISA китове за изследване на антитела срещу основните антигени на булозия пемфигойд (BP180 и BP230) и epidermolysis bullosa acquisita (колаген VII).

Съвременни методи като BIOCHIP мозайката дават възможност голям брой серумни проби да бъдат едновременно и комплексно изследвани чрез индиректна имунофлуоресценция за антитела срещу структури на дермо-епидермалната граница и десмозомите. Методът осигурява бърза и стандартизирана диагностика при пациентите с автоимунни булозни дерматози.

2.2 Устройство на дермо-епидермалната зона

Базалната мембрана представлява сложна система, осигуряваща дермо-епидермално свързване, гъвкавост и еластичност на кожата, както и

комуникация и пренос на вещества между епидермиса и мезенхима. Именно в тази динамична и непрестанно ремоделираща се структура, се проявяват голяма част от възпалителните дерматози, а дефекти в отделните й компоненти причиняват редица резистентни на терапия генодерматози. Автоимунните процеси при субепидермалните булозни дерматози водят до образуване на антитела насочени срещу разнообразния антигенен състав на дермо-епидермалната зона.

Базалната мембрана е гранична повърхност между структури с различен ембрионален произход – епителна тъкан (ектодерма) и дерма (мезенхимен произход). С помощта на електронна микроскопия се наблюдава комплексна ултраструктура, която повърхностно е изградена от цитоплазмената мембрана на базалните кератиноцити, заедно с хемидесмозомните комплекси. В дълбочина следват оптично светла ивица с дебелина 20-40 nm, наречена *lamina lucida* и оптично плътна 30-60 nm ивица – *lamina densa*. Зоната под нея, *sublamina densa*, съдържа влакнести структури (закотвящи фибрили), които свързват *lamina densa* с папиларна дерма. Биохимичният състав на базалната мембрана е сложен и се състои от 20 протеина (колагенни и неколагенни), гликопротеини, адхезионни молекули и др.

Базалната мембрана играе важна роля за свързването на епидермиса и дермата и механично поддържа епидермиса чрез гликопротеините си (основно ламинини), които са добър субстрат за адхезия и миграция на кератиноцитите и подпомагат епителизацията на раните. БМ представлява бариера за големи молекули и клетки, с което предотвратява навлизането на патогенни микроорганизми в кожата, като същевременно пропуска кислород, хранителни вещества, антитела, комплемент и имунни клетки от дермата в епидермиса.

Хемидесмозомите играят роля на мостове между цитоскелета на кератиноцитите и базалната мембрана. Те са съставени от три плътни плаки: - вътрешна плака, която е свързана с интермедиерните филаменти. Съдържа плектин и антиген 1 на булозния пемфигOID с молекулна маса 230 kDa

(BP230). С-терминалните краища на BP230 и плектина взаимодействат с интермедиерните филаменти (K5 и K14), а техните N-терминални участъци се свързват с цитоплазмения домейн на трансмембрания колаген XVII (ангитен 2 на булозния пемфигоид, BP180) и на $\beta 4$ интегрин субединицата.

- външна плака, разположена в близост до плазмената мембрана. Състои се от цитоплазмения участък на двата трансмембранны хемодесмосомални протеини, BP180 и $\beta 4$ интегрин. Други протеини на външната плака са P200 и IFAP 300.

- суб-базална плака – намира се в lamina lucida на мястото, където външните участъци на BP180 и $\beta 4$ интегриновата субединица се свързват с ламинин-332. Закотвящите филаменти, които са съставени от ламинин-332 и екстрацелуларната част на BP180, започват от суб-базалната плака, пресичат lamina lucida и се свързват със закотвящите фибрили в lamina densa.

Закотвящите фибрили осъществяват връзката между суб-базалната плака и колаген III в ретикуларна дерма. Те са изградени предимно от колаген VII, към когото са насочени патогенните антитела при epidermolysis bullosa acquisita.

Основният антиген при dermatitis herpetiformis – епидермалната трансглутаминаза, не е структурен компонент на базалната мембрана, а се намира в папиларна дерма.

Ролята на антителата, насочени срещу компоненти на базалната мембрана, ще бъде разгледана по-подробно при обсъждането на отделните заболявания.

Таблица 1. Таргетни антигени при придобитите субепидермални автоимунни булозни дерматози

Заболяване	Таргетни антигени	Локализация
Булозен пемфигOID	BP180-NC16A BP230 LAD-1	Хемидесмозоми
ПемфигOID на мукозните мембрани	BP180-NC16A BP230 $\alpha 6\beta 4$ Ламинин-311	Lamina lucida
Анти-ламинин-332 (антиепилигрин) пемфигOID	Ламинин-332	Долна част на lamina lucida
Анти-p200/ Ламинин $\gamma 1$ пемфигOID	Ламинин $\gamma 1$	Долна част на lamina lucida
Булозна дерматоза с антитела срещу $\alpha 5$ верига на колаген тип IV	$\alpha 5(IV)NC1$	Lamina densa
Линеарна IgA дерматоза	LAD-1 Колаген тип VII	Lamina lucida
Epidermolysis bullosa acquisita	Колаген тип VII	Закотвящи фибрили
Булозен системен лупус еритематозус	Колаген тип VII	Закотвящи фибрили
Dermatitis herpetiformis	Епидермална трансглутаминаза	Папиларна дерма

2.3 сАИБД с отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана

Основните заболявания в групата на пемфигоида са булозен пемфигOID, пемфигOID на мукозните мембрани, пемфигOID на бременните и lichen planus pemphigoides. Новоописаният анти-p200 пемфигOID се разглежда като отделна нозологична единица поради специфичния таргетен антиген, но клиничната картина и терапевтичното поведение са идентични с

тези при булозен пемфигOID. Анти-ламинин 332 пемфигOIDът (анти-епилигрин цикатризиращ пемфигOID) се причислява към хетерогенната група на пемфигOID на мукозните мембрани.

2.3.1 Булозен пемфигOID

2.3.1.1 Епидемиология

Булозният пемфигOID (BP) е най-често срещаната булозна дерматоза в страните от Западна Европа и засяга предимно лица в напреднала възраст (над 65-70 години). BP има честота от 6-7 случая на милион население на година във Франция³² и Германия³³ и дори по-висока във Великобритания³⁴ и някои региони на Италия³⁵. По-ниска заболеваемост от около 4 случая на милион се установява в Хърватия за пет годишен период от 2005 до 2010 г., при честота на пемфигус от 3,7 на милион³⁶. Епидемиологично проучване в Австрия, обхващащо 270 пациенти с автоимунни булозни дерматози в рамките на 17 години, показва близо 5 пъти по-висока честота на булозния пемфигOID, сравнено със заболяванията от групата на пемфигуса³⁷. Заболеваемостта е разпределена по равно между двата пола. През последните 10 години, в Обединеното кралство, Германия и Франция, заболеваемостта е нараснала значително (между два и пет пъти)^{38,39,40}. Причината за това вероятно се крие в нарастващата възраст на населението в тези страни, както и на наличността на по-чувствителни и специфични методи за диагностика на булозния пемфигOID.

Липсва единна база данни относно епидемиологията на сАИБД в България. В доклад от 2000 г. се съобщава за 324 пациенти с АИБД, диагностицирани в Катедрата по дерматология, София, през периода януари 1989 – април 2000 г.⁴¹ Броят на пациентите със субепидермалните булозни дерматози (174 случая) е по-голям от този на болни с различни форми на пемфигус (150 случая). За посочения 11-годишен период са диагностицирани 93 случая (28,7%) с булозен пемфигOID, 26 случая (8%) с цикатризиращ

пемфигоид, 2 жени (0,6%) с пемфигоид на бременността, 1 болна (0,3%) с lichen planus pemphigoides, 9 болни (2,8%) с epidermolysis bullosa acquisita, 5 болни (1,5%) с булозен системен lupus erythematosus, 22 случая (6,8%) с линейна IgA дерматоза и 13 болни (4%) с dermatitis herpetiformis.

Друга публикация по темата показва, че в периода 1985-1995 г., в Клиниката по кожни болести при ВМИ, Пловдив, са лекувани 31 болни с диагноза пемфигоид, от които 11 мъже и 20 жени. С булозен пемфигоид са 27 пациенти, 3-ма са диагностицирани с ММР, а една пациентка с РГ.⁴²

В прочуване на Влашев от 1971 г., са описани 37 пациенти с пемфигоид.⁴³ Според клиничната форма, авторът ги разделя на булозен пемфигоид (21 случая, 56,76%), полиморфен пемфигоид (8, 21,62%), цикатризиращ пемфигоид (4, 10,81%) и Brunsting-Perry пемфигоид (4, 10,81%), разгледани като клинични разновидности на едно заболяване. Съотношението мъже:жени в групата е 1,05:1, но при цикатризиращ пемфигоид жените са три пъти повече от мъжете. Повече от $\frac{3}{4}$ от пациентите са на възраст над 60 г., а едва 5,4% са под 40 г.

2.3.1.2 Смъртност, рискови фактори и асоциирани заболявания

Приема се, че ВР е с по-благоприятна прогноза от пемфигуса⁴⁴, въпреки че няколко големи европейски проучвания напоследък оборват това твърдение и установяват фатален изход при над 40% от пациентите в рамките на 12 месеца от началото на заболяването.⁴⁵ По-голямата част от смъртните случаи вероятно се дължат на възрастта и влошеното общо състояние на пациентите, като основен рисков фактор е прилагането на високи дози перорални кортикостероиди.^{46,47} Болните с булозен пемфигоид развиват пневмония и белодробен емболизъм три пъти по-често от съответни по възраст и пол контроли.⁴⁰

Успоредно с ВР могат да се проявят и редица автоимунни (ревматоиден артрит, тиреоидит на Hashimoto, дерматомиозит, системен лупус и автоимунна тромбоцитопения⁴⁸), ендокринни (диабет,

хипертиреоидизъм, хипотиреоидизъм) и други заболявания (пернициозна анемия, улцеративен колит, polymyalgia rheumatica, алоpecia, mycosis fungoides, първична билиарна цироза, нефрит и гломерулонефрит, морфея), описани еднократно или в малки серии и събрани от Ljubojević и Lipozenčić⁴⁹.

В българската литература са описани случаи на асоциация на булозен пемфигоид с псориазис вулгарис⁵⁰, както и с тиреоидит на Хашимото и витилиго⁵¹.

В някои случаи индуциращ фактор за развитие на заболяването са физични фактори (изгаряне, радиотерапия, ултравиолетово облъчване)⁵², или локални и системни лекарствени средства⁵³. В литературата са описани дванадесет случая на булозен пемфигоид, който се развива след термично изгаряне.⁵⁴ Данните са обобщени в Таблица 2.

Таблица 2. Случаи на булозен пемфигоид, индуциран от изгаряне

Автори	Възраст /пол	Време от изгарянето до появата на ВР лезии	ИИФ	Причинител на изгарянето
Jevtic and Grigoris ⁵⁵	80/М	2 седмици	(+)	Вряща вода
Vassileva et al ⁵²	79/М	1 месец	(+)	Нагорещена ракия
Quartey-Papafio and Hudson ⁵⁶	69/М	3 седмици	(+)	Гореща вода
Balato et al ⁵⁷	75/Ж	6–7 седмици	(+)	Термично изгаряне
Wagner et al ⁵⁸	49/Ж	5 седмици	Без данни	Гореща мазнина
	67/М	2 месеца	Без данни	Запален газ
Chen and Fairley ⁵⁹	49/М	1–2 седмици	(-)	Glutaraldehyde, isothiazolinone
Vermeulen et al ⁶⁰	89/Ж	1 седмица	(-)	Термично изгаряне
Blaise et al ⁶¹	72/М	40 дни	Без данни	Термично изгаряне
Xu et al ⁶²	51/М	6 седмици	(+)	Вряща вода
Bachmeyer et al ⁵⁴	74/М	4 седмици	(-)	Вряща вода
Manuelyan et al ⁶³	88/М	4 седмици	(+)	Термично изгаряне

Описаните пациенти са девет мъже и три жени, на възраст между 49 и 89 години. Причина за изгарянето е контакт на кожата с вряща вода, гореща мазнина, нагорещени предмети или възпламенен газ. В един случай ВР се свързва с химично изгаряне след излагане на кожата на действието на isothiazolinone и glutaraldehyde.⁵⁹ Периодът между термичната травма и появата на характерни за пемфигоид лезии варира от две до осем седмици. В два от случаите булозните лезии са локализирани само върху засегнатата повърхност^{58,60}, докато при всички останали пациенти, впоследствие се образуват мехури и в други кожни участъци. Хистологичното изследване винаги демонстрира субепидермална була, а ДИФ показва линейно отлагане на IgG и C3 в дермо-епидермалната зона. ИИФ е положителна в пет от случаите и отрицателна в три от тях. При всички пациенти се постига бързо клинично подобрене с локални или системни кортикостероиди, без рецидиви на заболяването. Наред с горните публикации, в литературата съществуват немалко съобщения за индуцирани от изгаряне pemphigus vulgaris^{64,65,66,67}, pemphigus erythematosus⁶⁸, и линейна IgA дерматоза⁶⁹. Ето защо, диференциалната диагноза на всяка булозна ерупция, възникнала в контекста на предшестваща термична травма на кожата, трябва да включва целия възможен спектър на придобити автоимунни булозни дерматози.

2.3.1.3 ВР и неопластични заболявания

При пациенти с ВР се описват злокачествени заболявания: висцерални карциноми, сарком, меланом и лимфопролиферативни състояния. Съществуват съобщения за възникване на ВР в асоциация с различни злокачествени тумори, предимно карциноми на вътрешните органи: карцином на бронхите⁷⁰, хранопровода⁷¹, стомаха⁷², ректума⁷³, панкреаса⁷⁴, бъбреците^{75,76}, вулвата⁷⁷, матката³⁵ и др. По-редки са описанията на ВР в съчетание със сарком на Kaposi вследствие на имуносупресивна терапия⁷⁸, както и при пациенти с малигнен меланом⁷⁹, лимфом⁸⁰ или

миелодиспластичен синдром⁸¹. Chorzelski и съавт. установяват повишена честота на злокачествени заболявания при пациенти с ВР в сравнение с контролни групи⁸². Подобни резултати установяват също Venning и Wojnarowska при 84 пациента с ВР: асоциирана неоплазма се установява при 18% от пациентите с ВР, сравнено с 5% у съответстващи по възраст и пол контролни лица.⁸³

Въз основа на тези наблюдения се дискутира евентуалният паранеопластичен характер на заболяването, но проучвания върху честотата на асоциация на ВР с неоплазми при по-големи серии от пациенти показват противоречиви резултати и подобни съчетания биха могли да се обяснят с факта, че ВР засяга предимно лица в напреднала възраст, при които рискът от развитие на малигнени тумори е поначало по-висок.⁸⁴ Така например, Ahmed и съавт. установяват наличие на злокачествени заболявания при 3% от 33 пациенти с ВР, сравнено с 4,2% при съответстваща по възраст контролна група.⁸⁵ В големи серии пациенти, Stone и Schroeter¹⁹ откриват неоплазми при 8 от 73 болни с ВР и при 21 от 146 пациенти-контроли, страдащи от други кожни заболявания.⁸⁶ Cozzani и съавт. съобщават резултатите от 2-годишно проучване върху 32 случая с ВР, подробно изследвани и проследени за развитие на съпътстваща неоплазма. Данни за малигнен процес са намерени в 6 от случаите, но не са установени клинични или имунологични параметри, които биха могли да се приемат като прогностични за тяхното развитие.¹⁰ През 1971 г. Влашев открива неоплазия при 3 от 37 случая с пемфигоид и съветва при всички болни с това заболяване да се търси неопластичен процес.⁴³

Според съвременните схващания, при липса на патологични соматични находки при физикалния преглед, не се препоръчват допълнителни изследвания с цел да се отхвърли злокачествено заболяване.

Автоимунните булозни дерматози често са описвани в асоциация със злокачествени заболявания, но до настоящия момент, дефинирани клинични, хистологични и имунологични критерии съществуват единствено за паранеопластичния пемфигус (pemphigus paraneoplasticus, PNP).⁸⁷

Независимо от факта, че редица варианти на пемфигоида, в т.ч. булозен, цикатризиращ, анти-епилигрин и др., са съобщавани в асоциация с неоплазми и са считани за паранеопластичен феномен, до момента няма възприети клинични или лабораторни критерии в подкрепа на тяхната паранеопластична природа.^{88,89} Някои автори изказват твърдението, че паранеопластичният пемфигоид показва атипични клинични белези като наличие на лезии тип *erythema figuratum*^{2,90}, *erythema gyratum repens*⁹¹, *erythema multiforme*¹⁵, засягане на видимите лигавици, епителизиране на лезиите с атрофични цикатрикси и формиране на милиуми, както и негативен резултат от индиректна имунофлуоресценция.^{92,93,94} Нито един от тези белези, обаче, не може да бъде считан за диагностичен по отношение на наличието на малигнена асоциация или прогностичен по отношение риска за развитие на такава в бъдеще.

При случаи на пемфигоид и асоциирана неоплазма, по аналогия с PNP, е уместно изследване на специфичността на циркулиращите антибазалномембранни антитела посредством имуноблот и ELISA, поради факта, че последните са по-надеждни и специфични от метода на индиректна имунофлуоресценция (ИИФ) по отношение характеризирането на антигените, срещу които са насочени антителата в серума на пациентите. При имунопреципитационните реакции автоантителата от серума на болни с пемфигоид реагират с хемидесмозомни антигени с молекулна маса 180 kDa и 230 kDa, които съответстват на BPAG1 и BPAG2. В литературата като единствено патогенни при BP се посочват автоантителата срещу BP180, а в скорошни публикации се изтъква, че в случаите на BP, асоцииран с неоплазма, в серума на болните се установяват автоантитела именно срещу BPAG 180 kDa.⁹⁵ При метода ELISA, за антиген служи рекомбинантен BP180-NC16A, което определя високата му чувствителност и специфичност дори при негативен резултат от имуноблот и значително подпомага диагностиката и определянето на профила на антителата в серума на пациентите с BP.

2.3.1.4 Асоциация с неврологични заболявания

При пациенти с ВР се наблюдава по-голяма честота на неврологични заболявания, включително деменция, епилепсия, множествена склероза, инсулт, болест на Parkinson, тремор, дискинезия и др.⁹⁶ При неврологично болни е установено значително повишаване на риска от развитие на ВР.^{97,98} Деменцията, болестта на Parkinson и униполярното или биполярно разстройство са независими рискови фактори за ВР.⁹⁹

Поради факта, че антиген 1 на булозния пемфигOID (BP230), се експресира в централната и периферната нервна система¹⁰⁰, се подозират общи аутоимунни механизми. В серума на пациенти, които страдат едновременно от ВР и неврологично заболяване, се откриват антитела, които разпознават BP230 в човешки мозък. Авторите на проучване от Китай¹⁰¹ достигат до заключението, че както кожата, така и мозъкът съдържат имуногенен BP230. Патологичните изменения при възрастни хора с неврологично заболяване вероятно „излагат на показ“ невроналните изоформи на BP230. В някои случаи, аутоантитела срещу BP230, насочени първоначално срещу невроналните изоформи на антигена, реагират кръстосано с изоформи в кожата, причинявайки забавеното развитие на ВР по-късно от началото на неврологичните симптоми.⁹⁹ Възможен е и обратният патофизиологичен сценарий – циркулиращи антитела срещу епителни изоформи на BP230 могат да разпознават общи последователности в невралните изоформи, допринасяйки за неврологичните манифестации.⁹⁸

2.3.1.5 Патофизиология

Булозният пемфигOID е прототип на органно-специфично заболяване, медирано от антитела срещу хемидесмозомни протеини. Таргетни антигени са локализирани в рамките на кожни и лигавични структури, което обуславя липсата на първично системно засягане от аутоимунния процес.

Сега е известно, че заболяването се медитира от автоантитела от клас IgG, насочени срещу два епидермални полипептида, които са нормални структурни компоненти на хемидесмозомите, а именно антиген I на булозния пемфигоид с молекулно тегло 230 kDa (BPAg1 или BP230) и антиген II на булозния пемфигоид с молекулно тегло 180 kDa (BPAg2 или BP180) или колаген XVII.^{102,103.}

BP180 – колаген XVII или антиген 2 на булозния пемфигоид е трансмембранен гликопротеин – хомотример от три алфа 1 (XVII) вериги, чийто екстрацелуларен край е локализиран в lamina lucida на базалната мембрана¹⁰⁴. Всяка 180 kDa алфа-верига съдържа глобуларен интрацелуларен домейн с тегло 70 kDa, който се свързва с β 4-интегрин, плектин и BP230. Имуногенният регион на BP180, към който са насочени антителата при заболяванията от групата на пемфигоида, представлява проксимален мембранен неколагенов домейн, обозначен като NC16A.¹⁰⁵ Въпреки това при голяма част от пациентите се откриват IgG автоантитела срещу други епитопи извън NC16A.^{106,107} Разработени са методи, при които чрез ELISA или BIOCIP се откриват антитела срещу BP180-NC16A. Количественото определяне на антителата срещу BP180 корелира с активността на болестния процес, а важността на антителата срещу BP180 в патогенетичния процес е доказана в редица проучвания.¹⁰⁸ Fc рецептор-независими ефекти се наблюдават в култивирани човешки кератиноцити, при които инкубиране с BP180-специфични антитела води до намаляване на експресията на BP180 с последващо клетъчно разделяне и сигнална трансдукция, което е съпроводено с освобождаване на интерлевкин 6 и интерлевкин.^{109,110,111}

Fc рецептор-медиирани ефекти играят основна роля във формирането на мехури, както е показано чрез *in vitro* животински модели.^{112,113,114} Повечето от данните са получени при експерименти с новородени мишки, при които инжектирането на противомиши BP180 антитела възпроизвежда основните характеристики на заболяването при човека.¹¹⁵ Този модел демонстрира значението на активацията на комплемента при дермо-епидермалната граница, както и участието на неутрофили, макрофаги,

мастоцити и различни протеази, включително неутрофилните еластаза, металопротеиназа 9, плазмин, $\alpha 1$ протеиназа инхибитор и мастоцитна протеиназа при образуването на мехури.¹¹⁶ IgG реактивността към С-терминални епитопи се асоциира с лигавични лезии и тежко засягане на кожата, докато антитела срещу вътреклетъчния домейн на BP180 играят патогенетична роля в по-ранни стадии на заболяването. В допълнение към антителата от клас IgG, в серума на пациенти с пемфигоид се откриват също IgA и IgE антитела срещу BP180.^{117,118,119} BP180-NC16A-специфични антитела от клас IgE се асоциират с форми на заболяването, протичащи по-тежко и резистентни на терапия с кортикостероиди.^{120,121}

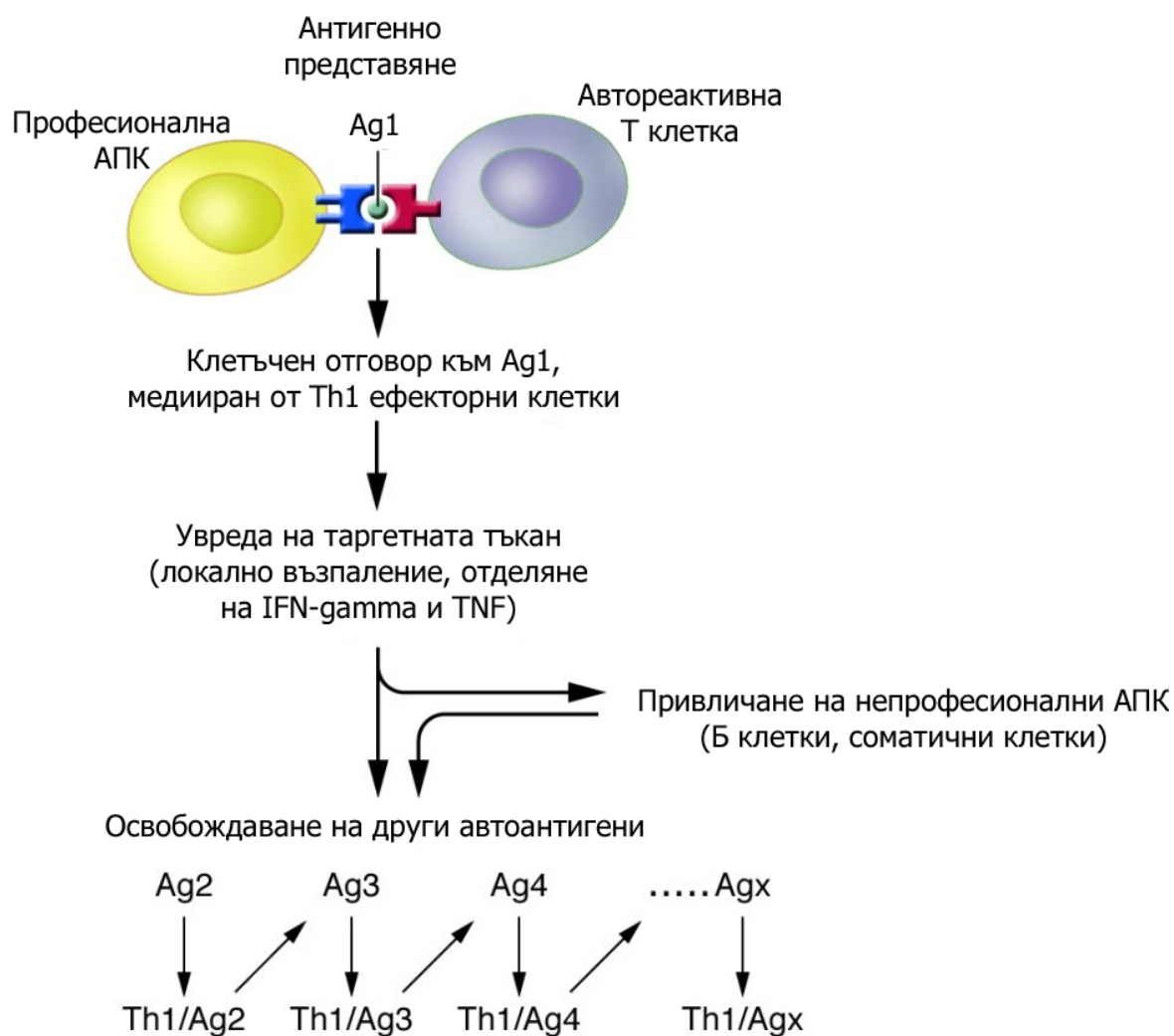
BP230 – антиген 1 на булозния пемфигоид е протеин с маса 230 kDa, който е локализиран интрацелуларно, принадлежи към групата на плакините и е структурен компонент на хемидесмозомната плака. Антителата срещу BP230 могат да бъдат от клас IgG или IgE и не корелират с тежестта на заболяването.¹²² Поради експресията на BP230 в невронални структури, е възможно антителата срещу антиген 1 на булозния пемфигоид да играят роля не само в кожните манифестации на заболяването.

Установено е, че патологичният процес често включва разпространение на имунния отговор извън стриктно определените таргети на антителата с въвличане на различни епитопи в структурата на един и същи протеин или на различни протеини в същата тъкан. Този факт се обяснява с имунологичния феномен, наречен „епитопно разпространение” (epitope spreading), при който тъканна увреда от първичен възпалителен процес индуцира освобождаването на изолирани или „скрити” до момента антигени, което води до вторичен автоимунен отговор и разпространяване на болестния процес в отдалечени области.¹²³

Автоимунният процес най-често се инициира от определен първичен антиген (Ag1), срещу който под действие на проинфламаторни цитокини възниква Т-клетъчно медиран отговор с основни ефектори Т-хелперните клетки (Th1). Настъпва увреда на таргетната тъкан и „разкриване” на допълнителни автоантигени (Ag2, Ag3 и др.), предизвикващи специфична

реакция (Фигура 1)¹²⁴. Разширяването на специфичността на автоимунния отговор се превръща в молекулярна основа за хронифициране на процеса. Следователно, дискутираният механизъм има значение както за степента на засягане на таргетния орган, така и за хода на протичане на автоимунното заболяване.

Фигура 1. Епитопно разпространение



АПК - антиген представящи клетки

IFN-gamma - interferon gamma

TNF - tumor necrosis factor

Проследяването на IgG антителата за период от 12 месеца в хода на заболяването при 35 пациенти с ВР показва, че при 17 от тях (49%) се установяват процеси на епитопно разпространение.¹²⁵ Те възникват по-често в ранните стадии на ВР и са значимо свързани с тежестта на заболяването^{126,127}. При трима пациенти преминаването към интерцелуларни епитопи на ВР180 и ВР230 се предшества от разпознаване на екстрацелуларния домейн на ВР180. В допълнение, реактивността на IgG спрямо екстрацелуларните епитопи на ВР180 и интрацелуларните епитопи на ВР230 корелира с тежестта на ВР в еволюция. Тези резултати подкрепят твърдението, че разпознаването на ектодомейна на ВР180 от IgG, е ранно и значимо събитие в патогенезата на ВР, последвано от променливи интра- и интермолекулярни процеси на епитопно разпространение, които вероятно определят протичането на заболяването. Феноменът е едно от възможните обяснения за асоциирането на ВР с някои дерматози като псориазис и лихен планус.

Феноменът на епитопно разпространение има отношение и към диагностиката на сАИБД. По този механизъм могат да се образуват антитела, насочени към дистални участъци от молекулата на ВРАG2, които не включват NC16A домейна. В резултат на това специфични и чувствителни изследвания като ВР180-NC16A ELISA могат да покажат негативен резултат дори при пациенти с циркулиращи антитела срещу ВР180.

Въпреки че феноменът на епитопно разпространение играе роля в патогенезата на редица автоимунни заболявания като автоимунен диабет и мултиплена склероза, предполага се, че това е естествен механизъм, чрез който имунната система атакува по-голям брой таргетни антигени на инфекциозни агенти и ракови клетки. Потвърждение за това може да се открие в хода на инфекциите с човешкия имунодефицитен вирус (HIV), вируса на хепатит В (HBV) и *Borrelia burgdorferi*, при които се наблюдава разгръщане на имунния отговор и поява на антитела с различна специфичност. При HIV инфекцията, например, наред с клиничното

състояние, броят на CD4 лимфоцитите и нивата на HIV-антигените, като индикатор за степента на прогресия на заболяването се счита и комбинацията от различни профили на антителата.¹²⁸

2.3.1.6 Клинична картина

При лица над 60 годишна възраст се появява полиморфен обрив, състоящ се от напрегнати були върху еритемна основа или нормална кожа, уртикоподобни или екзема-подобни плаки. Обикновено е налице интензивен сърбеж. Генерализиран пруритус може да предшества с месеци появата на кожните изменения.¹²⁹ Предилекционни области са флексорните повърхности на крайниците, страничните участъци на трункуса, корема и бедрата. Съществуват и локализирани варианти. Видимите лигавици, напр. оралната, се засягат рядко и се възстановяват без оформяне на цикатрикс. По изключение ВР се наблюдава и в детската възраст.¹³⁰

Известни са редица атипични варианти на булозния пемфигоид: 1) везикулозен - подобен на dermatitis herpetiformis; 2) полиморфен - подобен на erythema multiforme, с наличие на "кокардни" лезии; 3) нодуларен - с наличие на лезии тип prurigo nodularis; 4) еритродермичен; 5) локализиран - с ограничено засягане само в една област; 6) дисхидрозиформен - с ангажиране на длани и стъпала; 7) себореен - предимно в себорейните области; 8) вегетиращ - с локализация, предимно в гънките.

2.3.1.7 Лечение

Лечението на автоимунните булозни дерматози почива на патогенетични принципи, като в основата му стои продължителното приложение на имunosупресивни средства. Целта е да се постигне контрол върху производството на антитела и ограничаване на тяхното свързване с тъканите.

За лечение на ВР се прилагат системни кортикостероиди в дози, пониски от тези при пемфигус (0,5 до 0,75 mg/kg/ден) самостоятелно или в комбинация с azathioprine, mycophenolate mofetil, или tetracycline. Methotrexate се използва при тежки случаи и непоносимост към prednisone. При резистентни форми в съображение влиза плазмафереза. При по-леки случаи добър терапевтичен ефект се постига с прилагането на потентни локални кортикостероиди върху цялото тяло.¹³¹

2.3.2 Пемфигоид на мукозните мембрани

Пемфигоидът на мукозните мембрани (mucous membrane pemphigoid, ММР) представлява хетерогенна група от заболявания, включваща няколко нозологични единици. Характеризира се с предилекционно засягане на лигавиците. Според изработения консенсус за диагностика и лечение на ММР, старото понятие цикатризиращ пемфигоид се използва само при необичайния вариант на ММР с предимно засягане на кожата и преминаване на лезиите с цикатрикси.¹⁰ В зависимост от локализацията на лезиите, пациентите с ММР може да се обърнат първо към офталмолог, дерматолог или стоматолог, както и към гастроентеролог, гинеколог, общо-практикуващ лекар или УНГ специалист поради това че лигавичното засягане при заболяването може да доведе до смущения във функциите на храносмилателната, дихателната и репродуктивната система. Най-често се засяга оралната мукоза, последвана от конюнктивна, назо-фаринкс, ларинкс, трахея, хранопровод, ано-генитална област, и по-рядко се ангажира кожата.

ММР се характеризира с хроничен, но прогресиращ ход и склонност към цикатризиране и синехии на местата на епителизиращите лигавични ерозии. Съотношението жени към мъже е 2:1, а средната възраст на начало на заболяването е около 65 години.

Подобно на ВР, пемфигоидът на мукозните мембрани се медира от анти-базалномембранни антитела от клас IgG, насочени към антигени в

областта на lamina lucida и преминаващите през нея закотвящи филаменти. Шест таргетни антигени са асоциирани с клиничния фенотип на ММР – ВР180 (при 75% от пациентите)^{132,133}, ВР230 (25%, обикновено заедно с реактивност към ВР180), ламинин-332 (25%)²⁵, двете субединици на $\alpha\beta 4$ интегрин и колаген тип VII. В сравнение с ВР по-често се откриват С-терминални епитопи на ВР180, докато антитела срещу NC16A домейна се установяват при около 50% от пациентите.¹³⁴

Ламинин-332 е хетеродимер, който е съставен от $\alpha 3$, $\beta 3$, and $\gamma 2$ вериги, като най-чест таргет при пациенти с анти-ламинин пемфигоид е $\alpha 3$ веригата.¹³⁵ При пациенти с орални лезии са описани антитела срещу $\alpha 6$ интегрин, а реактивност срещу $\beta 4$ интегрин се асоциира с очно засягане.¹³⁶ Антителата срещу споменатите антигени индуцират образуването на субепидермален мехур. Редица профибротични фактори като серпин h1, растителен фактор на съединителната тъкан, интерлевкин 4, интерлевкин 5 и др. спомагат за формирането на характерната за заболяването фиброза.

В първия стадий на заболяването, който може да продължи години, лезиите са единични и локализирани само в една лигавична област, например устна кухина. Най-честата находка при орално засягане е десквамативен гингивит със свличане на епитела и оформяне на слабо болезнени кървящи ерозии, но заболяването се проявява и с трудно зарастващи улкуси върху букалната лигавица, твърдото и мекото небце. Отключващи фактори са травмата, носенето на зъбни протези, стоматологичните манипулации и др. С течение на времето болестта може да засегне други лигавични области и да доведе до тежки функционални проблеми.

Очният вариант на ММР се характеризира с прогресивно фиброзиране на конюнктивата и деформация на форниксите до симблефарон и анкилоблефарон. Засягането на роговицата се изразява във васкуларизация и помътняване, което води до силно намаление на зрението и до слепота.

Засягането на назофаринкс и ларинкс води до адхезии в областта на носния септум, епиглотиса, а в някои случаи и трахеята с нарушения в

говора и дишането. Обикновено в такива тежко протичащи случаи се въвлеча и лигавицата на хранопровода, където срастванията водят до стриктури с дисфагия, одиофагия, загуба на тегло и дори до пълна обструкция.

ММР може да засегне външните гениталии при мъжа и жената, а в напреднали случаи може да доведе до пълна атрезия на уретралното отворище или респективно вагината.

По правило засягането на кожата е изключително рядко и се характеризира с малко на брой слабо възпалителни лезии, които епителизират с атрофични цикатрикси. Наблюдават се и локализирани лезии по скалпа или горната част на трункуса. При преминаване на ерозиите в областта на капилициума може да се развие цикатризираща алопеция. Кожните лезии често демонстрират тенденция към бърза ремисия.

Рядка форма на ММР, известна като Brunsting-Perry, доброкачествен пемфигоид, протича с везикуло-булозни лезии и цикатрикси по кожата на скалпа и врата.¹³⁷ Някои автори причисляват тази разновидност към epidermolysis bullosa acquisita, поради честото откриване на антитела срещу колаген VII в серума на болните.¹³⁸

Наскоро описаният анти-ламинин-332 пемфигоид представлява между 5 и 20% от всички случаи на ММР, като клинически е неразличим от другите форми.¹³⁹ Заболяването е асоциирано с повишен риск за развитие на онкологични заболявания в сравнение с общата популация.¹⁴⁰

За разлика от булозния пемфигоид, ММР се повлиява слабо и несигурно от системни кортикостероиди.¹⁴¹ Терапевтично средство на избор са сулфоните (diaminodiphenylsulfone, Dapsone) в доза от 25 до 150 mg дневно, с поддържаща доза 100 mg дневно. Приложението на цитостатици (azathioprine, cyclophosphamide) е показано с цел избягване на страничните ефекти от системните кортикостероиди. Голямо значение има локалната терапия с антисептици, кортикостероидни препарати (гел или орална база) и cyclosporin A. При тежки и рефрактерни случаи може се проведе лечение с биологичното средство rituximab.¹⁴²

2.3.3 Lichen planus pemphigoides

При lichen planus pemphigoides (LPP) се развиват едновременно lichen planus и булозен пемфигоид. Предполага се, че възпалението в областта на дермо-епидермалната граница при lichen planus води до автоимунен отговор срещу структури на хемидесмозомите. Засягат се по-млади пациенти в сравнение с ВР, на средна възраст от 44 г. Първоначално се наблюдават типичните за lichen planus плоски полигонални папули, последвани след седмици или месеци от появата на напрегнати везикули и були, които се развиват от здрава кожа независимо от предходните лезии. В повечето случаи LPP протича по-леко се повлиява по-добре от терапията, в сравнение с ВР.

2.3.4 Pemphigoid gestationis

Pemphigoid gestationis (PG), познат преди като “herpes gestationis”, е автоимунна субепидермална булозна дерматоза, свързана с бременността. Състоянието обикновено се появява във втория или третия триместър и клинично се характеризира със силно сърбящи уртикариални лезии, които еволюират в големи напрегнати були. Честотата на заболяването варира между 1 на 10 000 и 1 на 50 000 бременности, като само 14% от случаите се развиват post-partum.^{143,144}

Имунологично PG се характеризира с линейарни отлагания на C3 по хода на базалната мембрана при директна имунофлуоресценция и с циркулиращи автоантитела от клас IgG, насочени срещу BP180-NC16A.¹⁴⁵ Точната патогенеза на PG все още не е известна, но се счита че заболяването се дължи на алогенна реакция срещу плацентата на плода, провокирана от аберантна експресия на МНС клас II молекулите в плацентата. Резултатът е автоимунен отговор срещу хориоамниотичните клетки и кръстосана реакция

с ВРАG2 в кожата. Участието на хормонални фактори също се подозира поради наличието на обострян timer по време на месечния цикъл или при прием на орални контрацептиви. PG е наблюдаван и при mola hydatidosa и хориокарцином.¹³⁸ При начало на заболяването в по-ранни срокове на бременността (първи или втори семестър), съществува по-голям риск от неблагоприятен изход на бременността, включително преждевременно раждане и новородени с ниско тегло.¹⁴⁶ У новороденото е възможно да се наблюдава транзиторна кожна ерупция в резултат на трансплацентарно преминали антитела от майката. Лечението на PG се провежда със системни и локални кортикостероиди.

2.3.5 Epidermolysis bullosa acquisita

Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) е придобита автоимунна булозна дерматоза, характеризираща се със субепидермални були и тъканно свързани и циркулиращи антитела, насочени срещу структури под lamina densa на базалната мембрана.¹⁴⁷

EBA е рядко заболяване. Няколкото налични изследвания показват честота от 0,22 случая на милион на година в Германия³³, 0,26 на милион/година във Франция¹⁴⁸, 0,23 на милион/година за Кувейт¹⁴⁹, и малко по-висока от 0,5 на милион/година за Сингапур¹⁵⁰. По-често се среща при жени и сред черното население.¹⁵¹ Средната възраст на начало на заболяването е 40 години; рядко се развива в по-късна възраст и по изключение при деца.

Главен таргетен антиген е колаген VII²⁴, при който основните антигенни епитопи са разположени в неколагенов домейн 1 (NC1), но съществуват и други потенциални таргети за патогенните антитела.^{152,153,154} Поради минимално възпаление, което се наблюдава при хистологично изследване, се предполага, че нарушената от антителата структура на NC1 директно компрометира функцията на колаген VII, като по този начин нарушава връзката му с екстрацелуларните компоненти в дермо-епидермалната зона, което води до повишена ранимост на кожата и образуване на були.¹⁵⁵

През 1971, Roenick въвежда първите диагностични критерии за ЕВА: начало в зряла възраст на състояние, подобно на наследствената дистрофична epidermolysis bullosa, спонтанна или травма-индуцирана поява на були, които преминават с цикатрикси и милиуми. При „класическата” форма се касае за невъзпалителни механобулозни изменения по крайниците. Поради изключителния фражилитет на кожата дори при минимална травма възникват мехури по гърба на дланите, екстензорните повърхности на малките стави на ръцете, лактите, колената, сакрума и ходилата.

Наред с тази „класическа” механобулозна форма са описани възпалителни варианти, клинично неразличими от ВР, ММР^{156, 157, 158, 159} и LAD. Около половината от пациентите с ЕВА страдат от генерализирана възпалителна везикуло-булозна ерупция, подобна на ВР. Често се засягат трункуса и флексорните повърхности. За разлика от класическата ЕВА, кожният фражилитет не е така силно проявен и формирането на цикатрикси и милиуми може да е минимално до липсващо. В някои случаи белезите на класическия и възпалителния вариант могат да се наблюдават едновременно или последователно в еволюцията на заболяването.

Друга група пациенти с ЕВА имат предимно лигавично засягане с последващи необратими усложнения като при ММР, в т.ч. слепота и стриктури на хранопровода. Описани са случаи на засягане на трахеята и обструкция на горните дихателни пътища, което налага трахеотомия.¹⁶⁰

ЕВА се съобщава в асоциация с витилиго,¹⁶¹ SLE, болест на Crohn и ХУК, амилоидоза, мултиплен миелом, автоимунен тиреоидит, захарен диабет, придобита хемофилия и множествени ендокринни синдроми.¹⁶² Скоростно проучване установява, че при имуноблот серумите на пациенти с болест на Crohn реагират с колаген VII, който присъства както в кожата, така и в интестинума.¹⁶³ Описани са паранеопластични варианти на ЕВА при лимфопролиферативни заболявания.¹⁶⁴

ЕВА е хронично заболяване; лечението е трудно и често незадоволително.¹⁶⁵ Леките случаи протичат хронично, докато агресивните варианти се контролират трудно и са свързани със значителна смъртност.

Стандартно прилаганите системни кортикостероиди, често в комбинация с cyclophosphamide, azathioprine, methotrexate, могат да са без ефект в някои случаи¹⁶². Има съобщения за успешно повлияване colchicine, dapsone, фотофореза, infliximab или високи дози интравенозни имуноглобулини.¹⁶⁶

2.3.6 Булозен системен лупус еритематозус

При пациенти със системен лупус еритематозус може да се развие антитяло-медирана субепидермална булозна дерматоза – булозен системен лупус еритематозус (BSLE). Заболяването предизвиква диференциално-диагностични проблеми, тъй като основният таргетен антиген (колаген VII) съвпада с този при ЕВА.

Клинично BSLE протича с различни по големина булозни лезии – от малки групирани везикули до големи напрегнати були, наподобяващи тези при dermatitis herpetiformis. Лезиите преминават с постлезионални хипер- или хипопигментации. Съществуват форми, които наподобяват класическата механобулозна ЕВА с минимално възпаление и образуване на милиуми и атрофия.

За поставяне на диагноза BSLE е необходимо да са изпълнени утвърдените критерии за системен лупус на Американския колеж по ревматология. Заболяването често се съпътства от треска, загуба на тегло, отпадналост, фоточувствителност, артралгии и артрити, както и прояви от страна на сърдечно-съдовата система, бъбреците, централна нервна система и др.

За разлика от ЕВА, при BSLE се постига бърз терапевтичен резултат при приложение на дапсон.

2.4 Диагностика на сАИБД

Всяка от изброените по-горе нозологични единици се диагностицира на базата на съвкупност от клинични, хистологични и имунологични

критерии. В условията на рутинната практика, внимателният клиничен преглед на пациент с везикуло-булозен обрив често е достатъчен да отграничи „баналните” случаи с ясна етиология (триене, изгаряне, измръзване, ултравиолетова радиация, химични субстанции, вкл. медикаменти, инсектни ухапвания, инфекциозни агенти и пр.) от потенциална имуно-булозна дерматоза. В това отношение водещо значение има морфологията и давността на обрива, възрастта на пациента, фамилността, влиянието на различни фактори, наличието на асоциирани заболявания или бременност.^{167,168} При прецизната диференциална диагноза на субепидермалните автоимунни булозни дерматози, клинични данни могат да имат насочваща, но не и решаваща роля. Въпреки че са описани редица особености в протичането на отделните заболявания от тази група, съществуването на застъпващи се клинични форми изисква специализирано изследване с високо специфични имунофлуоресцентни и имуносерологични техники за поставяне на точна диагноза.^{169,170}

2.4.1 Клинична диференциална диагноза на сАИБД

Диференциалната диагноза между отделните сАИБД е сложна, а в съображение влизат и редица заболявания извън тази група.

Основната диференциално-диагностично затруднение в групата на сАИБД с отлагане на IgG и/или С3 по хода на БМ, е разграничаването на ВР от ЕВА. Класическите форми на двете заболявания притежават следните общоприети характерни клинични белези (Таблица 3)¹⁷¹.

Специфичността на някои от тези клинични белези са поставени под съмнение в литературата. Съществуват противоречиви данни относно асоциацията на сАИБД с формиране на милиуми.¹⁷² Prost и колектив описват милиуми при 9 от 17 пациенти с ЕВА или ММР, но при нито един от 15 пациенти с ВР.¹⁷³ Различни са резултатите от проучвания на Venning¹⁷⁴ и Banfield¹⁷⁵, които съобщават за наличие на милиуми при съответно 38,9% и

31,1% от болните с ВР. В допълнение, при ВР често се засягат не само флексорните, а и екстензорните повърхности.

Таблица 3. ДД между ВР и ЕВА

	ВР	ЕВА
Заболеваемост	1:140.000	1:4.800.000
Средна възраст	65-75	40-80
Клинична картина	Спонтанни були върху еритемна основа или здрава кожа По-полиморфна	Механично индуцирани були с милиуми и атрофия, но също спонтанни були върху еритемна основа или здрава кожа По-мономорфна
Разпространение	Флексорни повърхности на крайниците и трункуса	Екстензорни повърхности на крайниците
Лигавично засягане	10-20% от случаите	50% от случаите
Ход	Хроничен	Хроничен
Терапия	Добро повлияване от кортикостероиди и имunosупресори	Слабо повлияване от кортикостероиди и имunosупресори

Класическият вариант на булозния пемфигоид не може да бъде категорично клинично отграничен от инфламаторната форма на ЕВ и от анти-р200 пемфигоид. Ако диагнозата се базира стриктно на клиничните находки, при генерализираната форма на ЕВА може лесно да бъде поставена неправилна диагноза ВР.

ВР и LAD представляват единен спектър на антибазално-мемранна реактивност с участието на антитела от класове IgA и IgG и в част от случаите също са клинично неразличими. Везикулозната форма на ВР прилича на dermatitis herpetiformis, полиморфната може да наподобява erythema multiforme, а себореината – pemphigus erythematosus. В пребулозния стадий ВР често показва неспецифична клинична картина на хронична уртикария или дерматит. Нодуларният ВР се представя с лезии тип prurigo

nodularis. В диференциалната диагноза влизат още локализирани и генерализирани лекарствени реакции, контактен дерматит, булозен скабиес, ектима, pityriasis lichenoides и др. Ювенилният ВР често в началото често се приема за булозно импетиго или SSS синдром, но не трябва да се пропускат заболявания като вроден сифилис, acrodermatitis enteropathica, генодерматози и др. В заключение ВР е едно от заболяванията в дерматологията, което може да бъде наречено „велик имитатор“.

При класическата механобулозна форма на ЕВА в диференциално-диагностичен план се обсъжда основно porphyria cutanea tarda, която също протича с повишена ранимост на кожата. Възпалителните варианти на ЕВА могат да имитират не само ВР, но и LAD или ДН. При засягане на лигавиците в съображение влиза и ММР. Редица съвременни автори причисляват т.нар. цикатризиращ пемфигоид на Brunsting-Perry към ЕВА.¹³⁸

В този аспект, трябва да се спомене и булозният системен лупус еритематозус, който освен по клинични особености, може да наподобява сАИБД и по хистологични и имунохистохимични белези.

Vaillant и колектив предлагат четири клинични критерия за диагностика на ВР, изведени чрез мултивариативен логистичен регресионен анализ.¹⁷⁶ Трябва да се подчертае, че създадените критерии се прилагат върху група от пациенти, при които вече е поставена диагноза сАИБД, чрез установяване на линейно отложени IgG и/или СЗ върху БМ при ДИФ. Разграничаването между отделните заболявания е извършено с имуноелектронна микроскопия. Целта на проучването е да улесни и стандартизира поставянето на диагнозата при липса или невъзможност за изпълнение и прилагане на съвременните диагностични методи като, ДИФ на сепарирана кожа, ИИФ на сепарирана кожа, Western blot, ELISA и др., както и при обработка на големи групи болни.

Включени са единствено статистически значимите клинични белези. Четирите критерии с добра предиктивна стойност за поставяне на диагноза булозен пемфигоид са:

1. Липса на атрофични белези.
2. Липса на засягане в областта на главата и шията.
3. Липса на лигавично засягане.
4. Възраст над 70 години.

Според направения статистически анализ, наличието на еритемни плаки, милиуми, механични були или хиперезинофилия, не са сигнификантни и нямат предиктивна стойност.

Според авторите, така подобреният сет от четири критерия показва 90% чувствителност и 83% специфичност при диагностиката на ВР и разграничаването му от други форми на пемфигоид и ЕВА.

2.4.2 Изследване на периферна кръв

Честа лабораторна находка при ВР е кръвната еозинофилия. Повишени са стойностите на тоталния IgE и на специфични антитела от клас IgE срещу ВР180-NC16А, като между тях не се наблюдава стриктна корелация.^{177,178} При голяма част от пациентите със сАИБД, изследването на периферна кръв не показва отклонения от референтните граници.

2.4.3 Хистологично изследване

Рутинното хистологично изследване на биопсичен материал от свежа интактна лезия установява субепидермален мехур при заболяванията от пемфигоидната група и epidermolysis bullosa acquisita, което ги отличава от интраепидермалната акантолитична була при пемфигусната група. Диференциалната хистопатологична диагноза между ДН и Р в повечето случаи не предизвиква големи затруднения. В случаите обаче на Р, богат на клетъчен инфилтрат, тя може да бъде трудна или дори невъзможна.¹⁷⁹ За отдиференцирането на отделните нозологични единици, значение се отдава и на вида и разположението на възпалителния инфилтрат в дермата. В групата

на пемфигоида инфилтратът често е съставен от еозинофили и неутрофили и е по-обилен от този при класическата форма на ЕВА. Въпреки това хистологичното изследване не е достатъчно за разграничаване на пемфигоид от възпалителната форма на ЕВА. Съществуват варианти с предимно неутрофилен инфилтрат, както и такива с оскъдни възпалителни промени. Допълнително ограничение на метода е ниската диагностичност на хистологичното изследване в началните стадии на субепидермалните булозни дерматози преди формирането на демонстративен субепидермален мехур. При наличието единствено на уртикариални лезии, с цел по-прецизен избор на участък за взимане на биопсичен материал за хистологично изследване, може да се използва новият неинвазивен метод конфокална микроскопия. При него в реално време могат да бъдат установени наличието на субепидермален мехур и степента на клетъчна инфилтрация¹⁸⁰

2.4.4 Имунофлуоресценция

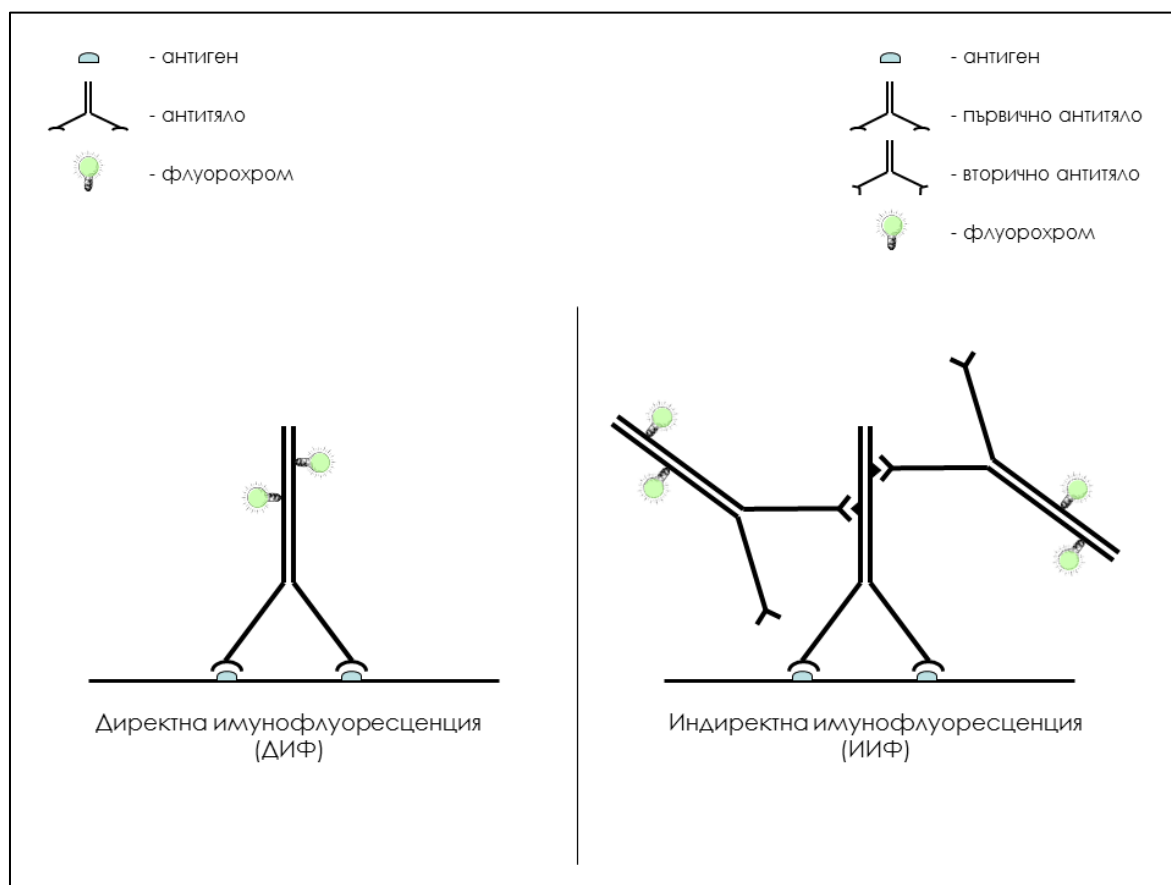
Ключови за диагнозата на пемфигоид и ЕВА остават имунофлуоресцентните техники: директна (ДИФ) и индиректна (ИИФ) имунофлуоресценция (Фигура 2, Таблица 4). Начинът на провеждане на тези изследвания е описан подробно в глава „Методи“.

Директна имунофлуоресценция се провежда върху биопсичен материал от непроменена перилезионална кожа. Чрез тази техника се установява вида и локализацията на имунореагенти (имуноглобулини, комплемент, фибрин и др.), отложени *in vivo* в кожата на пациента.¹⁸¹ Методът е едностъпален – използва се антитяло, маркирано с флуорохром. Комплексът се свързва с отложените в кожата таргетни антигени (Фигура 2).

При пемфигоид и ЕВА се наблюдава линейно отлагане на IgG и/или комплемент C3 по хода на базалната мембрана. Допълнително могат да се открият отлагания на IgA и IgM. Наличието едновременно на антитела от клас IgG и IgA се счита от някои автори за имунохистопатологичен белег,

достатъчен за обособяване на отделно заболяване.^{182,183} Съвременното схващане е, че ВР и LAD представляват заболявания в двата края на непрекъснат спектър от сАИБД с реактивност на антитела от клас IgG и IgA към БМ.

Фигура 2. Принцип на ДИФ и ИИФ



При някои от изследваните пациенти със сАИБД, при ДИФ се наблюдава отлагане единствено на С3. Проучване на Buschman и колектив показва, че вероятна причина за подобни резултати, е наличието на подвидове IgG, отложени в кожата при пациенти с пемфигоид. Комерсиалните античовешки IgG конюгати имат ограничена активност срещу субклас IgG4, което може да доведе до понижена чувствителност на ДИФ.¹⁸⁴

За прецизиране на местата на свързване на имуноглобулините и комплемента на ултраструктурно ниво се прилага директна имуноелектронна микроскопия, която съчетава постиженията на имунохистохимичните

техники и високата разделителна способност на електронната микроскопия.¹⁷³ При булозен пемфигоид се демонстрира локализацията на IgG и/или C3 в lamina lucida, при някои форми на ММР по-дълбоко в lamina densa, а при ЕВА под lamina densa на дермо-епидермалната граница.¹⁸⁵

Индиректната имунофлуоресценция установява наличието на циркулиращи антитела в тъканите течности (серум, мехурна течност) чрез изследването им върху различни епителни субстрати (маймунски или човешки хранопровод, нормална човешка кожа и др.). Методът е двустъпален. Първоначално антитела от изследвания serum се свързват с молекули на субстрата. След това, подобно на ДИФ, маркирано с флуорохром античовешко антитяло визуализира вече отложените serumни антитела (Фигура 2).

Най-постоянната и важна находка при ИИФ на serum от болни с пемфигоид, е наличието на IgG антитела срещу базалната мембрана. В допълнение, при голяма част от пациентите се откриват антитела от клас IgA, а при повечето пациенти с линейна IgA дерматоза се установяват IgG антитела срещу BP180.¹¹⁸ Тези находки потвърждават наличието на спектър от автоимунни реакции срещу BP180, които могат да се медиат поотделно от IgG, от IgA или от различни комбинации между двата класа антитела.

При ЕВА, в serumите на 10-30% от пациентите също се установяват циркулиращи IgG срещу базалната мембрана. Изследването може да се извърши върху субстрат с липсващ колаген VII (кожа от болни с epidermolysis bullosa dystrophica). При положителен резултат се отхвърля диагнозата ЕВА.

ИИФ върху сепарирана през lamina lucida кожа чрез инкубация в 1,0 М разтвор на NaCl позволява отдиференциране на субепидермалните булозни дерматози. Епидермално свързване (покрива на мехура) на IgG е характерно за булозен пемфигоид, пемфигоид на мукозните мембрани, pemphigoid gestationis и lichen planus pemphigoides.¹⁸⁶ Дермално свързване на имунореагентите при ДИФ се наблюдава, когато таргетните антигени са

разположени по-дълбоко в базалната мембрана или закотвящите фибрили. Отлагане на дъното на мехура вече не счита за специфично за ЕВА, а в съображение влизат още анти-ламинин-332 пемфигоид, анти-p200 пемфигоид и булозен системен лупус еритематозус¹⁸⁷.

Таблица 4. Имунофлуоресцентна находка при придобитите субепидермални булозни дерматози

Заболяване	ДИФ	ИИФ / сепарирана кожа
Булозен пемфигоид	Линеарно отлагане на IgG и/или C3 по БМ	Циркулиращи IgG анти-БМ антитела – епидермален тип
Пемфигоид на мукозните мембрани	Линеарно отлагане на IgG и/или C3 по БМ	Циркулиращи IgG анти-БМ антитела – епидермален или смесен тип
Анти-ламинин-332 (антиепилигрин) пемфигоид	Линеарно отлагане на IgG и/или C3 по БМ	Циркулиращи IgG анти-БМ антитела – дермален тип
Анти-p200/ Ламинин γ 1 пемфигоид	Линеарно отлагане на IgG и/или C3 по БМ	Циркулиращи IgG анти-БМ антитела – дермален тип
Булозна дерматоза с антитела срещу α 5 верига на колаген тип IV	Линеарно отлагане на IgG и/или C3 по БМ	Циркулиращи IgG анти-БМ (и анти-гломерулно БМ) антитела – дермален тип
Линеарна IgA дерматоза	Линеарно отлагане на IgA и/или C3 по БМ (рядко IgG или IgM)	Циркулиращи IgA анти-БМ антитела – епидермален, дермален или смесен тип
Epidermolysis bullosa acquisita	Линеарно отлагане на IgG и/или C3 по БМ (рядко IgA или IgM)	Циркулиращи IgG анти-БМ антитела – дермален тип
Булозен системен лупус еритематозус	Линеарно или грануларно отлагане на IgG и/или C3 по БМ (рядко IgA или IgM)	Циркулиращи IgA анти-БМ антитела – епидермален, дермален или смесен тип
Dermatitis herpetiformis	Грануларно отлагане на IgA и C3 по БМ, по-интензивно по върховете на дермалните папили	IgA анти-ендомизиумни антитела върху субстрат от маймунски хранопровод

В проучване на Maуuzumi и колектив, смесено епидермално и дермално отлагане се наблюдава при 5% от 98 пациенти с ВР и 45% от 23 пациенти с ММР.¹⁸⁸ При негативна ИИФ, може да бъде извършено изследване на сепарирана кожа от пациента чрез директна имунофлуоресценция.¹⁸⁹ Добавянето на ИИФ върху сепарирана кожа повишава чувствителността на метода спрямо ИИФ върху хранопровод.^{190,191} Комбинацията от двата метода води до по-малко негативни резултати и по-прецизна диагностика.

2.4.5 Имуноблот

Чрез имунопреципитация и имуноблот по-точно могат да се идентифицират антигените, към които са насочени циркулиращите в серума антитела. Имуноблотът позволява разпознаването на широк панел от кожни антигени чрез разграничаването им по молекулна маса, като по този начин се подобрява диагностичната ефективност.

Чрез този метод се установява молекулната маса на таргетните антигени при сАИБД, като в някои случаи това дава и името на новооткритите булозни дерматози (p200-пемфигоид, p105-пемфигоид). При ВР това са добре известните ВРАG1 и ВРАG2 с молекулна маса съответно 230 kDa и 180 kDa, а при ЕВА се установява, че антителата се свързват с протеини с молекулна маса 290 kDa и 145 kDa, които представляват съответно алфа веригата на колаген VII или нейния краен глобуларен аминокиселинен участък NC1.²⁴

За съжаление методът е скъп и трудоемък, което го прави труднодостъпен в рутинната практика.

2.4.6 ELISA

Ензимно-свързаният имуносорбентен анализ (ELISA) е високо чувствителен и специфичен метод, който навлиза все по-широко в

диагностиката на булозните дерматози. Разработен е комерсиален ELISA кит за откриване на антитела срещу имуногенния NC16A домейн на BP180, които играят важна роля в патогенетичния процес при пемфигоид, а нивата им корелират с активността на болестния процес. По-рядко в практиката се използва ELISA BP230.

Въпреки че директната имунофлуоресцентна микроскопия остава базичен и задължителен метод в диагностиката на булозния пемфигоид, по-голяма част от пациентите с ВР могат да бъдат диагностицирани серологично чрез установяване на специфични антитела срещу BP180-NC16A. В много редки случаи, антитела срещу BP180 се откриват при пациенти със сърбящи дерматози, захарен диабет или деменция, без наличие на клинични белези за ВР и при отрицателна ДИФ.^{192,193} Въпреки това, при пациенти с типична за ВР клинична картина, откриването на антитела срещу BP180-NC16A е достатъчно да бъде поставена диагнозата булозен пемфигоид. При положителен резултат за антитела срещу BP230 в допълнение се изискват и сигурни имунофлуоресцентни данни (положителна ДИФ).

Проследяването на антителата срещу BP180-NC16A може да даде на полезна насока на клинициста при взимането на решение за намаляване на терапевтичната доза или прекратяване на лечението.

Разработен е и чувствителен ELISA метод, използващ рекомбинантни протеини за установяване на автоантитела към колаген VII¹⁹⁴, както и метод за ИИФ върху трансфектирани с Col VII клетки. Според въведените през 1981 г. от Yaoita¹⁹⁵ и модифицирани по-късно от Gammon¹⁵⁸ диагностични критерии за ЕВА, наред с ИИФ SSS и имуоблот, ELISA методът е приет като алтернатива на имуоелектронната микроскопия при диагностика на заболяването. Въпреки високата чувствителност на метода, повечето китове са ограничени до откриване на антитела срещу NC1 домейна на колаген VII, което може да доведе до фалшиво отрицателни резултати при засягане на други участъци от молекулата.

2.5 Обобщение

Разграничаването между отделните клинични форми на пемфигоид и ЕВА, подобно на останалите автоимунни булозни дерматози, понякога е затруднено, а забавянето или липсата на адекватно лечение е свързана с тежки последствия като инвалидизиране и смърт.¹⁹⁶ Поради тази причина клиничното съмнение следва да бъде потвърдено в условията на специализиран преглед и с методите на специфични хистологични, имунолофлуоресцентни и имуносерологични изследвания. Точната диагноза би спомогнала за определяне на най-подходящия терапевтичен подход и е определяща по отношение на прогнозата на заболяването.

Въпреки наличието на редица съвременни методи, при различните школи все още съществуват разногласия относно стандартите, които трябва да бъдат изпълнени, за да се постигнат високи нива на сигурност при диагностиката на сАИБД. За това допринася хетерогенността на заболяванията в групата, както и продължаващият процес на откриване и въвеждане на нови нозологични единици. Водещите в света научни центрове налагат като златен стандарт за диагностика скъпи и труднодостъпни методи като имуноелектронната микроскопия. Извършването на тези изследвания в рутинната практика не винаги е възможно, което изисква търсене на комбинация от други диагностични методи, които да осигурят чувствителен и достоверен диагностичен алгоритъм.

3. Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат епидемиологията, клинико-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 клинико-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, имунофлуоресцентни 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.

4. Материал и методи

4.1 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 пемфигOID са включени серуми на пациенти, хоспитализирани в клиниката преди 2010 г., които не са част от основната група от 112 болни.

4.1.1 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 пемфигOID е попълнен въпросник за определяне на дерматологичен индекс за качество на живот (DLQI).

4.1.2 Лабораторни проучвания

Таблица 5. 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 клиники) 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 M 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.

4.2 Клинични методи

4.2.1 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.

4.2.2 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.

4.2.3 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. Въпросите са подбрани и написани на достъпен език, който позволява на по-голямата част от пациентите да се справят с попълването без да търсят помощ от лекаря. Това, от своя страна, помага за получаването на по-обективни и неповлияни от медицинските лица резултати.

Точкуване.

Всеки въпрос се точкува както следва:

Много	3 точки
Доста	2 точки
Малко	1 точка
Въобще	0 точки
Въпрос без отговор	0 точки
Въпрос 7, отговор "Да"	3 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.

Забележка: Точките, свързани с различните отговори не трябва да бъдат отпечатани на самия въпросник, тъй като това може да доведе окаже влияние върху резултата. Участието на лекаря при прочитането на въпросите също може да доведе до промяна на резултата.

Тълкуване на DLQI резултатите:

0-1 = никакъв ефект върху живота на пациента

2-5 = малък ефект върху живота на пациента

6-10 = умерен ефект върху живота на пациента

11-20 = много голям ефект върху живота на пациента

21-30 = изключително голям ефект върху живота на пациента

Подробен анализ на DLQI.

DLQI може да бъде анализиран в шест категории както следва:

Симптоми и чувства	Въпроси 1 и 2	Максимален резултат 6
Ежедневни дейности	Въпроси 3 и 4	Максимален резултат 6
Свободно време	Въпроси 5 и 6	Максимален резултат 6
Работа и училище	Въпрос 7	Максимален резултат 3
Лични взаимоотношения	Въпроси 8 и 9	Максимален резултат 6
Лечение	Въпрос 10	Максимален резултат 3

Резултатът за всяка една от тези секции също да бъде изразен като процент от 6 или 3. Резултатите могат да се бъдат представени както за индивидуалния пациент, така и за група от пациенти.

Тълкуване на неправилно попълнени въпросници.

Процентът на успеваемост на точно попълване на DLQI е много висок. Въпреки това, пациентите понякога правят грешки.

1. Ако един въпрос е оставен без отговор, за него се отчитат 0 точки и резултатите се сумират както обикновено.

2. Ако две или повече въпроса са оставени без отговор, въпросникът не се зачита за попълнен.

3. Ако на въпрос 7 е отговорено с "да", се отбелязват 3 точки. Ако въпрос 7 е отговорен с "не" или "не се отнася до мен", но след това е отбелязано "много" или "малко", се прибавят съответно 2 или 1 точки.

4. Ако две или повече опции са маркирани, се отчита отговорът с най-висок резултат.

5. Ако има отговор между две квадратчета, по-ниската от двете опции трябва да бъдат отчетена.

6. DLQI може да бъде анализиран чрез изчисляване на резултатите за всяка от шестте категории. При използване на категориите, ако отговорът на един въпрос в дадена категория липсва, последната не трябва да се зачита.

4.2.4 Метод за диагностика на булозния пемфигоид по четири клинични критерии (L Vaillant et al.)¹⁷⁶.

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.

4.3 Лабораторни методи

4.3.1 Метод за хистологично изследване.

Хистологичното изследване е провеждано рутинно в лабораторията по хистология към ККВБ. Материалът за изследване се получава от ръба на свежа кожна или лигавична лезия. При стерилни условия, след локална подкожна анестезия (lidocain) се извършва пънч-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 стъкла и оцветяване с

хематоксилин-еозин. Резултатите се отчитат при наблюдение под светлинен микроскоп на увеличение: x10, x20, x40.

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

ДИФ е провеждана рутинно върху биопсия от перилезионален кожен или лигавичен участък в близост до свежа лезия. Биопсията се получава при условия, идентични с описаните за хистологично изследване. Биопсичният материал подлежи на незабавно дълбоко замразяване в течен азот и съхранение при -70°C (REVCO). Материалът се обработва до 48h след получаването. След включване в tissue-embedding medium (Miles) се изработват срези с дебелина 5 μ (замразяващ микротом, Leika) върху предметни стъкла. Селектират се стъклата за инкубиране с анти-IgG, анти-IgA, анти-IgM и C3. След 30min съхнене, стъклата се изплакват във фосфатно-буфериран разтвор (PBS) pH 7,2, 0,15 N и се подсушават, без да се допуска изсъхване на срезите. Последните се инкубират със заешки античовешки FITC (fluorescein)-конюгирани IgG, IgA, IgM, C3 серуми и нормален кози античовешки IgG (DAKO). След предварително разреждане с PBS в съотношение 1:30 за анти-IgG, IgA, IgM; 1:75 за анти-C3; реагентите се накапват върху предварително подготвените стъкла. Инкубацията трае 30min на тъмно във влажна камера. След двукратно измиване в PBS по 15min, срезите инкубиране с анти-IgA, IgM и C3 се подсушават, включват се в буфериран глицерин и се покриват с покривно стъкло.

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

Изследването може да се проведе и след инкубиране на биопсичния материал в 5 ml разтвор на NaCl (1 mol/l). 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.

4.3.3 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, която е съхранявана за не-повече от 30 мин във физиологичен разтвор. Кожата се нарязва на парченца с диаметър приблизително 0,5 см, които се инкубират в 5 ml разтвор на NaCl (1 mol/l) при 4°C за 48 h или на стайна температура за 24 h и непрекъснато разклашане с vortex. След инкубацията, върху по върхността на кожата се извършва леко триене, при което с фин инструмент епидермисът се отделя от дермата. Така

пригответеният 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. След еднократно измиване в PBS за 15 min се изваждат и подсушават. Следва 30 min инкубиране с FITC-конюгиран античовешки анти-IgG, предварително разреден и подготвен по начина, описан за ДИФ. След двукратно измиване по 15 min в PBS, стъклата се монтират 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 отчитат 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 неколнократно 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.

4.3.4 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, която при кита на Medical & Biological Laboratories Co. продължава на 1h на стайна температура. 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 налива 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 (DO_{450nm} – стойност на поглъщане при 450nm; Sample – проба серум; Cal.1 – калибратор 1 – негативна контрола; Cal.2 – калибратор 2 – положителна контрола):

$$U/ml = \frac{DO_{450nm} \text{ Sample} - DO_{450nm} \text{ Cal.1} \times 100}{DO_{450nm} \text{ Cal.2} - DO_{450nm} \text{ Cal.1}}$$

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.

4.3.5 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.

Приготвените 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.

4.3.6 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).

Серумите или мехурната течност за изследване предварително се подготвят, като се разреждат с комерсиален разтворител, съдържащ се в кита. Следва инкубация с поликлонални антитела, натоварени в кладенчетата на плаките в продължение на 30 min на стайна температура. След трикратни измивания с т.нар. буфер за измиване следва инкубация за 30 min с конюгат – фабрично произведено моноклонално анти-IgG човешко антитяло, конюгирано с пероксидаза. След нови трикратни измивания в кладенчетата на плаката се налива хромоген/субстрат разтвор, с който се инкубира 15 min. Реакцията се спира със т.нар. стоп разтвор. 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) като се изготвя стандартна скала, базирана на наличните калибратори.

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.

4.3.7 Метод за характеризиране 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

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, Филаделфия, САЩ; Лаборатория по Имунопатология, Болница Charles Nicolle, Rouen, Франция; “Institute de recherche sur la peau”, Болница Saint-Louis, Париж, Франция.

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 M NaCl и отделеният епидермис се лизира в разтвор, съдържащ Tris HCl, sodium dodecyl sulfate (SDS) 1,5%, 2-mercaptoethanol и протеазни инхибитори; след ултразвукова дезинтеграция, лизатът се поставя в кипяща вода за 5min, центрофугира се (12000g, 30 min) и втечнения субстрат се замразява и съхранява при -70°C. Вертикалната електрофореза на протеините се извършва в полиакриламиден гел 4% и 6% (Novex), съдържащ Tris-глицинов буфер. Миграцията на протеините се извършва в кювета за вертикална електрофореза (mini-cuve double Xcell II Novex). За трансфер на полипептидите от полиакриламидния гел (2h, напрежение 30V) се използва нитроцелуозна мембрана с размер на порите 45nm; следва оцветяване на мембраната с rouge ponceau и обезцветяване с оцетна киселина. 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 антитела (PROGEN) срещу съответните епидермални антигени или човешки серуми, приети за положителни контроли. Миграцията трае 90min при 125V и сила на тока 30-40mA в началото и 8-12mA в края на миграцията.

За трансфер на полипептидите от полиакриламидния гел се използва нитроцелуозна мембрана с размер на порите 45nm (Hybond-C extra; Amersham). Оформя се "сандвич" от 3 пласта абсорбираща филтърна хартия (Oxoid 50211), 1 лист нитроцелуозна мембрана, гел и още 3 пласта абсорбираща филтърна хартия. Реакцията се извършва в модул за електротрансфер (Novex) при правилно ориентиране спрямо анод/катод

(протеините в SDS мигрират към анода). Кюветата за електротрансфер се изпълва със съответната течна среда (tris 14,52 g, glycine 72 g qsp 1l, 100 ml се разреждат с дестилирана вода 900ml), а около нея се поставя дестилирана вода. Трансферът трае 2 h при постоянно напрежение (30V). Следва оцветяване на мембраната с rougeponceau за около 3min и обезцветяване с оцетна киселина 5%.

Мембраната се нарязва на лентички, съответстващи на “пътеките” на белтъчна миграция. Лентичките се поставят в отделни вани за инкубация. Първоначално се сатурират за 1h при стайна температура с обезмаслено мляко, разредено до 5% в PBS. Серумите, подлежащи на изследване, са получени при центрофугиране 15 min на 1000g и консервирани при -30°C. След предварително разреждане 1:50 с PBS 1X-0,05% tween-2,5% обезмаслено мляко серумите се инкубират с лентичките нитроцелулозна мембрана за 2h при непрекъснато разклащане. След трикратно измиване се прибавя предварително разреден конюгат: моноклонално мише античовешко IgG (G1-G4) (Sigma). След още три измивания лентичките се инкубират с козе анти-мише IgG-биотин (Caltag), разредено предварително в съотношение 1:100 с PBS-tween-мляко. След три измивания се прибавя за 10min стрептавидин-алкална фосфатаза (Caltag), разредена 1:1000 в PBS-tween. Реакцията става видима след три измивания с реактив NBT/BCIP.

За контроли се използват моноклонални антитела (PROGEN) срещу дезмоглеин 1 и дезмоплакините или човешки серуми, приети за положителни контроли. Всяка серия лентички, съответна на една вертикална електрофореза, се придружава системно от две контроли за антигените на булозен пемфигоид и пемфигус.

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.

4.3.8 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 фото-приставка (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.

4.3.9 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. Освен това, броят на случаите в изходните клетки на таблицата трябва да е дадени като абсолютни величини. Клетки от таблицата, в които честотите са равни на 0, трябва да бъдат предварително отстранени. Емпиричната характеристика на хипотезата се изчислява по формула:

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

- 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.

5. Резултати

5.1 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 линейарно отлагане на IgG и/или C3 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 3. 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 6).

Таблица 6. 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 сгрупване на пациенти, родени в определен регион (Фигура 4).

Фигура 4. Разпределение на болните с пемфигOID по място на раждане



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 изследваните пациентите се срещат множество, характерни за възрастовата група придружаващи заболявания на различни органи и системи – най-често артериална хипертония, захарен диабет, исхемична болест на сърцето и аритмии, но също така предсърдно мъждене, чернодробна цироза, хронична бъбречна недостатъчност, тромбофлебит, хронична обструктивна белодробна болест, бронхиална астма, колит, глухота, прекаран миокарден инфаркт, стенокардия, хроничен калкулозен пиелонефрит, цервикоартроза с остеохондроза, спондилоза, тиреоидит на Хашимото, хипертиреозидизъм, кисти на яйчниците, Адисонова болест, мегалобластна анемия, катаракта, хиперплазия на простатата, хронична венозна недостатъчност и др.

Двама от пациентите съобщават за третирани в миналото злокачествени заболявания – карцином на тестиса и MALT-лимфом.

Неврологичните и психиатрични заболявания, които се срещат при изследваните болни, са мозъчен инсулт, отоневрологичен синдром, полиневропатия, епилепсия, шизофрения и депресия. Четирима от пациентите страдат от болест на Паркинсон с дългогодишна давност. Не се

установява хронологична връзка между появата на булезната дерматоза и неврологичното заболяване.

При повечето пациенти от изследваната група не се установява непосредствен провокиращ фактор за отключване на автоимунното заболяване. При един болен булезната 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 5). 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 5. 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)



5.2 Клинични проучвания

5.2.1 Общ клинико-морфологичен анализ

Клинико-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. В Таблица 7 са представени клиничните диагнози, поставени преди извършване на специфичните имунофлуоресцентни и имуносерологични тестове. От различни дерматологични звена в страната е изпратен биопсичен материал на 17 пациенти, при които в Направление за имунофлуоресцентна диагностика към ККВБ в Александровска болница е установено отлагане на IgG и/или C3 по БМ чрез ДИФ. Клиничните диагнози са написани върху насочващите фишове за изследване.

Таблица 7. Клинична диагноза при пациентите от изследваната група

	ККВБ*		други звена**	
	п	%	п	%
Булозен пемфигоид	69	75,0%	7	41,2%
Пемфигоид на мукозните мембрани	12	13,0%	1	5,9%
Epidermolysis bullosa acquisita	4	4,4%	0	0%
Линеарна IgA дерматоза	2	2,2%	1	5,9%
Pemphigus vulgaris	5	5,4%	8	47,0%
Общо	92	100%	17	100%

* - пациенти, хоспитализирани в ККВБ

** - изпратен биопсичен материал от други звена

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

Фигура 6. 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.

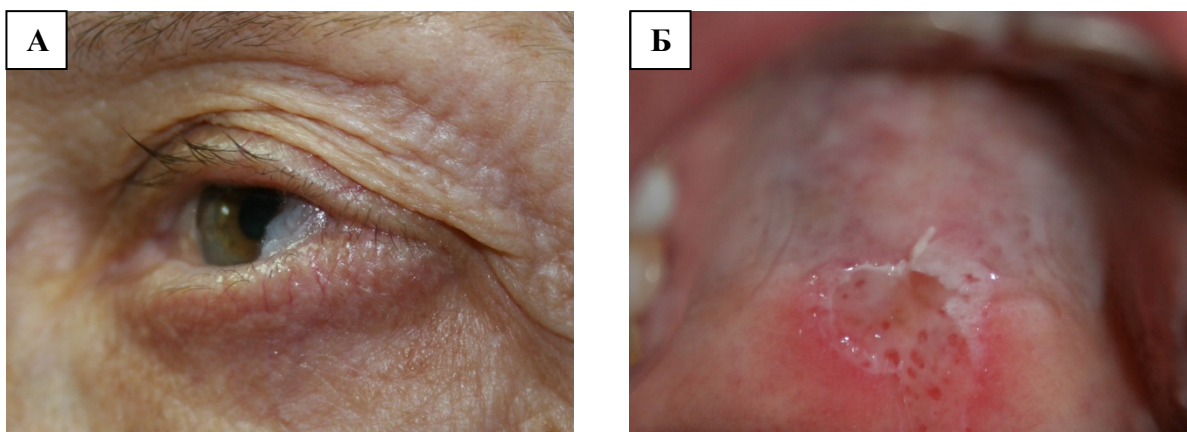
Таблица 8. Лигавично засягане в изследваната група от 92 болни

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



Всички болни с доминиращо лигавично засягане са от женски пол:

- Изолирано засягане на орална лигавица – 6 болни
- Изолирано засягане на очна лигавица – 2 болни
- Изолирано засягане на орална и генитална лигавица – 2 болни
- Изолирано засягане на орална, генитална и очна лигавица – 1 болна
- Засягане на орална и/или фарингеална лигавица с кожни прояви – 3 болни

При 14 пациенти водещи са оплакванията от страна на кожата, но паралелно с тях се наблюдават и изменения по лигавицата:

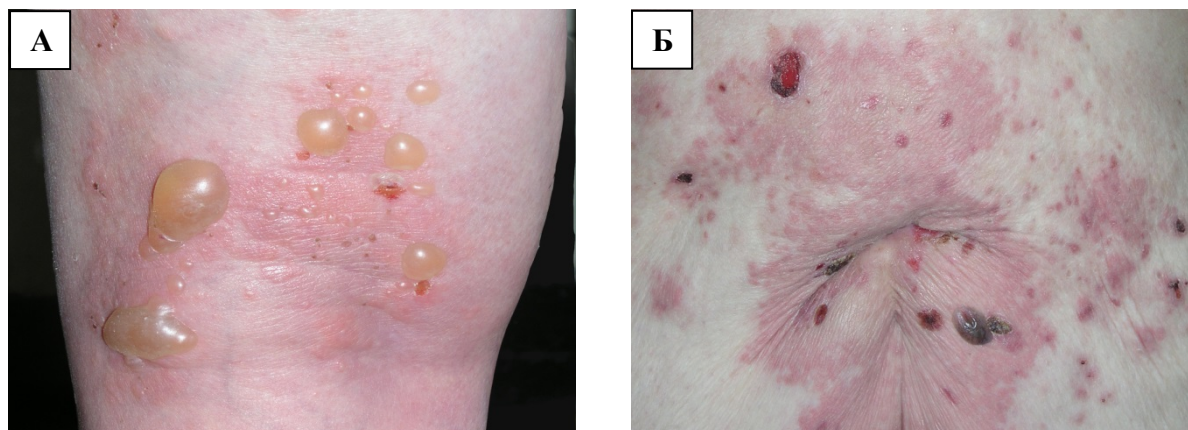
- Засягане на орална лигавица – 10 болни
- Засягане на орална и генитална лигавица – 1 болна
- Засягане на орална и очна лигавица – 1 болен
- Засягане на орална и ларингеална лигавица – 1 болна
- Засягане на фарингеална лигавица – 1 болна

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

спектр от комбинации между различни обривни елементи, включващи були, везикули, ерозии, корусти, уртикариални лезии, ексориации, 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 булезните елементи също варира от множество (44 пациенти), през ограничен брой (14 пациенти) до единични везикули и/или були (22 пациенти).

Фигура 8. 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

Изолирано засягане в областта на главата и шията се наблюдава само при един болен. При всички останали 28 пациенти се откриват и лезии по трункус и/или крайници.

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 9. 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

Особеностите в клиничната картина при всички пациенти с кожни прояви са оценени по четири валидирани клинични критерии с добра предиктивна стойност за диагностика на булозния пемфигоид (Vaillant):

1. Липса на атрофични белези.
2. Липса на засягане в областта на главата и шията.
3. Липса на лигавично засягане.
4. Възраст над 70 години.

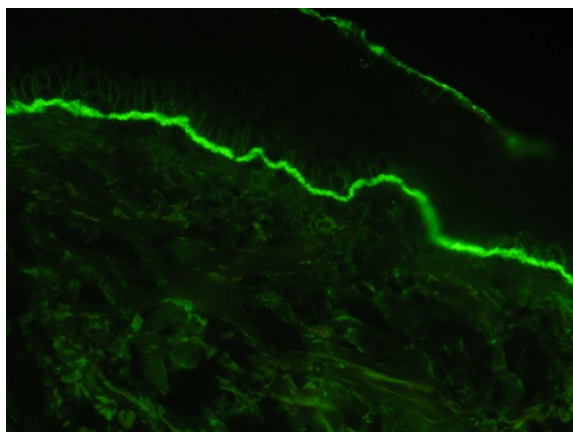
Общо 54 болни покриват 3 или повече критерии, а 27 болни – по-малко от 3 критерии.

5.3 Лабораторни изследвания

5.3.1 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 10).

Фигура 9. 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:

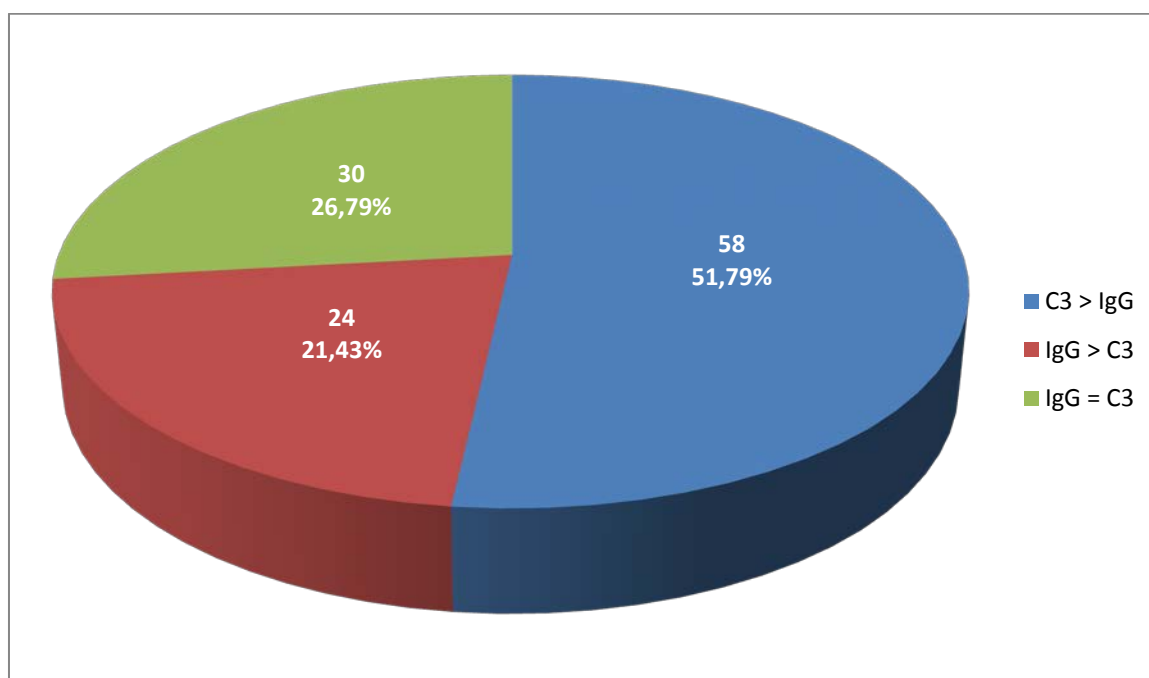
- IgG и C3 – 80 пациенти
- IgG, IgA и C3 – 10 пациенти
- само C3 – 9 пациенти
- само IgG – 7 пациенти
- IgG, IgM и C3 – 4 пациенти
- IgG и IgA – един пациент
- IgG, IgA, IgM и C3 – един пациент

Таблица 10. 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%

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.

Фигура 10. Сравнение между интензивността на отлагане на IgG и C3 при ДИФ



Направен е анализ с цел откриване на клиничко-лабораторна корелация между преобладаващия имунореагент при ДИФ и клинични белези като лигавично засягане (Таблица 11) и вид на перилезионална кожа (Таблица 12).

Не се откриват статистически значими разлики в имунофлуоресцентната находка при клинично разграничените групи:

Таблица 11. ДИФ и лигавично засягане

Засягане	IgG > C3		IgG ≈ C3		C3 > IgG	
	n	%	n	%	n	%
Предимно лигавично	4	28,57%	4	28,57%	6	42,86%
Предимно кожно	2	14,28%	4	28,57%	8	57,14%
Изолирано кожно	13	20,31%	12	18,75%	39	60,94%

Таблица 12. ДИФ и перилезионална кожа

Перилезионална кожа	IgG > C3		IgG ≈ C3		C3 > IgG	
	n	%	n	%	n	%
Непроменена	3	15%	6	30%	11	55%
Променена:	8	16,33%	9	18,38%	32	65,31%
Еритемна	1	5,26%	7	36,84%	11	57,89%
Уртикариална	7	23,33%	2	6,66%	21	70%

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.

5.3.2 Индиректна имунофлуоресценция

При 79 пациенти са проведени общо 125 рутинни индиректни имунофлуоресцентни изследвания върху субстрат от хранопровод, като циркулиращи анти-базалномембранни 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:

- Негативна ИИФ на серум и мехурна течност – 8 болни
- Положителна ИИФ с еднакви титри при серум и мехурна течност – 4 пациенти
- Положителна ИИФ с по-високи титри при изследване на серум, отколкото при материал от мехурна течност – 6 пациенти
- Положителна ИИФ с по-високи титри при изследване на мехурна течност, отколкото при материал от серум – 4 пациенти

При двама пациенти е отчетена положителна ИИФ на серум и негативна ИИФ на мехурна течност.

ИИФ SSS

След първоначална селекция на пациентите чрез ДИФ, индиректната имунофлуоресценция върху субстрат от сепарирана с 1 М 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 BIOCHIP панела.

Чрез ИИФ SSS са изследвани 86 пациенти (Таблица 13). Най-честата находка е отлагане на IgG по епидермалната страна на мехура:

Таблица 13. ИИФ върху сепарирана кожа

	п	%
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 14). ИИФ SSS показва по-висока чувствителност от ИИФ върху субстрат от хранопровод.

Таблица 14. 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	

5.3.3 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.

5.3.4 ВІОСНІР

Чрез ВІОСНІР са изследвани 76 серума на 75 пациенти (Фигура 11, Таблица 15)

Фигура 11. ИИФ върху тетрамерен рекомбинантен ВР180 (А) и трансфектирани клетки с ВР230 (Б) като част от ВІОСНІР панела

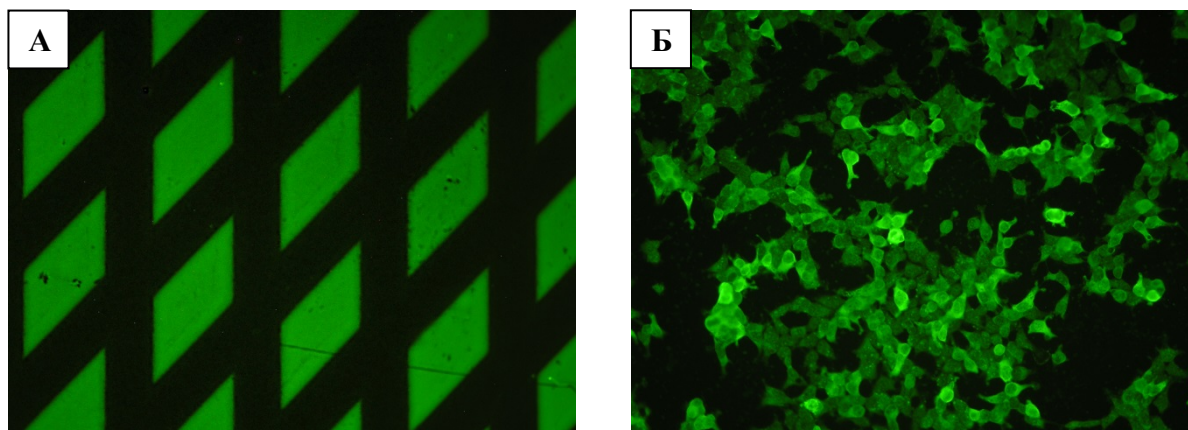


Таблица 15. Резултати от изследване на различни субстрати с ВІОСНІР

Субстрат	положителен		негативен	
	п	%	п	%
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%

п – брой пациенти

Предимството на изследването върху сепарирана кожа, в сравнение с това върху субстрат от хранопровод, е още по-демонстративно ($p < 0,01$) (Таблица 16).

Таблица 16. Сравнение между проведени ИИФ с BIOCHIP върху сепарирана кожа и субстрат от хранопровод

	BIOCHIP eso* (+)	BIOCHIP eso* (-)	Общо
BIOCHIP SSS** (+)	37	30	67
BIOCHIP SSS** (-)	0	8	8
Общо	37	38	

* ИИФ върху BIOCHIP субстрат от хранопровод

** ИИФ върху BIOCHIP на сепарирана кожа

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

5.3.5 Сравнение в чувствителността на различните методи

Чрез BIOCHIP 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 BIOCHIP се открива положителна находка:

- положителни на хранопровод, SSS и BP180 – 2 серума
- положителен на SSS и хранопровод – 1 серум
- положителни на SSS и BP180 – 2 серума
- негативни – 4 серума

ИИФ върху субстрат от сепарирана кожа е по-чувствителна като част от BIOCHIP панела, в сравнение със стандартния метод, използван в лабораторията (Таблица 17).

От 67 изследвани серума по двата използвани метода, на стандартна ИИФ положителни са 54 серума, а на BIOCHIP SSS – 60 серума. В 59 от случаите резултатите от изследването по двата метода съвпада. При 13 от негативните на стандартна ИИФ SSS серуми, е проведено изследване с BIOCHIP SSS, което води до намаляване на отрицателните резултати до 6. При шест от седем отрицателни на BIOCHIP SSS пациенти, изследването по стандартния метод също е отрицателно, а в един случай се отчита много слабо епидермално светене върху сепарирана кожа при негативен резултат върху хранопровод.

Таблица 17. Сравнение между проведени ИИФ по стандартна за лабораторията технология и като част от BIOCHIP панела

	BIOCHIP SSS (+)	BIOCHIP SSS (-)	Общо
ИИФ SSS (+)	53	1	54
ИИФ SSS (-)	7	6	13
Общо	60	7	

Обратна е зависимостта при изследването върху субстрат от хранопровод. От 65 изследвани серума, при рутинния метод положителни са 43, а чрез BIOCHIP – 34 серума (Таблица 18).

Таблица 18. Сравнение между рутинна ИИФ и ИИФ върху субстрат от хранопровод като част от BIOCHIP панела

	BIOCHIP eso (+)	BIOCHIP eso (-)	Общо
ИИФ eso (+)	28	15	43
ИИФ eso (-)	6	16	22
Общо	34	31	

От всички изследвани на BIOCHIP 76 серума, при 8 изследването е отрицателно върху всички субстрати. Рутинните ИИФ изследвания при 7 от тези пациенти също са отрицателни, а в един случай се отчита много слабо епидермално светене върху сепарирана кожа, при отрицателна ИИФ върху хранопровод.

Високата чувствителност на ИИФ върху сепарирана кожа при BIOCHIP изследването се потвърждава от факта, че сепарираната кожа е положителна при всички останали 68 изследвани серума. При изследването с BIOCHIP се наблюдава 100% корелация между резултатите върху сепарирана кожа и всички положителни резултати върху субстратите за BP180, BP230 и/или маймунски хранопровод. В нито един случай на положителен резултат върху друг субстрат, не се наблюдава отрицателен резултат върху сепарирана кожа.

Интерес представлява сравнението между чувствителността на двата използвани метода за установяване на серумни антитела срещу BP180, ELISA и ИИФ върху рекомбинантен тетрамерен BP180 като част от BIOCHIP панела. При 37 серума е извършено изследване за антитела срещу BP180-NC16A едновременно чрез ELISA и BIOCHIP, а резултатите показват по-висока чувствителност на ELISA (Таблица 19).

Таблица 19. Сравнение между BP180-NC16A ELISA и ИИФ върху рекомбинантен тетрамерен BP180 (BIOCHIP)

	BIOCHIP BP180 (+)	BIOCHIP BP180 (-)	Общо
ELISA BP180 (+)	8	8	16
ELISA BP180 (-)	0	21	21
Общо	8	29	

При серумите, изследвани с ELISA BP180 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 BP180 с BIOCHIP. При четирима от пациентите с положителна BP180-NC16A ELISA в ниски стойности (10, 18, 21, 21 U/ml), резултатът при изследването с BIOCHIP е негативно. При всички останали пациенти с положителни стойности на ELISA BP180 (над 41 U/ml), както и при всички пациенти с отрицателна ELISA BP180, се наблюдава корелация с резултата при изследването с BIOCHIP.

При изследваните с ELISA BP180 кит на Euroimmun, резултати над 20 U/ml се считат за положителни. При 22 от пациентите в тази група е извършено изследване с BP180 на BIOCHIP. При четирима от пациентите със стойности на антителата срещу BP180-NC16A ELISA между 25 и 40 U/ml, изследването с BIOCHIP е негативно. При всички останали случаи, в които са направени и двете изследвания, резултатите на BP180-NC16A ELISA и BP180 BIOCHIP съвпадат.

5.3.6 Диагностичен алгоритъм

Чрез адаптиран алгоритъм за диагностициране на сАИБД с отлагане на IgG и или C3 по базалната мембрана, включващ ДИФ, ИИФ и ДИФ върху сепарирана кожа, BP180-Nc16a ELISA и BIOCHIP изследванията, пациентите от изследваната група са диагностицирани както следва:

Таблица 20. 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 BP180 и BP230)	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 C3 по базалната мембрана	13
Общо:	112

Алгоритъмът е изпълнен в цялост при 80 пациенти. При 15 от тях е диагностициран пемфигоид на базата на епидермално отлагане при ИИФ върху субстрат от сепарирана кожа, без да се открият специфични антитела срещу ВР180 и ВР230. Според клиничната картина тези 15 пациенти са диагностицирани с ВР или ММР, оформяйки относителните дялове на тези заболявания в групата на сАИБД с отлагане на IgG и/или С3 по базалната мембрана (Таблица 21).

Таблица 21. Разпределение по диагнози на пациентите, при които диагностичният алгоритъм е изпълнен в цялост

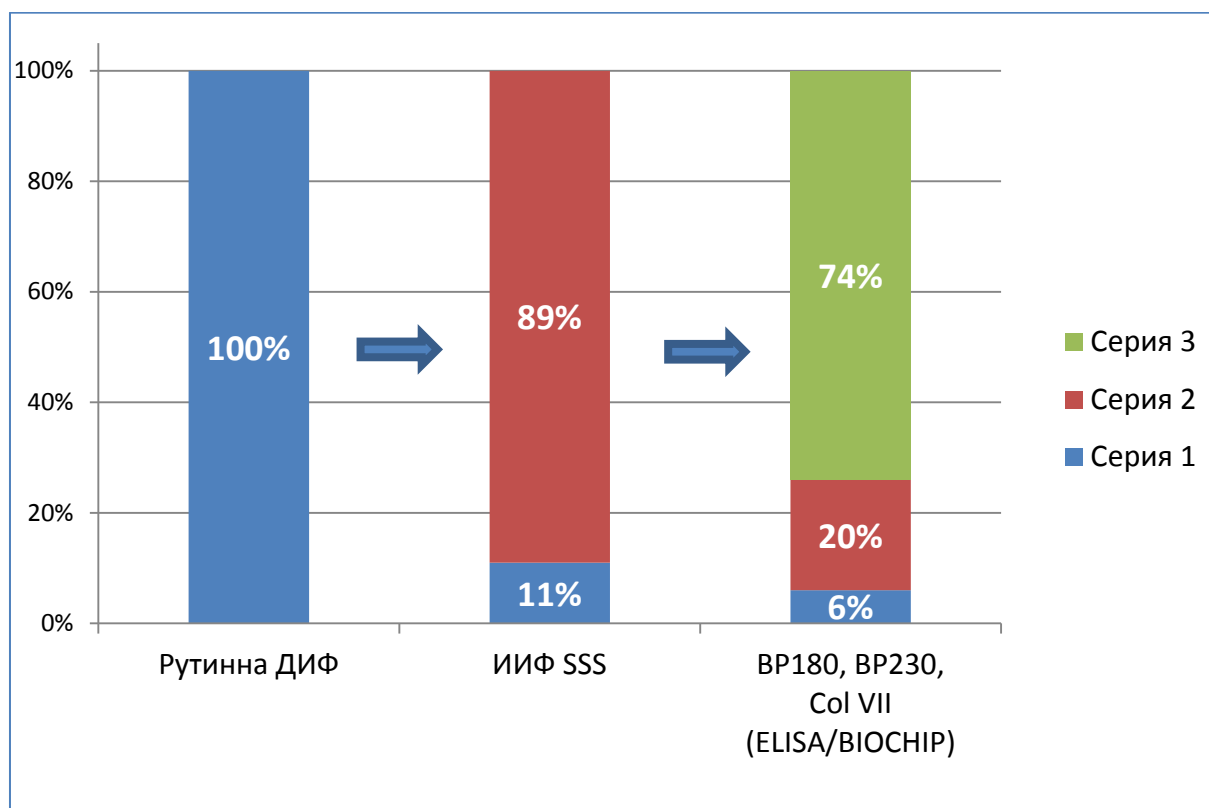
Заболяване	брой пациенти	%
Булозен пемфигоид	65	76,5%
Пемфигоид на мукозните мембрани	10	11,8%
Анти-ламинин-332 пемфигоид, анти-p200 пемфигоид?	3	3,5%
Epidermolysis bullosa acquisita	2	2,3%
Негативни на всички имуносерологични методи	5	5,9%
Общо:	85	100%

Анализ на отделните стъпки при изпълнението на алгоритъма ще бъде направен в глава „Обсъждане“.

Фигура 12 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 12. Прецизност на диагностиката на сАИБД в хронология на провеждане на различни по специфичност методи за изследване



5.3.7 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%). Получените резултати са:

- < 100 IU/ml – 8 пациенти
- 100-500 IU/ml – 21 пациенти

- 500-1000 IU/ml – 9 пациенти
- > 1000 IU/ml – 7 пациенти

Не се откриват статистически значими корелации между периферна еозинофилия и повишен IgE в серума (Таблица 22), както между параклиничните показатели и клинични белези като вид на перилезионалната кожа (Таблица 23) и сърбеж (Таблица 24).

Таблица 22. Сравнение между повишени нива на IgE и периферна еозинофилия

IgE	Eos (-)	Eos (+)
Нормално	75% (6)	25% (2)
Повишено	54% (19)	46% (16)

Таблица 23. Увеличение на еозинофилите и IgE спрямо клиничната картина и наличие на перибулозна еритемни или уртикариални лезии

Перибулозна кожа	Еозинофили в периферна кръв, n=45		Тотален IgE в серум, n=40	
	повишени	нормални	повишен	нормален
Здрава	50% (6)	50% (6)	100% (10)	-
Еритемна	33% (4)	67% (8)	69% (9)	31% (4)
Уртикоподобна	43% (9)	57% (12)	88% (15)	12% (2)

Таблица 24. Еозинофили и IgE спрямо интензивността на сърбежа

Сърбеж	Еозинофили в периферна кръв, n=45		Тотален IgE в серум, n=40	
	повишени	нормални	повишен	нормален
Липсващ/умерен	41% (7)	59% (10)	88% (14)	12% (2)
Интензивен/непоносим	48% (14)	52% (15)	87% (20)	13% (3)

5.3.8 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. В изследването са включени серуми на пациенти, хоспитализирани в клиниката преди 2010 г., които не са част от основната група от 112 болни, изследвани в рамките на дисертационния труд. Спектърът на подлежащите злокачествени заболявания включва предимно карциноми с разнообразен произход (9 болни) и 1 случай на менингеом.

Таблица 25. Демографски и клинични данни на пациентите

	Брой пациенти	Средна възраст (Интервал)	Клиничен фенотип	
			BP	MMP
Пемфигоид и неоплазма	10	63,8 (48 – 75)	8	2
Жени	8	62 (48 – 75)	6	2
Мъже	2	71 (69 – 73)	2	0
Пемфигоид без неоплазма	34	65,14 (12 – 86)	27	7
Жени	18	68,55 (52 – 86)	13	5
Мъже	16	61,18 (12 – 83)	14	2

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 (Таблица 26). Видно е, че процентът на положителни серуми е подобен в двете групи, като липсват достоверни

различия и в пропорцията на епидермален, дермален или смесен тип антитела.

Таблица 26. Резултати от приложението на ИИФ върху субстрат от сепарирана кожа

	Циркулиращи IgG анти-БМЗ антитела върху SSS			
	Позитивни Брой (%)	Епидермален тип	Смесен тип	Дермален тип
сАИБД и неоплазма (n = 10)	8/10 (80%)	6	2	0
сАИБД без неоплазма (n = 34)	26/34 (76,47%)	22	3	1

SSS – salt split skin, сепарирана кожа

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.

Таблица 27. Резултати от приложението на имуноблот и/или ELISA BP180 при болни с пемфигоид и злокачествено заболяване

Пациент	Пол	Години	Клиничен фенотип	ИИФ/SSS	WB kDa	ELISA U/ml	Асоциирана неоплазма
1. Л.Г.М.	Ж	66	BP	смесен	180	124	Ca colli uteri
2. С.Н.Р.	М	69	BP	епидермален	(-) отр.	98	Ca laryngis
3. И.К.А.	Ж	62	BP	епидермален	неизследван	90	Ca uteri
4. М.И.Ф.	Ж	75	BP	смесен	неизследван	11	Ca oesophagi
5. Р.Й.К.	Ж	52	ММР*	(-) отр.	DP; 160-170	(-) отр.	Ca mediastini
6. Р.Г.Н.	Ж	60	BP	(-) отр.	(-) отр.	72	Ca ventriculi
7. Ф.К.Т.	Ж	48	BP/ММР**	епидермален	неизследван	118	Ca uteri
8. П.Д.М.	М	73	BP	епидермален	неизследван	147	Ca gl. prostatae
9. М.Л.А.	Ж	62	BP	епидермален	неизследван	164	Meningioma
10. В.Г.Б.	Ж	71	BP	епидермален	(-) отр.	83	Ca colli uteri

* Предимно лигавично засягане с цикатризиране на лезиите

** Смесено кожно и лигавично засягане с белези на начално цикатризиране

Таблица 28. Резултати от приложението на WB и ELISA BP180 – контролна група

Пациент	Пол	Години	Клиничен фенотип	ИИФ/SSS	WB kDa	ELISA U/ml	Коментар
1. Б.С.К.	Ж	76	BP	епидермален	180	(-) отр.	контрола
2. Д.И.Д	М	68	BP	епидермален	180, 230	117	контрола
3. Н.С.М.	Ж	76	BP	епидермален	180	153	контрола
4. И.И.В.	М	12	BP	епидермален	180, 230	190	контрола
5. А.Д.Т.	М	54	BP	епидермален	180	184	контрола
6. Я.С.С.	М	71	BP	епидермален	180	49	контрола
7. Щ.Л.А.	М	51	BP	(-) отр.	(-) отр.	(-) отр.	контрола
8. К.Ж.К.	М	40	BP	епидермален	230	(-) отр.	контрола
9. П.М.Г.	М	79	BP	епидермален	180	127	контрола

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.

Таблица 29. Резултати от изследването с ELISA BP180

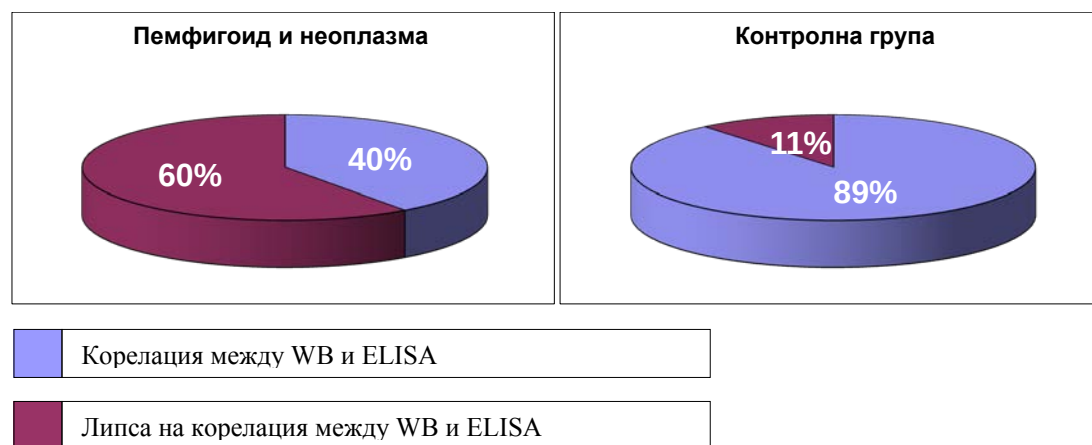
	Антитела срещу BP180 чрез ELISA			
	Позитивни	ELISA индекс		
	Брой (%)	mean	SD*	p
сАИБД и неоплазма (n = 10)	9/10 (90%)	90,7	53,16	
сАИБД без неоплазма (n = 34)	23/34 (67,64%)	79,02	82,48	> 0,05

SD – стандартно отклонение

При 5 от пациентите с пемфигоид и неоплазма, серумът е изследван едновременно чрез WB и ELISA BP180. При сравняване на резултатите от тези два теста, корелация се наблюдава при двама пациенти – в един случай има съвпадение на реактивност на серума с антиген с молекулно тегло 180 kDa и високи титри антитела на ELISA BP180 (пациент 1), а в друг случай при WB се установява реактивност спрямо антигени с молекулни тегла различни от 180 kDa, като съответно на това ELISA BP180 е негативна (пациент 5). При трима пациенти с пемфигоид и неоплазма прави впечатление негативният резултат на WB, за разлика от положителните стойности на ELISA BP180 (пациенти 2, 6 и 10).

В контролната група на двете изследвания са подложени серумите на 9 пациента. Прави впечатление, че в тази група случаите на съвпадение на положителни или отрицателни резултати между двата теста е доста по-висок - в 8 случая резултатът от WB корелира с този при ELISA BP180 (пациенти 2 - 9).

Фигура 13. Корелация между WB и ELISA



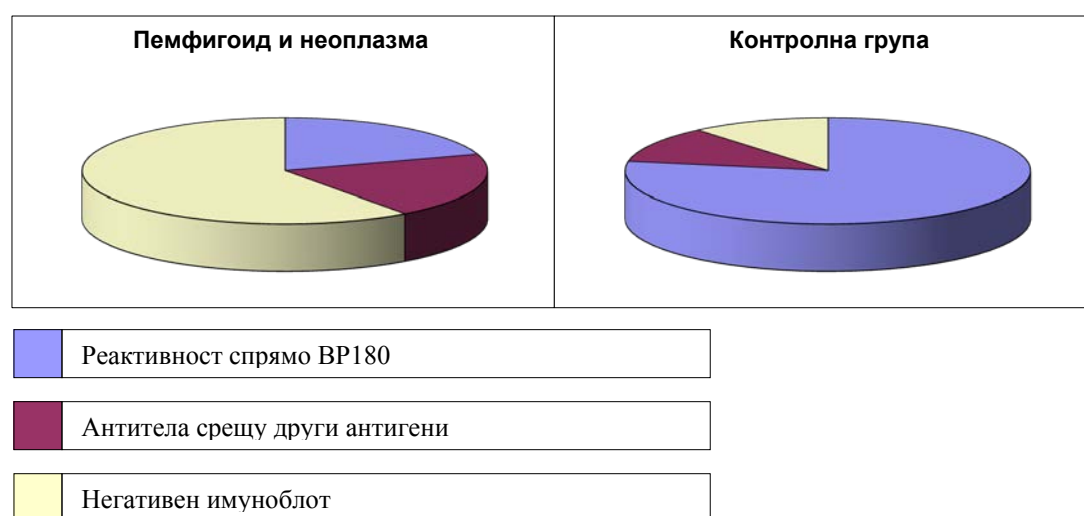
В 6 от случаите (пациенти, 2, 3, 4, 5, 6 и 9), серумът на болните реагира с антиген с молекулна маса 180 kDa (в два от тях, пациенти 2 и 4, допълнително и с молекулно тегло 230 kDa), като съответно на това

изследването с ELISA BP180 е положително. При 1 болен и двете изследвания са отрицателни (пациент 7). В 1 случай, серумът на пациента съдържа антитела срещу антиген с молекулна маса 230 kDa, като съответно на това изследването чрез ELISA BP180 е негативно (пациент 8). Само при 1 от всичките 9 болни, серумът реагира с BPAG2 с молекулно тегло 180 kDa на имуноблот, а ELISA BP180 тестът е отрицателен (пациент 1).

В тази група липсват серуми, които показват комбинация от негативен блот и положителен резултат на ELISA BP180, за разлика от групата на пациентите с пемфигоид и неоплазма, където подобна корелация се наблюдава в 3 от 5-те изследвани болни.

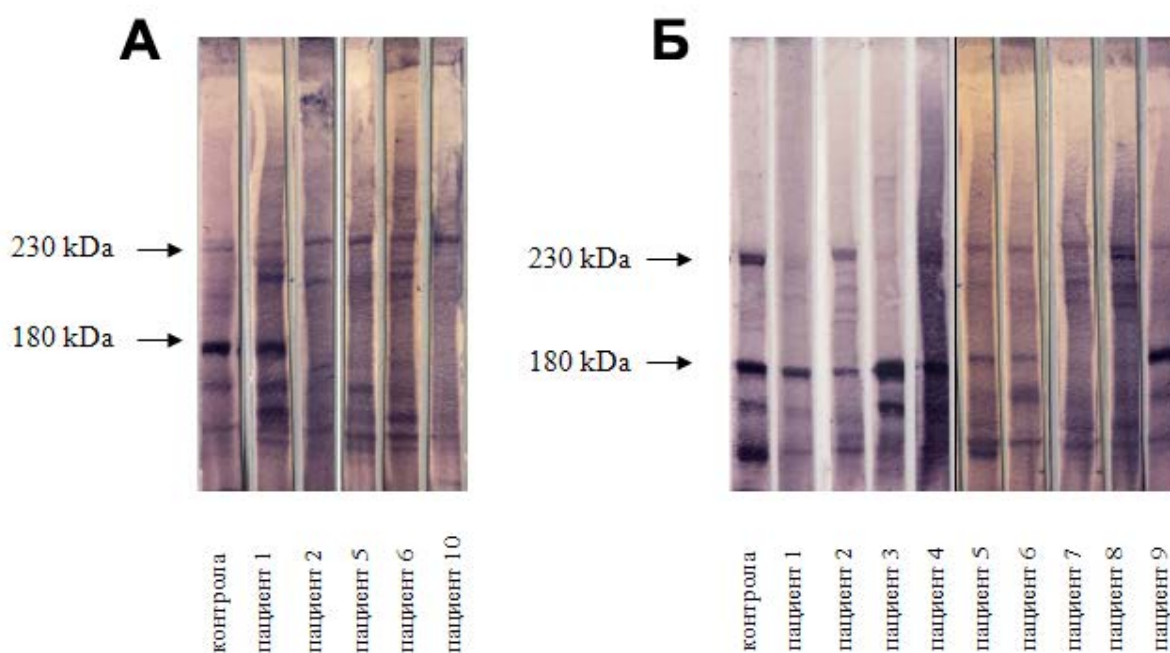
От направените общо 14 изследвания на серуми посредством имуноблот прави впечатление, че в групата на пациентите с асоциирана неоплазма, реактивност спрямо BPAG2 с молекулна маса 180 kDa се установява само при един от пет пациенти (пациент 1), при един се наблюдават антитела срещу други антигени (DP, 160-170 при пациентка с ММР – пациент 5), и при 3 болни блотът е негативен (пациенти 2, 6 и 10), въпреки изразените клинични, хистологични и имунофлуоресцентни данни за заболяването.

Фигура 14. Резултати от изследването с WB



Сравнено с контролната група - пациенти с пемфигоид без неоплазма, състояща се от 9 серума, реактивност спрямо BPAG2 с молекулна маса 180 kDa се установява в 7 от случаите, асоциирано в два от тях с реактивност спрямо BPAG1 с молекулна маса 230 kDa. В един случай в контролната група серумът съдържа само антитела, реагиращи с BPAG1 (пациент 8) и в един случай изследването е отрицателно (пациент 7).

Фигура 15. Western blot при пациенти с асоциация пемфигоид/неоплазма (А) и в контролната група пациенти с пемфигоид без неоплазма (Б)



При проведения анализ чрез ELISA BP180, не се открива статистически значима разлика между установените индекси на антителата в двете изследвани групи (Таблица 29). От проведените 10 теста с ELISA BP180 в групата на пациентите с подлежаща неоплазма се открива само 1 отрицателен резултат (при пациентка с MMP, пациент 5), а 9 серума дават положителни резултати, 8 от които с високи титри на антителата (над 71 U/ml), дори и при негативен имуноблот (пациенти 2, 6 и 10) или негативна ИИФ (пациент 6) (Таблица 27). Само един серум в тази група показва ниски стойности на антителата, близки до негативните (пациент 4). В контролната група с 34 ELISA BP180 изследвания, при 11 (67,64 %) от серумите е налице

ELISA индекс ≤ 9 U/ml, което е равностойно на отрицателен резултат. При останалите 24 изследвания, наред със сигурно положителните високи стойности на антителата срещу BP180, се наблюдават и по-ниски стойности в 8 случая (Таблица 28).

Съвпадение на първоначалната клинично-лабораторна диагноза с резултатите от WB се установява съответно в 10 случая (2 в групата с неоплазми и 8 в контролната група).

При изследването посредством ELISA BP180, разминаване с първоначалната клинично-лабораторна находка се наблюдава в общо 10 случая в контролната група, при които не се установява предполагаемото присъствие на циркулиращи антитела срещу BPAG2. В групата с неоплазми, резултатът от ELISA BP180 е негативен само при една пациентка с цикатризиращ пемфигоид и потвърждава диагнозата във всички останали 9 случаи.

5.4 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 имуофлуоресцентна лаборатория. Като основа са използвани Microsoft Excel и среда за разработка Visual Basic, основаваща се на език за програмиране BASIC. Системата позволява улеснено и детайлно въвеждане на паспортни данни за пациента, както и на резултатите от ДИФ (Фигура 16), ИИФ, ИИФ SSS, ELISA BP180-NC16A и BIOCHIP.

Заложена е функционалност, която дава възможност за хронологичен преглед на всички изследвания, проведени при даден пациент. За изчистване на грешки и постигане на необходимата прецизност при работа, са изпитани 38 версии на програмата.

Фигура 16. Електронна форма за въвеждане на резултатите от ДИФ

ДИФ

Директна имунофлуоресценция (ДИФ)

Номер Дата Днешна дата Клиника ИЗ номер

Епидермис

интерцелуларно (ICS)

☐ IgG ☐ IgA ☐ IgM ☐ C3

якъларно (Nuc)

☐ IgG ☐ IgA ☐ IgM ☐ C3

цитоплазмено (Cyt)

☐ IgG ☐ IgA ☐ IgM ☐ C3

Дермо-епидермална зона (BMZ)

☐ линеарно ☐ грануларно

☐ IgG ☐ IgA ☐ IgM ☐ C3 ☐ фибрин

Спонтанна була

☐ епидермално

☐ дермално

☐ смесено

ИЗЧИСТИ ИЗБОРА

IgG serration

☐ n

☐ u

Патили (Pap)

☐ IgG ☐ IgA ☐ IgM ☐ C3 ☐ фибрин

Бележки

Негативно изследване

Добави резултата

Информацията се съхранява на твърд диск, както и на защитени онлайн сървъри, което осигурява допълнителна надеждност и сигурност.

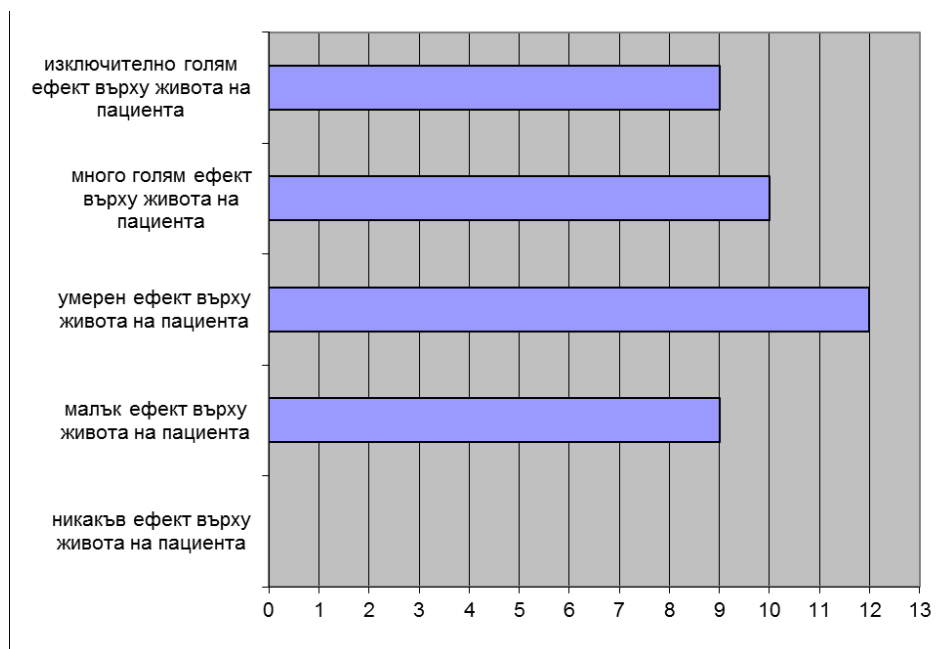
5.5 Качество на живот при пациенти с пемфигонд

Всички 40 попълнени въпросници за определяне на Дерматологичния индекс за качеството на живот (DLQI) се приемат за валидни, тъй като липсват въпросници с повече от един неотговорен въпрос.

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 пемфигонд има „много голям ефект върху живота” на пациентите в изследваната група.

В първия ден от хоспитализацията на тези болни, те се разпределят в различните групи на засягане както следва:

Фигура 17. Степен на засягане на качеството на живот



В групата от пациенти, попълнили въпросника, *липсват* такива, върху които заболяването да няма „*никакъв ефект*”.

Булозният пемфигOID 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.

Тълкуване на отделните категории на DLQI въпросника.

DLQI може да бъде анализиран в шест категории – „Симптоми и чувства”, „Ежедневни дейности”, „Свободно време”, „Работа и училище”, „Лични взаимоотношения” и „Лечение”. Средните резултати за всяка категория са както следва:

Таблица 30. 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

Сравнение по възраст и пол

При обработка на всички въпросници, в изследваната група от 40 пациенти не се откриват тенденции или статистически значими разлики в засягането на качеството на живот по възраст и/или пол.

6. Обсъждане

В резултат на проведените клинико-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.

6.1 Епидемиологичен анализ

В България липсва достъпна и обобщена за цялата страна епидемиологична информация относно заболяемостта от автоимунни булозни дерматози. Като добър ориентир за спектъра на тези заболявания може да послужи сравнението между честотата на две различни групи заболявания, диагностицирани в една водеща клиника за определен период от време. 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 заболяемост 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.

При сравнение на епидемиологичните данни с тези от последното десетилетие на XX век⁴¹, броят на сАИБД с отлагане на IgG по базалната

мембрана, диагностицирани в ККВБ София, е нараснал значително от 131 случая за 11 години (12 случая годишно) до 112 случая за 3 години (37 случая годишно). Това повишение вероятно не отразява докрай реалната заболяемост от сАИБД в България и може би в известна степен се дължи на по-големия брой пациенти, които клиниката обслужва, както и на подобрите налични методи за диагностика.

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.

Разпределението на пациентите по място на раждане е равномерно за цялата страна с най-голяма концентрация на болни в или около София, вероятно поради факта, че голяма част от болните с автоимунни булозни дерматози от този регион се обслужват от ККВБ към Александровска болница. В тази връзка, в изследваната група попадат по-малко количество пациенти от регионите в близост до градове с университетски клиники по дерматология и венерология (Пловдив, Варна Стара Загора, и Плевен).

При редки заболявания като сАИБД, установяването на статистически значимо по-висока честота на асоциираните заболявания е трудно, като за набиране на достатъчен брой пациенти, са необходими комбинирани данни от полицентрични проучвания. По наши впечатления, изследваната група не прави изключение от тенденцията за полиморбидност, характерна за пациентите над 60 години, без да се наблюдава необичайно повишение в честотата на най-разпространените системни, автоимунни или злокачествени заболявания.

Повишено внимание заслужава асоциацията на пемфигоид и болест на Паркинсон, в светлината на последните литературни данни, които показват вероятна патогенетична връзка между двете заболявания чрез антиген 1 на булозия пемфигоид (BP230). Болестта на Паркинсон сред българската популация е с установена болестност от 164-170 на 100,000 души, а резултатът корелира с данните от подобни проучвания, проведени в страни

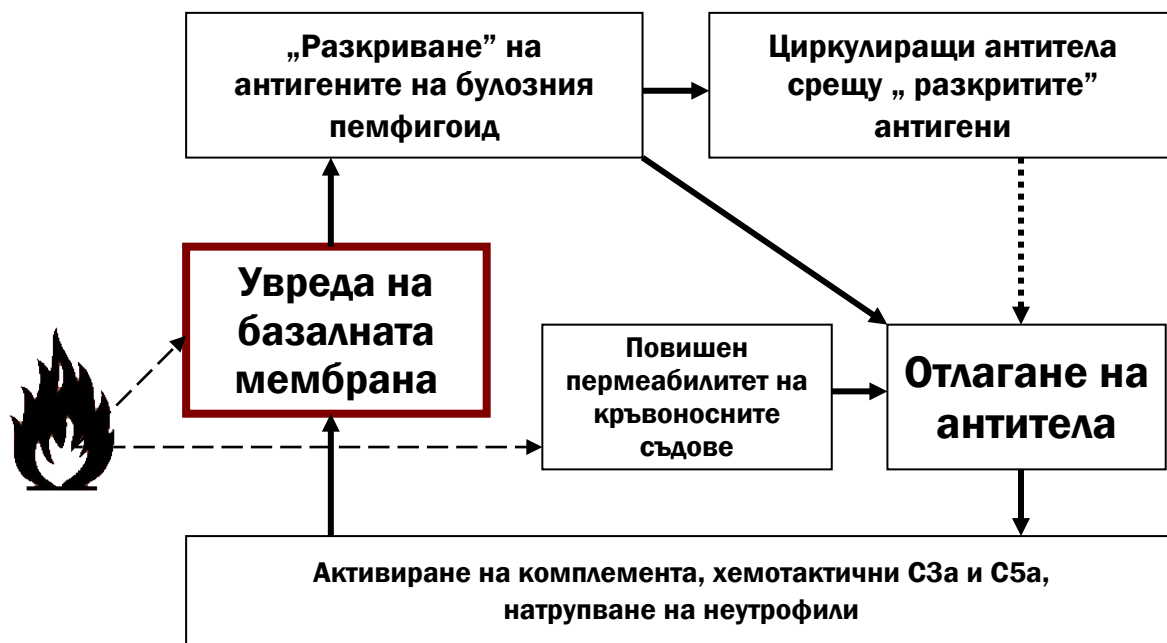
от Западна Европа.¹⁹⁷ Липсва информация за този показател в различните възрастови групи у нас, но в световен мащаб болестността нараства с възрастта като достига 1% в популацията над 60 години и 4% в тази над 80 години.¹⁹⁸ В изследваната от нас група има четирима болни с болест на Паркинсон, на възраст съответно 70, 79, 81 и 88 години, като болестността се изчислява на близо 5% при пациентите над 60 години и 10% при тези над 80 г. Пряка връзка с циркулиращи антитела срещу BP230 не беше открита. При пациентите с болест на Паркинсон, от трима изследвани чрез ИИФ върху трансфектирани с BP230 клетки, само при един се установиха циркулиращи антитела срещу BP230. Въпреки това, повишената болестност от Паркинсон, в съчетание с наблюдаваните други неврологични и психиатрични заболявания при пациенти със сАИБД, потвърждават литературните данни и предоставят възможност за бъдещи изследвания в тази насока.

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 предполагаме, че се касае за ВР, индуциран от изгаряне.

Патогенетичният механизъм, по който ВР се развива върху термично, механично или химично увредена кожа е спорен. Предполага се, че засегнатите структури в зоната на базалната мембрана могат да доведат до „разкриване” на антигените на булозния пемфигоид, индуцирайки образуването на насочени срещу тях антитела. От друга страна, променената пропускливост на кръвоносните съдове в увредените тъкани вероятно е свързана с повишено отлагане на антителата. Следва тригериране на имунологична каскада, включваща активиране на комплемента, привличане на левкоцити и протеолитично разцепване на базалната мембрана, което

води до възникване на субепидермални були. Формира се порочен кръг, започващ и завършващ с увреда на базалната мембрана (Фигура 18).

Фигура 18. Предполагам патогенетичен механизъм при ВР, индуциран от изгаряне



Възникването на булозната ерупция първоначално в засегнатия от химическа или термична травма участък вероятно може отчасти да се обясни и с изоморфния феномен на Коебнер, така добре познат при някои инфламаторни дерматози. По-рядко, Коебнер-феноменът е наблюдаван при пациенти с автоимунни булозни дерматози, в това число pemphigus, pemphigoid и dermatitis herpetiformis, където булозните лезии засягат участъците, подложени на предшестваща физична травма.¹⁹⁹ В този ред на мисли, интерес представляват описанията на ВР, възникнал върху пост-оперативен цикатрикс²⁰⁰, след фотохимиотерапия²⁰¹, и рентген терапия²⁰². От друга страна, независимо, че изоморфният феномен е примамливо обяснение за появата на булозната ерупция върху цикатрикс от изгаряне, то той не може да обясни разпространението на лезиите извън засегнатата от термичното поражение кожа. Подобна еволюция на заболяването се наблюдава при голяма част от пациентите с булозен пемфигоид, индуциран

от механична, химична или термична травма, при които лезиите се разпространяват извън първоначално засегнатата зона, понякога до степен на генерализирана кожна ерупция. Причината за това вероятно се крие в дискутирания по-горе в текста феномен на епитопно разпространение (Фигура 1).

6.2 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 автоимунни булозни дерматози с отлагане на IgG и/или C3 по БМ в българската популация.

Най-често болестта се извява 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).

При наличие на кожни лезии, лигавично засягане се наблюдава при 17% от болните, а при 12% от всички пациенти лигавичните промени са единствена проява на заболяването. Резултатите показват, че лезии по мукозата се откриват при близо една трета от всички пациенти в изследваната група. Най-често се засяга оралната лигавица (85,7%), но патологични изменения се развиват по

генитална, очна, фарингеална или ларингеална лигавица в 43,9% от случаите с лигавично засягане. Патологичните лезии по оралната лигавица водят до болка при прием на храна и течности, а в някои могат да затруднят говора. Гениталните лезии създават постоянен дискомфорт на пациентите и влияят на самочувствието и сексуалния живот. Особен проблем представлява засягането на мукозата на очите – симптом на заболяването при 4 пациенти от изследваната група. Установяват се еритем, вариращи по брой и размери ерозивни полета по конюнктива и роговица, оклузия на слъзния канал и различни по тежест сраствания на конюнктивата, застрашаващи зрителната функция, което изисква задължителна колаборация със специалисти по очни болести и хоспитализация в клиника по офталмология.

Булозните изменения са най-постоянната и демонстративна клинична проява при пациентите с отлагане на IgG и/или C3 по хода на базалната мембрана. В първия ден на хоспитализацията 80 от всички 81 пациенти с кожни лезии се представят с ексудативни обривни елементи – везикули и/или були. При повечето болни появата на мехури не е първи клиничен белег на заболяването, а се предшества от сърбеж и зачервяване, понякога месеци преди да настъпи везикуляция. Фактът, че 98,8% 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 булозният пемфигоид често биват третиран емпирично в амбулаторни условия за дерматит, хронична уртикария и др. Прилагат се разнообразни локални средства, системни антихистамини и ниски дози кортикостероиди. Като резултат от комбинацията на тези фактори, поставянето на екзактна 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 антихистамини²⁰³.

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. В повечето случаи оралните лезии биват третирани от лекари по дентална медицина с локални антисептични средства или системни антибиотици, за продължителен период от време преди пациентите да бъдат насочени към специалист по дерматология. При генитални промени пациентите се обръщат към гинеколог. Някои болни първоначално съобщават за болка при преглъщане или дисфония при засягане на лигавицата на фаринкса или ларинкса. Тези пациенти се насочват към УНГ кабинет. Повишаване на информираността и познанието след изброените специалисти и общо-практикуващите лекари, може да доведе до по-бързо поставяне на диагнозата при сАИБД чрез специализирани изследвания, извършени в клиника по дерматология.

Клиничната диагноза при пациентите всички пациенти с автоимунни булозни дерматози, включително тези от изследваната група, се поставя чрез използване на натрупания клиничен опит и познаване на научната литература. При съвместими с автоимунна булозна дерматоза данни, клиницистът се насочва към специализирани изследвания, за да докаже по неоспорим начин наличието на автоимунен процес в епидермиса или в зоната на базалната мембрана.

6.3 Лабораторни изследвания

6.3.1 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 незасегната перилезионална кожа, се избягват фалшиво отрицателни резултати.

След провеждането на директна имунофлуоресценция, прави впечатление, че клиничната диагноза често се различава от имунофлуоресцентната. В групата на пациентите с линейно отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана, хоспитализирани в ККВБ, 7,6% са насочени към лабораторията за изследване чрез ДИФ с несъвместима с последващия резултат клинична диагноза – 5,4% с диагноза *remphigus vulgaris*, а 2,2% с LAD. Този процент е много по-висок при пациентите, насочени от други клиники – при общо 52,9% клиничната диагноза е в противовес с находката при ДИФ, като общо 47% от пациентите с линейно отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана са с насочваща диагноза *remphigus vulgaris*. Това наблюдение отново подчертава основното значение на директната имунофлуоресценция при диагностиката на АИБД и показва затрудненията при клиничната диагноза на тези заболявания.

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.

6.3.2 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 19). Алгоритъмът е адаптиран към провежданите в България изследвания, като за основа е използван алгоритъм за диагностика на булозен пемфигOID, разработен от Zillikens и Schmidt.²⁰⁴ 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 автоимунните булозни дерматози е комплексен и многостепенен процес на информационен синтез. Следването на ясни правила и логически последователни стъпки осигурява висок стандарт на работа и сигурност в дейността на диагностичното звено и премахва риска от хаотичност и методични пропуски.

```

graph TD
    A[Директна имунофлуоресценция IgG/C3] -->|отр.| B[Изразена клинична картина, съвместима с АБД]
    B -->|не| C[Преосмисляне на диагнозата]
    A -->|+| D[Индиректна имунофлуоресценция на сепарирана кожа]
    D -->|отр.| E[Дермално свързване]
    D -->|+| F[Диф на сепарирана кожа, IgG]
    E --> G[Collagen VII BIOCHIP]
    F --> H[Епидермално или смесено свързване, IgG]
    G -->|отр.| I[Епидермално или смесено свързване, IgG]
    G -->|+| J[Според клиничната картина:  
• Булозен пемфигоид  
• Пемфигоид на мукозните мембрани  
• Pemphigoid gestationis  
• Lichen planus pemphigoides]
    H --> K[BP180-NC16A ELISA/BIOCHIP]
    K -->|отр.| L[BP230 BIOCHIP]
    K -->|+| M[Според клиничната картина:  
• Булозен пемфигоид  
• Пемфигоид на мукозните мембрани  
• Pemphigoid gestationis  
• Lichen planus pemphigoides]
    L -->|отр.| N[Пемфигоид с неизвестен таргетен антиген]
    L -->|+| M
    L -->|само при положителна Диф| M
  
```

Директна имунофлуоресценция IgG/C3

отр. → Изразена клинична картина, съвместима с АБД → не → Преосмисляне на диагнозата

+

Индиректна имунофлуоресценция на сепарирана кожа

отр. → Дермално свързване → Collagen VII BIOCHIP

+

Диф на сепарирана кожа, IgG → Епидермално или смесено свързване, IgG

отр. → Епидермално или смесено свързване, IgG

+

Collagen VII BIOCHIP → Епидермално или смесено свързване, IgG

+

BP180-NC16A ELISA/BIOCHIP → Според клиничната картина:

- Булозен пемфигоид
- Пемфигоид на мукозните мембрани
- Pemphigoid gestationis
- Lichen planus pemphigoides

отр. → BP230 BIOCHIP

отр. → Пемфигоид с неизвестен таргетен антиген

+

само при положителна Диф → Според клиничната картина:

- Булозен пемфигоид
- Пемфигоид на мукозните мембрани
- Pemphigoid gestationis
- Lichen planus pemphigoides

+

Пемфигоид с неизвестен таргетен антиген

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.

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 EBA и BSLE).²⁰⁵

2. При дермално свързване на ИИФ върху сепарирана кожа, се извършва изследване с BIOCHIP 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 BIOCHIP за колаген VII, според клиничната картина се обсъждат анти-p200 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%.²⁰⁶ 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.¹⁸⁶ 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-ВР230 антитела е достатъчно, за да се постави диагнозата пемфигоид.

6. При пациенти, в серума на които не се откриват антитела срещу ВР180 и ВР230, при позитивна ДИФ и епидермално или смесено отлагане при ИИФ или ДИФ на сепарирана кожа, се поставя диагнозата 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 20 на стр. 78). Следва описание на този многостъпален процес, а резултатите от проведените изследвания, които нямат пряко отношение към представения алгоритъм, ще бъдат обсъдени по-късно в текста.

Чрез индиректна имунофлуоресценция на сепарирана кожа са изследвани 86 от пациентите с линейно отлагане на IgG и/или C3 по БМ. При 67 от тях се наблюдава епидермално отлагане на имунореагентите. При 66 от тях е проведено изследване за антитела срещу ВР180-NC16A (ELISA и/или BIOCHIP), което в 53 от случаите е положително, а в 13 негативно. Според диагностичния алгоритъм, тези 53 пациенти се класифицират като пемфигоид, а клиничната картина е определяща за вида пемфигоид. При пет от пациентите преобладава лигавично засягане и се поставя диагнозата ММР, а при останалите 48 кожните изменения са съвместими с диагнозата булозен пемфигоид. В тази група липсват бременни жени или пациенти със съпътстващ *lichen ruber planus*.

При всички 13 негативни за антитела срещу BP180 пациенти, чрез ВЮСНІР е изследван серум за антитела срещу BP230, който е положителен при един пациент и отрицателен при останалите 12. Положителен резултат за антитела срещу BP230, в комбинация с линейно отлагане на IgG при ДИФ, дава възможност да се постави диагнозата булозен пемфигOID при този пациент, въпреки негативното изследване за реактивност срещу BP180. Останалите 12 пациенти, при които не се установяват антитела както срещу BP180, така и срещу BP230, могат да бъдат класифицирани към групата на пемфигOID с неизвестен антиген. При един от пациентите не са проведени изследвания за антитела срещу BP230 и BP180.

При 4 пациенти се наблюдава смесено отлагане на IgG и/или C3 при ИИФ на сепарирана кожа. При двама от тези пациенти не се установяват антитела срещу BP180 и BP230 което ги причислява в групата на пемфигOID с неизвестен антиген. При един изследването е положително за анти-BP180 антитела и с оглед на клиничната картина, се поставя диагнозата булозен пемфигOID. Един от пациентите не е изследван за BP180 и BP230.

При 5 пациенти се наблюдава дермално отлагане при сепарирана кожа на ИИФ. При двама от тях се установяват антитела срещу Col VII и се поставя диагноза epidermolysis bullosa acquisita. Трима от болните са негативни за антитела срещу BP230, BP180 и колаген VII. При тези пациенти в бъдеще е уместно да се проведе изследване с имуноблот или ELISA, с цел откриване на антитела срещу ламинин 332 или p200.

При 10 от пациентите, ИИФ на сепарирана кожа е била отрицателна. Антитела срещу BP180 се установяват при четирима от тези пациенти. При двама от тях преобладава лигавично засягане и се поставя диагноза пемфигOID на мукозните мембрани, а при останалите двама булозен пемфигOID. Всички негативни на ИИФ SSS пациенти са изследвани с ELISA BP180 без положителен резултат. При един от тях е проведена ДИФ на сепарирана кожа и е установено епидермално отлагане на IgG.

При 26 пациенти не е проведена ИИФ SSS. При трима от тях е изследван BP180, при един е положителен, а при двама отрицателен. При

други 12 вместо ИИФ е проведена ДИФ на сепарирана кожа. При 6 от тези пациенти се наблюдава епидермално светене, а при останалите 6 – смесен тип. При тези пациенти се поставя диагноза пемфигоид без яснота относно специфичността на антителата.

Представеният алгоритъм включва извършването на допълнителни изследвания, които обогатяват диагностичните възможности на рутинните тестове. Поради обективни организационни или технологични затруднения не винаги е възможно да се изпълнят всички стъпки на алгоритъма. В изследваната група от 112 пациенти, не са проведени имуносерологични тестове, поради липсата на серум за изследване, при 26 болни (изпратен биопсичен материал от други клиники, амбулаторно болни или отказали взимане на кръвна проба). При четирима от пациентите, негативни на всички имуносерологични методи, не е проведена ДИФ върху сепарирана кожа. При двама, след установяване на епидермален тип отлагане при ИИФ SSS, предстои изследване за специфичност на антителата (ELISA BP180 и BIOCHIP).

При всички останали 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/BIOCHIP. За поставяне на прецизна диагноза в тези случаи е уместно да се търсят антитела срещу фрагменти на BP180 извън NC16A, срещу $\alpha 6\beta 4$ интегрин и други антигени

на базалната зона, чрез диагностични методи като имуноблот, имунопреципитация и индиректна имуноелектронна микроскопия. При 12 от тези пациенти се наблюдава клиничен фенотип на ВР, а при трима – на ММР.

При двама пациенти най-вероятната диагноза е анти-р200 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.

При 24 пациенти ИИФ е проведена едновременно с материал от серум и мехурна течност. При 22 от случаите (91,7%) се наблюдава корелация при качественото определяне на наличие на антитела срещу базалната мембрана. Тази висока степен на съответствие 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 (Таблица 31). Особен проблем представлява поставянето на диагнозата epidermolysis bullosa acquisita по клинични белези.

Таблица 31. Съвпадение между лабораторна и клиничната диагноза

		Клинична диагноза				
Диагноза по алгоритъм	Общо*	BP	MMP	EBA	LAD	PV
Булозен пемфигOID	53	49	-	3	-	1
ПемфигOID на мукозните мембрани	7	-	6	-	-	1
Анти-ламинин-332 пемфигOID, анти-p200 пемфигOID?	3	2	1	-	-	-
ПемфигOID с неизвестен антиген (негативни за BP180 и BP230)	15	11	3	-	1	-
ПемфигOID с неизвестен антиген (епидермален тип при ИИФ SSS, без определяне на специфичност на антителата)	2	2	-	-	-	-
Epidermolysis bullosa acquisita	2	-	-	-	1	1
Негативни на всички имуносерологични методи (неизследвани на ДИФ SSS)	4	1	1	-	-	2
Неуточнени сАИБД с отлагане на IgG и/или C3 по базалната мембрана	6	4	1	1	-	-

* 92 пациенти, хоспитализирани в ККВБ

Показателен е случай на 5 годишно дете (Фигура 20) с дисеминиран полиморфен обрив, обхващащ обширни участъци от кожата на трункуса и крайниците, съставен от еритемни плаки и були, които преминават в ерозии и корусти. Поради ранната възраст, при детето се постави клинична диагноза LAD. При проведената директна имунофлуоресценция се установи отлагане на IgG (+++), IgM (+) и C3 (+++) по базалната мембрана, което доведе до промяна на работната диагноза на булозен пемфигOID. Последва изследване

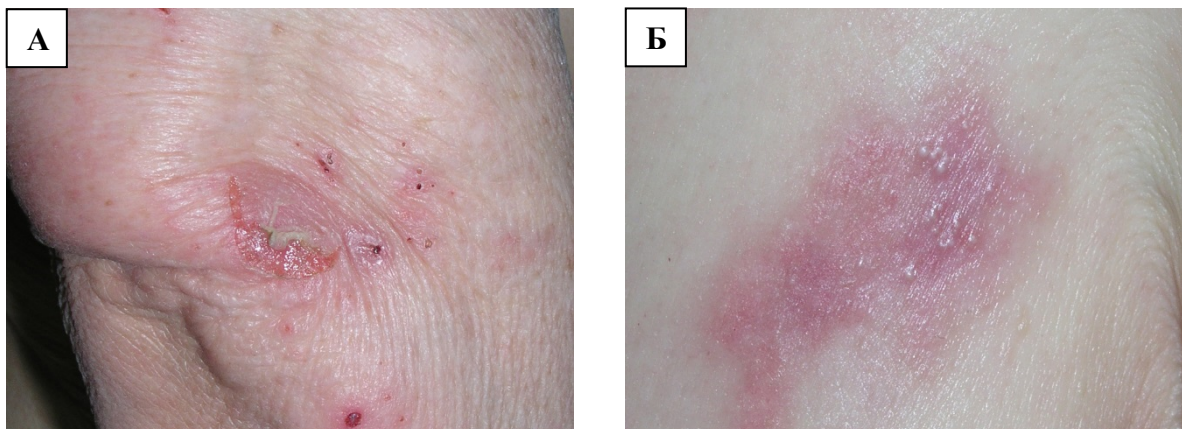
с ИИФ на сепарирана кожа, при което се отчете дермално свързване на циркулиращите антитела. Финалната диагноза *epidermolysis bullosa acquisita* беше поставена след положителен резултат от проведеното изследване с ВЮСНІР за антитела срещу колаген VII.

Фигура 20. Множество фигурирани ануларни лезии по долни крайници с перловиdni 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 пемфигOID. Такъв е случаят при болна с характерни механобулозни изменения по екстензорните повърхности на крайниците, преминаващи с образуване на милиуми (Фигура 21). ИИФ на сепарирана кожа показва епидермален тип отлагане, а ELISA ВР180 е положителна, поради което се поставя диагноза булозен пемфигOID.

Фигура 21. Пемфигоид с клиника, наподобяваща механобулозна форма на ЕВА. А – механобулозна лезия в лакътна област, Б – милиуми в стернална област



Клиничните критерии за диагностика на булозен пемфигоид, въведени от Vaillant и колектив, също не могат да осигурят високи нива на надеждност при оценка на пациентите в българската популация. От 53 пациенти с доказан булозен пемфигоид (установени антитела срещу BP180 и съвместима клинична картина), само 36 покриват 3 или повече критерии. И двамата пациенти с доказана ЕВА покриват само 2 от критериите.

6.3.3 Диагностична стойност на отделните методи

6.3.3.1 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.^{190,191} 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 BP180-NC16A ELISA, ИИФ върху трансфектирани с BP230 или Col VII клетки и ИИФ върху рекомбинантен тетрамерен BP180 (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.

6.3.3.2 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.

В допълнение, като една от двете възможности за доказване на антитела срещу BP180, ELISA е по-чувствителният метод и улавя по-ниски титри на антителата, в сравнение с BIOCHIP (в изследваната група позволява доказване на антигенната специфичност при 9 отрицателни на BIOCHIP BP180 пациенти).

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.

Високата диагностична стойност на BP180-NC16A ELISA може да бъде демонстрирана в случая на 76-годишен пациент, който постъпва в ККВБ по повод на интензивен сърбеж и дифузен еритем по кожата на тялото с давност няколко месеца, последвани от появата на множество напрегнати були по трункуса и флексорните повърхности на крайниците (Фигура 22). Булите преминават в ерозии, които се покриват от хеморагични крусти.

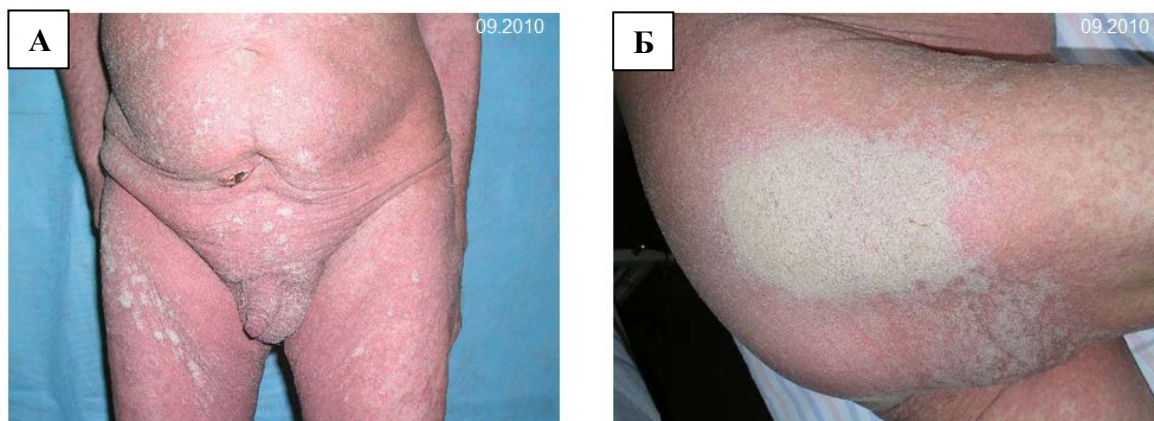
Фигура 22. Еритемо-едемни плаки по кожата на гърба, единични були и множество крусти в коремна област и по предна повърхност на бедрата



Хистологичното изследване показва субепидермална була. При директна имунофлуоресценция се наблюдава линейно отлагане на IgG и C3 по хода на базалната мембрана. Чрез ИИФ не се установяват циркулиращи анти-базалномембранны антитела. Въз основа на клиничните данни и проведените изследвания е поставена диагноза ВР. Проведеното лечение със системни кортикостероиди (methylprednisolone 60 mg дневно) и имunosупресори (azathioprine 100 mg дневно) е с добър терапевтичен ефект. Три месеца след първата хоспитализация, пациентът се представя в клиниката с дисеминирана прurigинозна еритемо-папулозна ерупция, с тенденция към конфлуиране до състояние на еритродермия. Наблюдават се сквамо-крустозни плаки с размери до 15 cm в диаметър, разположени в областта на корема, глутеусите и екстензорните повърхности на горни и долни крайници.

Директната имунофлуоресценция, проведена върху биопсичен материал от кожата на трункуса поддържа находка, характерна за булозен пемфигоид. Индиректната имунофлуоресценция е негативна. Проведено е микроскопското изследване на материал, получен чрез остъргване със скалпел на сквамо-крустозните лезии, което установи наличие на *sarcoptes scabiei* в епидермиса.

Фигура 23. Дуфизен еритем и сквамо-крупозни плаки по трункус (А) и крайници (Б)



След установяването на причинителя на крастата в кожата на пациента, следните диференциално-диагностични възможности влязоха в съображение.

1. Булозен скабиес наподобяващ булозен пемфигоид.
2. Булозен пемфигоид индуциран от скабиес като Коебнер феномен.
3. *Scabies crustosa* на фона на имуносупресивна терапия при булозен пемфигоид.

След тридневна терапия с бензил бензоат, настъпи рязко подобрение в кожния статус с резолюция на сквамо-крупозните плаки (Фигура 24).

Скабиес крустога (*porwegica*) е тежка форма на заболяването, което се среща при ятрогенно имуносупресирани болни, пациенти с Down синдром, при различни болести на имунитета, HIV и др.

Булозният скабиес е рядък вариант на скабиес крустога, който се характеризира с ексудативни лезии – везикули и були, на фона на масивна инфекция със *sarcoptes scabiei*. Редица клинични и лабораторни белези на заболяването наподобяват булозния пемфигоид, което може да доведе до диагностични затруднения (Таблица 32). В някои случаи при скабиес е

възможна да се наблюдава линейно отлагане на имунореагенти при директна имунофлуоресценция.

Фигура 24. Ефект от тридневна терапия с бензил бензоат



Таблица 32. Диференциална диагноза между булозен пемфигоид и булозен скабиес

	Булозен пемфигоид	Булозен скабиес
Еритем	+	+
Сърбеж	+	+
Були	+	+
Еозинофилия	+	+
Хистология – субепидермална була	+	+/-
ДИФ – IgG, C3 на БМ	+	+/-
ИИФ	+	-

При затруднения в разграничаването на булозен скабиес от булозен пемфигоид, от първостепенно значение е откриването на циркулиращи антибазалномембранни антитела в серума на болния. След негативния резултат при индиректна имунофлуоресценция, се извърши ELISA, която доказва наличие на антитела срещу BP180-NC16A в серума (131 U/ml, отр. < 9), с което диагнозата булозен пемфигоид беше дефинитивно поставена. Предвид на хронологията на заболяването беше прието, че се касае за scabies crustosa на фона на имunosупресивна терапия при булозен пемфигоид.

6.3.3.3 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.²⁰⁷

Може да се постави в дискуссионен план и реалната практическа диагностична стойност на трансфектирани с BP230 клетки. В изследваната група, установяването на антитела срещу BPAG1 допринася за поставяне на диагнозата едва в един от 75 изследвани случая (при пациент с отрицателен резултат за BP180).

Като предимство на метода може да се изтъкне много високата чувствителност на ИИФ SSS в рамките на BIOCHIP панела (89.33% за

изследваната група), а като недостатък наличието на фалшиво негативни резултати върху тетрамерен рекомбинантен BP180.

ИИФ върху BIOCHIP мозайка за определяне за определяне на антитела срещу колаген VII е друг важен метод в диагностичния алгоритъм на сАИБД. Подходящи за това изследване са серуми, при които ИИФ SSS показва дермален тип отлагане на антителата или е негативна. ИИФ върху трансфектирани с Col VII клетки дава възможност за прецизно диагностициране на едно от най-трудните за клинично отграничаване редки заболявания – epidermolysis bullosa acquisita.

6.4 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.

Повишени стойности на IgE се установиха при голяма част от болните – 82% от всички изследвани пациенти, което отговаря на литературните данни.¹⁷⁸ Не се откриха статистически значими корелации между нивата на IgE и клинични белези като вид на перилезионалната кожа и сърбеж. Същото важи и за регистрираната при 40% от болните периферна еозинофилия.

Все пак, при всички пациенти, които съобщават за непоносим сърбеж, се наблюдават еозинофилия и повишени стойности на тотален серумен IgE. При всички седем пациенти. При седем от изследваните се установяват много високи стойности на IgE (>1000 IU/ml), което неизменно се съпровожда от сърбеж във всички случаи. Връзката между сърбежа и нивата на тоталния IgE се дискутират в научната литература. Описан случай на рефрактерен на конвенционална терапия пемфигоид, лекуван успешно с анти-IgE моноклоналното антитяло omalizumab.²⁰⁸ При бъдещи проучвания е уместно да се направи изследване за BP180-NC16A-специфични антитела от клас IgE, за които е известно, че се асоциират с по-тежки и резистентни на терапия форми на булозен пемфигоид.

Значими корелации не се откриха при съпоставянето на данните за преобладаващ имунореагент при ДИФ (IgG или C3) и клинични показатели като лигавично засягане и вид на перилезионалната кожа.

Липсва зависимост между клиничното протичане на заболяването и нивата на анти-базалномембранны антитела, установени чрез ИИФ върху субстрат от хранопровод.

При провеждане на имуносерологичните изследвания е използван серум, взет в началото на първата хоспитализация на пациентите. Не се установяват статистически значими корелации между клинични белези и високи нива на антитела срещу BP180-NC16A, установени чрез ELISA. Обект на бъдещи проучвания трябва да е проследяването на титрите на антителата при пациенти в ремисия и при последващи рецидиви на болестта.

6.5 Софтуерна разработка

Използването на електронна база данни води до улесняване на процеса на въвеждане на резултатите от проведените изследвания, а в следствие спомага за по-бързото им и пълно интерпретиране, както и за прецизна статистическа обработка. Вградената функционалност за хронологичен

преглед на всички проведени изследвания при даден пациент, позволява да се анализира интензирана информация относно хода и еволюцията на заболяването.

Диагностиката на АИБД често изисква ревизия на получените резултати. При въвеждане на нови или недостъпни в миналото диагностични методи, се изследват съхранени по подходящ начин серумни проби, за което е необходимо извършване на документална справка в съществуващата база данни на лабораторията. В това отношение, разработеният софтуерен продукт е от голяма полза при изпълняване на отделните стъпки в диагностичния алгоритъм при сАИБД.

6.6 Паранеопластичен булозен пемфигид – проучване на специфичността на автоантителата чрез Western blot и ELISA BP180-NC16A

Негативната ИИФ се счита от някои автори като критерий за паранеопластичен пемфигид.^{92, 93, 94} 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 пемфигид чрез имуноблот потвърждават, че методът има значителен принос за диференциалната диагноза на автоимунните булозни дерматози.²⁰⁹ При 9 от изследваните чрез WB 14 случая с пемфигид, 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 пемфигид и асоциирана неоплазма. Останалите 8 случая са в контролната група пациенти с пемфигид 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 многостепенност 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.²¹⁰ От проведените общо 44 ELISA BP180 теста положителни са 33, от които 9 в групата на пациентите с неоплазма и 24 в контролната група. Сред пациентите в първата група се обособява следната зависимост: в три от случаите се установяват сравнително високи титри на антителата срещу BPAG2 при негативен имуноблот. Подобна зависимост не се наблюдава в контролната група. Това наблюдение поставя въпроса за ролята на антителата срещу BPAG2 и показва, че ELISA е много по-подходящ метод за установяване на циркулиращи антитела срещу BP180 при пациенти с BP и неоплазма.

Наред с кератиноцит-матриксната адхезия, в литературата се обсъжда допълнителна функция на BP180 (колаген XVII) в различни етапи на карциногенезата.²¹¹ Подтисната регулация на BP180 и други хемидесмозомални компоненти е установена *in vivo* при карцином на простатата и гърдата, които са епителни тумори без произход от многослойните епители. Обратно, стимулиране на регулацията е наблюдавано при редица карциноми с произход от многослойните плоски епители, като кожен, белодробен, цервикален, езофагиален и др. Следователно, наличието на BP180 автоантитела у пациенти с булозен пемфигоид и асоциирана неоплазма може да е израз на общи механизми, водещи до увреждане на базалната мембрана и туморна прогресия.^{212,213}

Проучванията върху по-големи серии от болни чрез WB и BP180-NC16A ELISA ще подпомогнат изясняването на възможна връзка между двете състояния.

При липса на реактивност чрез имуноблот (Western blot), системата BP180 ELISA се явява полезен и необходим метод за потвърждаване на присъствието на циркулиращи автоантитела, насочени срещу антигена BP180 при пациенти с булозен пемфигоид и асоцииран карцином.

За оценка на корелацията между клиничната картина с/без асоциирана неоплазма и специфичността на циркулиращите антитела при пемфигоид са необходими задълбочени проучвания върху по-големи серии от пациенти.

6.7 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.

Девет от пациентите са отбелязали отговори, които показват *„изключително голям ефект“* на заболяването върху живота, а при 10 ефектът е много голям. Установеното чрез DLQI силно нарушено качество на живот, налага извода, че е от изключителна важност да се обръща внимание не само на обективните клинични данни, а и на субективните усещания на болните.

Тълкуване на отделните категории на DLQI въпросника

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. Ако *всички* пациенти в изследваната група са посочили отговори за дадена категория, които дават половината от максималния брой точки, осреднения процент за групата ще е 50%. Дори най-ниският резултат от 22% сам по себе си е достатъчно висок, за да се тълкува като сигурен показател, че болестта води до тежко засягане на изследвания в тази категория аспект от качеството на живот.

Причините за това осезаемо понижаване на качеството на живот във всички негови аспекти, измерено чрез въпросника DLQI, са разнообразни и се преплитат в мрежа от взаимосвързани фактори.

Категория „Симптоми и чувства” обръща внимание върху субективните усещания на пациентите като сърбеж, болка, дразнене или парене на кожата. Такива оплаквания са налице при всички изследвани болни.

Субективните усещания от страна на кожата са от съществено значение, защото могат да доведат до сериозни и дълготрайни нарушения в съня на болните, до невъзможност за съсредоточаване, извършване на нормални служебни дейности, а някои случаи и до невротизиране. Непреодолимото желание за намаляване на тези симптоми може да доведе до стигматизиращи и неприемливи за обществото действия като непрестанно разчесване на кожата на публични места, на работното място и др.

Във втория въпрос от категорията са обобщени редица сложни проблеми, с които болните от хронични дерматози се сблъскват ежедневно. Фрустрацията от лезии по откритите части на тялото може да е изключително голяма, дори и пораженията по кожата да са с малки размери. В българското общество лисва обща култура по отношение на кожните болести, които интуитивно се възприемат от околните като „заразни”, въпреки че в огромен процент от случаите се касае за автоинфламаторни или автоимунни заболявания. В резултат на недостатъчна информираност на населението относно същността на този вид заболявания, болните с

хронични дерматози, които имат патологични изменения по кожата на видими места, ежедневно се сблъскват с неодобрителни погледи, гримаси на отвращение, а в някои случаи и отказ от основни услуги като обслужване във фризьорски салон.

В този контекст, разбираеми са резултатите, които показват, че абсолютно всички анкетирани са дали в различна степен положителен отговор най-малко на един от двата въпроса от категорията.

Категория „Ежедневни дейности” насочва вниманието към всекидневните грижи за дома и градината, пазаруването и избора на дрехи. Резултатите показват, че заболяването оказва влияние върху ежедневните дейности на пациентите, на които се налага да съобразяват всеки аспект от бита си със заболяването, което имат. Въпросникът е насочен към събитията от последната седмица преди попълването му, което се извършва в първия ден на хоспитализацията на пациентите. Според изискванията на Националната здравноосигурителна каса (НЗОК) минималния болничен престой за болни с автоимунни булозни дерматози е 10 дни. Пациентът трябва да набави от редица документи от личния си лекар, ТЕЛК и др. в периода преди постъпването. Подготовката за самото постъпване в болницата отнема време и влияе върху ежедневните дейности, които пациентът извършва.

Изборът на дрехи в голяма степен зависи от наличието на лезии по видимите части на кожата – крайници, лице, капилициум. Ексудиращите лезии и ерозивни участъци по кожата могат да доведат до силни неприятни усещания при допир с дрехите. Някои болни се принуждават да носят дрехи с дълги ръкави и крачоли дори в най-топлите месеци на годината, което е рисков фактор за топлинна травма.

Изключително важно значение има хоспитализацията и за нормалния работен или учебен ритъм на болния, което се отразява на резултатите в категория „Работа и училище” и при пациентите в изследваната група.

Пациента, той се задължава да заплати потребителска такса в размер на 1% от минималната работна заплата (МРЗ), което за 10 дневен престой се равнява на 10% от МРЗ. Отсъствието на болния от работното му място за дълги периоди от време (понякога общия престой за годината може да бъде над 50 дни), води до допълнителни финансови загуби, както и до проблеми с работодателя. Въпреки че средната възраст на пациентите от изследваната група е 72 години, 85% от тях са отбелязали, че заболяването им води до проблеми при работа или учение.

Локалната терапия е привилегия на дерматологията, но същевременно води до затруднения при прилагането и от страна на пациентите. Третирането на булозния пемфигоид в България се извършва предимно с перорални средства, а локалната терапия се използва като помощна в остриите фази на заболяването, когато ерозивните участъци се третират с антисептични разтвори. Локалните кортикостероиди имат своето място в лечението на ВР, но поради трудоемкото прилагане, в България не се използват като заместител на системната терапия. Въпреки това 38% от анкетиранияте, отбелязват, че лечението на кожата им е създавало проблеми през последната седмица. Причината вероятно се крие във факта, че преди да постъпят в болница, разполагаща със специфични диагностични възможности, болните с булозни дерматози често биват третирани амбулаторно с емпирично подбрани локални медикаменти, без преди това да бъде поставена правилната диагноза.

Категория „Свободно време“ включва въпроси, които се отнасят до социалните контакти на пациентите и практикуването на различни видове спорт.

Това е категорията с най-слабо засягане при пациентите в изследваната група. Повече от 77% от болните (31 от 42) са отбелязали “не се отнася до мен“ на въпроса, адресиращ проблемите със спорта. Причината се крие в напредналата възраст и значителната коморбидност на пациентите от изследваната група.

В категория „Лични взаимоотношения” се обръща внимание на възникналите проблеми между пациентите и техните партньори, близки приятели и роднини, както и на затруднения в сексуалния живот.

В грижите за хронично болен пациент почти неизменно се включват най-близките хора на пациента – партньора, роднините, както и близки приятели. Всеки един от факторите посочени по-горе може да доведе до влошаване на взаимоотношенията на болния с най-близките му хора. На първо място повишената раздразнителност на хронично болния е предпоставка за възникване на конфликти. Споменатите вече затруднения при всекидневното прилагане на локални терапевтични средства също могат да допринесат за това. Проблемите, които възникват в работата на болния обикновено се отразяват финансово на цялото семейство.

Причините за затруднения в сексуалния живот при болните с хронични дерматози са комплексни. Ролята на кожата в сексуалния акт е огромна, а някои я смятат за най-големия сексуален орган. Болната кожа намалява самочувствието, а в някои случаи води до отблъскване на сексуалния партньор. В нашето проучване са обхванати предимно възрастни хора, в резултат на което 25 от 40 болни са посочили „не се отнася до мен“ на въпроса „До каква степен състоянието на кожата ви причини затруднения в сексуалния ви живот?“.

7. 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. Обогащаването му като предмет на бъдещи проучвания е продължаващ процес и задължително условие за успех в динамичния свят на медицинската наука.

8. 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 замени 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. По-чувствителен 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 дейност, 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.

9. 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, медиирани 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 BIOCHIP 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, медиирани 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 крустоza 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.

10. Приложения

Приложение 1. Дерматологичен индекс за качество на живот – DLQI.

ДЕРМАТОЛОГИЧЕН ИНДЕКС ЗА КАЧЕСТВОТО НА ЖИВОТ

Болница №	Дата:			DLQI
Име:				
Адрес:	Диагноза:	Резултат:		

Целта на този въпросник е да определи до каква степен вашите кожни проблеми оказаха влияние върху живота ви ПРЕЗ ИЗМИНАЛАТА СЕДМИЦА. Моля поставете отметка 5 само в едно от квадратчетата за всеки въпрос

1.	До каква степен през изминалата седмица усещате сърбеж, дразнене, болка или парене на кожата?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	
2.	До каква степен през изминалата седмица бяхте смутен(а) или притеснен(а) заради състоянието на вашата кожа?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	
3.	До каква степен през изминалата седмица състоянието на вашата кожа ви попречи да пазарувате или да се грижите за дома или градината?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	Не се отнася до мен ☐
4.	До каква степен през изминалата седмица състоянието на кожата ви повлия на избора на дрехите, които носихте?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	Не се отнася до мен ☐
5.	До каква степен през изминалата седмица състоянието на вашата кожа се отрази на социалните ви контакти и на начина, по който прекарахте свободното си време?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	Не се отнася до мен ☐
6.	До каква степен през изминалата седмица състоянието на вашата кожа ви създаде трудности при спортуване?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	Не се отнася до мен ☐
7.	През изминалата седмица състоянието на вашата кожа пречеше ли ви да работите или учите?	Да	☐	
		Не	☐	Не се отнася до мен ☐
	Ако отговорът е „не“, то до каква степен състоянието на кожата ви създаваше проблеми при работа или учене през изминалата седмица?	Много	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	
8.	До каква степен през изминалата седмица състоянието на кожата ви създаваше проблеми с вашия(та) партньор(ка) или с близки приятели или роднини?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	Не се отнася до мен ☐
9.	До каква степен през изминалата седмица състоянието на кожата ви причини затруднения в сексуалния ви живот?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	Не се отнася до мен ☐
10.	До каква степен лечението на кожата ви през изминалата седмица ви създаваше проблеми (например с това, че ви е отнело много време или с това, че докато ви е бил разхвърлян)?	Много	☐	
		Доста	☐	
		Малко	☐	
		Въобще не	☐	Не се отнася до мен ☐

Моля, проверете дали сте отговорили на ВСИЧКИ въпроси. Благодаря.

^Δ AY Finlay, GK Khan, April 1992, www.dermatology.org.uk. Копирането на въпросника без разрешението на авторите е забранено.

Български за България

11. Литература

-
1. Sauvages F, Boissier de. *Nosologia methodica sistens morborum classes...*Amsterdam: de Tournes, 1763:382ff.
 2. Дреновска К., Съвременни аспекти в етиопатогенезата, клиниката и диагностиката на пемфигус. Дисертационен труд за присъждане на научна степен „доктор“, научна специалност: дерматология и венерология. София 2002 г.
 3. Dulieu L. François Boissier de Sauvages (1706-1767): revue d'histoire des sciences et de leur applications. Vendôme: Presses Universitaires de France, 1969:303-322.
 4. Holubar K. Etymology of pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1989;21:155-156.
 5. Gilibert S. *Monographie du pemphigus ou traité de la maladie vésiculaire*. Paris: C.L.F. Panckoucke, 1813.
 6. Savary M. Historical researches on pemphigus. *Med Phys J* 1814;32:281.
 7. Lever W. Savary's 1814 article on the history of pemphigus related to contemporary views. *Int J Dermatol* 1979;18:584-585.
 8. Lever WF. Pemphigus. *Medicine* 1953; 32: 1-123.
 9. Vodegel RM, *Immunofluorescence microscopy of subepidermal bullous autoimmune disease (doctoral dissertation)*, University of Groningen.
 10. Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine JD, Foster CS, Ghohestani R, Hashimoto T, Hoang-Xuan T, Kirtschig G, Korman NJ, Lightman S, Lozada-Nur F, Marinkovich MP, Mondino BJ, Prost-Squarcioni C, Rogers RS 3rd, Setterfield JF, West DP, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zillikens D, Zone JJ. The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol*. 2002 Mar;138(3):370-9.
 11. Russel B, Thorne NA. Herpes gestationis. *Br J Dermatol*. 1957 Oct;69(10):339–357.
 12. Beutner EH, Lever WF, Witebsky E, Jordon R, Chertock B. Autoantibodies in pemphigus vulgaris: response to an intercellular substance of epidermis. *Jama*. 1965 may 24;192:682-8.
 13. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA*. 1967 May 29;200(9):751-6.

-
14. van der Meer, JB (1969), Granular deposits of immunoglobulins in the skin of patients with dermatitis herpetiformis. an immunofluorescent study. *British Journal of Dermatology*, 81: 493–503.
 15. Kaposi. M, Lichen Ruber Pemphigoides. *Arch DermSyph* 1892, 24: 343.
 16. Strauss MJ, Vesicular and bullous lichen planus. *Acta Derm Venereol.* 1923; 14, 447-472.
 17. Souteyrand P, Pierini AM, Fernandez Bussy R., Thivolet J, and Cambazard F. *Dermatologica* 1981; 162, 414-416.
 18. Elliott GT. Two cases of epidermolysis bullosa. *J Cutan Genitourin* 1895; 13: 10.
 19. Roenigk HH, Jr., Ryan JG, Bergfeld WF. Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. *Arch Dermatol* 1971; 103: 1-10.
 20. Nieboer C, Boorsma DM, Woerdeman MJ, Kalsbeek GL. Epidermolysis bullosa acquisita. Immunofluorescence, electron microscopic and immunoelectron microscopic studies in four patients. *Br J Dermatol.* 1980 Apr;102(4):383-92.
 21. Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol.* 1986 Feb 15;136(4):1231-5.
 22. Stanley JR, Tanaka T, Mueller S, Klaus-Kovtun V, Roop D. Isolation of complementary DNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. *J Clin Invest.* 1988 Dec;82(6):1864-70.
 23. Pas HH, Kloosterhuis GJ, Heeres K, van der Meer JB, Jonkman MF. Bullous pemphigoid and linear IgA dermatosis sera recognize a similar 120-kDa keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic cross-reactivity to BP180. *J Invest Dermatol.* 1997 Apr;108(4):423-9.
 24. Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, Inman AO, Queen LL, Gammon WR. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med.* 1984 Apr 19;310(16):1007-13.
 25. Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB. Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J Clin Invest.* 1992 Oct;90(4):1628-33.
 26. Chan LS, Fine JD, Briggaman RA, Woodley DT, Hammerberg C, Drugge RJ, Cooper KD. Identification and partial characterization of a novel 105-kDalton lower lamina

-
- lucida autoantigen associated with a novel immune-mediated subepidermal blistering disease. *J Invest Dermatol*. 1993 Sep;101(3):262-7.
27. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, Shimizu H, Mayer J, Rank CV, Liu Z, Giudice GJ, Tran HH, Marinkovich MP, Bröcker EB, Hashimoto T. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol*. 1996 Mar;106(3):465-70. Corrected and republished in: *J Invest Dermatol*. 1996 Jun;106(6):1333-8.
 28. Fujiwara S, Shinkai H, Takayasu S, Owaribe K, Tsukita S, Kageshita T. A case of subepidermal blister disease associated with autoantibody against 450 kD protein. *J Dermatol*. 1992 Oct;19(10):610-3.
 29. Fujiwara S, Takeo N, Otani Y, Parry DA, Kunimatsu M, Lu R, Sasaki M, Matsuo N, Khaleduzzaman M, Yoshioka H. Epiplakin, a novel member of the Plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen. Structure and tissue localization. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):13340-7.
 30. Ghohestani RF, Hudson BG, Claudy A, et al. The alpha 5 chain of type IV collagen is the target of IgG autoantibodies in a novel autoimmune disease with subepidermal blisters and renal insufficiency. *J Biol Chem* 2000 26;275:16002-16006.
 31. Ghohestani RF, Rotunda SL, Hudson B, et al. Crescentic glomerulonephritis and subepidermal blisters with autoantibodies to alpha5 and alpha6 chains of type IV collagen. *Lab Invest* 2003;83:605-611.
 32. Bernard P, Valliant, Labeille B, et al. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. *Arch Dermatol* 1995; 131: 48-52.
 33. Zillikens D, Wever S, Roth A, et al. Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of Central Germany. *Arch Dermatol* 1995; 131: 957-958.
 34. Khumalo N, Kirtschig G, Middleton P, et al. Interventions for bullous pemphigoid (Review) *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, 3: CD002292.
 35. Cozzani E, Parodi A, Rebora A, Delmonte S, Barile M, Nigro A, Priano L, Troiano G, Patri PL; Gruppo Ligure di Studi in Dermatologia (GLISID). Bullous pemphigoid in Liguria: a 2-year survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001 Jul;15(4):317-9.
 36. Marinovic B, Lipozencic J, Jukic IL. Autoimmune blistering diseases: incidence and treatment in Croatia. *Dermatol Clin*. 2011 Oct;29(4):677-9.

-
37. Laimer M, Pohla-Gubo G, Kraus L, Nischler E, Bauer JW, Ahlgrimm-Siess V, Hintner H. Autoimmune bullous diseases in Austria. *Dermatol Clin*. 2011 Oct;29(4):691-8.
 38. Bertram F, Brocker EB, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; 7: 434–40.
 39. Joly P, Baricault S, Sparsa A, et al. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 1998–2004.
 40. Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJ, West J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris—incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 2008; 337: 160–63.
 41. Василева С. Спектър на автоимунните булозни дерматози в България. 7-ми Национален конгрес на БДД, София 11-13 Май, 2000, рез. L-13, стр. 6.
 42. Й. Савова, М. Желева. Клинични варианти и асоциации на пемфигоид. *Дерматология и венерология*. 1998, 37, 2, 18-20.
 43. Влашев Д. Клинично, хистологично и имунопатологично проучване на някои автоимунни булозни дерматози. Дисертационен труд за присъждане на научна степен „доктор“, научна специалност: дерматология и венерология. Пловдив 1989 г.
 44. Swerlick RA, Korman NJ. Bullous Pemphigoid: what is the prognosis? *J Invest Dermatol* 2004; 122: xvii-xviii
 45. Venning VA, Wojnarowska F. Lack of predictive factors for the clinical course of bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 585-589.
 46. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, et al. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med* 2002; 346: 321–27.
 47. Rzany B, Partscht K, Jung M, et al. Risk factors for lethal outcome in patients with bullous pemphigoid: low serum albumin level, high dosage of glucocorticosteroids, and old age. *Arch Dermatol* 2002; 138: 903–08.
 48. Venning VA, Wojnarowska F, Welch K. Bullous pemphigoid and autoimmunity. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 181-184.
 49. Ljubojevic S, Lipozenčić J. Autoimmune bullous diseases associations. *Clin Dermatol*. 2012 Jan-Feb;30(1):17-33.
 50. В. Гаров, Й. Савова, Ц. Абаджиева. Асоциация на псориазис вулгарис с пемфигоид. *Дерматология и венерология*. 1996, 35, 1, 36-37.

-
51. Ст. Павлов, С. Рачева, К. Николов. Булозен пемфигоид, съчетан с тиреоидит на Хашимото и витилиго. *Дерматология и венерология*. 2008, Suppl. 1, 47-9.
 52. Vassileva S, Mateev G, Balabanova M, et al. Burn-induced bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 1027-1028.
 53. Vassileva S. Drug-induced pemphigoid: bullous and cicatricial. *Clin Dermatol* 1998; 16: 379-389.
 54. Bachmeyer C, Cabanne-Hamy A, Moguelet P, et al. Bullous pemphigoid after boiling water burn. *South Med J* 2010; 103: 1175-1177.
 55. Jevtic A, Grigoris I. Bullous pemphigoid induced by a burn. *Australas J Dermatol* 1991; 32: 69-70.
 56. Quartey-Papafio CM, Hudson PM. Bullous pemphigoid initially localized to sites of burns (scalds) in a patient on sulphasalazine for ulcerative colitis. *Clin Exp Dermatol* 1994; 19: 281.
 57. Balato N, Ayala F, Patrino C, et al. Bullous pemphigoid induced by a thermal burn. *Int J Dermatol* 1994; 33: 55-56.
 58. Wagner GH, Ive FA, Paraskevopoulos S. Bullous pemphigoid and burns: the unveiling of the attachment plaque? *Australas J Dermatol* 1995; 36: 17-20.
 59. Chen DM, Fairley JA. A bullous pemphigoid-like skin eruption after a chemical burn. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38: 337-340.
 60. Vermeulen C, Janier M, Panse I, et al. Localized bullous pemphigoid induced by thermal burn. *Ann Dermatol Venereol* 2000; 127: 720-722.
 61. Blaise G, Piérard-Franchimont C, Quatresooz P, et al. [Post-thermal burn bullous pemphigoid]. *Rev Med Liege* 2008; 63: 182-183.
 62. Xu HH, Xiao T, He CD, et al. Bullous pemphigoid triggered by a boiling water burn. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 466-467.
 63. Мануелян К., Дреновска К., Василева С. Булозен пемфигоид индуциран от изгаряне. *Дерматология и венерология* 2012; 2: 69-76.
 64. Chorzelski T, Jablonska S, Beutner EH, et al. Can pemphigus be provoked by a burn? *Br J Dermatol* 1971; 85: 320-325.
 65. Kudejko J, Chorzelski T. Provoking factors in pemphigus in the light of the pobserved case. *Przegl Dermatol* 1979; 56:261-266.
 66. Hogan P. Pemphigus vulgaris following a cutaneous thermal burn. *Int J Dermatol* 1992; 31: 46-9.

-
67. Drenovska K, Vassileva S, Dencheva R, et al. Pemphigus vulgaris after a cutaneous thermal burn. *Bull CEEDVA* 2001; 3:35-38.
 68. Szymczykowa B, Jarzabek-Chorzelska M, Rzsza G, et al. [Case of pemphigus erythematosus following burns]. *Przegl Dermatol* 1975; 62:591-595.
 69. Girão L, Fiadeiro T, Rodrigues JC. Burn-induced linear IgA dermatosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2000; 14:507-510.
 70. Graham-Brown RAC. Bullous pemphigoid with figurate erythema associated with carcinoma of the bronchus. *Br J Dermatol* 1987; 117: 383-388.
 71. Yamamoto T, Tanaka A, Furuse Y. Bullous pemphigoid with esophageal cancer. *J Dermatol* 1994; 21: 283-284.
 72. Muramatsu T, Iida T, Tada H, et al. Bullous pemphigoid associated with internal malignancies: identification of 180 kDa antigen by Western immunoblotting. *Br J Dermatol* 1996; 135: 782-784.
 73. Hellier FF. Pemphigoid occurring with carcinoma of the rectum. *Proc R Soc Med* 1960; 53: 563.
 74. Ostlere LS, Branfoot AC, Staughton RC. Cicatricial pemphigoid and carcinoma of the pancreas. *Clin Exp Dermatol* 1992; 17: 67-68.
 75. Blum A, Wehner-Caroli J, Scherwitz C, Rassner G. Bullous pemphigoid as a paraneoplastic syndrome. A case report in renal-cell carcinoma. *Hautarzt* 1997; 48: 834-837.
 76. Klein T, Rotterdam S, Noldus J, et al. Bullous pemphigoid is a rare paraneoplastic syndrome in patients with renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2009; 43: 334-336.
 77. Parikh SK, Ravi A, Kuo DY, Nori D. Bullous pemphigoid masquerading as acute radiation dermatitis: case report. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001; 22: 322-324.
 78. Gao XH, Lin J, Yang C et al. A case of Kaposi's sarcoma associated with pemphigoid nodularis. *J Dermatol* 2001; 28: 388-392.
 79. Marks JM, Gold SC. Pemphigoid with malignant melanoma. *Proc R Soc Med* 1961, 54: 225-226.
 80. Egan CA, Florell SR, Zone JJ. Localized bullous pemphigoid in a patient with B-cell lymphoma. *South Med J* 1999; 92: 1220-1222.

-
81. Modiano P, Reichert S, Barbaud A et al. Bullous pemphigoid in association with cutaneous lesions specific to a myelodysplastic syndrome. *Br J Dermatol* 1997; 136: 402-405.
 82. Chorzelski TP, Jablonska S, Maciejowska E et al. Coexistence of malignancies with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1978; 114: 964-966.
 83. Venning VA, Wojnarowska F. The association of bullous pemphigoid and malignant disease: a case control study. *Br J Dermatol* 1990; 123: 439-445.
 84. Drenovska K, Kavaklieva S, Vassileva S, et al. Bullous pemphigoid associated with carcinoma of the larynx. *Bull CEEDVA* 2004; 6: 44-47
 85. Ahmed AR, Chu TM, Provost TT. Bullous pemphigoid. Clinical and serological evidence for associated malignant neoplasms. *Arch Dermatol* 1977; 113: 969.
 86. Stone SP, Schroeter AL. Bullous pemphigoid and associated malignant neoplasms. *Arch Dermatol* 1975; 11: 991-994.
 87. Anhalt GJ, Kim S, Stanley JR, et al. Paraneoplastic pemphigus: an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 1990; 323: 1729-1735.
 88. Setterfield J, Shirlaw PJ, Lazarova Z et al. Paraneoplastic cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 1999; 141: 127-131.
 89. Chamberlain AJ, Cooper SM, Allen J et al. Paraneoplastic immunobullous diseases with an epidermolysis bulosa acquisita phenotype: two cases demonstrating remission with treatment of gynaecological malignancy. *Australas J Dermatol* 2004; 45: 136-139.
 90. Gilmour E, Bhushan M, Griffiths CE. Figurate erythema with bullous pemphigoid: a true paraneoplastic phenomenon? *Clin Exp Dermatol* 1999; 24: 446-448.
 91. Hauschild A, Swensson O, Christophers E. Paraneoplastic bullous pemphigoid resembling erythema giratum repens. *Br J Dermatol* 1999; 140: 550-552.
 92. Hodge L, Marsden RA, Black MM et al. Bullous pemphigoid: the frequency of mucosal involvement and concurrent malignancy related to indirect immunofluorescence findings. *Br J Dermatol* 1981; 105: 65-69.
 93. Vassileva S, Mateev G, Tsankov N. Immunological and clinical studies in patients with bullous pemphigoid. *Problemi Dermatol Venereol (Sofia)* 1990, 1: 24-29.
 94. Venencie PY, Schroeter AL. Bullous pemphigoid and malignancy: relationship to indirect immunofluorescent findings. *Acta Dermatovenereol (Stockh)* 1984; 63: 316-319.

-
95. Schmidt E, Brocker EB, Zillikens D. New aspects on the pathogenesis of bullous pemphigoid. *Hautarzt* 2000; 51:637-645.
 96. Foureur N, Descamps V, Lebrun-Vignes B, Picard-Dahan C, Grossin M, Belaich S, Crickx B. Bullous pemphigoid in a leg affected with hemiparesia: a possible relation of neurological diseases with bullous pemphigoid? *Eur J Dermatol.* 2001 May-Jun;11(3):230-3.
 97. Langan SM, Groves RW, West J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. *J Invest Dermatol.* 2011 Mar;131(3):631-6.
 98. Li, J., Zuo, Y.-G., Zheng, H.-Y. and Qiu-Ning, S. (2013), Association between bullous pemphigoid and internal diseases. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 11: 263–264.
 99. Bastuji-Garin S, Joly P, Lemordant P, Sparsa A, Bedane C, Delaporte E, Roujeau JC, Bernard P, Guillaume JC, Ingen-Housz-Oro S, Maillard H, Pauwels C, Picard-Dahan C, Dutronc Y, Richard MA; French Study Group for Bullous Diseases. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol.* 2011 Mar;131(3):637-43.
 100. Leung CL, Zheng M, Prater SM, Liem RK. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol.* 2001 Aug 20;154(4):691-7.
 101. Chen J, Li L, Chen J, Zeng Y, Xu H, Song Y, Wang B. Sera of elderly bullous pemphigoid patients with associated neurological diseases recognize bullous pemphigoid antigens in the human brain. *Gerontology.* 2011;57(3):211-6.
 102. Stanley JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, et al. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 1981; 24: 897-903.
 103. Diaz LA, Rattie H 3rd, Saunders WS, et al. Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 1990; 86: 1088–94.
 104. Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2007; 33: 67–77.

-
105. Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 1993; 151: 5742–50.
 106. Perriard J, Jaunin F, Favre B, et al. IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 141–47.
 107. Hofmann S, Thoma-Uszynski S, Hunziker T, et al. Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH2- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1065–73.
 108. Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol*. 2000 Feb;136(2):174-8.
 109. Iwata H, Kamio N, Aoyama Y, et al. IgG from patients with bullous pemphigoid depletes cultured keratinocytes of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (type XVII collagen) and weakens cell attachment. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 919–26.
 110. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, et al. Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 842–48.
 111. Messingham KN, Srikantha R, DeGueme AM, Fairley JA. FcR-independent effects of IgE and IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Immunol* 2011; 187: 553–60.
 112. Gammon WR, Merritt CC, Lewis DM, Sams WM Jr, Carlo JR, Wheeler CE Jr. An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 285–90.
 113. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 664–71.
 114. Bieber K, Sun S, Ishii N, et al. Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp Dermatol* 2009; 19: 2–11.
 115. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 1993; 92: 2480–88.

-
116. Lin L, Bankaitis E, Heimbach L, et al. Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. *J Biol Chem* 2011; 286: 37358–67.
 117. Di Zenzo G, Grosso F, Terracina M, et al. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 103–10.
 118. Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, et al. Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun* 2000; 15: 293–300.
 119. Christophoridis S, Budinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *Br J Dermatol* 2000; 143: 349–55.
 120. Dopp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Brocker EB, Zillikens D. IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 577–83.
 121. Iwata Y, Komura K, Kodera M, et al. Correlation of IgE autoantibody to BP180 with a severe form of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 2008; 144: 41–48.
 122. Yoshida M, Hamada T, Amagai M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using bacterial recombinant proteins of human BP230 as a diagnostic tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2006; 41 (1) 21- 30
 123. Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, et al. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 103-109.
 124. You S, Chatenoud L. Proinsulin: a unique autoantigen triggering autoimmune diabetes. *J Clin Invest.* 2006; 116: 3108-3110.
 125. Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, et al. Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 2271-2280.
 126. Miner A, Kirsner RS. Epitope spreading in bullous pemphigoid: what does it mean? *J Invest Dermatol.* 2011 Nov;131(11):2165.

-
127. Mignogna MD, Fortuna G, Leuci S, Stasio L, Mezza E, Ruoppo E. Lichen planus pemphigoides, a possible example of epitope spreading. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Jun;109(6):837-43.
 128. Powell AM, Black MM. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26:427-33.
 129. Lamb PM, Abell E, Tharp M, et al. Prodromal bullous pemphigoid. *Int J Dermatol* 2006, 45: 209-214.
 130. Kuenzli S, Grimaître M, Krischer J, et al. Childhood bullous pemphigoid: report of a case with life-threatening course during homeopathy treatment. *Pediatric Dermatology* 2004; 21: 160-163.
 131. Joly P, Roujeau JC, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E, Vaillant L, D'Incan M, Plantin P, Bedane C, Young P, Bernard P; Bullous Diseases French Study Group. A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med.* 2002 Jan 31;346(5):321-7.
 132. Oyama N, Setterfi eld JF, Powell AM, et al. Bullous pemphigoid antigen II (BP180) and its soluble extracellular domains are major autoantigens in mucous membrane pemphigoid: the pathogenic relevance to HLA class II alleles and disease severity. *Br J Dermatol* 2006; 154: 90–98.
 133. Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, et al. Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol* 2001; 145: 778–83.
 134. Balding SD, Prost C, Diaz LA, et al. Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 141–46.
 135. Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, Yancey KB. Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the alpha subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 543–48.
 136. Rashid KA, Gurcan HM, Ahmed AR. Antigen specificity in subsets of mucous membrane pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2631–36.
 137. Michel B, Bean SF, Chorzelski T, et al. Cicatricial pemphigoid of Brunsting-Perry: immunofluorescent studies. *Arch Dermatol* 1977; 113: 1403-1405.
 138. Zillikens D. Autoimmune Bullous Diseases. In: Burgdorf, W.H.C. Plewig, G. Wolff, H.H. Landthaler, M., editors. *Braun-Falco's Dermatology* 3rd edition. Heidelberg: Springer 2009; 656-657.

-
139. Egan CA, Lazarova Z, Darling TN, et al. Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid: clinical findings, immunopathogenesis, and significant associations. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 177-186.
 140. Egan CA, Lazarova Z, Darling TN, et al. Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid and relative risk for cancer. *Lancet* 2001; 357: 1850-1851.
 141. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011 Oct;9(10):844-56;
 142. Le Roux-Villet C, Prost-Squarcioni C, Alexandre M, Caux F, Pascal F, Doan S, Brette MD, Soued I, Gabison É, Aucoeur F, Letestu R, Laroche L, Bachelez H. Rituximab for patients with refractory mucous membrane pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2011 Jul;147(7):843-9.
 143. Kroumpouzos G, Cohen LM. Specific dermatoses of pregnancy: an evidence-based systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 1083-1092
 144. Jenkins RE, Hern S, Black MM. Clinical features and management of 87 patients with pemphigoid gestationis. *Clin Exp Dermatol* 1999; 24: 255-259
 145. Guidice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, et al. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 1993; 151: 5742-5750.
 146. Chi CC, Wang SH, Charles-Holmes R, et al. Pemphigoid gestationis: early onset and blister formation are associated with adverse pregnancy outcomes. *Br J Dermatol* 2009; 160: 1222-1228.
 147. Gammon, Briggaman. Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. Diseases of autoimmunity to type VII collagen. *Dermatol Clinics* 1993; 11: 535-547.
 148. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, et al. Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. *Arch Dermatol* 1995; 131: 48-52.
 149. Nanda A, Dvorak R, Al-Saeed K, Al-Sabah H, Alsaleh OA. Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait. *Int J Dermatol* 2004; 43: 876-881.
 150. Wong SN, Chua SH. Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre Singapore: a 2-year review. *Br J Dermatol* 2002; 147: 476-480.
 151. Gammon WR. Epidermolysis bullosa acquisita. *Semin Dermatol* 1988; 7: 218-224.

-
152. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG. Epitope mapping of type VII collagen: identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest.* 1993;92:1831–1839.
 153. Jones DA, Hunt SW, III, Prisayanh PS, et al. Immunodominant autoepitopes of type VII collagen are short, paired peptide sequences within the fibronectin type III homology region of the noncollagenous (NC1) domain. *J Invest Dermatol.* 1995;104:231–235.
 154. Woodley DT, et al. Specific affinity between fibronectin and the epidermolysis bullosa acquisita antigen. *J Clin Invest.* 1987;179:1826.
 155. Gupta R, Woodley DT, Chen M. Epidermolysis bullosa acquisita. *Clin Dermatol.* 2012 Jan-Feb;30(1):60-9.
 156. Dahl MG. Epidermolysis bullosa acquisita—a sign of cicatricial pemphigoid? *Br J Dermatol* 1979; 101: 475-484.
 157. Gammon WR, Briggaman RA, Wheeler CE, Jr. Epidermolysis bullosa acquisita presenting as an inflammatory bullous disease. *J Am Acad Dermatol* 1982; 7: 382-387.
 158. Gammon WR, Briggaman RA, Woodley DT, Heald PW, Wheeler CE, Jr. Epidermolysis bullosa acquisita—a pemphigoid-like disease. *J Am Acad Dermatol* 1984; 11: 820-832.
 159. Caux F, Kirtschig G, Lemarchand-Venencie F, Venencie P-Y, Hoang-Xuan T, Robin H, Dubertret L, Prost C. IgA-epidermolysis bullosa acquisita in a child resulting in blindness. *Br J Dermatol* 1997; 137: 270-275.
 160. Wieme N, Lambert J, Moerman M, Geerts ML, Temmerman L, Naeyaert JM. Epidermolysis bullosa acquisita with combined features of bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Dermatology* 1999; 198: 310-313.
 161. Vassileva S, Drenovska K, Tsankov N. Epidermolysis bullosa acquisita associated with Graves' disease and vitiligo. *Bull CEEDVA*, 2001; 3: 50-52.
 162. Hallel-Halevy D, Nadelman C, Chen M, Woodley DT. Epidermolysis bullosa acquisita update and review. *Clin Dermatol* 2001; 19: 712-718.
 163. Chen M, O'Toole EA, Sanghavi J, Mahmud N, Kelleher D, Weir D, Fairley JA, Woodley DT. The epidermolysis bullosa acquisita antigen (type VII collagen) is present in human colon and patients with crohn's disease have autoantibodies to type VII collagen. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 1059-1064.
 164. Radfar L, Fatahzadeh M, Shahamat Y, Sirois D. Paraneoplastic epidermolysis bullosa acquisita associated with multiple myeloma. *Spec Care Dentist* 2006; 26: 159-163.

-
165. Woodley DT, Chen M, O'Toole E, Chan L. Epidermolysis bullosa acquisita. In: Kanitakis J, Vassileva S, Woodley D (eds). *Diagnostic immunohistochemistry of the skin*. London: Chapman & Hall, 1998: 114-122.
 166. Chen M, Hallel-Halevy D, Nadelman C, David T, Woodley DT. Epidermolysis bullosa acquisita. In: M. Hertl (Ed.). *Autoimmune diseases of the skin, pathogenesis, diagnosis, management*. Springer Verlag, Wien 2001; 99-122.
 167. Powell AM, Black M. A stepwise approach to the diagnosis of blisters in the clinic. *Clin Dermatol* 2001; 19: 598-606.
 168. Василева С., К. Дреновска. Булозни дерматози. *GP news*, 2006; 5: 24-29.
 169. Harman KE. New laboratory techniques for the assessment of acquired immunobullous disorders. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 40-46.
 170. Mihai S, Sitaru C. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 462-481.
 171. Bruins S, Fluorescence overlay antigen mapping of the epidermal basement membrane zone. Thesis, Groningen, the Netherlands; 9.
 172. Tsuruta D, Brzezinski P, Koga H, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T. Bullous pemphigoid with prominent milium formation. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2013;21(1):35-8.
 173. Prost C, Labeille B, Chaussade V, Guillaume JC, Martin N, Dubertret L. Immunoelectron microscopy in subepidermal autoimmune bullous diseases: a prospective study of IgG and C3 bound in vivo in 32 patients. *J Invest Dermatol* 1987;89:567-73.
 174. Venning VA, Allen J, Millard PR, Wojnarowska F. The localization of the bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid antigens: direct and indirect immunofluorescence of suction blisters. *Br J Dermatol* 1989;121:305-15.
 175. Banfield CC, Wojnarowska F, Allen J, George S, Venning VA, Welsh KI. The association of HLA-DQ7 with bullous pemphigoid is restricted to men. *Br J Dermatol* 1998;138:1085-90.
 176. Vaillant L, Bernard P, Joly P, Prost C, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Thomine E, Bertrand P, Lok C, Roujeau JC. Evaluation of clinical criteria for diagnosis of bullous pemphigoid. French Bullous Study Group. *Arch Dermatol*. 1998– Sep;134(9):1075-80.
 177. Bowszyc-Dmochowska M, Silny W, Dmochowski M: Detection of IgG4 deposits using a single-step direct immunofluorescence on sodium chloride-separated skin and

-
- elevated levels of serum total IgE in active bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 114:804a, 2000
178. Dimson OG, Giudice GJ, Fu CL, Van den Bergh F, Warren SJ, Janson MM, Fairley JA. Identification of a potential effector function for IgE autoantibodies in the organ-specific autoimmune disease bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*. 2003 May;120(5):784-8.
179. Й. Димитрова, Е. Обрешкова, А. Лазарова, В. Русева. Критерии за хистологичната диференциална диагноза на dermatitis herpetiformis и pemphigoid. *Дерматология и венерология*. 1981, 2, 87-91.
180. Ardigò M, Agozzino M, Amorosi B, Moscarella E, Cota C, de Abreu L, Berardesca E. Real-time, non-invasive microscopic confirmation of clinical diagnosis of bullous pemphigoid using in vivo reflectance confocal microscopy. *Skin Res Technol*. 2013 Aug 28.
181. Vassileva S. Immunofluorescence in dermatology. *Int J Dermatol* 1993; 32: 153-161.
182. Darling TN, Cardenas AA, Beard JS, Sau P, Yee CL, Zone JJ, et al. A child with antibodies targeting both linear IgA bullous dermatosis and bullous pemphigoid antigens. *Arch Dermatol*. 1995;131:1438-42.
183. Miyagawa S, Kiriya Y, Shirai T, Ohi H, Sakamoto K. Chronic bullous disease with coexistent circulating IgG and IgA anti-basement membrane zone antibodies. *Arch Dermatol*. 1981;117:349-53.
184. Buschman KE, Seraly M, Thong HY, Deng JS, Draviam RP, Abernethy JL. A predominant IgG4 subclass may be responsible for false-negative direct immunofluorescence in bullous pemphigoid. *J Cutan Pathol*. 2002 May;29(5):282-6.
185. Yaoita H, Briggaman RA, Lawley TJ, Provost TT, Katz SI. Epidermolysis bullosa acquisita: ultrastructural and immunological studies. *J Invest Dermatol* 1981; 76: 288-292.
186. Logan RA, Bhogal B, Das AK, McKee PM, Black MM. Localization of bullous pemphigoid antibody--an indirect immunofluorescence study of 228 cases using a split-skin technique. *Br J Dermatol*. 1987 Oct;117(4):471-8.
187. Gammon WR, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus: disease of autoimmunity to type VII collagen. *Dermatol Clin*. 1993;11:535-547.

-
188. Mayuzumi M, Akiyama M, Nishie W, et al. Childhood epidermolysis bullosa acquisita with autoantibodies against the noncollagenous 1 and 2 domains of type VII collagen: case report and review of the literature. *Br J Dermatol*. 2006;155:1048–1052.
 189. Gammon WR, Kowalewski C, Chorzelski TP, Kumar V, Briggaman RA, Beutner EH. Direct immunofluorescence studies of sodium chloride-separated skin in the differential diagnosis of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 664-670.
 190. Gammon WR, Fine JD, Forbes M, Briggaman RA. Immunofluorescence on split skin for the detection and differentiation of basement membrane zone autoantibodies. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27 : 79–87.
 191. Ghohestani R, Kanitakis J, Nicolas JF et al. Comparative sensitivity of indirect immunofluorescence to immunoblot assay for the detection of circulating antibodies to bullous pemphigoid antigens 1 and 2. *Br J Dermatol* 1996; 135 : 74–79.
 192. Foureur N, Mignot S, Senet P, Verpillat P, Picard-Dahan C, Crickx B, Labarre C, Nicaise-Roland P, Descamps V. Correlation between the presence of type-2 anti-pemphigoid antibodies and dementia in elderly subjects with no clinical signs of pemphigoid [in French] *Ann Dermatol Venereol*.2006;133:439–43.
 193. Jedlickova H, Racovska J, Niedermeier A, Feit J, Hertl M. Anti-basement membrane zone antibodies in elderly patients with pruritic disorders and diabetes mellitus. *Eur J Dermatol*.2008;18:534–8.
 194. Chen M, Chan LS, Cai X, O'Toole EA, Sample JC, Woodley DT. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 68-72.
 195. Yaoita H, Briggaman A, Lawley TJ. Epidermolysis bullosa acquisita: Ultrastructural and immunological studies. *J Invest Dermatol*. 1981;76:288–292.
 196. Fine JD. Management of acquired bullous skin diseases. *N Eng J Med* 1995; 30: 1475-1484.
 197. Milanov I, Kmetska K, Karakolev B, Nedialkov E. Prevalence of Parkinson's disease in Bulgaria. *Neuroepidemiology*. 2001 Aug;20(3):212-4.
 198. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006 Jun;5(6):525-35. Review.
 199. Reichert-Penetrat S, Barbaud A, Martin S, et al. Pemphigus vulgaris on an old surgical scar: Koebner's phenomenon? *Eur J Dermatol* 1998; 8:60-62.

-
200. Boyd AS, Neldner KH. The isomorphic response of Koebner. *Int J Dermatol* 1990; 29:401-10.
 201. Albergo RP, Gilgor RS. Delayed onset of bullous pemphigoid after PUVA and sunlight treatment of psoriasis. *Cutis* 1982; 30:621-4.
 202. Duschet P, Schwarz T, Gschnait F. Bullous pemphigoid after radiation therapy. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18:441-4.
 203. Bakker CV, Terra JB, Pas HH, Jonkman MF. Bullous pemphigoid as pruritus in the elderly: a common presentation. *JAMA Dermatol*.
 204. Schmidt E, Zillikens D. Diagnosis and clinical severity markers of bullous pemphigoid. *F1000 Med Rep*. 2009 Feb 24;1.
 205. Woodley D, Sauder D, Talley MJ, Silver M, Grotendorst G, Qwarnstrom E. Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. *J Invest Dermatol*. 1983 Aug;81(2):149-53.
 206. Beutner EH, Jordon RE, Chorzelski TP. The immunopathology of pemphigus and bullous pemphigoid. 1968. *J Invest Dermatol*. 1989 Apr;92(4 Suppl):166S; discussion 167S-168S.
 207. Zarian H, Saponeri A, Michelotto A, Zattra E, Belloni-Fortina A, Alaibac M. Biochip technology for the serological diagnosis of bullous pemphigoid. *ISRN Dermatol*. 2012;2012:237802.
 208. Yalcin A. et al. Anti-IgE Monoclonal Antibody (Omalizumab) is effective in Treating Bullous Pemphigoid and Its Effects on Soluble CD200. Letter to the editor. *Clin. Lab*. 2014; 60.
 209. Pas H. Immunoblot assay in differential diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Clin Dermatol* 2001; 19: 622-630
 210. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K et al. BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16A protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 224-232.
 211. Parikka M, Kainulainen T, Tasanen K, et al. Alterations of collagen XVII expression during transformation of oral epithelium to dysplasia and carcinoma. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:921-929.
 212. Lo AK, Yuen PW, Liu Y et al. Downregulation of hemidesmosomal proteins in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2001; 163: 117-123.

-
213. Herold-Mende C, Kartenbeck J, Tomakidi P, et al. Metastatic growth of squamous cell carcinoma is correlated with upregulation and redistribution of hemidesmosomal components. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 399-408.