

МЕДИЦИНСКИ
УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ



M E D I C A L
UNIVERSITY SOFIA

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ

Д-р МАРТИН АБУ ШАХИД

**СЪВРЕМЕННИ АСПЕКТИ В ДИАГНОСТИКАТА
НА ДЕРМАТИТИС ХЕРПЕТИФОРМИС:
КЛИНИЧНИ, ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНИ,
ИМУНОСЕРОЛОГИЧНИ И ИМУНОГЕНЕТИЧНИ
ПРОУЧВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
Проф. д-р СНЕЖИНА ВАСИЛЕВА, Д.М.

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:
Д-р КОСАРА ДРЕНОВСКА, Д.М.

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ

СОФИЯ, 2019 г.

Дисертационният труд е написан на 151 стандартни А4 печатни страници и е онагледен с 30 фигури, 19 таблици и 2 приложения. Библиографията съдържа 293 заглавия, от които 12 на кирилица и 281 на латиница, обхващащи периода от 1884 г. до 2019 г. Библиографията съдържа 23 заглавия от български и 270 от чуждестранни автори.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 3 публикации и 6 участия на научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедрата по дерматология и венерология към Медицински Университет – София и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

1. Проф. д-р Любка Гаврилова Стоянова-Митева, дм
2. Проф. д-р Димитър Константинов Господинов, дмн

Становища:

1. Проф. д-р Снежина Георгиева Василева, дм
2. Проф. д-р Христо Петров Добрев, дм
3. Доц. д-р Ивелина Аспарухова Йорданова-Василева, дм

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

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 22 ноември 2019 г. от 12.00 ч. в аудиторията на Катедрата по дерматология и венерология, Медицински факултет, Медицински университет – София, бул. “Св. Г. Софийски” 1, гр. София.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	5
Фигури	6
Таблицы	8
1. Въведение	9
2. Цел и задачи.....	10
3. Материал и методи.....	11
3.1. Материал	11
3.2. Клинични и епидемиологични методи.....	13
3.2.1. Метод за анализ на анамнестичните данни и клиничната картина.....	13
3.2.2. Документален метод	13
3.2.3. Дерматоскопски метод	13
3.2.4. Метод за анализ и оценка на влиянието на заболяването върху качеството на живот	14
3.3. Лабораторни методи	17
3.3.1. Хистологично изследване.....	17
3.3.2. Директна имунофлуоресценция (ДИФ)	18
3.3.3. Индиректна имунофлуоресценция (ИИФ).....	18
3.3.4. BIOCHIP	19
3.3.5. ELISA	20
3.3.6. HLA типизиране (PCR-SSP).....	20
3.3.7. Метод за съхранение на резултатите от изследванията.....	24
3.4. Статистически методи	24
3.5. Етични норми.....	25
4. Резултати	26
4.1. Епидемиологично проучване.....	26
4.2. Клинични проучвания.....	27
4.3. Имунофлуоресцентно проучване	34
4.4. Имуносерологично проучване.....	40
4.5. Имуногенетично проучване.....	45

4.6.	Качество на живот.....	48
5.	Обсъждане	51
5.1.	Епидемиологично проучване.....	51
5.2.	Клинични проучвания.....	52
5.3.	Имунофлуоресцентно проучване	55
5.4.	Имуносерологично проучване.....	56
5.5.	Имуногенетично проучване.....	57
5.6.	Диагностичен алгоритъм	58
5.7.	Стандартизирани скали.....	61
5.8.	Качество на живот.....	62
6.	Заключение	65
7.	Изводи.....	66
8.	Приноси	68
9.	Публикации и участия, свързани с дисертационния труд.....	70

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AGA.....	anti-gliadin antibody (антиглиадинови антитела)
ARA.....	anti-reticulin antibody (антиретикулинови антитела)
АИБД.....	автоимунна булозна дерматоза
Г6ФД.....	глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа
ДИФ.....	директна имунофлуоресценция
ДХ.....	дерматитис херпетиформис
ДЕГ.....	дермо-епидермална граница
DGP.....	deamidated gliadin peptides
DLQI.....	Dermatology Life Quality Index
ЕМА.....	endomysium antibodies
ELISA.....	enzyme-linked immunosorbent assay
ГЕ.....	глутенова ентеропатия
GAF3X.....	deamidated gliadin-analogous fusion peptides
HLA.....	human leukocyte group A
Ig.....	имуноглобулин
ИИФ.....	индиректна имунофлуоресценция
ККВБ.....	Клиника по кожни и венерически болести
LR+/-.....	положително/отрицателно вероятно отношение
мин.....	минути
NPV.....	negative predictive value (отрицателна прогностична стойност)
ПКК.....	пълна кръвна картина
PBS.....	phosphate-buffered saline
ppm.....	parts per million
PPV.....	positive predictive value (положителна прогностична стойност)
TG.....	transglutaminase (трансглутаминаза)
tTG, TG2.....	tissue transglutaminase (тъканна трансглутаминаза)
eTG, TG3 ..	epidermal transglutaminase (епидермална трансглутаминаза)
Ц.....	цьолиакия, целиакия

ФИГУРИ

Фигура 1. Разпределение на лезиите при ДХ по засегнати области в %	28
Фигура 2. Засягане на лактите при ДХ.....	29
Фигура 3. Засягане на коленете при ДХ.....	29
Фигура 4. Засягане на седалището при ДХ.....	29
Фигура 5. Засягане на главата при ДХ.....	30
Фигура 6. Хистопатологична находка при ДХ.....	30
Фигура 7. Акрална дерматоскопия (x19).....	31
Фигура 8. Витропресия при акрална пурпура.....	31
Фигура 9. Акрална пурпура при пациенти с ДХ.....	32
Фигура 10. Зъбен статус при пациент с ДХ.....	32
Фигура 11. Честота на отделните типове имунни отлагания при ДИФ анализ при пациенти с ДХ.....	34
Фигура 12. Честота на комбинираните типове имунни отлагания при ДИФ анализ при пациенти с ДХ.....	35
Фигура 13. Морфология на IgA имунните отлагания при ДИФ анализ при пациенти с ДХ.....	36
Фигура 14. ДИФ анализ на локализацията на IgA имунните отлагания и честота на съдовото засягане при пациенти с ДХ.....	37
Фигура 15. ДИФ анализ на честота на IgA имунните отлагания според тяхната морфология и локализация при пациенти с ДХ.....	37
Фигура 16. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ грануларно отлагане на IgA по дермалните папили.....	38

Фигура 17. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ грануларно отлагане на IgA по хода на ДЕГ с акцентуиране на папилите.	38
Фигура 18. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ фибриларно отлагане на IgA по хода ДЕГ.....	39
Фигура 19. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ периваскуларно грануларно отлагане на IgA.....	39
Фигура 20. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ смесен тип отлагане на IgA по ДЕГ с акцентуиране на папилите.....	40
Фигура 21. Имуносерологична чувствителност на ЕМА, anti-tTG, anti-eTG и GAF3X от клас IgA при пациенти с ДХ.	43
Фигура 22. Имуносерологична специфичност на ЕМА, anti-tTG, anti-eTG и GAF3X от клас IgA при пациенти с ДХ.	44
Фигура 23. ИИФ върху маймунски хранопровод, демонстрираща позитивни ЕМА при пациент с ДХ.	44
Фигура 24. Отчитане на резултати от агарозен гел при HLA типизиране чрез PCR-SSP.....	46
Фигура 25. Качество на живот при пациенти с ДХ.....	49
Фигура 26. Диагностичен алгоритъм при ДХ.....	60

ТАБЛИЦИ

Таблица 1. Брой пациенти, включени в отделните проучвания.	12
Таблица 2. DLQI точкуване.	14
Таблица 3. Тълкуване на DLQI резултатите.	15
Таблица 4. Тълкуване на DLQI резултатите по категории.	16
Таблица 5. Параметри на температурния блок при PCR-SSP.	23
Таблица 6. Разпределение по възраст и пол на новодиагностицираните пациенти с ДХ, преминали през ККВБ за периода януари 2004 – март 2019.	26
Таблица 7. Придружаващи заболявания.	33
Таблица 8. Диагностична стойност на ЕМА (BIOCHIP), anti-tTG и anti-eTG от клас IgA при пациенти с ДХ.	41
Таблица 9. Диагностична стойност на ЕМА IgA (ИИФ), GAF3X IgA и IgG при пациенти с ДХ.	42
Таблица 10. HLA типизиране – изследвана популация.	45
Таблица 11. HLA типизиране при пациенти с ДХ.	47
Таблица 12. Предразполагащи и протективни HLA алели и серологична специфичност.	47
Таблица 13. Диагностична стойност на HLA DQ2 и DQ8.	48
Таблица 14. DLQI резултати по категории.	50

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Дерматитис херпетиформис (ДХ, болест на Дюринг-Брок) е хронична субепидермална булозна дерматоза, която се характеризира със силно сърбящ полиморфен обрив по лактите, коленете, скалпа, седалището и наличието на грануларни отлагания на IgA антитела в папиларна дерма. Според съвременните схващания ДХ представлява кожна форма на глутеновата ентеропатия (ГЕ, цьолиакия). Пациентите с ДХ рядко проявяват клинично гастроинтестинални смущения, но демонстрират определена степен на вилозна атрофия при тънкочревна биопсия. Пациентите с ДХ и ГЕ споделят общи характеристики като чувствителност към глутен, същата силна асоциация с човешки левкоцитен антиген (HLA-DQ2 и HLA-DQ8), наличието на циркулиращи IgA антитела срещу тъканната трансглутаминаза (tTG) и антитела срещу епидермалната трансглутаминаза (eTG), която е доминантният антиген при ДХ.

Освен цьолиакия, при пациенти с ДХ могат да се появят с повишена честота и други заболявания като автоимунен тиреоидит, захарен диабет тип I, витилиго, системен лупус еритематозус, дерматомиозит, синдром на Sjogren и ревматоиден артрит. Естественият ход на заболяването е хроничен, с неопределена еволюция, в която се редуват периоди на обостряне и различно дълги ремисии. Безглутеновата диета подобрява и дори напълно редуцира кожните и интестинални прояви. Медикаментозното лечение е основно със сулфони (дапсон), чието приложение драматично подобрява кожната симптоматика, без обаче да повлиява симптомите на ГЕ.

Но колко от написаното по-горе е приложимо за България? Каква е честотата на ДХ сред българската популация? Има ли етнически групи по-засегнати от болестта? В какви честоти се срещат HLA-DQ2 и DQ8 сред пациентите в нашата страна? Съществуват ли особености в клиничната картина сред българските пациенти? Последните две десетилетия бележат бурен напредък по отношение на диагностичните маркери за ДХ, но колко приложими са тези тестове у нас? Как се чувстват пациентите с ДХ? Това са само някои от

въпросите, които стимулираха провеждането на този дисертационен труд. С тази научна разработка се надяваме не само да поставим България на картата на ДХ, но и да допринесем за по-доброто разбиране и своевременно диагностициране на заболяването.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучат епидемиологията, клинично-морфологичния и имунологичен спектър на дерматитис херпетиформис в българската популация и чрез приложението на съвременни диагностични методи да се утвърди работещ алгоритъм за неговото диагностициране.

За постигане на тази цел са разработени следните задачи:

Задача 1: Проучване на епидемиологичните, демографски и клинично-морфологични особености при пациенти с ДХ.

Задача 2: Проучване на чувствителността и специфичността на различни имунофлуоресцентни, имуносерологични и имуногенетични тестове при ДХ.

Задача 3: Създаване на алгоритъм за диагностика на ДХ, интегриращ класическите и съвременни диагностични техники.

Задача 4: Проучване на различните скали за оценка на тежестта и качеството на живот при пациенти с дерматитис херпетиформис.

Задача 5: Проучване на качеството на живот при пациенти с дерматитис херпетиформис.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Материал

Изследваната група се състои от 97 пациенти с ДХ, преминали през Клиниката по кожни и венерически болести (ККВБ) към Александровска болница, София, през периода януари 2004 - март 2019 г. Включени са само новодиагностицирани пациенти, чиято диагноза е поставена на базата на следните три критерия: 1) клинични данни – обрив, съвместим по морфология и локализация с ДХ; 2) хистологична находка - субепидермална була и 3) имунопатологичен критерий - наличие на грануларно отложен IgA в папиларна дерма чрез ДИФ върху перилезионелна кожа. Броят на пациентите включени в различните проучвания е обединен в Таблица 1. Епидемиологичното проучване и клинично-морфологичният анализ обхващат всички 97 болни, проследени проспективно след 2016 г. и ретроспективно преди 2016 г. На всички 97 пациенти е направен както хиспатологичен, така и ДИФ анализ като част от рутинната диагностична практика в ККВБ при суспекция за АИБД. Дерматоскопски анализ е извършен на 14 проспективно проследени пациенти. Чрез индиректна имунофлуоресценция (ИИФ) върху маймунски хранопровод за откриване на ЕМА са изследвани серумите на 50 болни и 50 контроли. За ВЮСНР анализ върху маймунски хранопровод за ЕМА, както и за ELISA тест за anti-tTG, anti-eTG, ЕМА, GAF3X бе използван серумът на 37 болни и 200 контроли. Чрез PCR-SSP за HLA типизиране е изследвана периферна кръв на 37 пациента и 41 клинично-здрави контроли. Качеството на живот е оценено с DLQI въпросника при 16 новодиагностицирани пациенти.

Таблица 1. Брой пациенти, включени в отделните проучвания.

ПРОУЧВАНЕ / МЕТОД	БРОЙ ПАЦИЕНТИ
Епидемиологично проучване	97
Общ клинично-морфологичен анализ	97
Дерматоскопия	14
Хистопатология	97
ДИФ	97
ИИФ (маймунски хранопровод)	50 (50 контроли)
ВЮСНР (маймунски хранопровод)	37 (200 контроли)
ELISA	37 (200 контроли)
HLA типизиране	37 (41 контроли)
DLQI	16

3.2. Клинични и епидемиологични методи

3.2.1. Метод за анализ на анамнестичните данни и клиничната картина

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

3.2.2. Документален метод

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

3.2.3. Дерматоскопски метод

Използван е дерматоскоп DermLite DL4 (3Gen) с оптично увеличение x10 и вградена окулярна милиметрова линия. За визуализация и запис на образите е използван iPhone 7 Plus с максимално оптично увеличение x2. За запазване на стабилно зрително

поле при използването на DermLite DL4, заедно с iPhone 7 Plus се приложи x19 максимално общо оптично увеличение.

3.2.4. **Метод за анализ и оценка на влиянието на заболяването върху качеството на живот**

Дерматологичният индекс за качеството на живот (DLQI, Dermatology Life Quality Index, AY Finlay & GK Khan, Приложение 1) е предназначен за употреба при пациенти над 16-годишна възраст. Попълването на въпросника се извършва от самия болен, който отговаря на 10 въпроса. Точкуването на отговорите е описано в Таблица 2. Използван е официалният превод на въпросника на български език.

Таблица 2. DLQI точкуване.

ОТГОВОР	ТОЧКИ
Много	3
Доста	2
Малко	1
Въобще	0
Въпрос без отговор	0
Въпрос 7, отговор "Да"	3
Въпрос 7, отговор "Много"	2

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.

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 (Таблица 3). DLQI може също да бъде представен като процент от максималния резултат от 30 точки.

Таблица 3. Тълкуване на DLQI резултатите.

ОБЩ СБОР	ЗНАЧЕНИЕ
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

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

Въпросите спадат към определени категории (Таблица 4). Резултатът за всяка една от тези секции може 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.

Таблица 4. Тълкуване на DLQI резултатите по категории.

КАТЕГОРИЯ	ВЪПРОСИ	РЕЗУЛТАТ
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

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 на въпрос 7 е отговорено 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 отговора 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.

3.3. Лабораторни методи

3.3.1. 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 ($d = 4\text{mm}$). 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.

3.3.2. Директна имуофлуоресценция (ДИФ)

Директната имуофлуоресценция е метод за идентифициране на имунореактанти, отложени *in vivo* в тъканите. ДИФ е провеждана рутинно върху биопсия от перилезионален кожен участък в близост до свежа лезия. Биопсията се получава при условия, идентични с описаните за хистологично изследване. Биопсичният материал подлежи на незабавно дълбоко замразяване 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, Leica) върху предметни стъкла. Селектират се стъклата за инкубиране с анти-IgG, анти-IgA, анти-IgM и анти-комплемент 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 isothiocyanate)-конюгирани IgG, IgA, IgM, C3 серуми (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 30мин. на тъмно във влажна камера. След двукратно измиване в PBS по 15 мин., срезите инкубират с анти-IgA, IgM и C3 се подсушават, включват се в буфериран глицерин (Mounting medium, Dako) 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).

3.3.3. Индиректна имуофлуоресценция (ИИФ)

Индиректната имуофлуоресценция е метод за откриване на автоантитела в серум, в нашия случай на ЕМА. Венозна кръв без антикоагулант се оставя да се съсирва в продължение на 30 мин. в

изправено положение, след което, се центрофугира за 15 мин. (центрофуга Eppendorf 5702 R, 3000 оборота/мин., 20°C). Извършено е качествено изследване като серумът на пациента се разрежда непосредствено преди провеждане на техниката в съотношение 1:20 с PBS. Серумите са изследвани върху субстрат от маймунски хранопровод (Nova Lite Monkey Esophagus substrate slides 10x5 wells). Подготвените стъкла се накапват със серума на болния и се инкубират за 30 мин. на тъмно във влажна камера. След еднократно измиване в PBS за 15 мин. се изваждат и подсушават. Следва 30 мин. инкубиране с FITC-конюгиран античовешки анти-IgA, предварително разреден и подготвен по начина, описан за ДИФ. След двукратно измиване по 15 мин. 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 24h след приготвянето на препаратите, на тъмно, с флуоресцентен микроскоп (Olympus) на увеличение x10, x20, x40 или x100 (имерсия).

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

3.3.4. ВЮСНIP

ВЮСНIP тестът е разработен на базата на стандартната ИИФ, но позволява комбинации от различни субстрати. За целта беше използван комерсиален кит със субстрат от маймунски хранопровод (Euroimmun) за детекция на ЕМА. Субстратите се инкубират с разреден серум. При положителна реакция, специфичните антитела 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 мин., 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 мин. и измиване с PBS-Tween. Биочипът се поставя върху покривно стъкло, предварително обработено с embedding medium и се отчита на флуоресцентен микроскоп. Резултатите се сравняват с една отрицателна и две положителни контроли.

3.3.5. ELISA

Ензимно-свързаният имуносорбентен анализ (ELISA) е високо чувствителен и специфичен метод за откриване на автоантитела в серум. Комерсиални ELISA китове (Euroimmun) бяха използвани за детекция на ЕМА, anti-tTG, anti-eTG и GAF3X в серума на болните. Тестовите бяха проведени според стандартните указания на производителя.

3.3.6. HLA типизиране (PCR-SSP)

Методът за HLA типизиране се разделя на три основни стъпки:

- ДНК изолация от кръв (Invitrogen iPrep PureLink)
- ДНК амплификация: PCR-SSP (Olerup SSP DQ low resolution)
- Детекция на амплификатите чрез агарозна гелелектрофореза

PCR-SSP методът е базиран на принципа, че напълно комплементарни на ДНК матрицата праймери ще се използват по-ефективно в първите критични цикли на PCR реакцията в сравнение с праймери, съдържащи в 3' края си един или няколко различни нуклеотида. Таq полимеразата не притежава 3'→5' екзонуклеазна активност и поради това праймер с един или няколко несъвпадащи нуклеотида в 3' края не може да бъде използван ефективно.

При PCR-SSP метода се използва панел от праймерни смеси, всяка от които съдържа двойка праймери, чиито 3' краища съвпадат напълно с последователността на даден алел или група от алели. Когато PCR реакцията се провежда при строго определени условия, амплификация се наблюдава само при пълно съответствие на двойката алел - или групово-специфични праймери и матрицата. Тъй като специфичността на типизирането е част от амплификацията, постаплификационните процедури са сведени до разделяне на амплификатите чрез агарозна гел електрофореза и визуализирането им чрез етидиев бромид. По този начин, въз основа на наличието и размера на амплификационния продукт за дадена реакционна смес, може да се определи специфичността на изследваната проба. Липсата на амплификат за дадена смес може да е резултат от технически грешки. Поради това всяка смес от праймери съдържа и една двойка вътрешно контролни праймери, които амплифицират консервативен участък от геномната ДНК и верифицират ефективността на PCR реакцията.

За извършване на теста се използва ДНК с концентрация 30-50 ng/μl, изолирана от периферна венозна кръв. За целта беше използвана автоматична система Invitrogen iPrep PureLink:

1. Праймери: Olerup-SSP китове съдържат лиофилизирани, предварително разпределени в 0.2 ml тънкостенни PCR епруветки или плаки праймери.
2. Приготвяне на PCR амплификационните смеси: За всички PCR реакции, които трябва да бъдат извършени за типизирането на една проба (един пациент), се приготвя една предварителна

PCR смес, съдържаща: Olerup SSP™ PCR Master Mix, включен във всеки кит; изолираната ДНК и Таq полимераза. Olerup SSP™ PCR Master Mix съдържа:

- Смес от dATP, dGTP, dCTP, dTTP – крайна концентрация на всеки нуклеотид – 200 μ l
- PCR буфер – крайни концентрации: 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl с ph 8.3, 0.001% w/v желатин.
- Глицерол – крайна концентрация 5%
- Cresol red – крайна концентрация 100 μ g/ml

Обемът на отделните компоненти, необходими за приготвянето на предварителната PCR смес, се изчислява въз основа на таблица, приложена към отделните китове. За всяка ДНК проба 10 μ l от предварителната PCR смес се добавят незабавно към всяка PCR епруветка, съдържаща лиофилизирани праймери. Епруветките се поставят в амплификатора и незабавно се стартира програмата за амплификация.

3. Параметри на PCR реакцията: PCR амплификацията е разграничаващата хибридизационна стъпка за SSP метода, поради което амплификацията трябва да бъде проведена при точно подбрани PCR параметри като температури и време. За всички PCR реакции с Olerup SSP китове (както за HLA клас I, така и за клас II типизиране) се използва следната амплификационна програма в амплификатор Applied Biosystems 9700 с параметри на температурния блок PE 9600, описани в Таблица 5.

Таблица 5. Параметри на температурния блок при PCR-SSP.

94°C	2мин.	1 цикъл
94°C	10сек.	10 цикъла
65°C	1мин.	
94°C	10сек.	20 цикъла
61°C	50сек.	
72°C	30сек.	
12°C	∞	

4. Детекция на амплификатите чрез агарозна гел-електрофореза. Агарозната гел-електрофореза е метод за разделяне на ДНК фрагменти по големина и при PCR-SSP метода има редица предимства като: визуализиране на вътрешната контрола, възможност за относително определяне размера на амплификатите и разграничаване на специфичните амплификати от праймер-олигомерни артефакти и неспецифични амплификати.

- 4.1 Приготвяне на 1.5 % агарозен гел в 1xTAE буфер: 575g агароза се разтварят в 35ml 1xTAE буфер чрез загряване в микровълнова печка. Охлажда се до 60°C и се добавят 1.75µl етидиев бромид (10mg/ml). Гелът се излива във вана с гребени и се оставя да изстине в продължение на 15мин.
- 4.2 Гребените се отстраняват, а гелът се поставя във ваната за подводна електрофореза, като трябва да бъде покрит с 1xTAE буфер на дълбочина 1-2мм.

- 4.3 Цялото количество PCR амплификати се нанася директно върху гела. Стартира се програма за електрофореза (15 мин., 200 V).
- 4.4 Разделените амплификати се визуализират чрез UV облъчване и се документират чрез фотографиране.

Интерпретиране на резултатите: специфичността на отделните разтвори на праймери от всеки OLERUP-SSP типизиращ кит е отбелязана в информация, приложена към кита и е специфична за всеки лот номер. Всеки OLERUP-SSP кит съдържа и таблица за интерпретиране на резултатите.

3.3.7. Метод за съхранение на резултатите от изследванията

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

Фотодокументиране се извършва посредством фото-приставка към флуоресцентния и светлинен микроскоп. Клиничните и дерматоскопски снимки се извършват с помощта на фотоапарат Canon 40D и смартфон iPhone 7 Plus.

3.4. Статистически методи

Данните бяха въведени и обработени със статистическия пакет SPSS v.24.0. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието $p < 0.05$. Бяха приложени следните методи: дескриптивен и честотен анализ, кростабулация, вариационен анализ,

графичен анализ, Chi square, Fischer exact тест, метод на Колмогоров-Смирнов, Student T-test, тест на Mann-Whitney, 95% доверителен интервал (CI).

Използван беше **ARLEQUIN ver 3.5** – Expectation Maximization алгоритъм за изчисляване на HLA алелни честоти. Chi square / Fischer exact тест за сравнителен анализ между групите. Беше направена корекция на P по Bonferonni.

Диагностичната стойност на различните серологични тестове беше оценена и чрез изчисляване на чувствителност, специфичност, положителна и отрицателна прогностична стойност (PPV и NPV), точност на теста (V), вероятностни отношения (LR+ и LR-) при 95% доверителен интервал (CI).

3.5. Етични норми

Всички пациенти при постъпването в ККВБ подписват информирано съгласие. Проектът е одобрен от Етичната комисия към Катедрата по дерматология и венерология (ЕККВД).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Епидемиологично проучване

Епидемиологичното проучване включва периода между януари 2004 г. и март 2019 г. и обхваща 97 новодиагностицирани пациенти с ДХ, преминали през Клиниката по дерматология и венерология, Медицински университет, София. Резултатите (Таблица 6) показват средно около 6 новодиагностицирани пациенти с ДХ на година. Честотата на ДХ сред АИБД е 7%.

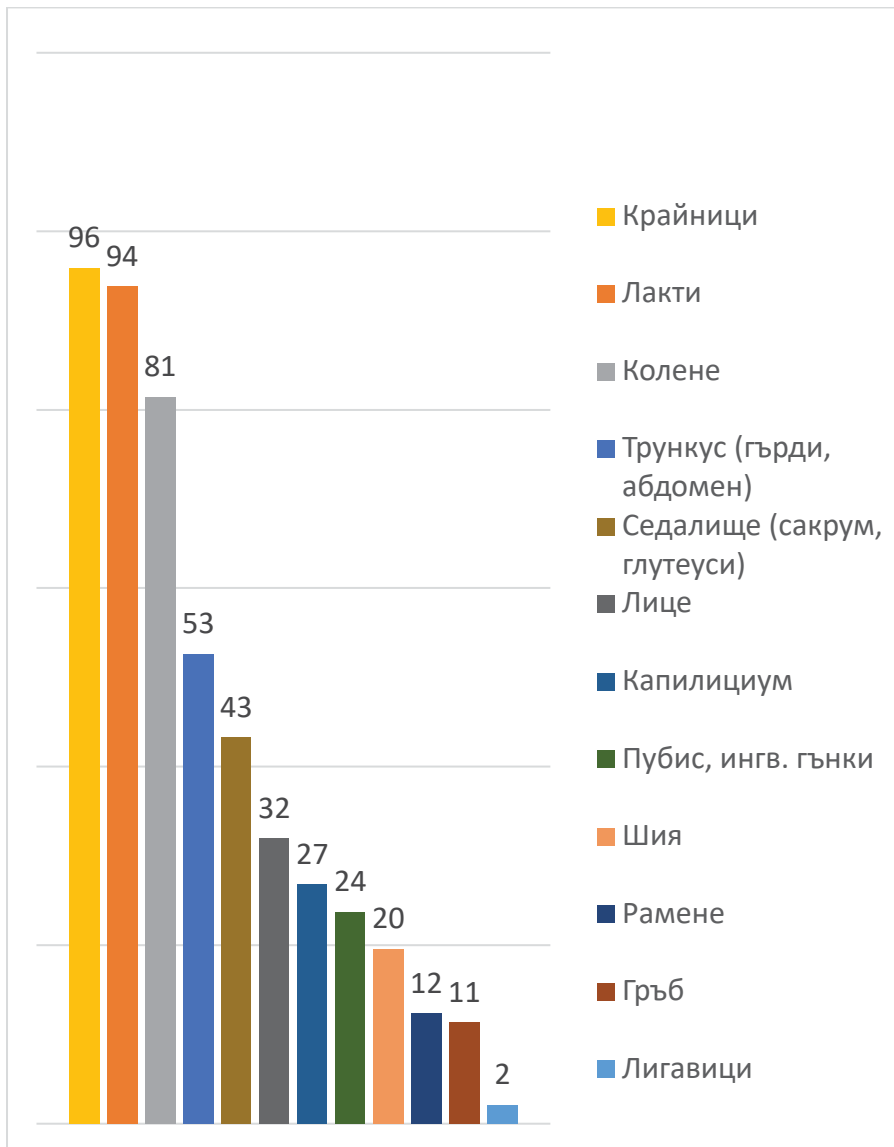
Таблица 6. Разпределение по възраст и пол на новодиагностицираните пациенти с ДХ, преминали през ККВБ за периода януари 2004 – март 2019.

		Брой пациенти		
		Мъж	Жена	Общо
Възраст (години)	1-10	1	3	4
	11-20	3	3	6
	21-30	6	4	10
	31-40	12	4	16
	41-50	13	4	17
	51-60	8	4	12
	61-70	12	10	22
	71-80	6	4	10
	Общо	61	36	97

Всички пациенти принадлежат към кавказката раса, като 93% са етнически българи, докато 7% са етнически турци. Съотношението мъже : жени е съответно 1.7 : 1, докато до 20-годишна възраст е 1 : 1.5. Възрастовият диапазон е от 2 до 80 г. Средната възраст на изследваните ДХ пациенти е 47 г. с медиана от 49 г. и мода (mode) от 70 г. Най-много пациенти (23%) попадат между 61-70 г., където съотношението мъже : жени е съответно 1.2 : 1. Най-много мъже (21%) попадат между 41-50 г. Най-много жени (38%) попадат между 61-70 г. Средната възраст на мъжете е 48 г., докато на жените е 46 г., като няма статистически значима разлика между стойностите ($p=0.63$).

4.2. Клинични проучвания

Общият клинико-морфологичен и хистологичен анализ обхваща всички 97 новодиагностицирани пациенти с ДХ. Средната давност на заболяването е 36 месеца и сърбеж се наблюдава при почти всички болни (99%). Разпределението по засегнати области (Фигура 1) показва, че най-често се засяга кожата на крайниците (96%), като доминират лактите (94%) (Фигура 2) и коленете (81%) (Фигура 3). При малко повече от половината пациенти (53%) се засяга трункусът, докато при 43% е засегната седалищната област (Фигура 4). Лигавичното ангажиране е рядко (2%). В областта на главата кожните изменения се локализируют често по кожата на лицето (32%) с предилекция към границата между окосмена и неокосмена зона (hairline zone) (Фигура 5). Прави впечатление също сравнително честото засягане на пубисната област и ингвиналните гънки (24%).



Фигура 1. Разпределение на лезиите при ДХ по засегнати области в %.



Фигура 2. Засягане на лактите при ДХ.



Фигура 2. Засягане на коленете при ДХ.

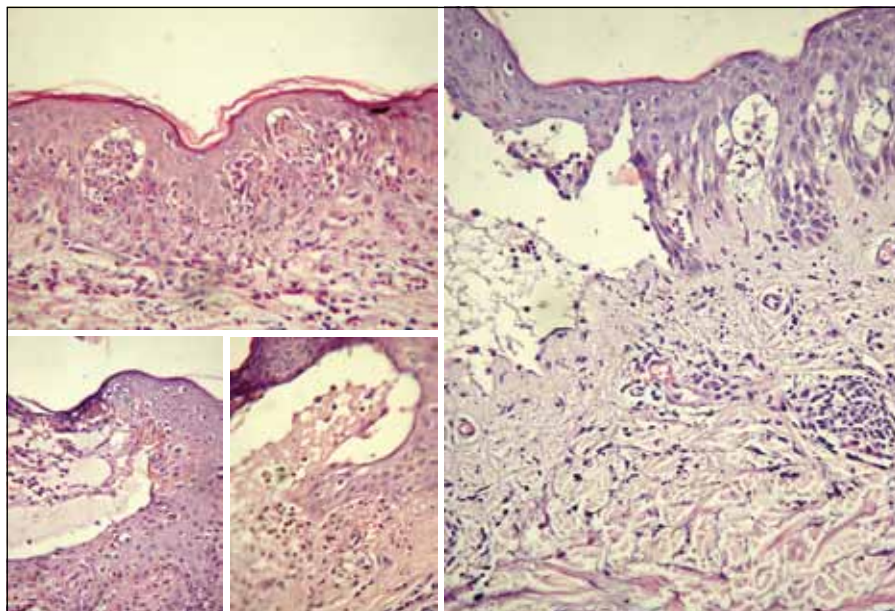


Фигура 2. Засягане на седалишето при ДХ.



Фигура 5. Засягане на главата при ДХ.

Хистологичната находка при пациентите е съвместима с ДХ, като най-често се наблюдава субепидермално отлепване и/или неутрофилни микроабсцеси в папиларна дерма (Фигура 6).



Фигура 6. Хистопатологична находка при ДХ.

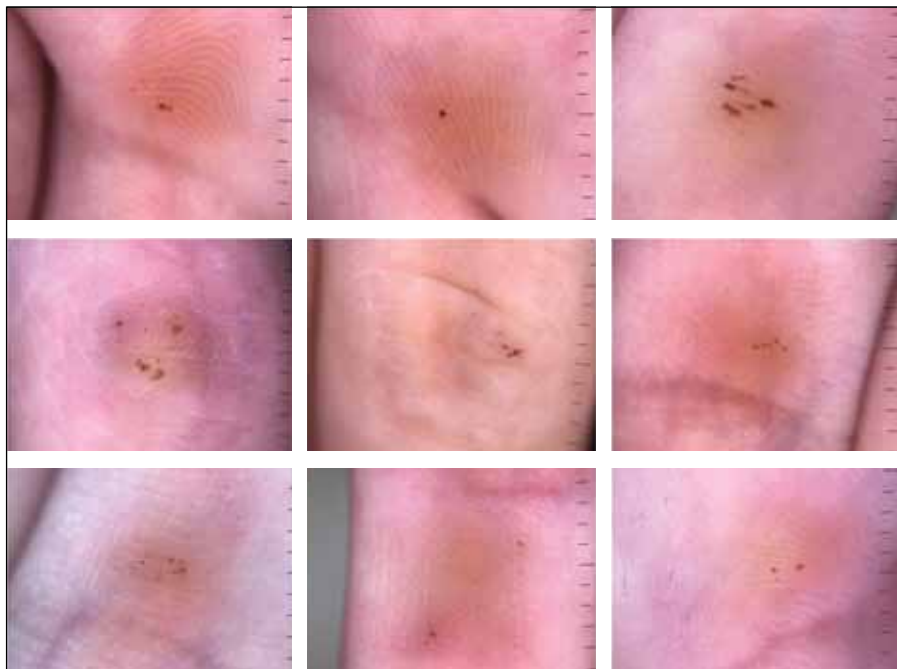
Дерматоскопският анализ обхваща 14 проспективно изследвани пациенти. При 79% се наблюдава акрална пурпура (Фигура 7 и Фигура 9), която при витропресия не изчезва (Фигура 8). При 43% от тях се регистрират и изменения в денталния статус, изразяващи се най-често с промяна на цвета на зъбите и дефекти в емайла (Фигура 10).



Фигура 7. Акрална дерматоскопия (x19).



Фигура 8. Витропресия при акрална пурпура.



Фигура 9. Акрална пурпура при пациенти с ДХ.



Фигура 10. Зъбен статус при пациент с ДХ.

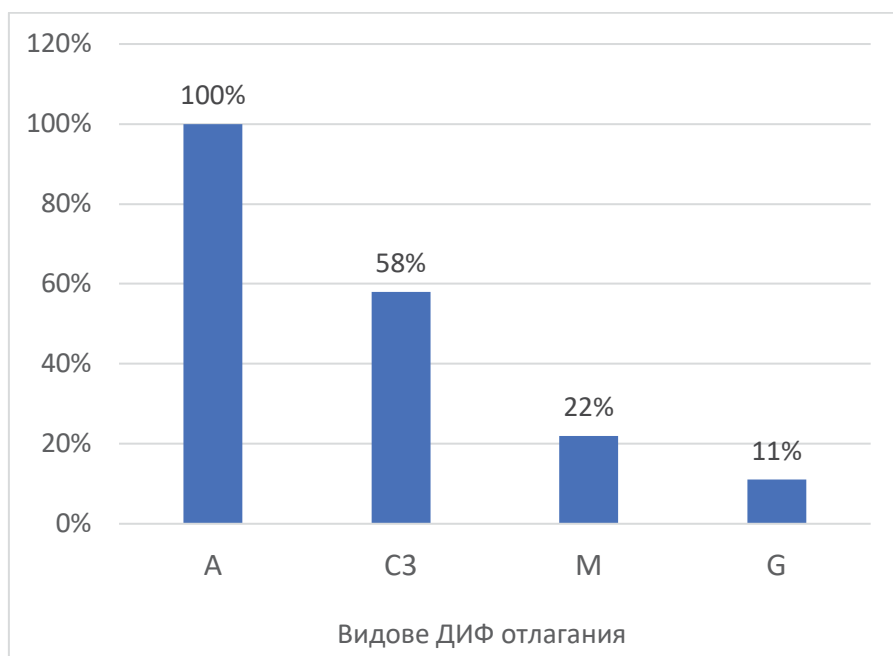
По отношение на придружаващите заболявания най-много пациенти страдат от артериална хипертония и заболявания на щитовидната жлеза, съответно 8 и 5 болни. При 4 пациента е диагностицирана ГЕ. На Таблица 7. са обединени най-честите придружаващи заболявания, документирани сред изследваните пациенти.

Таблица 7. Придружаващи заболявания.

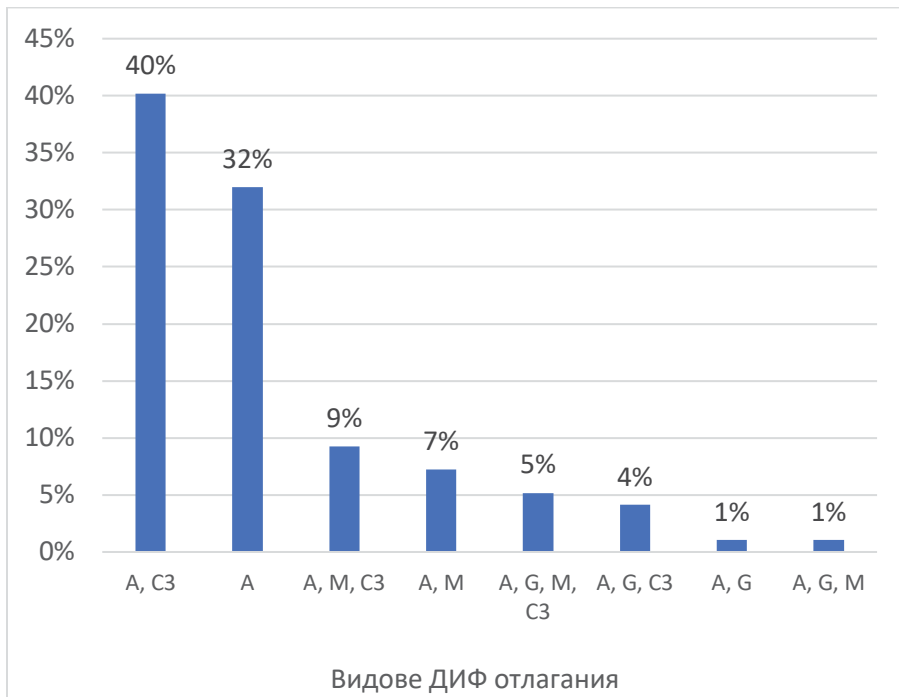
ЗАБОЛЯВАНЕ	БРОЙ ПАЦИЕНТИ
Артериална хипертония	8
Заб. на щитовидната жл.	5
Глутенова ентеропатия	4
Язва на дванадесетопръстника	3
ЗД тип 1 & витилиго	2
ЗД тип 2	2
Диабетна полиневропатия	2
Бронхиална астма	2
Тромбоцитопенична пурпура	1
Псориазис	1

4.3. Имунофлуоресцентно проучване

Анализът на ДИФ находката при всичките 97 пациента разкри някои интересни резултати. Най-честите типове имунни отлагания при ДИФ са IgA и C3 (Фигура 11), като това е и най-често наблюдаваната комбинация (40%) при пациенти с ДХ (Фигура 12).

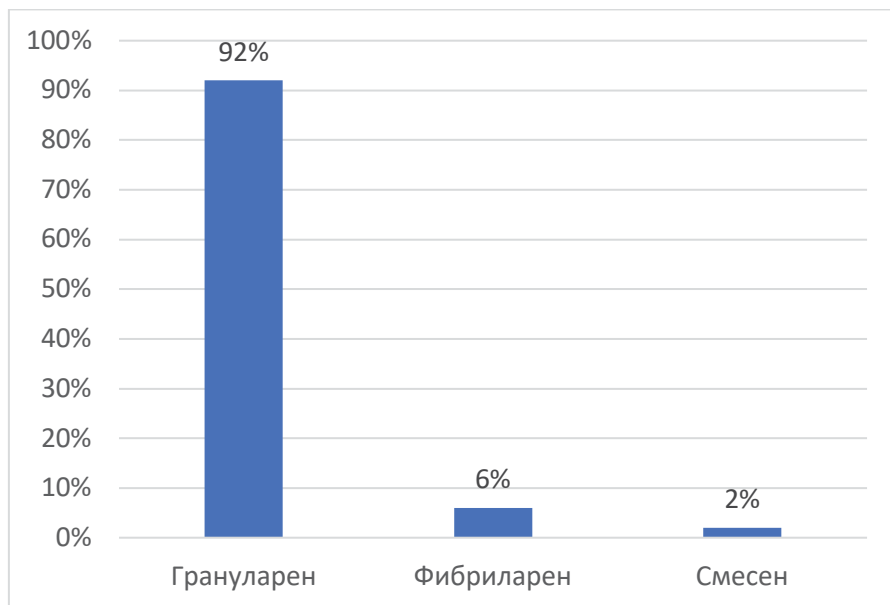


Фигура 11. Честота на отделните типове имунни отлагания при ДИФ анализ при пациенти с ДХ.



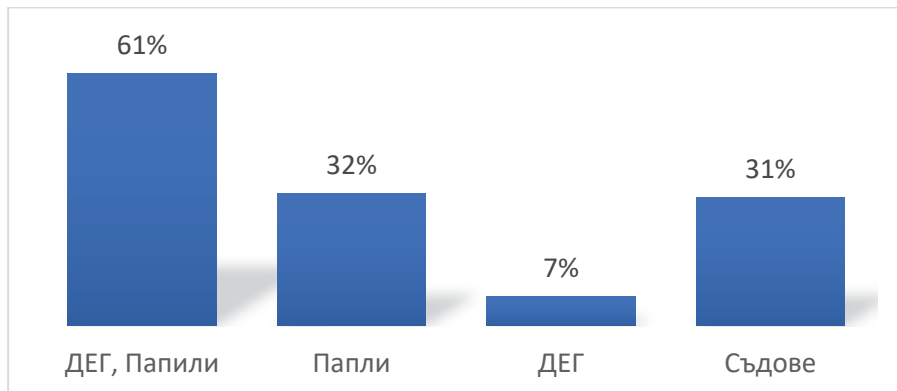
Фигура 12. Честота на комбинираните типове имунни отлагания при ДИФ анализ при пациенти с ДХ.

Грануларният тип отлагания от IgA преобладава сред българските пациенти (Фигура 13) и е патогномичен в световен мащаб за ДХ. Фибриларният тип отлагане, който е по-чест сред японската раса, се среща в 6% от изследваната българска популация (Фигура 13 и Фигура 18). Фибриларно-грануларният (смесен) вариант е най-рядък и се среща само при 2% от болните (Фигура 13 и Фигура 20).

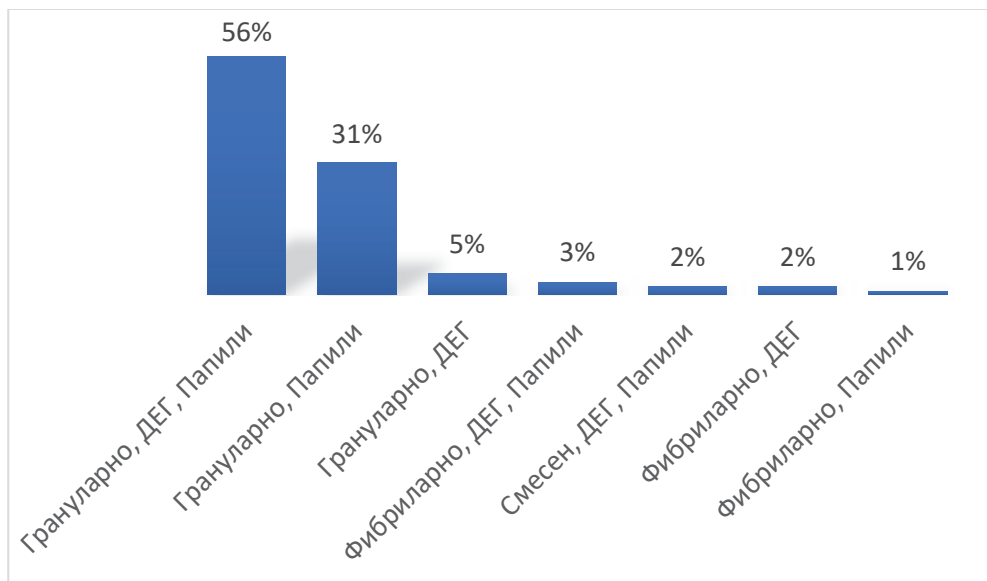


Фигура 13. Морфология на IgA имунните отлагания при ДИФ анализ при пациенти с ДХ.

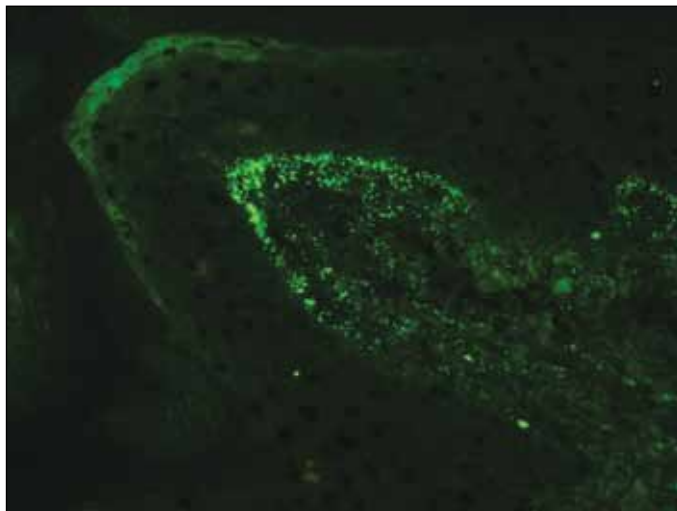
Отлагане по хода на ДЕГ с акцентуиране на дермалните папили е най-честата (61%) локализация на IgA имунните отлагания (Фигура 14). Съдови имунни отлагания има при 31% от пациентите (Фигура 14 и Фигура 19). Грануларно отлагане на IgA по ДЕГ с акцентуиране на дермалните папили е най-честата (56%) ДИФ находка (Фигура 15 и Фигура 17). При около 31% от болните се наблюдава грануларно отлагане на IgA само по дермалните папили (Фигура 15 и Фигура 16).



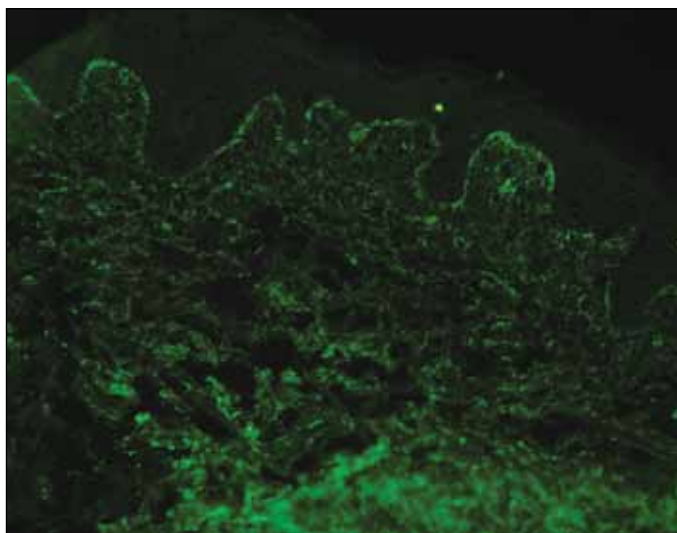
Фигура 14. ДИФ анализ на локализацията на IgA имунните отлагания и честота на съдовото засягане при пациенти с ДХ



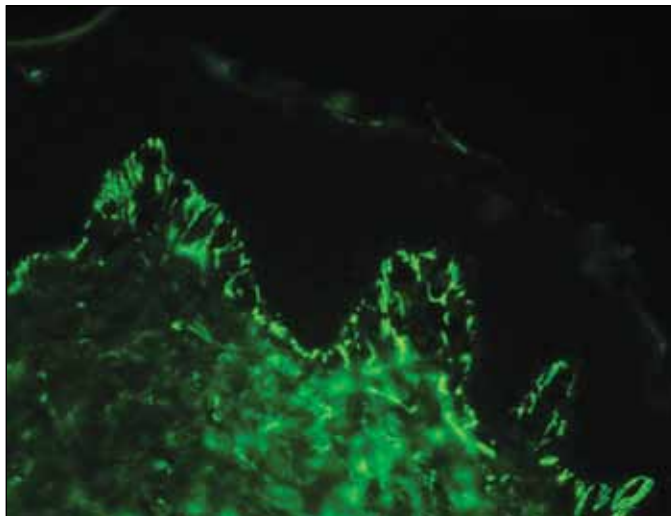
Фигура 15. ДИФ анализ на честота на IgA имунните отлагания според тяхната морфология и локализация при пациенти с ДХ.



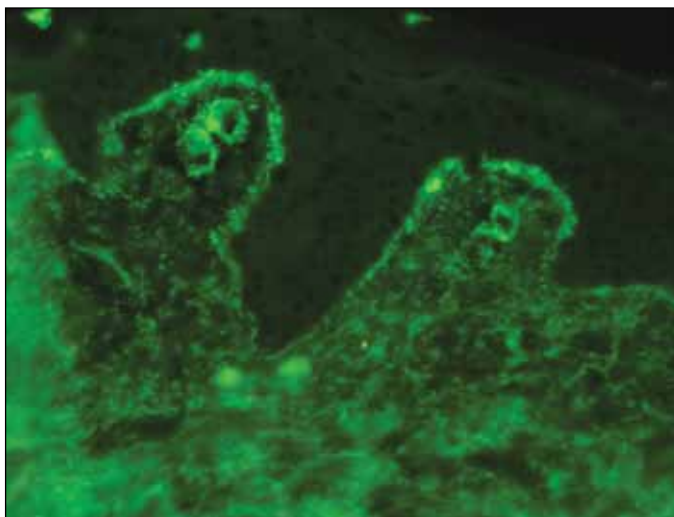
Фигура 16. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ грануларно отлагане на IgA по дермалните папили.



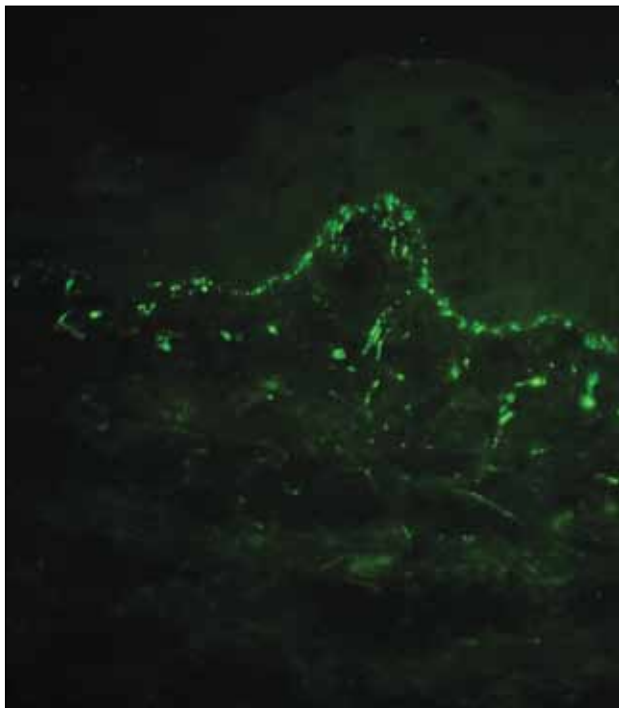
Фигура 17. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ грануларно отлагане на IgA по хода на ДЕГ с акцентуиране на папилите.а



Фигура 18. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ фибрилрно отлагане на IgA по хода ДЕГ.



Фигура 19. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ периваскуларно грануларно отлагане на IgA.



Фигура 20. ДИФ при пациент с ДХ, демонстриращ смесен тип отлагане на IgA по ДЕГ с акцентуиране на папилите.

4.4. Имуносерологично проучване

Всички проведени тестове (ELISA: anti-tTG IgA, anti-eTG IgA, anti-GAF3X IgA, anti-GAF3X IgG; ЕМА чрез ИИФ и ВЮСНІР) показват изключително висока специфичност, но варираща чувствителност (Фигура 21 и Фигура 22). В това отношение ЕМА (ВЮСНІР) и anti-tTG (ELISA) демонстрират най-високи диагностични стойности (Таблица 8 и Таблица 9). Те не само регистрират по-голямата част от болните с ДХ (висока чувствителност), но и нямат фалшиво положителни резултати (100% специфичност). Това се потвърждава от високите стойности на

PPV и NPV, които зависят от специфичността и чувствителността на тестовете. PPV показва колко от позитивните резултати наистина имат ДХ, докато NPV оценява колко от негативните резултати наистина нямат ДХ. Това са важни показатели от практическа гледна точка.

Таблица 8. Диагностична стойност на ЕМА (BIOCHIP), anti-tTG и anti-eTG от клас IgA при пациенти с ДХ.

HLA серологична специфичност	ЕМА (BIOCHIP) (95% CI)	anti-tTG (95% CI)	anti-eTG (95% CI)
Чувствителност	78.4% (61.8 – 90.2)	75.7% (58.8 – 88.2)	75.7% (58.8 – 88.2)
Специфичност	100% (96.4 – 100)	100% (96.4 – 100)	95% (88.7 – 98.4)
PPV	100%	100%	84.9% (70 – 93.1)
NPV	89.7% (74.1 – 96.3)	91.7% (86.3 – 95.2)	91.4% (85.7 – 94.9)
Точност (V)	94.2% (88.8 – 97.5)	93.4% (34.8 – 57.8)	76.9% (66 – 85.7)
LR +	∞	∞	15.14 (6.32 – 36.26)
LR -	0.22 (0.12 – 0.40)	1.14 (0.96 – 1.36)	0.26 (0.14 – 0.45)

Легенда: PPV = Positive Predictive Value; NPV = Negative Predictive Value; LR+ = Positive Likelihood Ratio; LR- = Negative Likelihood Ratio; CI = Confidence Interval.

Таблица 9. Диагностична стойност на ЕМА IgA (ИИФ), GAF3X IgA и IgG при пациенти с ДХ.

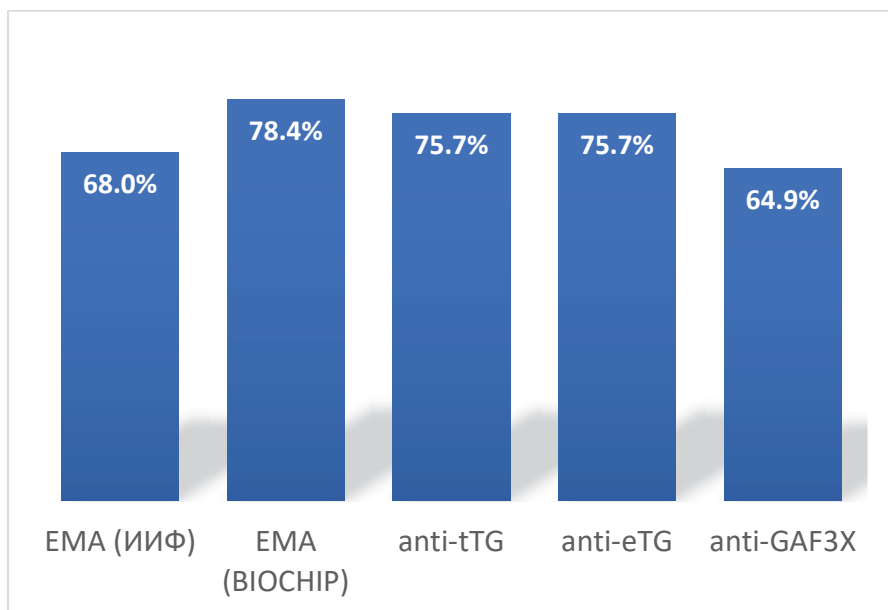
HLA серологична специфичност	ЕМА IgA (ИИФ) (95% CI)	GAF3X IgA (95% CI)	GAF3X IgG (95% CI)
Чувствителност	68% (53.3 – 80.5)	64.9% (47.5 – 79.8)	54.1% (36.9 – 70.5)
Специфичност	100% (92.9 – 100)	99% (94.6 – 100)	99% (94.6 – 100)
PPV	100%	96% (77.1 – 99.4)	95.2% (73.6 – 99.3)
NPV	75.8% (67.6 – 82.4)	88.39% (83.01 – 92.2)	85.3% (80.4 – 89.2)
Точност (V)	84% (75.3 – 90.6)	76.9% (66 – 85.7)	86.9% (80 – 92)
LR +	∞	64.86 (9.10 – 462.59)	54.05 (7.52 – 388.64)
LR -	0.32 (0.21 – 0.48)	0.35 (0.23 – 0.55)	0.46 (0.33 – 0.66)

Легенда: PPV = Positive Predictive Value; NPV = Negative Predictive Value; LR+ = Positive Likelihood Ratio; LR- = Negative Likelihood Ratio; ИИФ = Индиректна Имунофлуоресценция; CI = Confidence Interval.

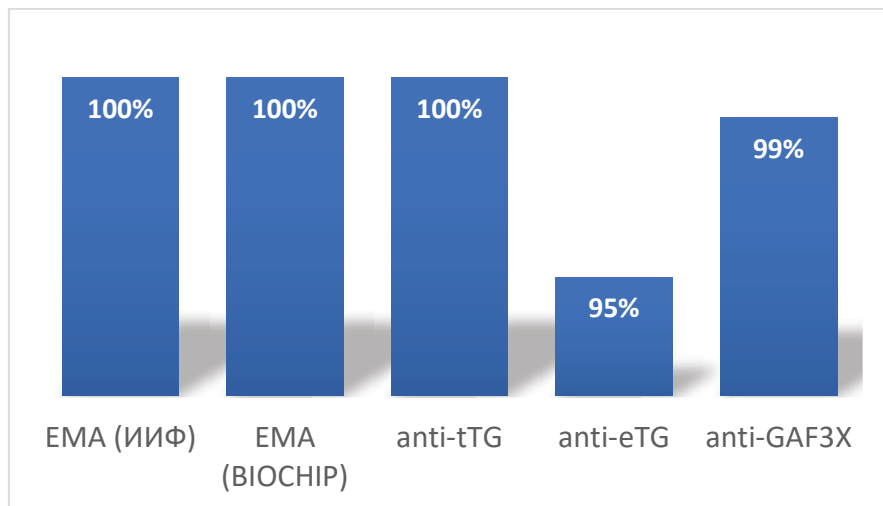
Най-ниски са чувствителностите на GAF3X, като GAF3X IgA има по-добри диагностични показатели от тези на GAF3X IgG (Таблица 9). Това донякъде е обяснимо и очаквано предвид факта, че ДХ е IgA медирана дерматоза. Тестуването за ЕМА с ВЮСНIP демонстрира по-добри диагностични показатели от тези на ЕМА чрез стандартна ИИФ. Това зависи и от качеството на субстрата от маймунски хранопровод.

Показателят *положително вероятностно отношение* (LR+) е по-нов и показва колко пъти е по-вероятно да има болест у пациент с положителен резултат. Колкото по-висока е стойността на LR+, толкова по-голяма е вероятността за откриване на заболяването. В това отношение се открояват ЕМА и tTG със стойности до безкрайност (∞) (Таблица 8 и Таблица 9). Високите им LR+ стойности в съчетание с добрата им чувствителност са особено ценни при извършване на скрининг за ДХ.

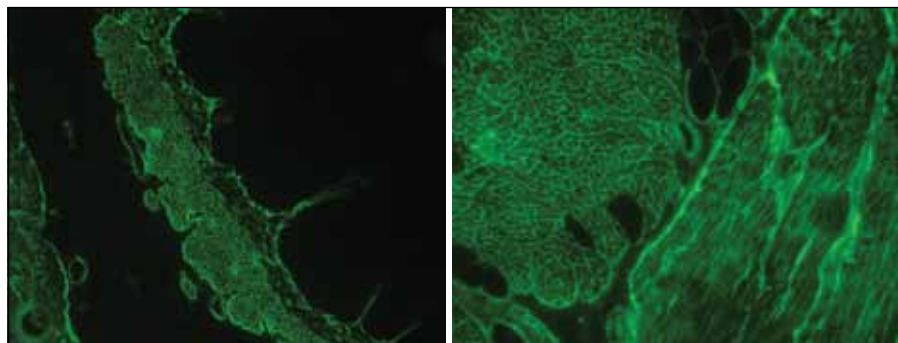
Показателят *отрицателно вероятностно отношение* (LR-) се отнася за обратна ситуация и показва колко пъти е по-вероятно при отрицателен резултат изследваният да е здрав. По този показател стойностите на ЕМА и anti-eTG са най-добри (Таблица 8).



Фигура 21. Имуносерологична чувствителност на ЕМА, anti-tTG, anti-eTG и GAF3X от клас IgA при пациенти с ДХ.



Фигура 22. Имуносерологична специфичност на EMA, anti-tTG, anti-eTG и GAF3X от клас IgA при пациенти с ДХ.



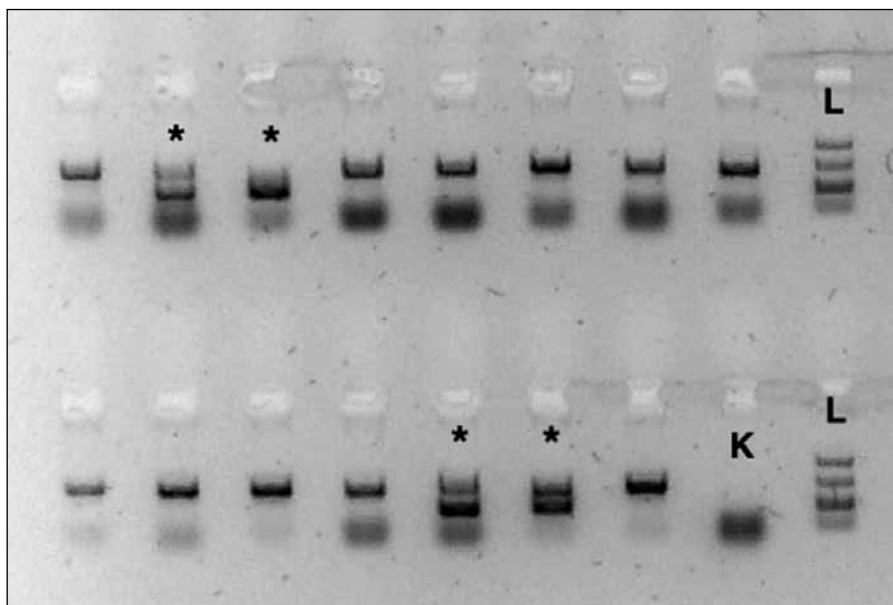
Фигура 23. ИИФ върху маймунски хранопровод, демонстрираща позитивни EMA при пациент с ДХ.

4.5. Имуногенетично проучване

HLA-DQB1 типизиране бе проведено при 37 болни с ДХ и 41 здрави контроли (Таблица 10 и Фигура 24). Резултатите показват, че сред българската ДХ популация DQB1*02 алелът и DQ2 серологичната специфичност имат предразполагащ характер, докато DQB1*03 и DQ7 играят протективна роля (Таблица 11 и Таблица 12). DQ2/DQ8 демонстрира 100% чувствителност, но много ниска специфичност (56%). Това обуславя и тяхната висока NPV от 100%, но ниска PPV (67.3%) със сравнително добра точност (V) от 76.9% (Таблица 13). От практическа гледна точка, за изключване на заболяването прави впечатление стойността на $LR(-) = 0$.

Таблица 10. HLA типизиране – изследвана популация.

	Изследвана група	Контролна група
Брой пациенти	37	41
Мъже	24 (65%)	22 (54%)
Жени	13 (35%)	19 (46%)
Особености	ДХ	клинично здрави
Материал	венозна кръв	венозна кръв



Фигура 24. Отчитане на резултати от агарозен гел при HLA типизиране чрез PCR-SSP.

Легенда: К = негативна контрола; L = Ladder = ДНК маркер, съдържащ фрагменти с точно определен размер. Гнезда * съдържат праймери, които амплифицират HLA-DQB1*02 (DQ2) и DQB1*06 (DQ6) алели.

Таблица 11. HLA типизиране при пациенти с ДХ.

		честота ДХ пациенти 2n = 74	честота Контролна група 2n = 82	OR	Pc
HLA-алелна група	DQB1*02	0.55405	0.17073	4.82	Pc<0.001
	DQB1*03	0.13514	0.39024	0.20	Pc<0.001
	DQB1*04	0	0.03659		ns
	DQB1*05	0.16216	0.21951		ns
	DQB1*06	0.14865	0.18293		ns
Серологична специфичност	DQ2	0.55405	0.17073	4.82	Pc<0.001
	DQ4	0	0.03659		ns
	DQ5	0.16216	0.21951		ns
	DQ6	0.14865	0.18293		ns
	DQ7	0.09459	0.26829	0.27	Pc<0.001
	DQ8	0.05405	0.09756		ns
	DQ9	0	0.02439		ns

Легенда: OR = odds ratio; Pc = коригирана P ст-т по Бонферони при множествени сравнения; ns = несигнификантна разлика

Таблица 12. Предразполагащи и протективни HLA алели и серологична специфичност.

	HLA алел/серологична специфичност	OR	Pc
Предразполагащи	DQB1*02	4.82	Pc<0.001
	DQ2	4.82	Pc<0.001
Протективни	DQB1*03	0.20	Pc<0.001
	DQ7	0.27	Pc<0.001

Таблица 13. Диагностична стойност на HLA DQ2 и DQ8.

HLA серологична специфичност	DQ2 (95% CI)	DQ8 (95% CI)	DQ2/8 (95% CI)
Чувствителност	91.9% (78.1 – 98.3)	8.1% (1.7 – 21.9)	100% (90.5 – 100)
Специфичност	63.4% (46.9 – 77.9)	80.5% (65.1 – 91.1)	56.1% (39.8 – 71.5)
PPV	69.4% (60 – 77.4)	27.2% (9.7 – 56.7)	67.3% (59.3 – 74.4)
NPV	89.7% (74.1 – 96.3)	49.3% (44.8 – 53.7)	100%
Точност (V)	76.9% (66 – 85.7)	46.2% (34.8 – 57.8)	76.9% (66 – 85.7)
LR +	2.51 (1.66 – 3.80)	0.42 (0.12 – 1.45)	2.28 (1.61 – 3.22)
LR -	0.13 (0.04 – 0.39)	1.14 (0.96 – 1.36)	0

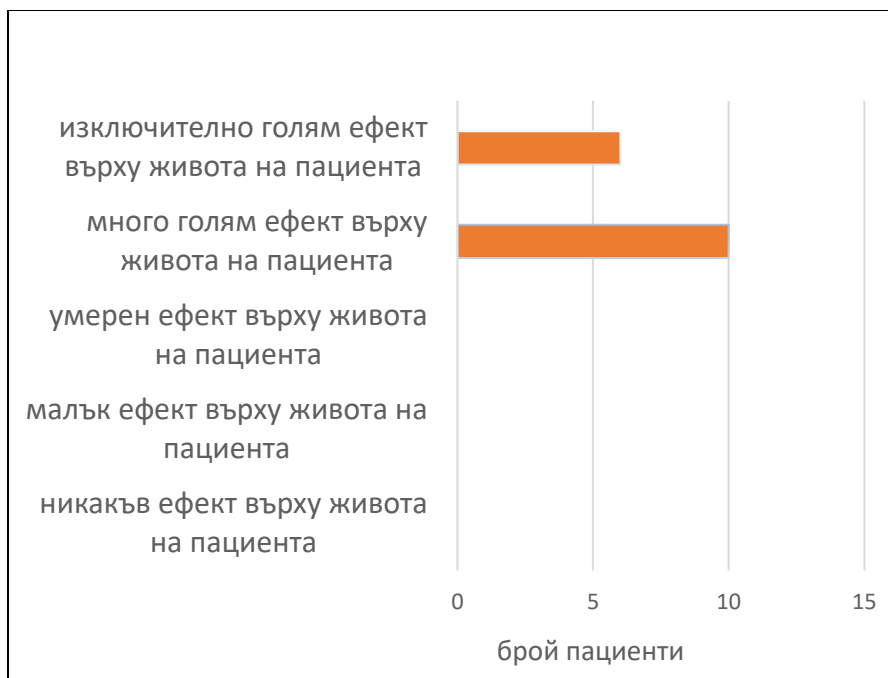
Легенда: PPV = Positive Predictive Value; NPV = Negative Predictive Value; LR+ = Positive Likelihood Ratio; LR- = Negative Likelihood Ratio; CI = Confidence Interval.

4.6. Качество на живот

Всички 16 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 19. Според инструкциите за тълкуване на резултатите от DLQI този резултат означава, че ДХ има „много голям ефект върху живота” на пациентите в изследваната група.

ДХ има „много голям ефект върху живота на пациента” в 10 от 16 случая в изследваната група. Шест от пациентите са отбелязали отговори, които показват „изключително голям ефект” на заболяването върху живота (Фигура 25). В групата от пациенти, попълнили въпросника, липсват такива, върху които заболяването да няма „никакъв ефект”.



Фигура 25. Качество на живот при пациенти с ДХ

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 систематизирани в Таблица 14.

Таблица 14. DLQI резултати по категории.

Категория	Въпроси	Резултат* (точки)	Тежест** (%)
Симптоми и чувства	1 и 2	5	83%
Ежедневни дейности	3 и 4	3.1	52%
Свободно време	5 и 6	3	50%
Работа и училище	7	1.7	57%
Лични взаимоотношения	8 и 9	4.1	68%
Лечение	10	1.8	60%

* осреднен резултат в точки за категорията

**осреднен процент от максималния брой точки за категорията

5. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Епидемиологично проучване

ДХ се среща най-често при пациенти от северноевропейски произход, като разпространението в определени популации надхвърля 39 на 100 000 души, а новооткритите случаи достигат до 2.6 на 100 000 души годишно. Повечето епидемиологични проучвания показват, че заболяването засяга до два пъти по-често мъже, отколкото жени. ДХ се развива във всички възрасти, но по-често у млади индивиди на възраст между 30-40 години.

Липсват систематизирани епидемиологични и демографски данни за страната ни. Резултатите потвърждават, че ДХ е сравнително рядка диагноза сред българското население (6 случая на година) и една от по-редките АИБД (7%). На тези факти може би се дължи и прекомерното забавяне на диагнозата от средно 3 години. Средно повече мъже (1.7 : 1) заболяват от ДХ, но това не е валидно за възрастовия диапазон до 20 г., където преобладават жените. Тези резултати съответстват на публикуваните данни сред кавказката популация. Интересен е фактът, че най-много болни попадат във възрастовия диапазон между 61-70 г, където съотношението мъже : жени почти се изравнява (1.2 : 1), тъй като това е и групата с най-много новодиагностицирани жени. Тези резултати са по-високи от повечето публикувани данни. Въпреки това, от ДХ боледуват всички възрастови групи. Прави впечатление, че болшинството от пациентите с ДХ са етнически българи, докато малцинствата са представени предимно от етнически турци. Това е в противовес с данните за българските пациенти с пемфигус, където преобладават етническите българи, но ромската популация е преобладаваща сред малцинствата.

5.2. Клинични проучвания

ДХ се характеризира със силно сърбящ полиморфен обрив, който се локализира симетрично, предимно по кожата на екстензорните повърхности на крайниците, гърба и седалищната област. Често са налице еритем, папули и уртикариални плаки, като обикновено обривът се предшества от сърбеж и парене. Типичните херпетиформно сгрупирани везикули върху еритемна основа рядко се наблюдават интактни, поради сърбящия характер на лезиите. Мехурите обикновено се разкъсват при разчесване и техният ексудат засъхва с образуване на корусти. Често се наблюдава постлеззионелна дисхромия. Нерядко по лигавицата на устната кухина се наблюдават афтозни промени, както и аномалии в зъбния статус, които включват различни по степен дефекти на емайла и по-често развитие на зъбни кариеси. Данните от клиничното проучване потвърждават, че ДХ е сърбяща дерматоза, която практически може да засегне почти всяка област на тялото, но най-често ангажира крайниците и много рядко лигавиците. Установи се сравнително често засягане на главата в областта на границата между гладка кожа и капилициум (hairline zone) (Фигура 5). Този тип на засягане много наподобява емблематичните в дерматологията „корони“ - psoriatica/seborrheica/Veneris (syphilitica). Това ни даде основание да предложим понятието „corona herpetiformis“. Диагностицирането на пациенти с ДХ в България не е своевременно и се забавя средно с цели 36 месеца. Тези факти допринасят за наблюдавания еволютивен полиморфизъм на кожните лезии.

В литературата има предимно единични докладвани случаи на акрална пурпура сред ДХ пациенти. Систематизираното ни проучване показва, че акралната дерматоскопия демонстрира висока чувствителност при българските пациенти с ДХ. Тези наблюдения направиха възможно включването на акралната пурпура като клиничен критерий в първия европейски консенсус за ДХ (S2k guideline for diagnosis and therapy of dermatitis herpetiformis, финансиран от EADV, в процес на финализиране). Тъй като наблюдаваната пурпура често е

незабележима с невъоръжено око, препоръчва се рутинно провеждане на акрална дерматоскопия при суспектни за ДХ пациенти.

При болните с ДХ може да се проявят и белези на ГЕ с основен симптом стеаторея, поради нарушеното смилане на мазнините, както и дефицит на желязо и витамини. Освен подлежащата цьолиакия, ДХ често се асоциира и с други заболявания. Познаването на асоциираните заболявания и свързаните рискове е изключително важно за правилното проследяване на пациенти с ДХ. Изследваните български пациенти с ДХ страдат предимно от артериална хипертония, заболявания на щитовидната жлеза, ГЕ и захарен диабет (Таблица 7). Имайки предвид, че ДХ е кожна форма на Ц, диагнозата на ГЕ не е изненадваща. Литературните данни потвърждават, че няколко състояния, включително автоимунни заболявания като тиропатии, захарен диабет тип 1, Адисонова болест и мултиендокринни синдроми, както и лимфопролиферативни заболявания и хипоспленизъм, демонстрират повишено разпространение при пациенти с Ц и ДХ. Сред тях най-често се наблюдава субклинична тиреоидна болест. Поради тази причина, всички пациенти с ДХ трябва да бъдат насочено изследвани в насока заболяване на щитовидната жлеза, поне чрез измерване на TSH. Тъй като лимфопролиферативните заболявания са по-малко разпространени при ДХ, отколкото при Ц, рутинна оценка в насока лимфоми не се препоръчва, освен ако няма клинично подозрение.

Интересен факт е, че пациентите с ДХ имат по-ниска от очакваната коригирана спрямо възрастта смъртност, вероятно като резултат от променената диета и начин на живот в резултат на болестта. Въпреки това, диетата на пациенти с ДХ остава предимно личен избор в съчетание с териториални възможности и национални регулации. Доказано е, че диетата на болните от цьолиакия се основава на регионалните традиции и стилове за приготвяне на храна. Безглутеновите продукти често имат по-високи нива на липиди, захар и сол, за да подобрят вкусовите качества и консистенция на храната, което може да доведе до прекомерна консумация на хиперкалорични и хиперлипидни храни при пациенти с ДХ. Това може да има

отрицателно въздействие върху кардиометаболичните рискови фактори като затлъстяване, серумни липидни нива, инсулинова резистентност, метаболичен синдром и атеросклероза. В допълнение, лечението с дапсон може да има тежки странични ефекти при пациенти със сърдечно-съдови заболявания.

Следователно, при мъже над 40 и жени над 50-годишна възраст медицинската история следва да се фокусира върху рисковите фактори за сърдечно-съдови заболявания (тютюнопушене, хипертония, диабет, хиперлипидемия и хиперурикемия) и върху оценката на сърдечно-съдовия статус по време на диагностициране и проследяване.

Тълкуването на хистологичната находка при пациенти с ДХ само по себе си не е лесен процес. При изследваните български пациенти най-често се наблюдаваше субепидермално отлепване и/или неутрофилни микроабсцеси в папиларна дерма. През 50^{те} години на 20^{ти} век, Pierard описва струпването на неутрофили в дермалните папили, което е значително изразено при по-свежи уртикариални лезии. В днешно време микроабсцесите на Pierard са отличителен хистопатологичен белег при пациенти с ДХ. Понякога във възпалителния инфилтрат може да присъстват еозинофили, което затруднява диференциалната диагноза с булозен пемфигоид. В практическо-диагностичен план, за хистологичен анализ се препоръчва взимането на кожен материал от еритемен или еритемо-папулозен участък в съседство до мехур. Това дава възможност за отграничаване на микроабсцесите на Pierard в хистологичния препарат. При биопсиране на везикули се демонстрира субепидермален мехур, което затруднява разграничаването на ДХ от други булозни дерматози със сходно ниво на разцепване.

Трябва да се отбележи, че хистопатологичната картина от кожна лезия е по-скоро с насочващ, отколкото с диагностичен характер, тъй като се наблюдава сходство с находката при други АИБД като линейната IgA булозна дерматоза и булозната епидермолиза. В допълнение, Warren и Cockerell демонстрират, че хистопатологичната картина е неспецифична при над 30% от случаите, разкриваща само периваскуларен лимфоцитен инфилтрат и минимално възпаление в

дермалните папили. За златен стандарт в диагностиката на ДХ е прието наличието на положителна ДИФ находка, поради което хистопатологичното изследване следва винаги да се извършва успоредно с ДИФ на перилезионелна кожа.

5.3. Имунофлуоресцентно проучване

През 1969 г. Van der Meeg описва наличието на грануларни отлагания от IgA в папиларна дерма при пациенти с ДХ, което позволява за първи път неговото отдиференциране от линейната IgA булозна дерматоза. При пациенти с ДХ се срещат няколко специфични ДИФ модела: 1) грануларно отлагане на IgA в купола на дермалните папили; 2) грануларно отлагане на IgA по ДЕГ; 3) грануларно отлагане на IgA по ДЕГ с акцентуиране на дермалните папили; 4) фибриларно отлагане на IgA, предимно в областта на дермалните папили. Последният тип отлагане се среща по-често при пациенти от азиатски произход. Други видове имунни отлагания, които могат да бъдат наблюдавани при ДИФ, са наличието на периваскуларни IgA депозити в горна дерма, както и на грануларно отлагане на IgM или С3 по ДЕГ и/или в дермалните папили.

Находката от ДИФ анализа сред българската популация показва сходства с описаните в литературата резултати сред кавказката раса, но и в същото време се наблюдават и някои особености. За първи път се описват 3 вида отлагания на IgA сред българската популация с ДХ, а именно грануларен, фибриларен и смесен. Най-често срещаният вид имунни отлагания на IgA, установен чрез ДИФ при българските пациенти с ДХ, е грануларният тип с локализация по хода на ДЕГ и в купола на дермалните папили (Фигура 17). Макар и рядко, фибриларният тип IgA отлагания, характерен за японските пациенти с ДХ, се среща и в българската популация (Фигура 18). Видовете и начинът на отлагане на IgA са разнородни сред българската популация

с ДХ и тяхното разпознаване и определяне е важно за своевременната и точна диагноза на заболяването.

ДИФ при ДХ има някои специфики, които са от изключителна важност за интерпретация на резултатите и последваща диагноза. Биопсия за ДИФ при ДХ следва да се извършва върху перилезионелна кожа, тъй като в областта на лезиите е възможно отстраняване на имуноглобулините от възпалителните клетки. В допълнение, пациентите, подлежащи на биопсия, трябва да бъдат на нормална диета, поради риск от изчезване на отлаганията от IgA в кожата. Ако пациентът е на безглутенова диета, трябва да се приложи нормална диета и биопсията да се извърши най-рано след един месец.

ДИФ при ДХ има диагностична чувствителност и специфичност близки до 100%. Освен това, съгласно насоките на ESPGHAN, положителен ДИФ при пациент със съмнение за ДХ позволява диагностициране на ГЕ без необходимост от дуоденална биопсия. Фалшиво-негативни резултати се наблюдават при по-малко от 5% от биопсичните проби. В случай на негативен ДИФ при високо-суспектни за ДХ пациенти се препоръчва ревизиране на мястото за биопсия. В изолирани случаи в литературата се съобщава за пациенти с ДХ и негативен ДИФ. В подобни ситуации, комбинацията от клинични, хистопатологични и серологични данни, заедно с цялостно изследване в насока ГЕ, може да подпомогне поставянето на коректна диагноза.

5.4. Имуносерологично проучване

Имуносерологичните методи се използват за скрининг, диагностика и проследяване на пациенти с ДХ и ГЕ. Пациентите с ДХ обикновено позитивират повечето специфични за ГЕ антитела. Специфичните циркулиращи антитела са най-често от клас IgA и порядко IgG. Сред тях, ЕМА, anti-tTG и anti-eTG антителата се считат за най-чувствителни и специфични и трябва да бъдат изследвани като

първа линия на серологично тестване при пациенти със съмнение за ДХ. В допълнение, титърът на антиендомизиумните и анти-tTG антителата корелира със степента на кожното засягане и с тежестта на асоциираната глютен-сензитивна ентеропатия. При пациенти с негативен резултат за серумни анти-tTG антитела, глютеновата провокация води до позитивиране на антителата. Нашите резултати потвърждават високата диагностична стойност на ЕМА, anti-tTG и anti-eTG при пациенти с ДХ. Anti-ЕМА, anti-tTG и anti-eTG IgA-антителата демонстрират добра специфичност за диагнозата ДХ. Поради спецификата на методиката, те могат да се използват както за диагностика, така и за имуно-серологичен скрининг на пациентите с ДХ.

Известните от миналото IgA-антиглиадинови (AGA) и IgA-антиретиккулинови (ARA) антитела понастоящем имат ограничено диагностично приложение, тъй като не са достатъчно специфични за заболяването. Новото поколение деамидирани глиадинови антитела anti-DGP и anti-GAF3X не показват по-добри диагностични показатели за ДХ в сравнение с ЕМА, anti-tTG и anti-eTG. Настоящите резултати и публикувани такива потвърждават това твърдение. Следователно, на този етап не може да препоръчаме изследването на anti-GAF3X в рутинната практика за диагностициране на ДХ.

5.5. Имуногенетично проучване

Редица проучвания демонстрират, че ДХ и ГЕ се срещат у генетично предразположени индивиди, носители на HLA DQ2 или DQ8. Наличието на двата алела осигурява чувствителност близка до 100% с висока отрицателна прогностична стойност, т.е. при индивиди, които не носят нито един от гореспоменатите алели може да се изключи диагнозата ДХ и ГЕ. От друга страна, DQ2 и DQ8 алелите се срещат при около 30% от общата популация, което обуславя ниската им

положителна прогностична стойност по отношение на диагностицирането на ДХ.

Проведеното имуногенетично проучване потвърждава, че HLA DQ2/DQ8 демонстрира висока NPV и ниска PPV сред българската популация. Поради тази причина HLA типизирането не е подходящо за рутинната диагностична практика, но е ценно изследване за изключване на ДХ и при български пациенти. Тези резултати са съпоставими с литературните данни относно кавказката раса, и са сравнително приложими сред нашите географски ширини. От друга страна, азиатските пациенти демонстрират различни резултати при HLA типизиране и това трябва да се има предвид от практическа гледна точка, предвид имиграцията и широката глобализация. Интересен е резултатът, че HLA DQ7, който в българската популация в хаплотип с DRB1*11 е протективен за развитие на различни автоимунни заболявания (пемфигус, системен лупус еритематозус, инсулинзависим захарен диабет, множествена склероза), има статистически значим протективен ефект и при ДХ.

5.6. Диагностичен алгоритъм

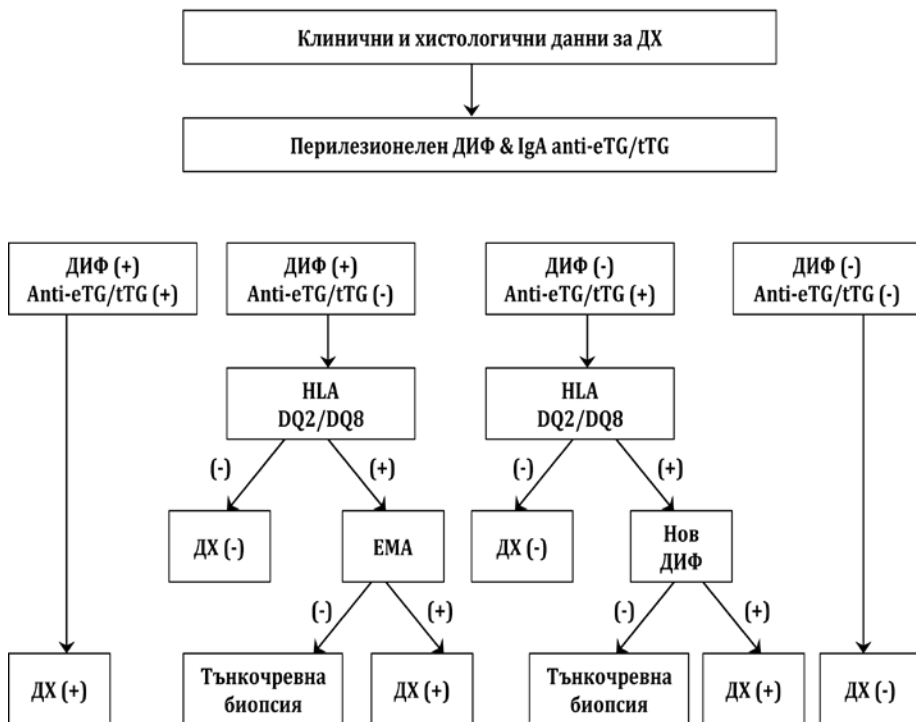
На база получените резултати и данни от множество клинични, хистологични, имунохистохимични, генетични и серологични проучвания, натрупани през последните две десетилетия, се изработи съвременен диагностичен алгоритъм за диагноза на ДХ (Фигура 26). При пациенти с клинични и/или хистопатологични данни за ДХ следва да се проведе ДИФ от перилезионелна кожа и серологични изследвания на anti-eTG, или anti-tTG антитела, успоредно с общ титър на IgA. В зависимост от находката диагностичният алгоритъм следва определени насоки:

1) При типична ДИФ находка и при положителни тестове за anti-eTG или anti-tTG може да се потвърди диагнозата ДХ и съответно ГЕ.

2) В случай на типични ДИФ резултати, но отрицателни anti-eTG/tTG антитела се препоръчва HLA типизиране (HLA DQ2 и DQ8). При отрицателни HLA резултати ДХ може да бъде изключен, но при положителни такива, пациентите трябва да бъдат допълнително изследвани. По-конкретно, налага се изследване на ЕМА антитела, с цел изключване на предишен фалшиво-отрицателен резултат за anti-eTG или anti-tTG антитела. Положителни ЕМА антитела са потвърдителни за ДХ. При отрицателни стойности следва да се спазват указанията за диагностициране на ГЕ, включително прилагането на тънкочревна биопсия.

3) В случай на негативен ДИФ и наличие на anti-eTG/tTG антитела, се препоръчва HLA типизиране. При отрицателен резултат, диагнозата ДХ може да бъде изключена. При положителен такъв, пациентите следва да бъдат допълнително изследвани посредством нова перилезионелна кожна биопсия за ДИФ, с цел изключване на фалшиво-отрицателни резултати, дължащи се на неправилен избор на кожен участък при предишната кожна биопсия. В случай, че повторният ДИФ показва типични данни за ДХ, диагнозата може да бъде потвърдена. При повторен негативен резултат, в съответствие с указанията за диагностициране на ГЕ, се препоръчва биопсия на дванадесетопръстника.

4) При негативен ДИФ и отрицателни anti-eTG/tTG, ДХ следва да бъде изключен и клиничните и хистопатологични находки на пациентите трябва да бъдат преразгледани в насока диагноза на друго заболяване.



Фигура 26. Диагностичен алгоритъм при ДХ.

Anti-eTG, anti-TTG и ЕМА показват най-високи и сравними диагностични показатели по отношение на ДХ. Поради тази причина, достъпността на даденото изследване определя използването му. Изследването на ЕМА е по-трудоемко и изисква специализиран персонал, поради което условно е поставено по-надолу в диагностичния алгоритъм.

Различните глиадинови антители, в това число и деамидираните като anti-GAF3X, демонстрират ниска диагностична стойност по отношение на ДХ. Поради тази причина, те не намират основно място в съвременния диагностичен алгоритъм.

Наличието на IgA се счита за изискване в патогенезата на ДХ. Към днешна дата не се съобщават за случаи на пълен IgA дефицит при ДХ. Има доклади за частичен IgA дефицит, който не пречи за формирането на достатъчно високи титри от специфични IgA антитела и развитието на ДХ. Поради тази причина, изследването на тоталните нива на IgA е препоръчително, но не е задължително.

Провеждането на хистологично изследване не е със задължителен характер при поставянето на диагнозата, но предоставя ценна информация в диференциално-диагностичен план.

Тъй като ДХ се възприема за кожна проява на ГЕ, според най-актуалните консенсуси за заболяването се възприема, че при пациент с доказана диагноза ДХ, не е необходимо провеждане на дуоденална биопсия за потвърждаване на ГЕ. Въпреки това, при съмнителни случаи на ДХ трябва да се приложат всички диагностични методи, които са необходими за диагностициране на ГЕ, включително биопсия на дванадесетопръстника. Такава биопсия трябва да се извърши и в случай на предполагаеми стомашно-чревни усложнения, в т.ч. лимфом.

5.7. Стандартизирани скали

На този етап няма специализирани скали и въпросници за оценка на тежестта и качеството на живот при пациенти с ДХ. В процеса на търсене бяха установени две неточности. При ABSIS, скалата за оценка на тежестта при хранене е обърната. На въпрос номер 7 от DLQI, отговор „Много“ трябва да се промени на „Доста“, за да съответства на общата легенда за точкуване. Правилното точкуване е описано в Таблица 2. Съответните автори на ABSIS и DLQI са уведомени за откритите неточности.

5.8. Качество на живот

Качество на живот при дерматитис херпетиформис

Средната стойност на DLQI от 19 в изследваната група показва, че ДХ има *„много голям ефект върху живота“* на пациентите. На пръв поглед резултатът не изглежда напълно логичен, с оглед на факта, че се касае за болни със сравнително по-леко засягане на кожата в сравнение с други АИБД като пемфигус и булозен пемфигоид. Предвид данните, че диагнозата на ДХ в България се забавя около 3 години в комбинация с обикаляне по лечебни заведения, включване на неефективни терапии и субективни оплаквания като интензивен сърбеж, допринасят за нарушаване на нормалния ежедневен ритъм.

Шест 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 показва необходимостта да се обръща внимание както на обективните клинични данни, така и на субективните усещания на болните.

Тълкуване на отделните категории на DLQI въпросника

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

Изключително разнообразни са причините за значителното понижаване на качеството на живот във всички негови аспекти, измерено чрез въпросника DLQI и това се дължи на множество взаимосвързани фактори.

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

Субективните усещания отстрана на кожата биха могли да доведат до сериозни и дълготрайни нарушения в съня на болните, до влошаване на концентрацията, затрудняване извършването на нормални служебни дейности, а в някои случаи и до невротизиране. Непреодолимото желание за намаляване на тези симптоми може да доведе до непрестанно разчесване на кожата, включително и на публични места, на работното място и др.

Във втория въпрос от категорията са обобщени редица проблеми, с които болните от хронични дерматози се сблъскват ежедневно. Смущението от лезии по откритите части на тялото може да е изключително голямо, дори и пораженията по кожата да са с малки размери. В българското общество лисват достатъчна информираност по отношение на кожните болести, които интуитивно се възприемат от околните като „заразни”, поради което болните с хронични дерматози, имащи патологични изменения по кожата на видими места, ежедневно се сблъскват с негативно отношение.

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, 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. Подготовката за самото постъпване в болницата също отнема време и влияе върху обичайните дейности, които пациентът извършва.

Изборът на дрехи в голяма степен зависи от наличието на лезии по видимите части на кожата – крайници, лице, капилициум. Промените по кожата могат да доведат до силни неприятни усещания при допир с дрехите. Някои болни се принуждават да носят дрехи, покриващи крайниците им дори в най-топлите месеци на годината.

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. Отсъствието на болния от работното му място за дълги периоди от време води до финансови загуби, както и до проблеми с работодателя.

Категория „Свободно време“ включва въпроси, които се отнасят до социалните контакти на пациентите и практикуването на различни видове спорт. В тази категорията се намери умерено засягане при пациентите в изследваната група.

В категорията „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 винаги се включват най-близките хора на пациента – партньора, роднините, понякога 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 от всякакво естество. 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 определят като най-големия сексуален орган. Болната кожа намалява самочувствието, а в някои случаи води до отблъскване на сексуалния партньор. В нашето проучване голяма част от болните са посочили отговор „много“ на въпроса „До каква степен състоянието на кожата ви причини затруднения в сексуалния ви живот?“.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Независимо от многобройните проучвания, проведени през последните 130 години, патогенетичните механизми на херпетиформния дерматит все още остават енигма за медицинската наука. Вероятни причини за това са ниската честота и хетерогенен характер на заболяването. Въпреки това, последните две десетилетия бележат неимоверен прогрес, както в етиопатогенетичен аспект, така и в клинично-диагностична насока.

Проведеното епидемиологично проучване поставя ДХ сред по-редките АИБД. Етническото стратифициране трасира насоки за бъдещи изследвания на засегнатите групи. Клиничните проучвания изясняват предилекционните места на засягане, еволутивния полиморфизъм на кожните промени и насочват вниманието към рядко изследвани прояви като тези на дентицията. Установява се, че акралната дерматоскопия е сравнително бърз, лесно достъпен и достоверен метод при диагностиката на ДХ, който позволява визуализиране на характерни пурпурични изменения по кожата на пръстите на ръцете и краката. Направените генетични изследвания разкриват, че HLA DQ2/DQ8 типизирането е изключително полезен скриниращ инструмент сред българската популация в случаите на необходимост от изключване на заболяването.

Описаните имунофлуоресценти находки са от изключителна важност, имайки предвид, че ДИФ е златният стандарт за поставяне на диагнозата на ДХ. Видовете и начинът на отлагане на IgA са разнородни сред българската популация с ДХ и тяхното разпознаване и определяне е важно за своевременната и точна диагноза на заболяването. Циркулиращите ЕМА, anti-tTG и anti-eTG се оказват имуносерологични маркери с много добра диагностична стойност сред българската популация. Познаването на асоциираните заболявания и терапевтични опции е важно за правилното проследяване на пациентите с ДХ.

Не на последно място, качеството на живот на българските пациенти с ДХ е силно засегнато. За този факт допринася също забавянето на диагнозата, което нарушава цялостния ежедневен ритъм на пациентите за по-продължителен период.

Надяваме се, че тези данни ще допринесат за по-доброто разбиране на ДХ сред българската популация и за своевременното поставяне на диагнозата.

7. ИЗВОДИ

1. ДХ остава сравнително рядко заболяване, което се среща във всички възрастови групи.
2. ДХ демонстрира по-висока честота при мъжкия пол, но това не е валидно за възрастовия диапазон под 20 г. Изненадващо, най-много болни попадат във възрастовата група между 61-70 г, където съотношението на половете почти се изравнява.
3. ДХ е сърбяща дерматоза, която практически може да засегне почти всяка област на тялото, но най-често засяга крайниците в областта на лакти и колене и изключително рядко лигавиците. Сравнително често се засяга границата между гладка и окосмена кожа на главата под формата на „корона херпетиформис“. Нерядка локализация на лезиите са пубисната област и ингвиналните гънки.
4. Акралната дерматоскопия демонстрира висока чувствителност при пациенти с ДХ. Тъй като акралната пурпура често е незабележима с невъоразено око, препоръчва се рутинна дерматоскопия при суспектни за ДХ пациенти.
5. Най-често срещаният вид имунни отлагания на IgA, установен чрез ДИФ при българските пациенти с ДХ, е грануларният тип с локализация по хода на ДЕГ и в купола на дермалните папили. Макар и рядко, фибриларният тип IgA отлагания, характерен за японските пациенти, се среща и в българската популация. Видовете IgA отлагания са разнородни и тяхното разпознаване е важно за своевременната диагноза.
6. Серумните ЕМА, anti-tTG и anti-eTG IgA-антитела демонстрират добър диагностициращ и скриниращ потенциал.

7. Anti-GAF3X антителата демонстрират сравнително ниски диагностициращи показатели и не се препоръчват в рутинната практика.
8. HLA DQ2/DQ8 чувствителности корелират с публикуваните данни за кавкзката раса, като само HLA DQ2 има стойност на статистически значим предразполагащ фактор в българската популация от изследваните серологични специфичности. Поради високата си NPV, HLA DQ2/8 генотипизирането е приложимо при диагностиката на ДХ, в определени случаи, изискващи изключване на заболяването.
9. HLA DQ7, който в българската популация в хаплотип с DRB1*11 е протективен за развитие на аутоимунни заболявания, има статистически значим протективен ефект и за ДХ.
10. ДХ оказва значим негативен ефект върху качеството на живот на пациентите, засягайки всички аспекти от ежедневието им. Тези показатели са важни, имайки предвид, че диагностицирането на ДХ в България не е своевременно.

8. ПРИНОСИ

Приоритетни научни приноси с оригинален характер

1. Проведено е първото мащабно епидемиологично проучване, обхващащо над 15 годишен период при голяма група пациенти с ДХ в България.
2. За първи път у нас са анализирани клиничко-морфологичните данни на голям брой пациенти с ДХ.
3. За първи път се провежда систематизирано дерматоскопско проучване при проспективна серия от пациенти с ДХ.
4. За първи път в България се провежда ДИФ проучване при голяма група пациенти с ДХ.
5. За първи път се описват 3 вида отлагания на IgA сред българската популация с ДХ – грануларен, фибриларен и смесен.
6. За първи път у нас се изследват серумни anti-eTG и anti-GAF3X антитела при пациенти с ДХ и се определя тяхната диагностична стойност.
7. За първи път в страната се изследва имуносерологичен панел от антитела, включващ ЕМА, anti-TTG, anti-eTG и anti-GAF3X.
8. За първи път у нас е проведено систематизирано HLA типизиране при голяма група пациенти с ДХ.
9. За първи път е оценено качеството на живот при голяма група новодиагностицирани пациенти с ДХ.

Приноси с потвърдителен и теоретичен характер

1. Проучен е спектърът на асоциираните с ДХ заболявания сред българската популация.
2. За първи път у нас е описан случай на ДХ с фибриларен тип имунореактанти.

Приноси с научно-приложен характер

1. Акраланта пурпура се включва като клиничен критерий в първия европейски консенсус за ДХ.
2. Дерматоскопията се включва като диагностичен метод в първия европейски консенсус за ДХ.
3. Създаден е алгоритъм за диагностика на ДХ, адаптиран към провежданите в България клинични и имунологични изследвания.

9. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. Velikova T, Shahid M, Ivanova-Todorova E, Drenovska K, Tumangelova-Yuzeir K, Altankova I, Vassileva S. Celiac-related autoantibodies and IL-17A in Bulgarian patients with dermatitis herpetiformis: a cross-sectional study. Med Kaunas Lith 2019; 55. [IF 1.467]
2. Шахид М, Дреновска К, Митева Л, Василева, С. Дерматитис херпетиформис: съвременен диагностичен алгоритъм. Дерматология и венерология 2018; 57: 3–9.
3. Шахид М, Бело У, Дреновска К, Василева С. Стандартизирани скали за оценка на тежестта и активността на аутоимунните булозни дерматози. Дерматология и венерология 2016; 54: 3-8.

Участия, свързани с дисертационния труд

1. Шахид М, Дреновска К, Серафимова Д, Митева Л, Василева С. Акрална пурпура. XXVII Софийски дерматологични дни. София, България, 01-04.11.2018 (презентация).
2. Shahid M, Drenovska K, Miteva L, Vassileva S. Dermatitis herpetiformis with fibrillar IgA deposition – an unusual finding among the Bulgarian population. 27th EADV Congress. Paris, France, 12-16.09.2018 (abstract and eposter).

3. Shahid M, Velikova T, Drenovska K, Miteva L, Vassileva S. Correlation of interleukin-17A levels and gluten-specific autoantibodies in the sera of patients with dermatitis herpetiformis. 2018 AAD Annual Meeting. San Diego, USA, 16-20.02.2018 (abstract and eposter).
4. Shahid M, Drenovska K, Velikova T, Vassileva S. Dermatitis Herpetiformis in Bulgaria: Report of 78 Patients. Journal of Investigative Dermatology 2017;137(10S):S280 (abstract and poster).
5. Shahid M, Velikova T, Drenovska K, Mateeva V, Miteva L, Vassileva S. Immune serologic studies in patients with dermatitis herpetiformis: endomysium, tissue transglutaminase, and deamidated gliadin-derived peptide circulating antibodies. 16th International Congress of Medical Sciences (ICMS), May 11-14 2017, Sofia, Bulgaria (oral presentation).
6. Pavlova R, Vassileva S, Drenovska K, Shahid M, Balabanova M, Miteva L, Pehlivanov G. Dermatitis herpetiformis in association with vitiligo. 25th EADV Congress. Vienna, Austria, 28.09-02.10.2016 (abstract and eposter).

Д-Р МАРТИН АБУ ШАХИД

**СЪВРЕМЕННИ АСПЕКТИ В ДИАГНОСТИКАТА НА
ДЕРМАТИТИС ХЕРПЕТИФОРМИС: КЛИНИЧНИ,
ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНИ, ИМУНОСЕРОЛОГИЧНИ И
ИМУНОГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

София, 2019