UNIVERZITA KARLOVA, 3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

Praha 2020 **MUDr. Jana Krabcová**

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

PATOFYZIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE AUTOIMUNITNÍCH PUCHÝŘNATÝCH KOŽNÍCH CHOROB

MUDr. Jana Krabcová

školitel: Doc. MUDr. Monika Arenbergerová, PhD

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze,

Jméno, příjmení: MUDr. Jana Krabcová
Podpis:

Identifikační záznam:

KRABCOVÁ, Jana. Patofyziologická charakterizace autoimunitních puchýřnatých kožních chorob [Pathophysiological characterization of autoimmune bullous skin diseases]. Praha 2020, 80 stran, přílohy 0. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Dermatovenerologická klinika 3. LF a FNKV, 2020, Doc. MUDr. Monika Arenbergerová, PhD.

Klíčová slova: protilátka, pemphigus, pemphigoid, přímá imunofluorescence, nepřímá imunofluorescence, komplement fixační test

Key words: antibody, pemphigus, pemphigoid, direct immunofluorescence, indirect immunofluorescence, complement fixation test

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat paní Doc. MUDr. Monice Arenbergerové, Ph.D. a panu prof. MUDr. Petrovi Arenbergerovi, DrSc, MBA, FCMA, za podporu v rámci doktorandského studia a při zpracování disertační práce. Dále bych ráda poděkovala panu prof. Dr.med. Dr.h.c.mult. Thomasi Ruzickovi a panu prof. Dr.Dr.med. Miklosi Sardymu za odbornou spolupráci a supervizi na LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie v Mnichově.

Použité zkratky:

AIBD	**Autoimmune bullous disease (autoimunitní puchýřnatá choroba)**
BM	**Basement membrane (bazální membrána)**
BP	**Bullous pemphigoid (bulózní pemphigoid)**
CFT	**Complement fixation test (komplement fixační test)**
DEJ	**Dermo-epidermal junction (dermoepidermální junkce)**
DIF	**Direct immunofluorescence (přímá imunofluorescence)**
ELISA	**Enzyme-linked immuno-sorbent assays**
FITC	**Fluorescein isothiocyanate (fluorescein isothiokyanát)**
IgG	**Immunoglobulin G (imunoglobulin G)**
IIF	**Indirect immunofluorescence (nepřímá imunofluorescence)**
PBS	**Phosphate-buffered saline (solný roztok pufrovaný fosfátem)**
PBST	**Phosphate-buffered saline + 0,005% Tween**
SSS	**Salt split skin (tkáňový substrát štěpený roztokem 1 mol/l NaCl)**

Souhrn:

Autoimunitní puchýřnaté choroby jsou závažná a chronicky probíhající onemocnění sliznic a kůže s neznámou etiologií. Jsou charakterizovány tvorbou specifických protilátek proti adhezivním molekulám v epidermis nebo v oblasti tzv. dermoepidermální junkce. Vazba protilátek na cílové struktury vede v dané oblasti k poruše adheze, a tak vzniku puchýře – intraepidermálně při onemocněních skupiny pemphigu či subepidermálně v oblasti dermoepidermální junkce při onemocněních skupiny pemphigoidu. Detekce autoprotilátek vázaných v tkáni či cirkulujících v séru je esenciální v diagnostice autoimunitních puchýřnatých chorob.

U bulózního pemphigoidu jsou typické specifické protilátky produkované proti hemidesmosomálním antigenům BP180 a BP230, které spojují bazální keratinocyty a bazální membránu. Diagnóza je založená na pozitivitě minimálně dvou specifických markerů - histologický průkaz, detekce tkáňově vázané protilátky frakce imunoglobulinu G a C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány epidermis metodou přímé imunofluorescence, detekce cirkulujících protilátek frakce imunoglobulinu G pomocí nepřímé imunofluorescence na opičím či králičím jícnu nebo na tkáňovém substrátu štěpeném 1mol/l NaCl, detekce antigenů BP180/ BP230 pomocí ELISA. Klinický obraz může pomoci při stanovení správné diagnózy.

Další diagnostickou metodou, která byla v 70. letech 20. století využívána pouze k úzké diagnostice pemphigoid gestationis (dříve známý jako herpes gestationis) je tzv. komplement fixační test (herpes gestationis factor test), nikdy však nebyla využita pro diagnostiku větší skupiny nemocných s bulózním pemphigoidem. Komplement fixační test jsme proto implementovali na vzorek 300 pacientů s prokázanou diagnózou bulózního pemphigoidu a 136 negativních kontrol k zjištění, zda může být tato metoda využita také k diagnostice jiných puchýřnatých chorob než jen pemphigoid gestationis.

Nepřímá imunofluorescence je standardní diagnostickou metodou bulózního pemphigoidu, jejíž senzitivita je relativně nízká. U pacientů s bulózním pemphigoidem je známo, že subtypy imunoglobulinu G hrají důležitou roli (imunoglobulin G1-3 jako komplement fixační protilátky, imunoglobulin G4 nefixuje komplement). Zaměřili jsme se proto na detekci jednotlivých subtypů protilátky (konkrétně IgG1, IgG3, IgG4) u 64 pacientů s verifikovanou diagnózou bulózního pemphigoidu, kteří byli ale negativní dle klasické nepřímé

imunofluorescence. Výzkum jednotlivých subtypů protilátky IgG metodou nepřímé imunofluorescence nebyl zatím v literatuře popsán.

Dle našeho výzkumu může být komplement fixační test zařazen mezi klasické diagnostické markery bulózního pemphigoidu a pomoci ve správné diagnostice u sérologicky rozporuplných případů. Jeho senzitivita se dle našich výsledků vyšplhala až na 71,7 % při zachování 100% specificity. Detekce jednotlivých subtypů protilátky imunoglobulinu G1, G3, G4 a jejich kombinace pomocí metody nepřímé imunofluorescence na opičím jícnu může signifikantně zlepšit diagnostiku u pacientů s bulózním pemphigoidem, senzitivita u původně falešně negativních pacientů vzrostla až na 48,8 % při 97% specificitě. Závěrem lze říci, že hypotéza byla potvrzena.

Summary:

Autoimmune bullous diseases are severe and chronic conditions, which involve skin and mucosal surface. The etiology is unknown. The specific antibodies against structural components of cellular adhesions molecules of epidermis, at the dermal-epidermal junctions or at the basement membrane zone, are characteristic. The connection between antibodies and targeted antigens leads to cell-cell or cell-matrix discontinuity, which develops into blister formation. Intraepidermal disruption is typical for pemphigus diseases, dermo-epidermal (sub-epidermal) blistering process is specific for pemphigoid diseases. Detection of specific autoantibodies either tissue-bound or circulating in serum is essential to diagnose autoimmune nature of autoimmune bullous disease.

The specific antibodies for bullous pemphigoid against the hemidesmosomal antigens BP 180, BP 230 are seen, which connect the basal keratinocytes to basement membrane. The correct diagnosis is based on positivity of minimally 2 markers - histological proof, detecting of tissue-bound antibody Immunoglobulin G and C3 component of complement at the basement membrane zone by direct immunofluorescence, detection of circulating Immonoglobulin G by indirect imunofluorescence on the monkey or rabbit esophagus or salt-split skin, as well as by BP180, BP230 ELISA. Typical clinical picture can help to make the right diagnosis.

Other diagnostic method, which was commonly used just in the diagnostics of pemphigoid gestationis (originally named herpes gestationis) in the 1970s is complement fixation test (herpes gestationis factor test). It has not been published yet for the greater group of bullous pemphigoid patients. Complement fixation test was assessed in 300 bullous pemphigoid positive patients compared to 136 negative controls.

Indirect immunofluorescence is one of the diagnostic methods with relatively low sensitivity itself. Among bullous pemphigoid patients is already well-known, that all Immunoglobulin G subclasses play a role (Immunoglobulin G1-3 as complement fixing antibodies, Immunoglobulin G4 can not fix complement). We deeply targeted each subtypes in 64 bullous pemphigoid- proven patients (specifically IgG1, IgG3, IgG4), which were false-negative by classical indirect immunofourescence. We assessed the operating characteristics of an IgG subclass, which have not yet been determined.

We found out, that complement fixation test is suitable for the diagnosis of bullous pemphigoid and can help serologically challenging cases. Its´ sensitivity is 71,7 %, its´ specificity is 100 %. Assessment of Immunoglobulin G subclasses, especially IgG1 and IgG4 antibodies by indirect imunofluorescence on monkey esophagus can significantly improve diagnostic performance of indirect immunofluorescence in the bullous pemphigoid patients, the sensitivity of earlier false negative patients increased up to 48, 8 % with 97% specificity. In conclusion, our hypothesis is beeing confirmed.

Obsah:

1. ÚVOD…… 13

2. CHARAKTERIZACE JEDNOTLIVÝCH AUTOIMUNITNÍCH PUCHÝŘNATÝCH CHOROB……..... 23

2.1. Intraepidermální tvorba puchýře……. 25

2.1.1. Onemocnění skupiny pemphigu…….. 25

2.1.1.1. Pemphigus vulgaris……... 28

2.1.1.2. Pemphigus vegetans……..... 31

2.1.1.3. Pemphigus herpetiformis……..... 31

2.1.1.4. Pemphigus foliaceus…… 32

2.1.1.5. Pemphigus erythematosus…… 33

2.1.1.6. Fogo selvagem…….. 34

2.1.1.7. Paraneoplastický pemphigus…… 34

2.1.1.8. IgA pemphigus…….. 36

2.1.1.9. Léky indukovaný pemphigus…… 37

2.2. Subepidermální tvorba puchýře…….. 37

2.2.1. Onemocnění skupiny pemphigoidu…… 38

2.2.1.1. Bulózní pemphigoid…….. 38

2.2.1.2. Pemphigoid gestationis…… 43

2.2.1.3. Jizvící pemphigoid (mucous membrane pemphigoid)…….. 45

2.2.1.4. Anti-p200 (laminin γ1) pemphigoid…….. 46

2.2.2. Epidemolysis bullosa acquisita…… 46

2.2.3. Dermatitis herpetiformis Duhring…… 47

2.2.4. Lineární IgA dermatóza…… 48

3. VZÁCNÉ AUTOIMUNITNÍ PUCHÝŘNATÉ CHOROBY…… 50

3.1. Morbus Hailey- Hailey……... 50

3.2. Morbus Grover……..... 51

4. KLASICKÉ VYŠETŘOVACÍ METODY U BULÓZNÍHO PEMPHIGOIDU…. 52

4.1. Histopatologie…… 52

4.2. Přímá imunofluorescence ……..... 54

4.3. Nepřímá imunofluorescence ……..... 57
4.4. ELISA…… 58

5. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE……..... 59
5.1. Hypotéza…… 59
5.2. Cíle práce…… 59

6. MATERIÁLY A METODIKY…… 61
6.1. Komplement fixační test ……..……... 61
6.1.1. Pacienti……. 64
6.1.2. Metodika…….. 66
6.1.3. Statistické vyhodnocení…….. 69
6.2. Detekce jednotlivých subtypů IgG protilátky…… 69
6.2.1. Pacienti……. 70
6.2.2. Metodika…….. 71
6.2.3. Statistické vyhodnocení……... 72

7. VÝSLEDKY…….. 73
7.1. Komplement fixační test jako spolehlivá diagnostická metoda……. 73
7.2. Zvýšení senzitivity nepřímé imunofluorescence detekcí IgG1, IgG3, IgG4 a jejich kombinace…….. 78

8. DISKUZE A ZÁVĚRY……..... 84

9. POUŽITÁ LITERATURA……..... 93

1. ÚVOD

Autoimunitní puchýřnaté choroby (AIBD) reprezentují široké spektrum onemocnění vyskytujících se na kůži. První zmínky o AIBD sahají až do daleké historie, tzv. pemphigoidovou horečku (pemphigodes pyertoi) popsal již Hippokrates (460-370 př. Kr.), Galén pojmenoval pustulózní postižení úst jako febris pemphigodes (131-201 po Kr). Prvnímu dokumentovanému pacientovi s puchýři a bolestivými ulceracemi v dutině ústní byla diagnóza pemphigus přiřknuta v 18. století. První případ pemphigus foliaceus byl popsán v polovině 19. století (Cazenave PLA, 1844, Annales des Maladies de la Peau et de la Syphilis) jako speciální superficiální forma pemphigu, která se rychle rozšiřuje. Jako pemphigus vegetans se označoval poprvé nemocný s bradavičnatými granulacemi (Neumann I, 1886, Annales de Dermatologie). V roce 1926 se jako pemphigus erythematosus nazvalo onemocnění se společnými klinickými znaky lupus erythematosus a pemphigu (Senear E, Usher B, Arch Dermatol Syph.). V roce 1881 se poprvé uvažovalo o oddělení jednotlivých epidermálních buněk od sebe (Auspitz H, System der Hautkrankheiten), až o několik let poté, v roce 1943, byl jasně histopatologicky popsán proces akantolýzy u pemphigus vulgaris, vegetans a foliaceus (Civatte A, Ann Dermatol Syph.), který odlišoval pemphigus vulgaris, pemphigus vegetans a pemphigus foliaceus od jiných bulózních kožních chorob. Teprve v roce 1953 se jasně hovoří o bulózním pemphigu neboli tzv. pemphigus-like onemocnění (Lever WF, Medicine), které je odlišné od pemphigu a postihuje hlavně lidi starší generace. Pro toto onemocnění je charakteristická subepidermální bula, proto dostalo označení bulózní pemphigoid. První z vyšetřovacích metod byla v polovině 20. století metoda nepřímé imunofluorescence popisující cirkulující autoprotilátky proti intercelulární substanci v kůži a na sliznicích, dále pomocí přímé imunofluorescence se zkoumala vazebnost těchto protilátek na patologických preparátech (Jordon R, 2003, Salavec M, 2018). Od té doby se koncept klasifikace AIBD mírně upřesnil.

Dle základního dělení rozeznáváme onemocnění skupiny pemphigu, skupiny pemphigoidu a dermatitis herpetiformis Duhring, dále jsou popisovány vzácné choroby jako familiární benigní pemphigus Hailey-Hailey a Morbus Grover. Jedná se o závažné a chronicky probíhající získané choroby sliznic a kůže s neznámou etiologií. Jsou to orgánově specifické autoimunitní choroby, které jsou charakterizovány tvorbou patogenních autoprotilátek proti adhezivním molekulám v epidermis nebo v oblasti dermoepidermální junkce (DEJ). Autoprotilátky jsou protilátky, které jsou namířené proti antigenům vlastního těla,

autoantigenům. Tyto protilátky jsme schopni stávajícími metodami detekovat a jejich stanovení je esenciální při diferenciální diagnostice jednotlivých autoimunitních puchýřnatých chorob od sebe či od jiných typů kožních chorob. Stávající medicínské trendy spějí k tomu, že se rozvíjí potřebnost pracovišť zabývajících se těmito chorobami, které mají samostatná oddělení autoimunitních laboratoří. Tyto laboratoře se specializují na vývoj nových možných diagnostických metod a nových markerů, které by mohly přispět k včasnější či přesnější diagnostice AIBD, a tím i k promptnější léčbě nemocných s podezřením na AIBD.

Za normálního fyziologického stavu je nedůležitější vlastností imunitního systému vytvoření tolerance vůči vlastním tkáním. Tato schopnost organismu se vyvíjí zcela záhy a je tou nejdůležitější fyziologickou funkcí k správnému dalšímu vývoji organismu. Stav imunitního systému předurčuje člověku životaschopnost, tedy stupeň morbidity či mortality. Imunitní systém je odpovědný za správné fungování orgánů, za správné reakce při styku s jakýmkoliv antigenem tak, aby nedošlo k poškození vlastního organismu. Imunitní systém člověka je strážcem a ochráncem organismu v takové míře, jako je antivirová ochrana pro počítač. Bez správného nastavení či manuálu je nebezpečná sobě samému a může ohrozit nejen sebe, ale i blízké okolí.

Po setkání se s jakýmkoliv antigenem se aktivují diferencující se bílé krvinky, T a B lymfocyty, které zajišťují specifickou imunitní odpověď, kromě cílené reakce na faktory zevního prostředí. Imunitní systém by mohl reagovat proti vlastním antigenům a vést k poškození buněk tělu vlastním. To by mohlo způsobit porušení tzv. klonální delece a imunologické tolerance. Klonální delece je schopnost likvidovat poškozené či nevhodně či nedostatečně reagující lymfocyty, které by mohly způsobit samotné poškození organismu. Imunologickou tolerancí nazýváme zcela opačný stav, při kterém lidský organismus není schopen reagovat na jakékoliv antigenní podněty. Imunologická tolerance se rozlišuje na dva základní typy, specifická a nespecifická. Nespecifická imunologická tolerance je takový stav, při kterém je imunitní systém inaktivován, a tak není schopný reagovat na žádný antigen (týká se i odpovědi na virovou či bakteriální infekci). Tento stav můžeme uměle navodit cytostatickou léčbou, která je při některých onemocněních život zachraňující, kdy se imunokompetentní buňky vyřadí ze své správné funkce a je navozena tzv. imunosuprese. Další možností vzniku nespecifické imunologické tolerance je ultrafialové záření. Jako specifickou imunologickou toleranci označujeme stav, kdy lidský organismus nereaguje jen na ty antigeny, které byly použity k navození samotné tolerance, ale zcela normálně reaguje

na ostatní antigeny. Pojmem tzv. self tolerance rozumíme stav, kdy je imunitní tolerance namířena proti buňkám vlastního těla, vůči tzv. autoantigenům, a chrání ho tak před jakoukoliv nebezpečnou imunitní atakou, která by lidský organismus mohla ohrozit. Tento stav je pro člověka fyziologický. T lymfocyty, které rozhodují o správném mechanismu finální imunologické odpovědi, jsou podrobeny dvěma typům selekce. Tzv. negativní selekce, kdy jednotlivé klony T lymfocytů s afinitou k vlastním buňkám po setkání se s vlastními antigeny hynou, nebo naopak tzv. pozitivní selekce je pojem, který určuje ty klony, které mají minimální nebo vůbec žádnou afinitu k buňkám tělu vlastním, ty jsou také odsouzeny k zániku.

Porušení této klonální delece a imunologické tolerance vyústí ve vznik tzv. autoimunitních onemocnění. Dalším prohlubováním a poškozováním buněk tělu vlastních přispívá přítomnost autoreaktivních cytotoxických buněk a makrofágů. Následkem toho je také typická produkce autoreaktivních protilátek ze strany T buněk (Fölsch UR et al., 2003), protože odpověď efektorových T i B lymfocytů je závislá na T buňkách.

Imunitní systém člověka má schopnost rozpoznat antigeny vlastních tkání, což patří mezi základní fyziologický stav, a vede tak k udržení homeostázy. Staré, poškozené či jinak pozměněné buňky jsou za normálních okolností rozpoznány imunitním systémem a likvidovány. Při ztrátě této schopnosti eliminace a poškozování i zdravých funkčních buněk se rozvíjí autoimunitní onemocnění. Tvorba autoreaktivních protilátek skupiny IgG vede k tkáňovému poškození cytotoxickým účinkem spolu s NK buňkami (natural killer buňky) a aktivovanými složkami komplementu. Při tomto II. typu přecitlivělosti se aktivuje komplement za vzniku membránového lytického komplexu, který vytvoří transmembránový pór v napadené buňce, což má za následek smrt buňky. Aktivace NK buněk vede k tvorbě antigen dependentního a buňkou zprostředkovaného cytotoxického účinku (ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity) a následuje rozpad buňky, tzv. cytolýza. Další schopností protilátky IgG je ukládání imunokomplexů jako součást III. typu přecitlivělosti, kde se tvoří komplex antigen-protilátka při aktivaci komplementu a chemotakticky se atrahují fagocytující buňky, které mají schopnost fagocytózy. Opět se napadená buňka lyzuje. Buňkami zprostředkovaná autoimunitní reakce způsobí tvorbu cytotoxických T-lymfocytů a pomocných T1 lymfocytů, TH1 buněk, které jsou základem opožděného neboli IV. typu přecitlivělosti, a to po atrakci fagocytujících buněk, vyvolá silnou zánětlivou reakci a zničení napadené buňky (Hořejší V, Bartůňková J, 2002).

Autoimunitní onemocnění se často vyskytují u více členů jedné rodiny. Jako důvod se uvádí určitý haplotyp HLA (lidský leukocytární antigen), konkrétně se jedná o haplotypy HLA-DQBI-0301, -0305, -0602, -0603 (Thoma-Uszynski S et al., 2006), který je společný členům rodiny, jehož samotná přítomnost je rizikovým faktorem vzniku některého z onemocnění. Jako příklad se může uvažovat o Hashimotově thyreoiditidě, perniciózní anemii, systémovém lupus erythematosus či pemphigu (Gawkrodger DJ, 1987). Receptory T lymfocytů reagují s buňkami v thymu, které jsou pomocí svých HLA molekul prezentovány antigen prezentujícími buňkami (APC). Tyto receptory T buněk reagují s povrchovými molekulami jen v tzv. imunologicky privilegovaných místech, které odpovídají fyziologické struktuře buněčné anatomické bariéry, tím pádem jsou imunitním systémem imunologicky tolerovány. Dále se tolerance týká těch buněk, které nemohou svůj antigen prezentovat, protože na svém povrchu nemají HLA molekuly, a tím jsou T lymfocytům nepředstaveny. Další možností je, že se určité antigeny mohou vyskytovat v příliš malém množství, takže je T lymfocyty nejsou schopné detekovat.

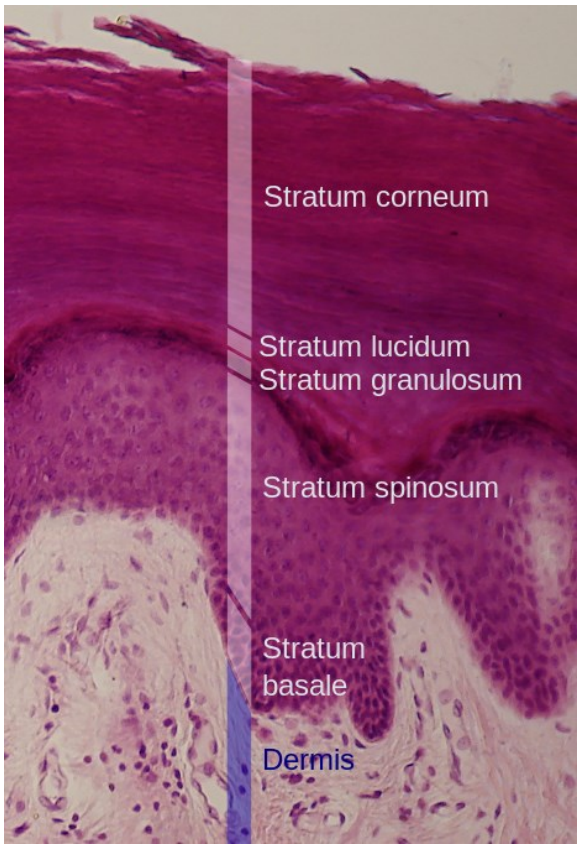
V experimentální medicíně může být imunologická tolerance navozena uměle, při inokulaci alogenních buněk nebo při transplantaci tkáně do novorozeného organismu, který není schopný reagovat, protože jeho imunitní systém je zatím nevyzrálý. Podobný postup platí u dospělých osob, které prodělali cytostatickou léčbu či ozáření, kde byl jejich imunitní systém uměle potlačen.

Příčin vzniku autoimunitních onemocnění je nespočet, většinou se jedná o kombinaci vnitřních faktorů, jako je dědičnost, a faktorů zevního prostředí. Proto hovoříme o multifaktoriálních příčinách vzniku autoimunitních chorob. Autoimunitní onemocnění můžeme rozdělit na 2 základní typy – systémová a orgánově specifická onemocnění. Systémová autoimunitní onemocnění jsou typicky namířená proti jaderným buněčným strukturám orgánově nespecifických antigenů. Orgánově specifické autoimunitní choroby tvoří orgánově specifické cytotoxicky působící autoprotilátky. AIBD patří mezi orgánově specifická autoimunitní onemocnění, kde u onemocnění skupiny pemphigu nalézáme specifické protilátky proti antigenům desmosomálních struktur, zatímco u skupiny pemphigoidu detekujeme autoprotilátky proti antigenům hemidesmosomů. Dalšími příklady orgánově specifických autoimunitních onemocnění, která se projevují na kůži, jsou Hashimotova thyreoiditida, Addisonova choroba, primární biliární cirhóza, perniciózní anemie či vitiligo. Jako kontrast s orgánově specifickými autoimunitními onemocněními se

vyskytuje také skupina onemocnění, která postihuje více orgánových soustav, hovoří se tedy o systémových či orgánově nespecifických autoimunitních onemocněních. I tyto choroby mají však typické projevy na kůži. Typickými představiteli jsou lupus erythematosus, systémová sklerodermie či dermatomyositida (Gawkrodger DJ, 1987).

Autoprotilátky se v těle tvoří fyziologicky a hrají významnou roli v obraně organismu v procesu autoreaktivity, tedy označení a odstraňování nepatřičných či nebezpečných autoantigenů, které by mohly tělo poškodit. Jsou součástí humorálního imunitního systému. T-lymfocyty a B-lymfocyty, popřípadě plazmatické buňky, reagující pomocí receptorů proti tkáním vlastního těla, jsou včas imunitním systémem v thymu či kostní dřeni eliminovány. Tento proces klonální delece vytváří již zmíněnou imunologickou toleranci, což je základem pro rozpoznání antigenů cizího od antigenu těla vlastního. Pokud toto rozlišování selže, vznikají autoimunitní onemocnění (Silbernagel S, Lang F, 2001). Detekce autoprotilátek je tak obecně základním markerem při diagnostice autoimunitních onemocnění.

Lidská kůže se skládá se z epidermis, dermis a hypodermis. Epidermis je složitá struktura skládající se z rohovějícího vrstevnatého dlaždicového epitelu – keratinocytů. Pokožka se skládá z 5 vrstev buněk keratinocytů (Obr. č. 1).



Obr. č. 1: Histopatologický obraz jednotlivých vrstev kůže.
(autor Mikael Häggström (z původní práce Wbensmith, WVSOM Meissner´s corpuslce.JPG), Department of Biological Science Northern Kentucky University).

Nejspodnější vrstva buněk, která je na rozhraní epidermis a dermis, tzn. v oblasti dermoepidermální junkce, se nazývá *stratum basale*. Mezi sebou jsou propojeny desmosomy, mezi bazálním pólem buňky a bazální membránou se nacházejí hemidesmosomy. Tato vrstva keratinocytů je pro studium onemocnění skupiny pemphigoidu klíčová. Dalšími apikálněji uloženými vrstvami jsou *stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum a stratum corneum*, jejichž jednotlivé buňky jsou mezi sebou propojeny desmosomy a jejichž akantolýza je podstatou onemocnění skupiny pemphigu.

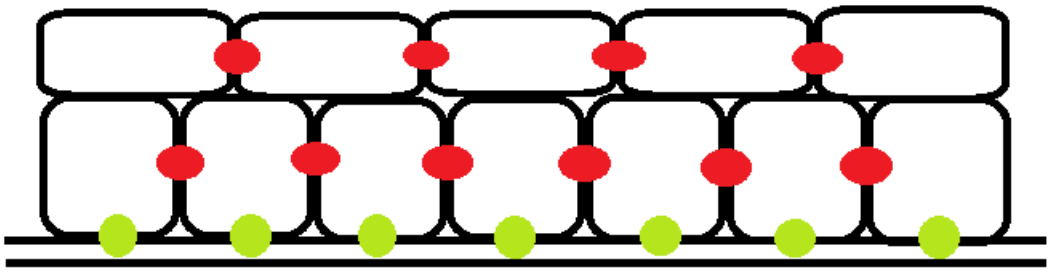
Buněčná spojení mezi jednotlivými keratinocyty se vyvíjejí při procesu embryogeneze. Mezibuněčná soudržnost je velká, k jejímu oddělení je potřeba značné mechanické síly. Kvalita adheze jednotlivých epitelových buněk je extrémní v epitelech, které jsou vystaveny

neustálému tlaku a tahu, což je typické pro lidskou kůži. Kromě kohezivních sil zprostředkovaných mezibuněčnými molekulami a ionty, se vyskytují tzv. mezibuněčná spojení. Mezibuněčná spojení slouží ke spojení a vzájemné komunikaci mezi jednotlivými buňkami. Tato spojení se nacházejí na bazálních a laterálních stranách všech buněk. Rozlišujeme několik typů spojení – těsná spojení, komunikační spojení a adhezní typ spojení.

Těsná spojení neboli „tight junctions“ či *zonulae occludentes*, se nacházejí nejblíže apexu buněk a zajišťují vznik nejtěsnější tělesné bariéry obkružující celý obvod buňky, aby nemohlo dojít ke komunikaci s dvěma oddělenými kompartmenty – mezi kůží a okolím, tzv. paracelulární komunikaci od apexu k bázi a naopak. Tento typ spojení je typický pro střevo, slinivku či žaludeční sliznici. *Zonula adherens* neboli adhezní typ spojení se vyskytuje mezi epitelovými buňkami na kůži, tento typ spojení je také typický mezi kardiomyocyty, mezi endotelovými buňkami či jako součást nervové synapse. Dále rozeznáváme komunikační typ mezibuněčného spojení neboli „gap junctions“, jejichž komunikace je možná prakticky kdekoliv podél buněčných membrán většiny epitelových buněk. Pomocí membránových hydrofilních pórů, tzv. nexů neboli konexonů, se těsně přimknou sousední buněčné membrány, a vytvoří se tak mezibuněčný hydrofilní kanál. Rozhodujícím znakem pro průchod molekul skrz „gap junctions“ je velikosti molekuly, spoj je průchodný pomocí prosté difúze jen pro molekuly do velikosti 1,5 nm. Typicky se nachází v tkáni jater, oční čočky či v srdečním svalu.

Specifickým typem spojení je tzv. macula adherens neboli desmosom, který se z funkčního hlediska řadí mezi adhezní typ spojení. Desmosom je diskovitá struktura, která se nachází na povrchu buňky a je spojena s podobnou strukturou sousední buňky. Vzdálenost mezi jednotlivými buněčnými membránami u desmosomálního spojení je namísto 20 nm 30 nm. Uvnitř každé buňky se nachází tzv. úponová ploténka, která desmosomy poutá k buněčné membráně. Tato ploténka navazuje na cytoskeletální vlákna uvnitř buňky. Desmosomy jsou proteinové struktury, které se typicky nalézají podél postranních membrán většiny epitelových buněk a jsou jediným typem spojení v plochém vrstevnatém epitelu kůže. Protože kůže je extrémně namáhaným orgánem, je potřeba zajistit vysoce pevnou mechanickou soudržnost sousedních buněk. K tomu slouží právě desmosomy. V kontaktní vrstvě bazálních buněk s bazální laminou se v kůži nacházejí tzv. hemidesmosomy (Obr. č. 2). V molekulárně biologické podstatě vytvářejí poloviční strukturu desmosomů, z toho plyne i jejich původně

řecký název. Diskovitá struktura se nachází, jako u desmosomů, na plasmalemě epitelové buňky a přichycuje bazální buňky k bazální membráně (Janqueira LC et al., 1992).



Obr. č. 2: Adhezivní typ spojení v lidské kůži. Dvě spodní vrstvy suprabazálních keratinocytů a bazální membrána oddělující epidermis od dermis. Desmosomy mezi jednotlivými keratinocyty (červeně), hemidesmosomy mezi keratinocyty a bazální membránou (zeleně).

Adheze na intraepidermální úrovni u onemocnění skupiny pemphigu postihuje desmosomy, které spojují jednotlivé epidermální keratinocyty mezi sebou. Extracelulární část desmosomů, tzv. kadheriny (transmembránové proteiny uplatňující se při mezibuněčné adhezi a pomocí cateninů jsou spojeny s cytoskeletem) (antigeny Desmoglein 1, Desmoglein 3, a další), vede k mezibuněčnému spojení sousedních keratinocytů a pomocí desmosomálního plaku jejich intracelulární část spojuje desmosomální proteiny s intracelulárními intermediárními filamenty buněčného cytoskeletu keratinocytů. Při onemocnění skupiny pemphigu je imunitní reakce namířená proti intraepidermální transmembranózní adhezivní molekule, která způsobí poškození kontaktu mezi sousedními buňkami epidermis, a dojde tak k tvorbě intraepidermálního puchýře.

U onemocnění skupiny pemphigoidu je adheze v oblasti mezi bazálními keratinocyty a bazální membránou kůže, tedy v oblasti dermoepidermální junkce, typická pro transmembranózní strukturální proteiny, hemidesmosomy. Pro vznik subepidermálních puchýřů je esenciální vznik autoprotilátek proti jednotlivým antigenům hemidesmosomů, přesněji proti intracelulárnímu plectinu a BP230 antigenu a transmembranóznímu antigenu BP180, což vede ke ztrátě spojení strukturálních keratinových filament v buňce keratinocytů k proteinovým strukturám v bazální membráně kůže či sliznic. Vznik specifických

autoprotilátek proti strukturálním subepidermálním proteinům způsobí poruchu adheze a opět vzniku puchýře.

Vazba autoprotilátek na cílové struktury kůže či sliznic způsobuje v dané oblasti separaci keratinoctyů a tvorbu puchýře, buď intraepidermálně (onemocnění skupiny pemphigu) či v subepidermální oblasti (onemocnění skupiny pemphigoidu, epidermolysis bullosa acquisita, lineární IgA dermatózy a dermatitis herpetiformis Duhring).

Pro diagnostiku AIBD je klíčový histopatologický rozbor odebrané tkáně od pacienta s podezřením na puchýřnaté onemocnění. Detekce specifických autoprotilátek vázaných v tkáni či cirkulujících v séru je základem pro diagnózu onemocnění ze skupiny AIBD. Tkáňově vázané protilátky detekujeme pomocí metody přímé imunofluorescence (DIF), tkáň je vždy odebírána perilezionálně vyjmutím zdravé tkáně těsně v blízkosti čerstvého projevu, na rozdíl od klasického histopatologického obrazu, kde je nutné odebrat vzorek přímo z floridní léze. Pro detekci v krvi cirkulujících protilátek můžeme využít metodu nepřímé imunofluorescence (IIF), ELISA či jiné méně používané metody.

Základní eflorescencí všech AIBD je vezikula či bula s napjatou či plihou krytbou, s čirým obsahem na erytematózním podkladě či normální kůži. Sekundárně u těchto onemocnění může dojít k zakalení obsahu puchýře, puchýře praskají a tvoří se eroze až rozsáhlé macerace. Následně je možno pozorovat zasychání v krusty, neléčení či špatně léčené hojení eflorescencí způsobuje také sekundární impetiginizaci. Puchýře či eroze mohou být jednotlivé a lokalizované nebo se mohou rozšiřovat po celém kožním integumentu, někdy mohou vést k jizvení.

Puchýřnaté choroby se manifestují na kůži nebo mohou být součástí multiorgánového onemocnění a vést tak k vážným patofyziologickým stavům, až ke smrti. Z tohoto důvodu je včasná a správná diagnostika nesmírně důležitá.

Dalším neméně vážným následkem AIBD, kde při tvorbě puchýřů a následném prasknutí je pozorován výrazný úbytek tekutiny, ale hlavně elektrolytů a proteinů, dojde k porušení homeostázy. Při postižení sliznic (orální, faryngální, jícnové a dalších) pacient může mít problémy s polykáním potravy, s tzv. intolerancí přísunu potravy, tekutin či léků. To vede k malnutrici a imunosupresi, a tak k život ohrožujícím infekcím až sepsi či smrti.

Tato práce obecně shrnuje základní patofyziologickou charakterizaci všech doposud známých autoimunitních puchýřnatých chorob, rozděluje AIBD dle histopatologického obrazu na intraepidermální a subepidermální puchýřnaté choroby. Zaměřuje se na popis častých i méně častých onemocnění, jejich základní patofyziologickou charakteristiku, histologický obraz, imunofluorescenční vyšetřovací metody, klinický obraz a základní epidemiologická data. Tato práce nabízí shrnutí všech získaných puchýřnatých chorob, se kterými se člověk v lékařské praxi může setkat.

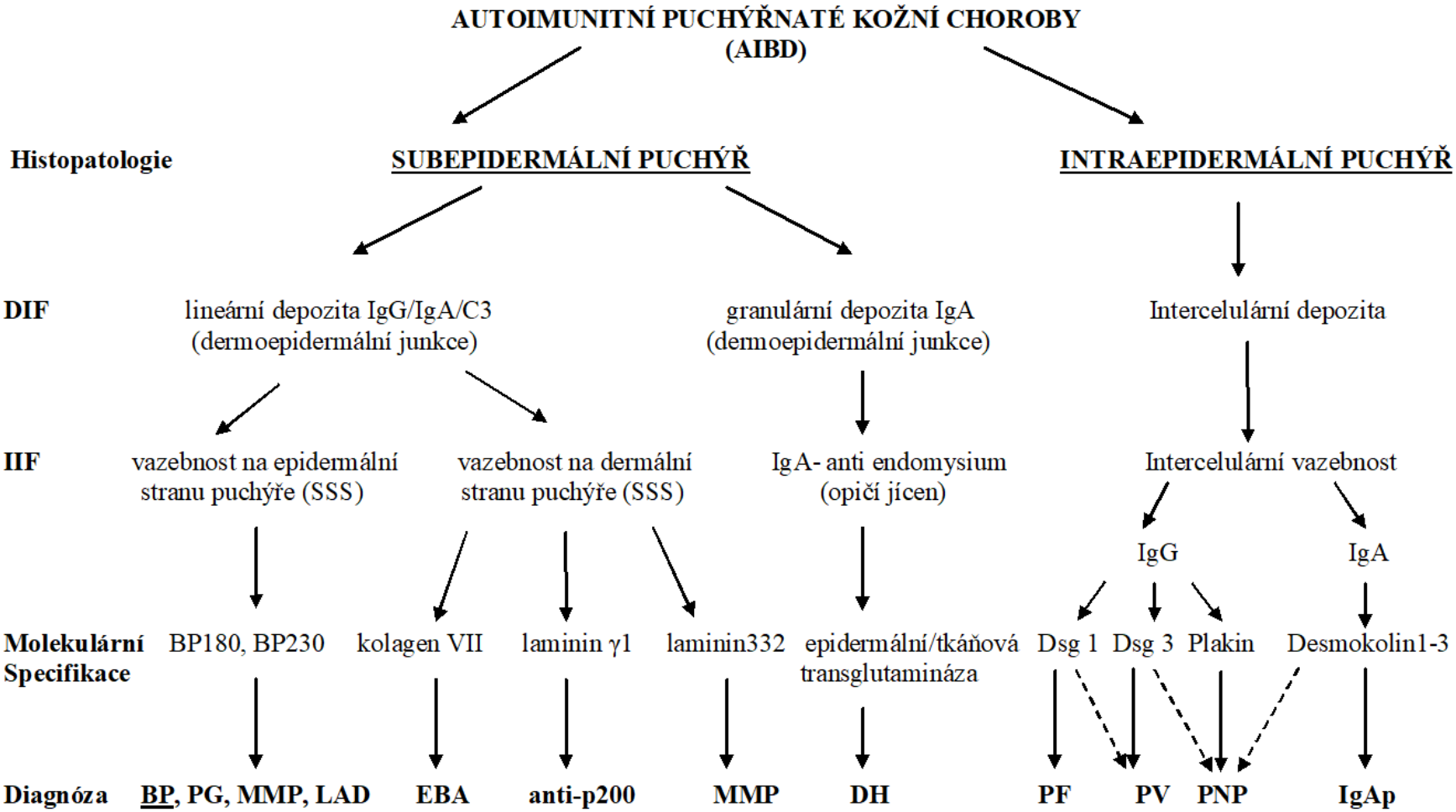
Vzhledem k velmi širokému spektru všech AIBD se tato disertační práce zaměřuje především na diagnostiku a současně užívané vyšetřovací metody potřebné při stanovení diagnózy u nejčastějšího subtypu AIBD – bulózního pemphigoidu. Hlavním cílem této práce je popsat nové vyšetřovací metody a diagnostické markery.

2. CHARAKTERIZACE JEDNOTLIVÝCH AUTOIMUNITNÍCH PUCHÝŘNATÝCH CHOROB

Autoimunitní puchýřnatá onemocnění je široká skupina chorob asociovaná s autoimunitou a tvorbou specifických autoprotilátek proti strukturálním komponentám mezi jednotlivými sousedními keratinocyty v epidermis či mezi bazálními keratinocyty a bazální membránou oddělující epidermis od dermis. AIBD postihují kůži svými typickými lézemi, které mohou vést ke stanovení předpokládané diagnózy, některé tvoří eflorescence i na sliznicích.

AIBD je široká skupina onemocnění, jejichž klasifikace se v literatuře mnohdy liší. Ve většině publikací rozdělují autoři AIBD na 4 základní soubory – onemocnění skupiny pemphigu, skupiny pemphigoidu, epidermolysis bullosa acquisita a dermatitis herpetiformis Duhring (Mihai S, Sitaru C, 2007, Kneisel A, Hertl M, 2011, Otten JV et al., 2014), v jiných se však popisuje jiné dělení, tj. onemocnění skupiny pemphigu, skupiny pemphigoidu, IgA lineární dermatóza a dermatitis herpetiformis Duhring (Štork J et al., 2008). Zvlášť stojí vzácné choroby – Morbus Hailey-Hailey a Morbus Grover. Vzhledem k těmto diskrepancím zjednoduším rozdělení AIBD v této práci dle odlišného histopatologického obrazu na 2 základní skupiny, tj. na onemocnění s tvorbou intraepidermálního puchýře (onemocnění skupiny pemphigu) a se vznikem subepidermálního puchýře (onemocnění skupiny pemphigoidu, epidermolysis bullosa acquisita, lineární IgA-dermatózu a dermatitis herpetiformis Duhring) (Salavec M, Boštíková N, 2018) (Obr. č. 3). U AIBD s intraepidermální akantolýzou se tvoří specifické autoprotilátky proti proteinovým vazebným strukturám sousedních keratinocytů v epidermis, desmosomům, zatímco protilátky reagující se specifickými antigeny hemidesmosomů v oblasti dermoepidermální junkce vytváří subepidermální poruchu adherence, tvoří se subepidermální puchýř.

AIBD jsou chronicky probíhající onemocnění. Jsou to orgánově specifické choroby s typickým klinickým obrazem, který doplňuje základní diagnostické markery a metody, a pomáhá tak ke stanovení správné diagnózy. V posledních letech se vědci zaměřují na vyvíjení a specifikaci nových diagnostických postupů a markerů, které by mohly sloužit k přesnější a rychlejší diagnostice AIBD, popisují se tak nové entity, které nebyly v minulosti známy.



Obr. č. 1 : Histopatologické rozdělení AIBD: subepidermální formace puchýře u bulózního pemphigoidu (BP), pemphigoidu gestationis (PG), jizvícího pemphigoidu (MMP), lineární IgA-dermatózy (LAD), epidermolysis bullosa acquisita (EBA), anti-p200 pemphigoidu (anti-p200) a morbus herpetiformis Duhring (DH), zatímco intraepidermální akantolýza je charakteristická pro pemphigus foliaceus (PF), pemphigus vulgaris (PV), paraneoplastický pemphigus (PNP) a IgA pemphigus (IgAp).

(přeloženo z původní publikace Otten JV, Hashimoto T, Hertl M, Payne AS, Sitaru C. Molecular diagnosis in autoimmune skin blistering conditions)

2.1. Intraepidermální tvorba puchýře

AIBD obecně rozdělujeme na dvě základní skupiny – s intraepidermální či se subepidermální ztrátou adheze, a tak v klinickém obrazu vytvoření puchýře v epidermis či v oblasti dermoepidermální junkce. Specifické autoprotilátky u intraepidermálního typu AIBD reagují s antigeny strukturálních proteinů epidermis, dojde tak k vytvoření intraepidermálního puchýře. Při intraepidermální akantolýze se oddělí jednotlivé vrstvy epidermis, aniž by byly poškozeny strukturální proteiny v oblasti dermoepidermální junkce, bazální membrána tedy pevně lpí k dermis. Jedná se o onemocnění s tvorbou protilátek proti desmosomům. Do této skupiny patří hlavně pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, paraneoplastický pemphigus a IgA pemphigus. K odlišení jednotlivých chorob slouží stanovení specifických autoprotilátek.

2.1.1. Onemocnění skupiny pemphigu

Pemphigus je skupina vzácných autoimunitních puchýřnatých onemocnění, u kterých je typickým znakem intraepidermální vznik puchýře. Název pemphigus pochází z řeckého slova pemphix, což znamená v překladu bublina nebo puchýř. Tento název se poprvé vyskytl v literatuře na konci 18. století od německého dermatologa Johanna Ernsta Wichmanna k popisu puchýřnatých onemocnění (Mihai S, Sitaru C, 2007, Otten JV et al., 2014).

Pemphigus je skupina život ohrožujících chorob postihující kůži i sliznice. Molekulárním základem onemocnění ze skupiny pemphigu je formace akantolytického intraepiteliálního puchýře, který vzniká přítomností různých specifických protilátek proti adhezivním molekulám (desmosomům) v epidermis kůže. Různé typy onemocnění skupiny pemphigu jsou charakterizované specifickými protilátkami.

Jednotlivé subtypy onemocnění skupiny pemphigu se liší úrovní ztráty adheze v rámci jednotlivých vrstev epidermis. O akantolýze spíše suprabazálně, tj. ve vrstvách těsně nad bazální membránou v oblasti dermoepidermální junkce, se hovoří u pemphigus vulgaris a pemphigus vegetans, více superficiální formace puchýře je typická pro pemphigus foliaceus a jeho podtypy.

Diagnózu stanoví lékař odběrem tkáně. V histopatologickém obraze z floridní léze je popisována ztráta adheze jednotlivých keratinoctyů či skupin keratinocytů intraepidermálně. Zlatým standardem je perilezionální odběr vzorku kůže nemocného metodu DIF. Metodou DIF použitím fluorescenčního barviva je možné pozorovat jasnou zeleno – žlutou intraepidermální síť způsobenou intercelulárními depozity imunoreaktantů vázaných ve tkáni. Naopak specifické cirkulující protilátky jsou zachyceny metodou IIF použitím humánní kůže nebo jiné senzitivní tkáně jako substrátu, pro tyto účely se nejčastěji využívá opičí či králičí jícen, možno použít i jícen morčat. Molekulární charakterizace jednotlivých intraepidermálních strukturálních proteinů a jejich cDNA (complementary DNA) zkoumá metoda ELISA. ELISA u skupiny pemphigu využívá nejčastěji rekombinantní antigen Dsg1 a Dsg3 k detekci cirkulujících autoprotilátek v pacientově séru. Pomocí spektrofotometru se stanoví intenzita zbarvení vzorku, což odpovídá antigenní hladině protilátky. Sérové hladiny protilátek, které jsou detekovatelné pomocí ELISA, vypovídají o aktivitě a rozsahu onemocnění u nemocných s pemphigem (Mihai S, Sitaru C, 2007, Ishii K, 2015, Salavec M, 2018), tzn. vyšší hladina protilátek je pozorována u exacerbace onemocnění, naopak snížení hladiny je typické při remisi. Této dynamiky změn hladin protilátek se využívá také při kontrole odpovědi organismu na nastavenou terapii. ELISA je metoda, která slouží k vyšetření aktivity onemocnění i ve stádiu, když dojde zcela k vymizení floridních erozí či puchýřů na kůži či sliznicích. Pokud se hodnoty tzv. ELISA indexu zvýší, je potřeba nemocného kontrolovat častěji, pokud však ELISA index roste bez současného vzniku kožních a slizničních eflorescencí, nejedná se o dostatečný důvod ke změně terapie. Pokud by však vznikaly nové léze za současného růstu ELISA indexu, je potřeba terapii změnit či upravit dávkování. Hladina ELISA indexu u různých pacientů se liší, stejná hodnota u více lidí neznamená shodnou aktivitu onemocnění. Jako důvod tohoto faktu se uvádí skutečnost, že důležitou roli hraje polyklonalita séra s heterogenním zastoupením protilátek, patogenních i nepatogenních (Ishii K, 2015).

Puchýře se tvoří intraepidermálně, tedy vznikají oddělením jednotlivých vrstev epidermis od sebe, bez současného postižení bazální membrány. To je způsobeno přítomnosti autoreaktivní protilátky Ig, asi v 90 % se jedná o subtyp cirkulujícího IgG. Cirkulující autoprotilátka IgG reaguje přímo s intercelulárními substancemi epidermis a je detekovatelná nepřímou imunofluorescenční metodou. Hladina těchto protilátek přímo koreluje s aktivitou onemocnění, přítomností IgG se předpokládá intraepidermální porušení adheze. Metodou

přímé imunofluorescence se stanovují depozita intercelulárních substancí v suprabazálních vrstvách epidermis.

Patogenicita protilátek u pemphigu byla poprvé demonstrována GJ Anhaltem v roce 1982 na myším modelu intraperitoneální a subkutánní injekcí purifikované protilátky IgG od nemocného s *pemphigem vulgaris* (Anhalt GJ et al., 1982).

Podstatou onemocnění skupiny pemphigu je imunitní reakce namířena proti intraepidermálním glykoproteinům ze skupiny kadherinů. Typickými představiteli kadherinů jsou desmoglein 1 (Dsg1) a 3 (Dsg3) o molekulové hmotnosti 165 kDa, resp. 130 kDa, desmokolin 1 (Dsc1), desmoplakin I (250 kDa) a II (210 kDa), plakoglobin, periplakin (190 kDa), plektin (500 kDa) či envoplakin (210 kDa). Jejich extracelulární část spojuje sousední keratinocyty v epidermis, intracelulární část je součástí keratinových filament cytoskeletu buňky.

Rozlišujeme několik typů pemphigů – *pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, paraneoplastický pemphigus* a další vzácnější formy (*pemphigus erythematosus (pemphigus seborrhoicus či Senear-Usher syndrom), IgA pemphigus, endemický pemphigus,* léky indukovaný pemphigus*, pemphigus herpetiformis, pemphigus vegetans Hallopeau/ Neumann*).

Obecně lze říci, že diagnózu nejčastějších typů pemphigů lze předpokládat dle klinického obrazu. U *pemphigus vulgaris* se vyskytují fragilní superficiální puchýře, které se nejčastěji nacházejí ve kštici, obličeji, na zádech, na hrudníku a ve flexorových stranách končetin. Pro *pemphigus vegetans* jsou typické papilomatózní hypertrofické léze. *Pemphigus foliaceus* je charakteristický svými drobnými až rozsáhlými superficiálními mělkými erozemi nejčastěji v seborrhoické lokalizaci, tj. na obličeji či ve kštici. *Pemphigus erythematosus* má některé společné klinické znaky s lupus erythematodes, tj. pevně lpící šupiny či eroze hlavně v lokalizacích slunečního osvitu (obličej, kštice a dekolt).

2.1.1.1. Pemphigus vulgaris

Pemphigus vulgaris (PV) je získané chronické autoimunitní onemocnění, které se typicky vyskytuje v mladším středním věku, nejčastěji mezi 30. a 60. rokem. PV je méně časté onemocnění, ve srovnání s nejčastěji se vyskytující entitou ze skupiny autoimunitních puchýřnatých chorob, bulózním pemphigoidem, jeho průběh je však častěji těžší, v některých případech, při stanovení špatné diagnózy či nedostatečné terapie, může být až fatální. PV je nejčastější variantou onemocnění skupiny pemphigu, incidence se celosvětově pohybuje od 0,7 do 5 nových případů na milion obyvatel za rok, vyšší je u Aškenázi Židů (16–32 nových případů na milion za rok), Japonců a Peršanů. Poměr zastoupení žen vs. mužů je 1:1 (Ruocco V et al., 2013, Kershenovich R et al., 2014, Salavec M, 2018). Pro PV jsou charakteristické autoprotilátky proti desmosomům epidermálních keratinocytů, nejčastěji jsou popisovány protilátky proti antigenu Desmoglein 1 (Dsg1) a 3 (Dsg3). Cirkulující protilátky IgG, které jsme schopni detekovat ze séra nemocného, se vážou na extracelulární části těchto antigenů. Hladina cirkulujících autoprotilátek IgG koreluje s klinickou aktivitou PV. V poslední době se hovoří o účasti jak desmoglein reaktivních protilátek, tak i protilátek proti acetylcholinovým receptorům membrány keratinocytů (Salavec M, 2018). V literatuře se popisuje, že PV nepostihuje vnitřní orgány, eroze se však vyskytují často na sliznicích. PV tedy ovlivňuje negativně kvalitu života pacientů (QOL – quality of life) a má život ohrožující potenciál. Je ale známá asociace s jinými autoimunitními, zánětlivými, infekčními či neoplastickými onemocněními nebo endokrinopatiemi, jako jsou myastenia gravis, perniciózní anemie, psoriáza, urtikaria a další, které jsou již schopné postihovat i jiné orgány než jen kůži a sliznice, takováto koexistence je popisována u asi 25 % pacientů s PV (Vassileva S et al., 2014).

Rizikovými či spouštěcími faktory PV jsou expozice radiaci (UV záření – PUVA, ionizační záření), užívání některých léků (př.: penicilamin, kaptopril, propranolol) či drog, virové infekce (HSV), dieta (česnek, cibule, černý a chilli pepř, červené víno, čaj), kouření, tepelná traumata a elektrotraumata, stres, hormonální poruchy, chirurgické či kosmetické zákroky nebo expozice pesticidů (organofosfátů) (Otten JV et al., 2014, Salavec M, 2018).

Pro stanovení diagnózy PV je nutné dodržení diagnostických kritérií. Jako povinné kritérium se označuje přítomnost depozit IgG s/bez depozit C3 složky komplementu na epiteliálních površích buněk epidermis metodou DIF. Dále se stanovují 2 hlavní kritéria – plihý puchýř

nebo eroze na kůži či slizničním povrchu a histopatologicky formace puchýře intraepidermálně. Jako vedlejší kritéria se označují depozita IgG intraepidermálně metodou IIF, stanovení Dsg3 bez pozitivity Dsg1 metodou ELISA či stanovení těchto antigenů imunoblotem. Pro stanovení definitivní diagnózy PV musí být dodrženo povinné kritérium a 2 hlavní kritéria či povinné kritérium + 1 hlavní + 1 vedlejší (Kershenovich R et al., 2014).

U slizničního postižení PV je detekován častěji Dsg3, zatímco u muko-kutánní formy PV je typická přítomnosti obou antigenů, tedy Dsg1 i 3 (Ding X et al., 1997, Amagai M et al., 1999, Salavec M, 2018). Sliznice exprimují Dsg3 rovnoměrně v celém rozsahu, zatímco na kůži se Dsg3 vyskytuje nejvíce v bazální vrstvě a nejbližších suprabazálních vrstvách epidermis, Dsg1 naopak v horních vrstvách epidermis. U PV způsobí autoprotilátky proti Dsg3 vznik puchýře primárně mezi suprabazálními keratinocyty, zatímco pemphigus foliaceus (PF), který je typicky zastoupen přítomností protilátky Dsg1, vykazuje akantolýzu v povrchových vrstvách epidermis.

Typické eflorescence u slizniční formy PV se zpočátku vyskytují v ústní dutině jako křehké puchýře (intaktní zastižitelné velmi vzácně) a eroze, které nemocný pociťuje jako extenzivní bolestivost, může také vést k odmítání potravy, hubnutí a malnutrici. U více než 50 % nemocných s PV zjišťujeme první projevy na sliznicích (Salavec M, 2018). Postižena může být nejen dutina ústní či jícen, projevy se vyskytují také v nosní dutině, na vaginální či anální sliznici. Pokud hovoříme o muko-kutánní formě PV, je postižena kromě sliznice také kůže. Asi u poloviny pacientů s PV slizniční léze předcházejí výskyt kožních eflorescencí, v některých případech se s projevy na sliznicích setkáme až o několik měsíců dříve (Gawkrodger DJ, 1987). Eflorescence se tvoří na integumentu bez jasné predilekční lokalizace. Nejprve se tvoří necharakteristické primární léze, které se po několika týdnech a měsících vyvinou v plihé vezikuly až buly. Puchýře či eroze se tvoří na zdravé či erytematózní kůži, jsou výrazně bolestivé, jen ojediněle jsou svědivé. Drobné puchýře splývají ve větší erodované plochy, které se sekundárně impetiginizují a znamenají tak rizikový faktor vývoje septických komplikací (Štork J et al., 2008). V některých ojedinělých případech můžeme hovořit o čistě kutánní formě PV, kde dominuje postižení kožního povrchu bez současného postižení sliznice (Ding X et al., 1997, Amagai M et al., 1999, Jamora MJJ et al., 2003).

Pro PV je dále typický histopatologický obraz demonstrující suprabazální akantolýzu a intraepiteliální separaci keratinocytů s malým zánětlivým infiltrátem. Hlavní kritérium pro stanovení správné diagnózy PV je přímá imunofluorescenční mikroskopie pacientovy perilezionální kůže s intercelulárními lineárními depozity vazebných protilátek IgG a C3 složky komplementu připomínající dlažební kostky. Přítomnost cirkulujících autoprotilátek IgG ve vazbě na intercelulární junkce keratinocytů je pomocí IIF vyšetřována na tkáni lidské kůže či jiných substrátech – opičím jícnu. V neposlední řadě detekce Dsg3 (v případě slizničního postižení) a Dsg1 (při muko – kutánním postižení) pomocí metody ELISA. Pro akantolýzu u PV je typické oddělení jen svrchních vrstev epidermis, zatímco spodní vrstva epidermis pevně lpí k dermoepidermální bazální membráně, vytváří tzv. řadu náhrobních kamenů (Mihai S, Sitaru C, 2007).

Diagnózu PV stanovíme pomocí typického klinického obrazu doplněného specifickými klinickými testy – přímým a nepřímým Nikolského fenoménem. Pozitivním přímým Nikolského příznakem, tzn. zatlačením palce na blízké okolí puchýře či eroze proti pevné podložce, dojde k diskontinuitě vrchních a spodních epidermálních vrstev a tvorbě eroze či rozšíření puchýře. Je dokázáno, že i v blízkém okolí probíhá vazba autoprotilátek na desmosomy. To je důvod, proč je nutné provést odběr vzorku z blízkého okolí puchýře k imunofluorescenčnímu vyšetření. Pozitivní, tzv. nepřímý Nikolského fenomén se vyznačuje zatlačením na krytbu puchýře a zvětšením velikosti puchýře do blízkého okolí. Tím můžeme jasně odlišit onemocnění skupiny pemphigu a pemphigoidu, kde u pemphigoidu jsou Nikolského příznaky vždy negativní. Dalším pomocníkem při stanovení klinické diagnózy PV je nespecifický tzv. Tzanckův test – cytologický průkaz akantolytických Tzanckových buněk na otiskovém preparátu ze spodiny čerstvého puchýře, materiál se barví May-Gruenwald-Giemsa.

Důležité pro správnou diagnostiku je diferenciální diagnóza PV, ne jedno onemocnění je schopné imitovat PV. Je potřeba vyloučit ostatní AIBD (onemocnění skupiny pemphigoidu, lineární IgA dermatózu, epidermolysis bullosa acquisita, dermatitis herpetiformis Duhring) či jiná hereditární bulózní onemocnění (epidermolysis bullosa simplex). Některé infekční choroby jsou schopné akantolýzy k vytvoření puchýře, jako jsou impetigo contagiosa nebo stafylokokový syndrom opařené kůže. V neposlední řadě musíme vyloučit jiné imunologicky podmíněné choroby – bulózní lékový exantém, erythema exsudativum multiforme či erozivní lichen planus. Podobný klinický obraz mohou mít i jiné dermatózy, u kterých však

nenalezneme autoprotilátky typické pro PV – porphyria cutanea tarda, bulózní eflorescence u pacientů s diabetes mellitus, posttraumatické buly vznikající opařením či elektrickým zásahem.

2.1.1.2. Pemphigus vegetans

Vzácnou variantou PV je tzv. *pemphigus vegetans*, kde se tvoří rozsáhlé madidující eroze nejčastěji v kožních záhybech (intertriginózních lokalizacích – v axilách či tříslech). Typické plošně vyvyšující se projevy mají hypertroficko – papilomatózní až vegetující vzhled s chronickým průběhem. Vznikají na podkladě předchozích vezikul (tzv. Neumannův typ vyskytující se převážně u žen) nebo pustul (tzv. Hallopeau typ). Sekundárně se eflorescence mohou impetiginizovat s přítomností kandidové infekce. U pemphigus vegetans vidíme přítomnost typických protilátek proti Dsg1 a 3, při postižení vzácných lokalit i Dsc1, v histopatologickém nálezu jsou typické abscesy s četnou přítomností eozinofilního infiltrátu v silně akantotické epidermis a tvorbou suprabazálního puchýře. Důležité je vždy odlišit podobně klinicky vypadající onemocnění, jako je lékový exantém jododerma či bromoderma tuberosum po kontaktu s léky obsahující jod či brom, nebo condylomata lata jako typické eflorescence u latentního stádia syphilis (Štork J et al., 2008).

2.1.1.3. Pemphigus herpetiformis

Pemphigus herpetiformis je vzácná klinická varianta pemphigu s klinickými znaky podobnými dermatitis herpetiformis (dříve nazýván „akantolytická dermatitis herpetiformis“) a s charakteristickými imunologickými znaky pemphigu (Ishii K, 2015). U pemphigus herpetiformis se tvoří puchýře v herpetiformním či anulárním uspořádání s vzácným postižením sliznice a typickou přítomností protilátek proti Dsg1 i Dsg3 (Otten JV et al., 2014) a Dsc3, proto se předpokládá, že pemphigus herpetiformis je klinickou variantou pemphigus foliaceus či pemphigus vulgaris (Ishii K, 2015). Drobné či větší puchýře se tvoří na povrchu erytematózních až urtikarielních eflorescencí, které mohu svědit či pálit. Projevy se hojí pomocí krust, centrální postupné epitelizace a mírné atrofie, tvoří se pozánětlivé hyperpigmentace po zhojených puchýřích či erozích, k jizvení však nedochází.

V histologickém obraze je opět typická suprabazální akantolýza a eosinofilní spongióza epidermis. Diagnóza je však stanovena pozitivitou DIF a typickým klinickým obrazem.

2.1.1.4. Pemphigus foliaceus

Pemphigus foliaceus (PF) je superficiální varianta onemocnění skupiny pemphigu. Je méně závažnou variantou pemphigu než PV. Vyskytuje se u osob mezi 30. a 60. rokem. Vyznačuje se kožními eflorescencemi, ve většině případů bez současného postižení sliznice. Typické pro PF jsou autoprotilátky, nejčastěji subtyp IgG4, proti Dsg1, které vedou k subkorneální akantolýze v oblasti *stratum granulosum* epidermis s nebo bez přítomnosti eosinofilního či neutrofilního zánětlivého infiltrátu (Rock B et al., 1989, Otten JV et al., 2014). Diagnóza PF je potvrzena intercelulárními depozity tkáňově vázaných či cirkulujících protilátek IgG a C3 složky komplementu pomocí DIF, resp. IIF. Molekulární specificita cirkulujících protilátek proti Dsg1 je stanovena také pomocí ELISA, hladina protilátek proti Dsg3 je u metody ELISA vždy nulová. Hladina Dsg1 koreluje se sérologickou a klinickou aktivitou PF. Spouštěcí faktor u PF je neznámý či sporadický. Dalšími možnými rizikovými faktory jsou extenzivní UV expozice, spálení, užívání léků (D-penicilamin, ACE inhibitory, nesteroidní antirevmatika), malignita (thymom) či endemické faktory prostředí.

Nejčastějšími lokalizacemi u PF jsou seborrhoické oblasti, tj. centrální obličej, kštice, hrudník a horní části zad. Zpočátku je možné pozorovat drobné superficiální intaktní puchýřky v těchto lokalizacích, kterých si často nemocný nevšimne, protože se velmi záhy rozšiřují a mění do rozsáhlých šupinatých erozí s krustami s okolním erytémem s drobnými puchýřky v okrajích, popisuje se vzhled kukuřičných lupínků (Otten JV et al., 2014), jejich splynutím může vzniknout až exfoliativní generalizovaná erytrodermie. Eflorescence u PF svědí a pálí. PF na rozdíl od PV je chronické onemocnění, které je asociované s menší mírou mortality. Jsou popsány i případy spontánní remise bez použití adekvátní léčby, projevy však mohou perzistovat i po několik let (Štork J et al., 2008).

Důležité je vždy odlišit seborrhoickou dermatitidu či erytrodermii způsobenou generalizovanou psoriázou či ekzémem, kde klinický obraz může zmást, proto je potřeba doplnit histopatologické vyšetření, DIF, IIF či ELISA ke stanovení správné diagnózy tohoto typu pemphigu v rámci AIBD.

Jako vzácné subtypy PF jsou popisovány *pemphigus erythematosus*, *endemický pemphigus foliaceus (Fogo selvagem)*, či *léky podmíněný pemphigus foliaceus*, které mají stejné klinické, histologické a imunopatologické znaky jako PF.

2.1.1.5. Pemphigus erythematosus

Pemphigus erythematosus (PE), neboli *Senear-Usher syndrom* či *pemphigus seborrhoicus*, je mírnější lokalizovaná a ostře ohraničená forma PF s chronickým průběhem. Byl poprvé popsán Francisem Seanerem a Barney Usherem v Chicagu na příkladu 11 pacientů, kteří sdíleli znaky pemphigu a lupus erythematosus (Senear FE, Usher B, 1926). Histologicky je obraz velmi podobný PF, tj. subkorneální akantolýza a ztluštění PAS-reaktivní BM, metodou DIF jsou stanovena lineární depozita protilátky IgG proti Dsg1, složky komplementu a na rozdíl od klasického PF i antinukleární protilátky (ANA) a lupus-band test, které jsou typické pro onemocnění pojiva a které ukazují na těsný vztah mezi PF a lupus erythematosus (Sitaru C et al., 2004, Mihai S, Sitaru V, 2007). Metodou IIF jsou namířeny cirkulující protilátky proti intercelulárním strukturám, vykazují tak typickou fluorescenci síťovitého charakteru, často kombinovanou s fluorescencí jader samotných keratinocytů v epidermis (Vassileva S et al., 2014).

Nemocní s PE vykazují také znaky systémového onemocnění, jako jsou anemie, lymfopenie, trombocytopenie, ledvinné abnormality, proteinurie, hypalbuminemie, generalizovaný edém při renálním selhání či pozitivitu revmatoidního faktoru. Dále jsou popisovány častější asociace s myasthenia gravis nebo thymomem.

Dle klinického obrazu u PE se v seborrhoické lokalizaci vyskytují jednotlivé či symetricky uspořádané erytematózní šupinaté a superficiálně erodované pevně lpící eflorescence, nejčastěji v obličeji, ve kštici, ale také v oblasti dekoltu či horní části zad, postihuje také sliznice. Předpokládá se účast slunečního záření jako spouštěcího faktoru tohoto onemocnění. V obličeji projevy často připomínají tvar křídel motýla, který je typickým znakem lupus erythematosus (Štork J et al., 2008).

2.1.1.6. Fogo selvagem

Fogo selvagem neboli brazilský pemphigus foliaceus, je závažná endemická varianta PF vyskytující se nejčastěji v Brazílii (také v Peru, Kolumbii, Paraguayi, El Salvadoru, Chile či Tunisu). Spouštěčem onemocnění se zdají být faktory zevního prostředí na podkladě molekulárních mimiker způsobené virovou infekcí přenášenou písečnou mouchou. To způsobí akantolýzu subkorneálních vrstev epidermis. U těchto nemocných je popisována vyšší familiární incidence (genetický faktor), nižší věk nástupu onemocnění či špatný celkový stav (Vassileva S et al., 2014).

2.1.1.7. Paraneoplastický pemphigus

Paraneoplastický pemphigus (PNP) je unikátní skupina pemphigu, která je asociovaná s nádorovým onemocněním (Ishii K, 2015). PNP byl poprvé popsán v roce 1990 GJ Anthaltem jako autoimunitní multiorgánové onemocnění, které se sdružuje s různými neoplastickými procesy, ale vykazuje pozitivitu protilátek proti desmosomům (Anthalt GJ et al., 1990). Také byly popsány další antigeny, nejen Dsg1 a 3, ale také desmoplakin I a II, periplakin (190 kDa), envoplakin (210 kDa), hlavní antigen u BP (BP230), plektin (500 kDa), inhibitor proteáz alfa-2- makroglobulinu 1 (170 kDa) či ne zcela identifikovaný peptid o molekulové hmotnosti 190 kDa (Mihai S, Sitaru C, 2007, Štork J et al., 2008, Otten JV, 2014, Salavec M, 2018). Diagnostika PNP se může zakládat také na imunofluorescenčním vyšetření, konkrétně se jedná o pozitivní reakci IgG metodou IIF použitím krysího žlučníku jako substrátu, který je bohatý na plakiny. Tím se odlišuje PNP od PV či PF, kde imunitní reakce na tomto substrátu je negativní, protože se zde neexprimuje Dsg1 ani Dsg3 (Ishii K, 2015).

Je to relativně velmi vzácné onemocnění, které postihuje jak kůži, tak sliznice a má klinicky podobný obraz jako PV. Je to jediné onemocnění ze skupiny pemphigu, kde vnitřní orgány mohou být poškozeny autoimunitním procesem (Vassileva S et al., 2014). Nejčastěji popsaná asociace je s lymfoproliferativním onemocněním, jako je B-lymfom, non-Hodgkinský i Hodgkinský lymfom, chronická lymfocytická leukémie, Castelmanova choroba či Waldenströmova makroglobulinemie, méně thymom, maligní melanom, systémová

mastocytóza či retoperitoneální sarkom (Nikolskaia OV et al., 2003, Mihai S, Sitaru C, 2007, Otten JV et al., 2014, Vassileva S et al., 2014).

Nejčastěji se PNP vyskytuje ve věku 45 až 75 let, ojediněle jsou popisovány i dětští či adolescentní nemocní, častější výskyt PNP je u mužů (Mimouni D et al., 2001, Vassileva S et al. 2014).

U PNP nelze hovořit o typickém klinickém obrazu, eflorescence bývají velmi polymorfní, vyskytují se na kůži i sliznicích. Popisuje se 5 klinických variant – pemphigus-like, pemphigoid-like, erythema multiforme-like, graft vs. host disease-like a lichen planus-like. Nejčastěji jsou popisovány perzistující silně bolestivé slizniční eroze v orofaryngu či na rtech (podobné se Stevens-Johnsonovým syndromem), diagnostikované jako refrakterní stomatitida. Může být postižena i sliznice genitálu, nosní a oční sliznice, jako tzv. pseudomembranózní konjunktivitida. Tzv. periungválni puchýřnaté léze, tj. v okolí nehtů na prstech rukou a nohou, či erythema multiforme-like léze na dlaních a ploskách jsou typické pro PNP. Difúzní erozivní stomatitida je typická pro PNP, u PV jsou popisovány spíše jednotlivé drobné izolované eroze. Jizvení v oblasti oční sliznice, tzv. jizvící konjunktivitida je dalším znakem k odlišení PNP od PV. Někdy morfologie odpovídá lichenoidním erupcím, lichen planus-like léze, dochází ke vzniku vezikul, bul, papul či erozí. Nelze hovořit o jasné predilekční lokalizaci na kůži, projevy se vyskytují na končetinách i trupu. Eflorescence u PV začínají nejčastěji na trupu a končetinách, zatímco u PNP jsou nejdříve postiženy dlaně, plosky a kolem nehtové oblasti. Nikolského znaky jsou u PNP na rozdíl o PV negativní. Dále je popisováno selhávání vnitřních orgánů, jako jsou plíce, s postižením bronchiálního epitelu, což vede k dyskeratóze a akantolýze buněk respiračního epitelu, vyvíjejí se těžké stenózy, to může dospět až k progresivnímu respiračnímu selhání (obstruktivní či restriktivní brochniolitidě) s intrapulmonálním krvácením asi u 30 % nemocných, ač obraz na RTG snímku plic se zdá být normální (Otten JV et al., 2014, Vassileva S et al., 2014). Kromě respiračního traktu je postižena štítná žláza, ledviny, hladká svalovina a gastrointestinální trakt, proto PNP tvoří součást tzv. paraneoplastického autoimunitního multiorgánového syndromu (PAMS) (Nguyen VT et al., 2001, Vassileva S et al., 2014).

Správná diagnostika nejen u PNP je esenciální. V histopatologickém obrazu pozorujeme intraepiteliální separaci keratinocytů s akantolýzou a interface dermatitidou. Pro DIF typicky svědčí intercelulární depozita IgG a C3 složky komplementu a lineární depozita v oblasti

bazální membrány. Cirkulující IgG pomocí IIF se vážou na epitel jícnu a BM. Zlatým standardem pro diagnostiku PNP je tzv. imunoprecipitace, která využívá radioaktivní značení keratinocytů, dále imunoblot nebo ELISA.

2.1.1.8. IgA pemphigus

Imunoglobulin A pemphigus je vzácná varianta pemphigu s asociací autoprotilátky IgA ve vazbě na povrch keratinocytů. Jedná se o chronické či subakutní onemocnění s výsevem pustul s tendencí ke splývání a formaci v anulární eflorescence s vyvýšenými okraji. Incidence a prevalence IgA pemphigu není dosud známá. IgA pemphigus se dále rozděluje na 2 subvarianty – subkorneální pustulózní dermatitidu (cílenou na desmokolin – Dsc1) či intraepidermální neutrofilní IgA dermatózu bez jasného cíleného antigenu (nejen Dsg1 a 3) (Mihai S, Sitaru C, 2007, Otten JV et al., 2014, Ishii K, 2015). Je popisována asociace IgA pemphigu a benigních či maligních IgA monoklonálních gamapatií a onemocnění gastrointestinálního traktu (Salavec M, 2018).

Primární léze jsou fragilní vezikuly či buly na erytematózní a olupující se kůži, které se postupně přetvářejí v pustuly, nejčastěji je postižený trup a končetiny, projevy se mohou však vyskytovat i v kštici, retroaurikulárně nebo v zapářkových lokalizacích, sliznice bývá ušetřena (Štork et al., 2008, Tsurata D et al., 2011).

V histologickém nálezu se prokazuje u IgA pemphigu subkorneální nebo intraepidermální zánětlivý neutrofilní infiltrát v horní dermis nebo epidermis s málo vyjádřenou a vzácnou akantolýzou. Dle DIF pozorujeme intercelulární IgA depozita v celé epidermis (platí intraepidermální neutrofilní dermatózu) nebo zvýrazněná depozita v horních vrstvách epidermis – subkoreálně (typické pro subkorneální pustulózní dermatózu), dále jsou popisována menší depozita IgG či C3 složky komplementu. Při IIF se stanovují cirkulující IgA autoprotilátky, které rozpoznávají spíše non – desmosomální transmembranózní proteinové struktury, jako substrát je použit opičí jícen. Pro zvýšení senzitivity klasické IIF se využívají IIF s Dsc1 transfektovanými COS-7 buňkami (Hashimoto T et al., 1997). K diagnóze se také může využít metoda stanovení protilátek proti desmokolinu metodou ELISA, jehož senzitivita však není příliš vysoká (Ishii K, 2015).

2.1.1.9. Léky indukovaný pemphigus

Léky indukovaný pemphigus je sporné a sporadické onemocnění skupiny pemphigu, které je asociováno s užíváním některých léků. Tímto příkladem jsou nejčastěji sulfhydrilové či thiolové léky jako je D-penicilamin, kaptopril, pyroxicam či pyritinol, dále penicilin a pyrazolony (Salavec M, 2018). U pacientů užívající tyto léky je léky indukovaná varianta mnohem častější než PV. Přesné autoantigeny u léky indukovaného pemphigu zatím nebyly dostatečně charakterizovány, popisují se jen protilátky proti desmogleinu (Korman NJ et al., 1991, Mihai S, Sitaru C, 2007). Klinicky se jedná o přítomnost morbili-formních či urtikariálních lézí, později imituje obraz pemphigus foliaceus nebo erythematosus. Výjimečně jsou postiženy sliznice.

2.2. Subepidermální tvorba puchýře

AIBD, u kterých se autoprotilátky vážou na strukturální proteiny v oblasti dermoepidermální junkce bazální membrány, označujeme jako onemocnění se subepidermální tvorbou puchýře. Tvoří se tedy protilátky proti hemidesmosomům. Při imunofluorescenčním vyšetřením pozorujeme lineární či granulární depozita protilátek IgG, IgA či C3 složky komplementu. Mezi tato onemocnění patří nejčastější bulózní pemphigoid, dále *pemphigoid gestationis*, jizvící pemphigoid, lineární IgA dermatóza*, epidermolysis bullosa acquisita, anti-p200 pemphigoid a dermatitis herpetiformis Duhring*. Všechna onemocnění sice řadíme mezi AIBD, pro každé jsou však stanovované rozdílné specifické autoprotilátky, mají rozdílný klinický obraz vyžadující odlišnou léčbu, liší se průběhem a také prognózou. Mají však společný mechanismus imunitní reakce, kde dojde k oddělení vrstev epidermis od bazální membrány, a tak se vytvoří subepidermální puchýř, adheze jednotlivých vrstev epidermis mezi sebou je však neporušena. Přesná a správná diferenciální diagnóza všech subepidermálních chorob u jednotlivců má terapeutickou a prognostickou odlišnost. Jako např.: *anti-laminin 332 pemphigoid* může být asociován s maligními procesy až ve 30 % případů, *anti p-200γ pemphigoid* se obvykle snadněji léčí a lépe a rychleji odpovídá na terapii, *epidermolysis bullosa acquisita* reaguje naopak hůře na cílenou terapii než BP (Van Beek N et al., 2012).

2.2.1. Onemocnění skupiny pemphigoidu

Klinický obraz při onemocnění pemphigoidu je velmi podobný onemocněním skupiny pemphigu, tvorba puchýře však probíhá na úrovni DEJ, tzn. subepidermálně. Je součástí AIBD, kde jsme schopni detekovat specifické strukturální proteiny, které zprostředkovávají adhezi hemidesmosomů bazálních keratinocytů (BP180, BP230, plektin, α6β4 integrin, CD151) k proteinům v lamina lucida či lamina densa (kolagen VII) BM.

U pemphigoidu rozeznáváme bulózní pemphigoid (BP), *pemhigoid gestationis* (*herpes gestationis*), jizvící pemphigoid (mukózní membranózní pemphigoid) a další vzácnější formy (lineární IgA dermatóza, bulózní systémový lupus erythematosus, *anti-laminin 332 pemphigoid* (detekce lamininu 5)*, anti-p200/laminin γ1 pemhigoid* (detekce lamininu γ1)*, α5 kolagen VII pemphigoid*).

2.2.1.1. Bulózní pemphigoid

Nejznámějším a nejčastějším typem onemocnění skupiny pemphigoidu je bulózní pemphigoid (BP), který je také nejčastějším typem všech AIBD. BP byl poprvé popsán jako samostatné onemocnění odlišné od pemphigu v roce 1953 (Lever W, 1953). Walter F Lever jako první na světě odlišil nejen BP od pemphigu, ale také odlišil dermatitis herpetiformis Duhring a další AIBD. Od této doby se hovoří o pojmu imunodermatologie a o autoimunitních bulózních chorobách. Teprve v roce 1964 Beutner a Jordan objevili, že autoprotilátky typické pro BP jsou stanovené metodou DIF a IIF a jsou lokalizované v oblasti bazální membrány (Beutner EH, Jordon RE, 1964).

Etiologie vzniku BP je ve většině případů neznámá, existuje však několik možných spouštěčů onemocnění, jako jsou UV záření, RTG záření, některé léky nebo vakcinace u dětí (Otten JV et al., 2014). Dále se hovoří o vztahu hormonálních regulačních mechanismů – estrogeny pravděpodobně stimulují vznik onemocnění, naopak vyšší hladina progesteronu působí spíše imunosupresivně (Salavec M, 2018).

BP se vyskytuje hlavně u starší populace, nejčastější nástup onemocnění je v 6. - 8. dekádě života (Feliciani C et al., 2009). Velmi vzácně se vyskytuje v mladších věkových skupinách a

u dětí, v tomto případě je prognóza většinou dobrá (Salavec M, 2018). Lehká predominance je popisována u ženského pohlaví. Incidence BP roste s rostoucím věkem, pohybuje se v rozmezí 2,5 - 41,8 nových případů/milion/rok (Jung M. et al., 1999, Bertram F et al., 2009, Alpsoy E et al., 2015). U pacientů starších 80 let incidence stoupá až k 150 - 330/ milion obyvatel/ rok (Kershenovich R et al., 2014). Nárůst počtu pacientů s BP může být důsledkem zvyšujícího se počtu příchozích pacientů do ambulancí dermatologů, lepší diferenciální diagnostikou svědivého exantému na těle, stárnutím populace či obecně zkoumáním nových diagnostických markerů k vyloučení AIBD. Rutinní provádění diagnostických testů u všech pacientů s podezřením na BP, tj. nemocných se svědivými projevy v pokročilém věku či ve stádiu s již plně rozvinutými puchýři, by mohlo přispět k dalšímu nárůstu incidence BP.

Proces imunosenescence, jinými slovy stárnutí imunitního systému daného organismu, zvyšuje šanci na výskyt autoimunitních onemocnění a nemožnost imunitního systému se vypořádat s touto poruchou adekvátní produkcí imunitních efektorových buněk. Zrání efektorových T lymfocytů, jako součást adaptivní imunity, je podmíněno správnou diferenciací z kmenové lymfoproliferativní buňky u mladých lidí, s přibývajícími léty však ubývá replikační schopnost naivních T lymfocytů měnit se v efektorové buňky. Stárnutím se redukuje počet naivních buněk, efektorové T buňky jako stárnoucí buňky již nemají správou proliferační kapacitu a nemohou se tedy klonálně expandovat k místu setkání se s potencionálním patogenem. To vypovídá o nedostatečné ochraně organismu a možnosti vzniku infekce (Aspinall R et al., 2010). Ve studiích in vivo a in vitro se ukazuje, že orgánově specifické protilátky způsobí poškození kůže a formaci puchýře v oblasti dermoepidermální junkce. Tento fakt závisí na aktivaci komplementu a chemotaxi zánětlivých buněk či sekreci proteolytických enzymů. Patogenicita autoprotilátek způsobuje přímou inhibici cílených adhezivních a specifických epitopů epidermálních struktur keratinocytů (Thoma-Uszynski S et al., 2006).

Autoprotilátky u BP jsou produkované proti hemidesmosomálním antigenům BP180 (BPAG2, kolagen XVII, velikost antigenu je 180 kDa) a BP230 (BPAG1, o velikosti 230 kDa), které připojují bazální keratinocyty epidermis k bazální membráně (Baum S et al., 2014). Protilátky (nejčastěji IgG, méně často IgA, IgE, IgM) u BP jsou většinou namířeny proti transmembránovému antigenu hemidesmosomů BP180 a intracelulárnímu plakinu BP230. BP180 je orientován svým N-koncem intracelulárně a zbylá delší část zůstává extracelulárně a skládá se z 15 kolagenových regionů, kde 16. nekolagenová doména

(NC16A) je známá jako imunodominantní region BP180 u pacientů s BP a pemphigoid gestationis (Giudice GJ et al., 1993, Murakami H et al., 1996).

Diagnóza BP je založená na pozitivitě minimálně dvou specifických markerů – histologický průkaz, detekce tkáňově vázané protilátky imunoglobulinu G (IgG) a C3 složky komplementu v oblasti BM epidermis metodou přímé imunofluorescence (DIF), detekce cirkulujících protilátek IgG pomocí nepřímé imunofluorescence (IIF) na opičím či králičím jícnu nebo na tkáňovém substrátu štěpeným 1 mol/l NaCl (salt split skin – SSS), detekce antigenů BP180/ BP230 pomocí ELISA. Pomoci nám může i typický klinický obraz.

Klinický obraz BP je velmi široký, existuje několik klinických variant. Jako typická manifestace BP se popisuje puchýř s napjatou krytbou. U nebulózní, kutánní formy BP pozorujeme silně svědivé, urtikariální a ekzematické plaky. Další variantou je lokalizovaný BP s přesně predilekční lokalizovanou skupinkou několika drobných puchýřů. Pro tzv. dyshidrotický BP jsou typické dyshidroziformní léze podobné palmoplantárnímu ekzému. Dále vezikulózní BP se projevuje vznikem jen drobných vezikul nikoliv bul. Další variantou BP je prurigoformní BP, kde klinický obraz je podobný onemocnění prurigo simplex subacuta nebo prurigo nodularis, posledním typem je vegetující pemphigoid s vegetacemi ve formě erozí hlavně v intertriginózních lokalizacích (Kneisel A, Hertl M, 2011, Schmidt E, Zillikens D, 2013) (Tab. č. 1).

Tab. č. 1: Varianty bulózního pemphigoidu dle typického klinického obrazu.

Varianty BP	**Klinický obraz**
Nebulózní	Svědivé, urtikariální a ekzematické plaky
Lokalizovaná	Drobné puchýře v přesně ohraničené predilekční lokalizaci
Dyshidrotická	Dyshidroziformní léze
Vezikulózní	Jen drobné vezikuly, bez přítomnosti bul
Prurigoformní	Svědivé papulky
Vegetující	Vegetující erozivní plaky v intertriginózních lokalizacích

Obecně lze však rozlišit 2 typická stádia BP - tzv. prodromální stádium BP neboli pre – pemphigoid (Obr. č. 4), které se vyznačuje perzistentní urtikárií a eflorescencemi podobnými jako při ekzému v prvních dnech až týdnech onemocnění. Předpokládá se, že tato atypická forma BP se ne vždy musí vyvinout v typický aktivní obraz BP a je často méně agresivní formou (Feliciani C et al., 2009). U BP v klasickém stádiu se během několika týdnů až měsíců rozvíjí generalizované drobné zánětlivé napjaté a čiré nebo hemoragické puchýře až několikacentimetrové buly na erytematózní či normální kůži. Jsou pevné a nesnadno praskají (Tab. č. 2, Obr. č. 4).

Tab. č. 2: Stádia bulózního pemphigoidu, vztaženo na časový horizont vzniku prvních eflorescencí a typického klinického obrazu.

Stádia BP	**Časový průběh**	**Klinický obraz**
Prodromální	První dny až týdny	- perzistentní urtikariální exantém - xerosis cutis - drobnopapulózní exantém - povrchová lichenifikace
Klasické/ plně rozvinuté	Po týdnech až měsících	- drobné napjaté/ čiré/ až hemoragické vezikuly či buly - na flexorových stranách končetin a intertriginózních zónách s postupnou generalizací na trup až postihující celé integumentum - na normální či erytematózní kůži - eroze či krusty, pozánětlivé hyperpigmentace, milia - hojení bez jizev

Nikolského znak je u BP na rozdíl od onemocnění skupiny pemphigu negativní. Projevy vždy silně svědí a hojí se bez vzniku jizev. Po prasknutí puchýře pozorujeme krusty a eroze na erytematózní spodině, zanechávají tzv. pozánětlivé hyperpigmentace, někdy milia. Projevy začínají na flexorových stranách končetin či v intertriginózních (zapářkových) zónách, postupně se rozšiřují na trup a může také dojít k postižení celého kožního integumenta. Kůže kštice, obličeje a dutina ústní bývají většinou bez projevů.

Obr. č. 4: prodromální stádium (vlevo) a plně rozvinuté stádium bulózního pemphigoidu (vpravo), archiv LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Mnichov, autor- prof. Dr.Dr.med. M. Sárdy.

U BP pozorujeme přítomnost specifických IgG autoprotilátek namířených proti strukturálním antigenům hemidesmosomů v oblasti DEJ. Etiopatogeneze u BP je nejasná. Při diagnostice AIBD je vždy třeba vyloučit nádorové onemocnění (popsána asociace s přítomností antigenu BP180) (nejčastěji karcinom prostaty a karcinom plic) pomocí stagingových metod (RTG

hrudníku, SONO břicha, specifické onkomarkery). Jako spouštěcí faktor onemocnění může hrát roli současné užívání některých medikamentů (např. ACE inhibitor, amoxicillin, vankomycin, penicilin G, penicilin V, lithium, amiodaron, nesteroidní antirevmatika, etanercept, furosemid a mnoho dalších). Kožní projevy pozorujeme po týdnech až měsících užívání daného léku, po vysazení se kožní změny hojí. Dalším možným spouštěcím faktorem je popisována fotodynamická terapie či UV záření (Altmeyer P, on-line Enzyklopädie, Otten JV et al., 2014).

Pro stanovení BP jsou známá diagnostická kritéria. Povinným kritériem je lineární depozitum IgG a C3 složky komplementu v oblasti dermoepidermální junkce při bazální membráně metodou DIF. Hlavními kritérii jsou napjaté puchýře či eroze na kůži, velmi vzácně s postižením sliznic, dále histopatologický nález subepidermálního puchýře s eosinofily. Mezi vedlejší kritéria patří depozita IgG v oblasti bazální membrány metodou IIF, přítomnost antigenu BP180 a BP230 pomocí IIF a stanovení těchto antigenů pomocí imunoblotu. Pro stanovení definitivní diagnózy BP musí být dodrženo povinné kritérium a 2 hlavní kritéria či povinné kritérium + 1 hlavní + 1 vedlejší (Kershenovich R et al., 2014).

2.2.1.2. Pemphigoid gestationis

Pemphigoid gestationis, dříve nazývaný *herpes gestationis* (PG), patří mezi extrémně vzácná autoimunitní puchýřnatá onemocnění kůže. Poprvé bylo toto onemocnění popsáno v roce 1872 Miltonem jako jedno z prvních onemocnění, které je spojené s těhotenstvím (Kelly SE et al., 1990, Jenkis RE et al., 1999). Vyskytuje se charakteristicky v době gravidity a těsně po porodu, nejčastěji si ho všimneme u primogravidit. Od názvu *herpes gestationis* se brzy upustilo, neprokázala se souvislost s herpetickou infekcí (Schmidt E, Zillikens D, 2013). Jedná se o velmi vzácné onemocnění, kde se tvoří vezikuly až buly na kůži či slizničních membránách. *Pemphigoid gestationis* je samostatná entita, jejíž imunopatologický obraz je úzce spojen s BP. U PG jsou typické autoprotilátky namířené proti strukturálním proteinům hemidesmosomů, a dochází tak k poruše adheze na úrovni DEJ a tvorbě subepidermálního puchýře. Popisovanými antigeny, proti kterým jsou u PG namířeny protilátky IgG jsou BP180 a BP230 (Huilaja L et al., 2014). U většiny pacientek s PG je detekovatelný subtyp IgG1 autoprotilátek, které jsou zaměřeny proti 5 epitopům BP180 (nekolagenní domény NC16A), z nichž 4 představují hlavní cílové antigeny protilátek provázející BP (Chimanovitch I et al.,

1999). V patogenezi PG se hovoří o možné zkřížené reakci mezi kůží a placentární tkání. Placentární BP180 je detekovatelný v trofoblastických buňkách plodu již v 1. trimestru. Cirkulující protilátka IgG1 proti hemidesmosomálnímu antigenu BP180 je také označována jako PG faktor (dříve HG faktor nebo termostabilní IgG1) (Salavec M, Boštíková N, 2019).

Výskyt PG je velmi ojedinělý, popisuje se 1 PG na 40.000 – 50.000 těhotenství bez rasové predilekce (Shornick JK et al., 1984, Semkova K, Black M, 2009, Kneisel A, Hertl M., 2011, Huilaja L et al., 2014). V evropských studiích se hovoří o incidenci 0,5 nemocných/ 1 milion obyvatel/ rok (Salavec M, Boštíková N, 2019). Projevy se mohou vyskytnout v jakémkoliv stádiu těhotenství, nejčastěji však v druhém až třetím trimestru, po několika málo týdnech po porodu projevů ubývá, klinická manifestace však může přetrvávat 2 týdny až 12 let po porodu (Jenkins RE et al., 1999). U 20 % případů se mohou typické eflorescence vyskytovat až po porodu (Salavec M, Boštíková N, 2019). Post partum jsou popisované exacerbace, které mohou být vázané na menstruační cyklus a pokles hladiny progesteronu či užívání anovulatorních léků (Lynch FW, Albrecht RJ, 1966, Osmundsen PE, 1966, Morgan JK, 1968). Při následujících graviditách se vždy vyskytuje závažnější průběh onemocnění a dřívější nástup generalizovaného silně svědivého pruritu (Katzenellenbogen I, Frumkin J, 1971). První vzniká extrémní pruritus sledovaný malými papulami, urtiky, plaky a drobnými až rozsáhlými puchýři v oblasti břicha, nejčastěji periumbilikálně, tedy kolem pupku, jejichž uspořádání je herpetiformní či anulární. Po několika dnech může dojít k rozšiřování na další části těla, trup, záda, hýždě a končetiny, také na dlaně a plosky. Projevy na obličeji a sliznicích jsou vzácné. Puchýře vznikají nejčastěji za 2–4 týdny od začátku onemocnění (Lipozencic J et al. 2012). V souvislosti s PG nebylo zaznamenáno vyšší riziko mortality a morbidity matky či dítěte, popisuje se jen častější vznik předčasného porodu (Jenkis RE et al., 1999, Vaughan JSA et al., 1999, Castro LA et al., 2006, Aoyama Y et al., 2007, Bedocs PM et al., 2009, Lipozencic J et al., 2012) či přechodné výsevy puchýřků u dětí (Salavec M, Boštíková N, 2019).

Diagnostickým markerem je typický klinický obraz a DIF, která ukazuje lineární depozita C3 složky komplementu v oblasti DEJ. Lineární depozice IgG je popisována v 25–50 % případů, není tedy základním diagnostickým kritériem (Holmes RC et al., 1982, Shimanovich I et al., 2002). Sérové protilátky mohou být u PG detekovány pomocí IIF či komplement fixačního testu (Kneisel A, Hertl M, 2011, Kneisel A, Hertl M, 2014). Dalšími diagnostickými

možnostmi je histopatologický odběr vzorku z postižené oblasti, imunoblotting, ELISA či HLA typizace (Salavec M, Boštíková N, 2019).

2.2.1.3. Jizvící pemphigoid (mucous membrane pemphigoid)

Jizvící pemphigoid neboli mukózní membranózní pemphigoid (MMP) či slizniční pemphigoid je vzácné onemocnění a je variantou ze skupiny pemphigoidu. MMP není charakterizován přítomností specifického cílového antigenu, u většiny pacientů nalézáme však IgG nebo IgA protilátky proti antigenu BP180, dále se popisuje přítomnost lamininu 5 či 6 (Salavec M, 2018). Incidence se pohybuje okolo 1–2 případů/ 1 milion/ rok bez známé rasové predilekce. Onemocnění postihuje častěji ženy v poměru 2: 1. Nemocní jsou většinou vyššího věku, medián se pohybuje mezi 62-66 lety (Salavec M, 2018). Pro MMP jsou charakteristické subepidermální puchýře postihující hlavně sliznice, a to orální a okulární. U mála pacientů je postiženo i kožní integumentum. MMP není primárně asociovaný s jinými systémovými chorobami, svými lézemi na sliznicích oka, dutiny ústní, genitálu či trávicího a respiračního traktu vede ke komplikacím v těchto lokalizacích, proto nemocný s MMP primárně vyhledá specializovaná pracoviště. Typickou lézí MMP je bolestivá bula, která se hojí přes stádium erozí a zanechává jizvy a adheze v příslušných postižených systémech, většinou jsou projevy lokalizované na hlavě, krku nebo v místě traumatu. Dochází tak ke ztrátě hlasu, obstrukci dýchacích cest, dysfágii, úbytku váhy, suchosti oka až slepotě (symblepharon) či poruchám reprodukce.

Vzácnou variantou MMP je anti-laminin MMP (anti-epiligrin, anti-laminin 5 či anti-laminin 332 pemphigoid). Vyskytuje se asi u 5–20 % všech MMP (Egan CA et al., 2003). Tato varianta je častěji asociována se solidními tumory, jako jsou adenokarcinomy v oblasti gastrointestinálního traktu, gynekologické a respirační oblasti, dále je popsána asociace s non-Hodgkinským lymfomem nebo kožní formou T buněčného lymfomu (Vassileva S et al., 2014).

2.2.1.4. Anti-p200 (laminin γ1) pemphigoid

Anti-p200 pemphigoid je podskupina subepidermálních AIBD, která se v literatuře popisuje až od roku 1996. Charakteristicky se vyskytují cirkulující protilátky proti lamininu o molekulové hmotnosti 200 kDa v oblasti dermoepidermální junkce v lamina lucida. Léze postihují jen kožní povrch, nejsou zmínky o postižení jiných orgánových soustav. Postižení jsou spíše mladší dospělí. Je známá asociace s preexistující psoriázou, patogeneze je zatím nejasná. Eflorescence anti-p200 pemphigoidu je třeba odlišit od BP, typickými lézemi jsou vezikuly či buly (Zillikens D et al., 1996).

2.2.2. Epidermolysis bullosa acquisita

Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) je vzácné chronicky probíhající subepidermální puchýřnaté onemocnění s postižením kůže a sliznic, které často nereaguje na jakoukoliv terapii. Je to získaná forma AIBD, která postihuje převážně dospělou populaci, jsou však popsány i případy u dětí. Pro EBA jsou typické cirkulující protilátky IgG proti nekolagenní doméně NC1/ kolagenní doméně kolagenu VII jako součásti BM o molekulové hmotnosti 290 kDa, popsány u dermoepidermální junkční zóny epitelu intestinální sliznice tlustého střeva (Chen M et al., 2002). Incidence onemocnění se popisuje na 0,26 % případů/ 1 milion obyvatel a tvoří asi 5 % puchýřnatých dermatóz (Salavec M, 2018).

Klinický obraz u EBA je heterogenní, rozlišujeme dva základní typy. První, tzv. klasický, nezánětlivý či mechanobulózní fenotyp, je typický na traumaticky poškozeném povrchu kůže, nejčastěji na rukou a nohou, pozorujeme dystrofii nehtů, vzhledem k fragilitě kůže se tvoří puchýře, léze se hojí jizvami a tvoří se drobná milia. Popisuje se i výskyt jizvící alopecie. Druhou generalizovanou variantou je tzv. inflamatorní fenotyp s erytematózními až urtikarielními eflorescencemi s napjatými čirými či prokrvácenými puchýři. Typicky se léze vyskytují na hýždích, v axilách nebo tříslech a jsou podobné projevům u BP či lineární IgA dermatózy. U nemocných, kde EBA postihuje i mukózní povrchy, jako je orální, okulární, vaginální či jiné sliznice, dochází ke strikturám při procesu jizvení a signifikantní dysfunkci v těchto lokalizacích (jícnové striktury, stenózy supraglottis), jako je ztráta vízu s obstrukcí nasolakrimálních vývodů, dysfágie, malnutrice, proces může končit až smrtí. Tento fenotyp je podobný MMP.

Tak jako některá AIBD i EBA vykazuje asociaci se systémovými onemocněními, jako jsou jiné autoimunitní choroby, malignity, hematologická onemocnění, infekce, endokrinopatie či idiopatické záněty střev. Až u 30 % pacientů je EBA asociovaná s Crohnovou chorobou, popisuje se, že EBA je jedna z extraintestinálních manifestací tohoto onemocnění (Ljubojevic S, Lipozencic J, 2012). Patogeneze EBA není zcela jasná, kolagen VII se nachází jak v kůži, tak ve střevním epitelu (intestinální forma kolagenu VII).

Diagnostickými kritérii EBA je histopatologické vyšetření a DIF, které jsou podobné BP. IIF na substrátu SSS vykazuje lineární depozita IgG na dermální straně puchýře (v německé literatuře se používá výraz „Blasenboden" neboli česky spodina puchýře), na rozdíl od BP, kde fluoreskuje epidermální strana puchýře (tzv. „Blasendach", česky krytba puchýře). Proto připadá v úvahu i diferenciální diagnostika k odlišení hlavně BP, dále lineární IgA dermatózy, porphyria cutanea tarda či toxické epidermální nekrolýzy (Štork J et al., 2008).

2.2.3 Dermatitis herpetiformis Duhring

Dermatitis herpetiformis Duhring (DH) je méně častá chronicky probíhající subepidermální kožní puchýřnatá choroba. Etiopatogeneze DH není zcela známá, jako základní příčina onemocnění se považuje gluten senzitivní enteropatie. Mezi další možné spouštěče patří trauma, expozice UV záření či příjem jodových preparátů (Salavec M, 2018). DH se vyskytuje nejčastěji mezi 30. – 40. rokem života s mírnou převahou mužů (3: 2). DH je asociována s HLA II. haplotypem B8, DR3, DQA1 a Dqw2, který je typický pro celiakii s familiárním výskytem. Střevní problematika je zpočátku ukryta, může se ale projevovat typickými symptomy, jako jsou bolesti břicha, průjem, deficit železa nebo růstová retardace u dětí (Štork J et al., 2008, Otten JV et al., 2014), pouze u 2/3 nemocných je histologicky potvrzena atrofie klků při intestinální biopsii.

Jedná se o subepidermální typ AIBD s IgA depozity v oblasti bazální membrány epidermis či dermálních papil. IgA protilátky rozpoznají epidermální transglutaminázu a zkříženě reagují s tkáňovou transglutaminázou (tTG) a vyústí v aktivaci komplementové kaskády alternativní cestou a přítomností neutrofilního a eosinofilního infiltrátu. Interakce tTG a střevního imunitního systému vede k aktivaci gluten-responzivních T-lymfocytů a zánětu na střevní sliznici (Salavec M, 2018). Metoda DIF prokazuje granulární depozita IgA v oblasti

dermoepidermální junkce s akcentací v dermálních papilách. Cirkulující anti-EMA protilátky (IgA1) v séru nemocných reagují s endomysiem a jsou detekovatelné pomocí IIF na opičím jícnu.

Klinicky se jedná o difúzní, vždy symetrické, polymorfní léze na erytematózním či urtikariálním podkladě, dále papuly, herpetiformně uspořádané vezikuly či eroze. Nejčastěji jsou postiženy extenzorové plochy loktů (90 %), kolen (30 %), ramena, hýždě, oblast sakra a při rozšiřování projevů se šíří do kštice a na obličej. Vyznačuje se projevy, které jsou provázené silným pruritem, pálením, a protože nutí ke škrábání, zanechává exkoriace a krusty. Tzv. prebulózní stádium DH s extenzivním pruritem a exkoriacemi imituje další svědivé dermatózy jako je urtikaria, scabies, nodulární prurigo či atopický ekzém.

Dále je k správné diagnostice možné provedení biopsie z tenkého střeva, genetické HLA testování či screening k vyloučení jiných autoimunitních chorob. Nemocní s DH obvykle nevykazují klinické symptomy střevního postižení. Aplikace glutenu přímo na povrch kůže či do kůže nezpůsobí vznik kožních eflorescencí, periorální aplikace glutenu však ano (Salavec M, 2018). Remise DH nastane při dodržování bezlepkové diety, při které vymizí i střevní obtíže spojené s celiakií.

2.2.4. Lineární IgA dermatóza

Lineární IgA dermatóza (LAD) či lineární IgA bulózní dermatóza (LABD) je vzácné chronicky probíhající onemocnění, pro které je typická asociace IgA a protilátek proti strukturám bazální membrány v lamina lucida nebo lamina densa. Histopatologicky se vyznačuje subepidermální tvorbou puchýře s formací mikroabscesů. Pro imunofluorescenční vyšetření jsou charakteristická lineární IgA depozita v oblasti bazální membrány, která jsou namířena proti tzv. LAD-1 (o molekulové hmotnosti 120 kDa) a LABD97 (s hmotností 97 kDa) antigenu, což jsou extracelulární domény antigenu BP 180 (Štork J et al., 2008, Salavec M, 2018).

Historicky byla zaměňována s dermatitis herpetiformis Duhring, nyní se hovoří o třech různých subtypech subepidermálního puchýřnatého onemocnění. LAD se vyskytuje v jakémkoliv věku s vyšší predominancí u žen. Jsou popisovány 2 peaky – dospělá forma u

lidí mezi 40 a 60 lety věku, dětská forma u dětí předškolního věku či neonatální forma. LAD je nejčastější AIBD v dětském věku (Štork J et al., 2008). U těhotných žen dochází ke zlepšení klinického obrazu i při zastavení užívání indikované terapie, po porodu jsou však popisovány časté relapsy (Vassileva S et al., 2014). Na rozdíl od DH, LAD nevykazuje žádnou asociaci s gluten senzitivní enteropatií.

Klinicky se jedná o heterogenní skupinu subepidermálních bulózních onemocnění. Bez speciální predilekce se tvoří na kůži silně svědivé až pálivé urtikarielní papuly (ojediněle absolutně bez svědění), vezikuly či buly v anulárním nebo polycyklickém pruhovitém až herpetiformním uspořádání, nazývané jako šňůra perel či hrozen šperků (u dětské formy), okraje jsou často vyvýšené. Nejčastěji jsou postiženy hýždě a perineum, také se projevy vyskytují na trupu nebo končetinách. Léze mají tendenci k rozšiřování se a splývání do skupinek bez jasné stranové symetrie, tím se liší od DH, kde jsou projevy vždy symetricky uspořádané. U dětské formy u 60–80 % nemocných se popisuje současné postižení sliznic, nejčastěji se jedná o orální či konjunktivální léze (Kelly SE et al., 1988, Vassileva S et al., 2014), déle perzistuje, má proto horší prognózu.

Etiopatogeneze u LAD je nejasná, jde ve většině případů o AIBD bez jasné asociace s jinými systémovými chorobami. V několika málo případech byl popsán současný výskyt LAD a idiopatických onemocnění střev (ulcerózní kolitida), chronické hepatitidy či malignity (Hodgkinovy, non-Hodgkinovy lymfomy a chronická lymfatická leukémie, ale i solidní tumory typu karcinomu močového měchýře). Jako spouštěcím faktorem se zdá být UV záření, traumata, infekce či užívání drog či léků (vankomycin, somatostatin, phenytoin, amiodaron, diclofenac, captopril, sodné soli penicilinu, ampicilin) (Vassileva S et al., 2014). U dětských pacientů se hovoří o infekčních spouštěčích (brucelóze, tuberkulóze, varicelle, herpes zoster, gynekologických infekcích, plicních infekcích /Paecilomyces/ a infekcích horních cest dýchacích).

3. VZÁCNÉ AUTOIMUNITNÍ PUCHÝŘNATÉ CHOROBY

Tento odstavec popisuje další AIBD, které se vyskytují méně často. Typickými představiteli je morbus Hailey – Hailey a morbus Grover.

3.1. Morbus Hailey – Hailey

Morbus Hailey – Hailey neboli familiární benigní pemphigus (pemphigus chronicus benignus familiaris, jiným eponymem dyskeratosis bullosa hereditaria) je onemocnění ze skupiny puchýřnatých chorob, které se vyskytuje u více členů rodiny bez pohlavní predilekce, jedná se tedy o hereditárně vázanou vzácnou AIBD. Je to choroba s autozomálně dominantním typem dědičnosti s inkompletní penetrancí, tzn. asi u dvou třetin pacientů s familiárním benigním pemfigem onemocní i jiní členové stejné rodiny, u zbytku se předpokládá sporadický výskyt. Nejčastěji se vyskytuje v pozdním dospívajícím věku a v dospělosti, tj. mezi 30. a 40. rokem věku. Jedná se o onemocnění s chronicky recidivujícím průběhem. První zmínka o tomto onemocnění byla od bratrů Haileyových již v roce 1939 (Hailey H, Hailey H, 1939). Typicky pro M. Hailey – Hailey jsou časté relapsy a remise.

Přesná etiologie vzniku familiárního benigního pemphigu zůstává nejasná, nejčastěji se jako patofyziologický důvod vzniku onemocnění zdá být nižší počet desmosomů intraepidermálně či disociace desmosomů a kolaps skeletu keratinocytů, dochází tak k inkompletní akantolýze a dyskeratóze, tedy abnormální a předčasné keratinizaci keratinocytů v epidermis. Dále se popisuje defekt vazebného transmembránového proteinu kalciové pumpy APT2C1, to vede k poruše regulace intercelulární adheze mezi keratinocyty v epidermis (Štork J et al., 2008). Imunofluorescenční metody jsou negativní.

Typickými eflorescencemi jsou malé často splývající vezikuly na erytematózní spodině, které jsou křehké a snadno praskají. Nejčastěji se vyskytují v zapářkových oblastech ve velkých kožních záhybech či na krku, tedy v místech častého možného mechanického dráždění. Tímto drážděním vznikají rozsáhlé a ostře ohraničené erodované až macerované plochy, které jsou velmi bolestivé. Postupně se hojí v krusty, mohou se však sekundárně impetiginizovat. Pro morbus Hailey – Hailey je typické hojení eflorescencí z centra při současném rozšiřování se velikosti lézí.

Možnými spouštěcími či rizikovými faktory jsou kromě mechanického dráždění i UV záření, extenzivní pocení, infekce, alergická nebo toxická reakce či současně probíhající seborrhoická dermatitida (Štork J et al., 2008).

3.2. Morbus Grover

Morbus Grover je přechodná a silně svědivá dermatóza, která se vyskytuje s mužskou predilekcí u nemocných středního věku. Tzv. tranzientní akantolytická dermatóza či benigní akantolytická dermatóza je onemocnění nejasné etologie. V histopatologickém obraze pozorujeme ohraničenou spongiózu se současnou akantolýzou a dyskeratózou. I zde, jako u benigního familiárního pemphigu, je fluorescenční vyšetření negativní.

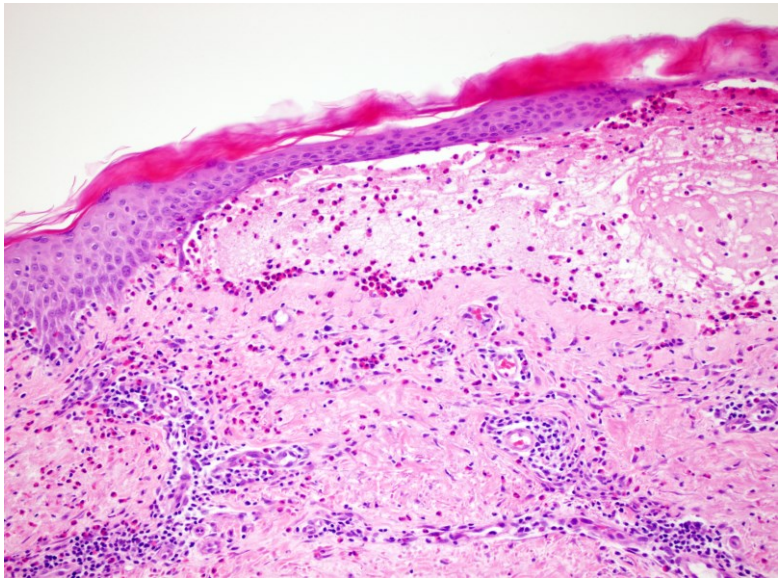
Typickými eflorescencemi jsou zarudlé, papulózní, papulovezikulózní či hyperkeratotické léze s tvorbou krust nejčastěji na trupu a horních končetinách, méně často v dutině ústní. Za rizikový faktor se považuje UV záření, horko, horečka nebo extenzivní pocení (Štork J et al., 2008).

4. KLASICKÉ VYŠETŘOVACÍ METODY U BULÓZNÍHO PEMPHIGOIDU

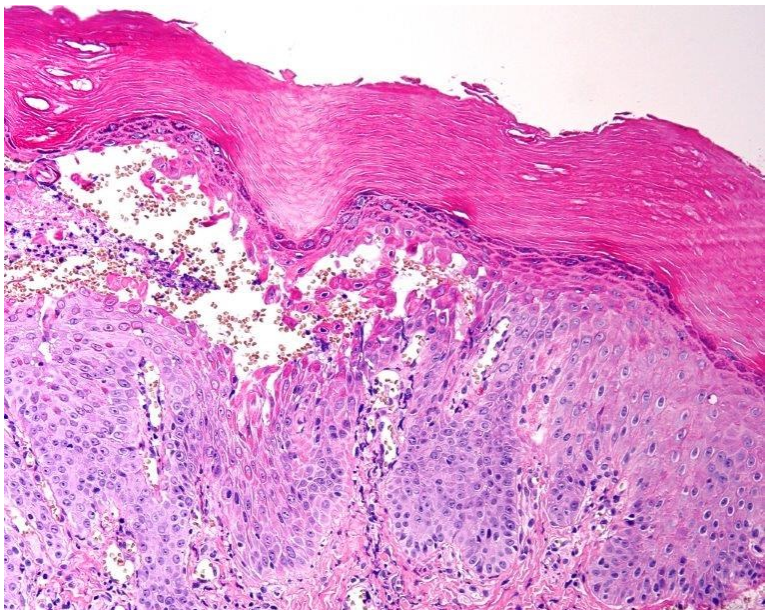
Mezi klasické diagnostické metody, které jsou v patofyziologii BP užívané, patří histopatologický rozbor postižené tkáně a fluorescenční metody. Histopatologické vyšetření u AIBD se řídí podle základního pravidla – odběr tkáně se vždy provádí z floridní léze. Vždy je potřeba odebrat čerstvou eflorescenci, protože pokud se odebere starší tkáň, případně sekundárně exkoriovaná či jinak pozměněná tkáň, výsledek může být i falešně negativní a diagnózu BP tak může histopatolog mylně vyloučit. Naopak odběr tkáně na imunofluorescenční vyšetření probíhá vždy perilezionálně, tj. odebírá se nepostižená tkáň, která se nachází v těsné blízkosti floridní eflorescence. Měli bychom se vyhnout odběru tkáně z projevů na dolních končetinách, kde je popisována nižší přítomnost antigenu BP. Mezi další experimentální metody v diagnostice BP patří ELISA, imunoblotting, imunoelektronová mikroskopie a imunoprecipitace (Salavec M, 2018).

4.1. Histopatologie

Histologický průkaz u BP je jen doplňkovou metodou ke stanovení správné diagnózy. Tkáň na histopatologický rozbor je v dermatologické praxi odebírána z čerstvého projevu nejčastěji pomocí rotačního průbojníkového nože. Vzorek kůže je poté fixován v roztoku formalínu. Histologický obraz plně rozvinutého obrazu BP může být typicky ve dvou variantách: BP bohatý nebo chudý na buňky. V případě BP, který je chudý na buňky, detekujeme subepidermální přítomnost puchýře s intaktními papilami s mírným až chybějícím zánětlivým infiltrátem. Pokud hovoříme o variantě BP bohatým na buňky, je možné stanovení subepidermální formace puchýře se zřetelným zánětlivým infiltrátem na edematózní spodině puchýře a v lumen puchýře pozorujeme velké množství eosinofilů, lymfocytů a neutrofilů. V prvotním urtikarielním stádiu, zatím bez vzniku puchýřů, je typický edém dermálních papil, rozšíření krevních a lymfatických cév, dále fokální smíšený buněčný infiltrát složený z lymfocytů, eosinofilů a ojediněle neutrofilních leukocytů. Diagnostickým znakem je lineární uspořádání leukocytů v oblasti dermoepidermální junkční zóny. Méně často nalézáme eosinofilní subkorneální mikroabscesy (Kneisel A, Hertl M, 2014, Otten JV et al., 2014). Typické pro BP je tedy separace basálních keratinocytů v oblasti dermoepidermální junkce (Obr. č. 5), na rozdíl od onemocnění skupiny pemphigu, kde pozorujeme intraepidermální formaci puchýře (Obr. č. 6).



Obr. č. 5: histopatologický obraz bulózního pemphigoidu (subepidermální akantolýza), zvětšeno 20x, barvení hematoxylin eosin, Autoimunitní laboratoř LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie Mnichov, autor- prof. Dr.Dr.med. M. Sárdy.



Obr. č. 6: histopatologický obraz pemphigus vulgaris (intraepidermální akantolýza), zvětšeno 200x, barvení hematoxylin eosin, Archiv histopatologické laboratoře FN Královské Vinohrady.

Obecně lze říci, že epidermis u BP vykazuje úseky parakeratózy v rohové vrstvě, nevýraznou spongiózu a exocytózu mononukleárů a ojedinělých eozinofilů. V prosáklém vazivu horního a středního koria jsou patrné perivaskulární mononukleární infiltráty s hojnou účastí eozinofilů, které jsou přítomny i intersticiálně.

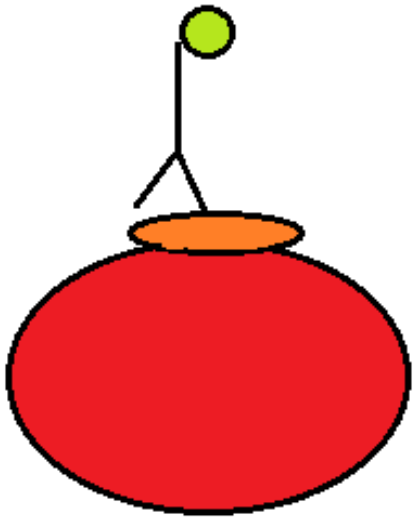
4.2. Přímá imunofluorescence

Vzorek kůže k vyšetření metodou přímé imunofluorescence je odebrán z blízkého okolí čerstvého projevu, perilezionálně, nejčastěji rotačním průbojníkovým nožem jako je tomu v případě histopatologického vyšetření. Odebraná tkáň musí být co nejrychleji transportována do laboratoře, nejčastěji je nativní tkáň ihned hluboce zmražena nebo se může transportovat v Michelově mediu, výsledky lze poté odečíst i v odstupu 2 týdnů (Salavec M, 2018). Fluorescenční mikroskopie je obecně mikroskopická metoda založená na tom, že používané fluorescenční látky, které jsou ozářeny světlem určité vlnové délky, emitují takové světlo, jehož vlnová délka je delší. Při technice fluorescenční mikroskopie užíváme ultrafialového světla, takže k emisím dochází ve spektru viditelného světla, které je lidské oko schopno rozpoznat. Fluoreskující látka, která je v této metodě používána, se jeví jako velmi jasně žlutavo – zeleně svítící částice na černém poli. K tomuto jevu je potřeba použít takový mikroskop, jehož zdrojem je ultrafialové světlo. Vzhledem k tomu, že musíme hlavně chránit lidské oko, aby při emisi UV záření nedošlo k jeho poškození, jsou součástí mikroskopu speciální filtry, které nebezpečné záření odcloní. Jako fluoreskující substance se může použít přirozeně fluoreskující látka, která je normální součástí buňky, jako jsou vitamín A, vitamín B či porfyriny. Ve většině experimentálních postupů se využívají jiná fluorescenční barviva, jako jsou např. fluorochromy, při diagnostice AIBD se využívá fluorescein isothiokyanát (FITC). Tyto fluorescenční látky mají vysokou afinitu k buňkám a tkáním, proto se fluoreskující barvivo na buněčné struktury snadno naváže.

Přímá imunofluorescence (DIF) je v dermatologii používána jako rutinní metoda. Umožňuje detekci protilátek, antigenů, složek komplementového systému a fibrinových produktů. Přímá, jinak označovaná jako primární, imunofluorescence je základní diagnostickou metodou BP, která vykazuje nejvyšší senzitivitu, přes 90 % (Sárdy M et al., 2013). Dochází k vazbě specifických primárních protilátek proti specifickému vyšetřovanému strukturálnímu proteinu v tkáňovém preparátu (Obr. č. 7). K detekci jen vázaných protilátek je potřeba

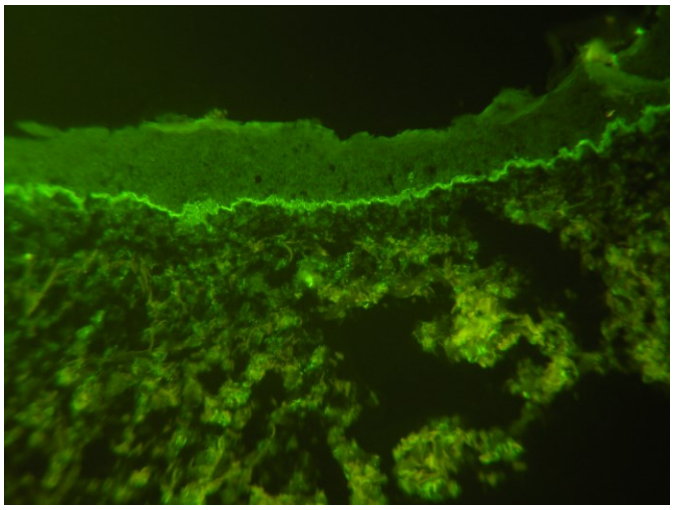
preparát promýt oplachovým roztokem, který je schopný vymýt volné nenavázané protilátky a ponechat jen protilátky specificky vázané.

Velmi důležité je predilekční místo odběru, u podezření na AIBD je vhodné odebrat těsné sousedství čerstvého puchýřku, tzv. erytematózní val.

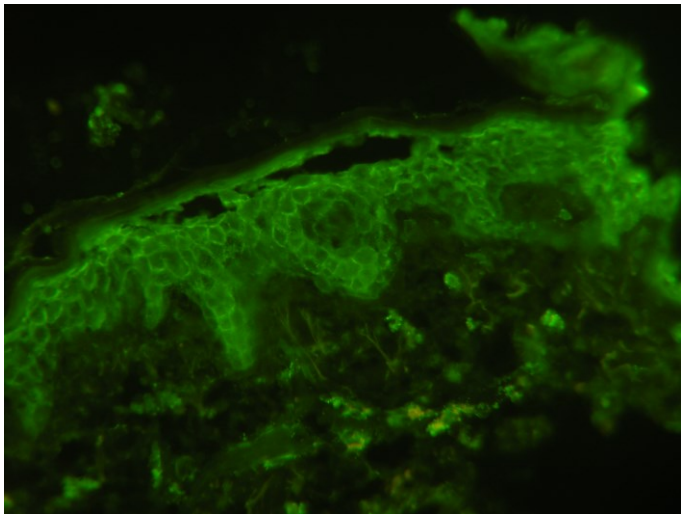


Obr. č. 7: schéma metody přímé imunofluorescence, keratinocyt (červeně), antigenní buněčné povrchové struktury (oranžově), navázaná primární protilátka, která je značená fluorochromem (zeleně).

Imunohistopatologie DIF je charakterizována přítomností tkáňově vázaných protilátek IgG namířených proti strukturálním komponentám kožní bazální membrány. IgG protilátky se specificky a predominantně vážou na hemidesmosomální proteiny – BP180, jinak nazývaný kolagen XVII, BP antigen 2, BPAG2, a dále BP230, známý též pod jménem BP antigen 1 či BPAG1. Kromě protilátky IgG je možno detekovat i IgA a IgM. C3 složka komplementu hraje také významnou roli v diagnostice BP. Pro BP je typický souvislý pruh IgG a C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány epidermis a bazální membrány adnex, který u bulózního pemphigoidu přechází do stropu subepidermálního puchýře (Obr. č. 8), na rozdíl od onemocnění skupiny pemphigu, kde nalézáme fluoreskující intraepidermální lineární síť (Obr. č. 9). Pro vizualizaci protilátek Ig a C3 je potřeba použít vizualizační fluorescenční činidlo, FITC. Veškeré preparáty jsou hodnoceny použitím fluorescenčního mikroskopu. DIF je v dnešní době brán jako zlatý standard při diagnostice BP.



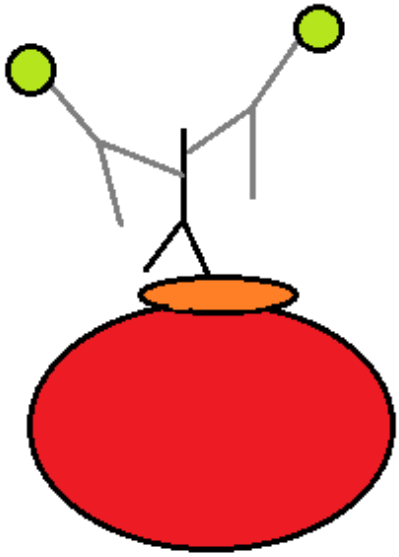
Obr. č. 8: subepidermální lineární depozita C3 a IgG metodou přímé imunofluorescence pod fluorescenčním mikroskopem, zvětšeno 20x, Archiv autoimunitní laboratoře LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie Mnichov, autor- prof. Dr.Dr.med. M. Sárdy.



Obr. č. 9: intraepidermální depozita IgG metodou přímé imunofluorescence pod fluorescenčním mikroskopem, zvětšeno 40x, Archiv autoimunitní laboratoře LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie Mnichov, autor- prof. Dr.Dr.med. M. Sárdy.

4.3. Nepřímá imunofluorescence

Metoda nepřímé imunofluorescence (IIF) využívá séra od pacienta s BP a zdravou tkáň jako substrát. Jedná se o dvoukrokovou metodu. Nejprve je zdroj antigenu (tkáňový substrát) inkubován s vyšetřovaným sérem k formaci komplexu antigen – protilátka, poté je tento vytvořený komplex označen antihumánním imunoglobulinem konjugovaným s fluorescenčním barvivem (Salavec M, 2010). Zkoumá se, zda pacientovy cirkulující protilátky jsou schopné se navázat na epidermální/dermální stranu separované tkáně využívající specifické antigenní struktury hemidesmosomů. U IIF hodnotíme přítomnost a množství primárních patogenních autoprotilátek v séru pacienta s AIBD. Jako zdroj antigenu je možno využít kromě normální lidské kůže i živočišnou tkáň, nejčastěji se používá tkáň jícnu opice, králíka či epitel morčecí tlamky (Salavec M, 2010). Fluorochromem neznačný epitop primární specifické protilátky se váže na vyšetřovaný protein v tkáni. Na tuto primární protilátku nasedá sekundární protilátka, která se na ni specificky váže, je však již značena fluorochromem pro vizualizaci (Obr. č. 10).



Obr. č. 10: schéma metody nepřímé imunofluorescence: keratinocyt (červeně), antigenní buněčné povrchové struktury (oranžově), navázaná primární protilátka (černě), na kterou je navázána sekundární protilátka (šedě), která je značená fluorochromem (zeleně).

Jednotlivé sérologické testy obyčejně prokážou správnou diagnózu BP u 60–80 % pacientů. U jiných chronicky probíhajících svědivých dermatóz je popisována občasná přítomnost protilátky IgG proti specifickému antigenu BP180 a/nebo BP230 (Feliciani C et al., 2009). Kombinace více diagnostických testů vede k záchytu většího procenta pacientů se správnou diagnózou BP. Proto je třeba vyvíjet nové diagnostické metody, které by přispěly ke zvýšení senzitivity při současném zachování vysoké specificity.

4.4. ELISA

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) je analytická metoda, která je schopná zachytit imunoenzymaticky cirkulují protilátky a specifické antigeny u BP. Na jednoho z těchto partnerů se kovalentně váže enzym (peroxidáza či alkalická fosfatáza). Tento enzym katalyzuje chemickou přeměnu přidaného chromogenního či fluoregenního substrátu a mění ho na produkt, který se následně zbarví. K odečtení výsledku reakce se využívá spektrofotometr, který vyhodnotí výsledek na základě intenzity barvy. V dnešní době se ELISA používá jako doplňující standardní metoda u nejednoznačných případů BP. Existuje několik modifikací testu – přímá ELISA detekující antigeny, nepřímá ELISA detekující protilátky či sandwichová metoda v přímé i nepřímé variantě (Salavec M, 2010). Imunofluorescenční metody jsou metodou první volby u diagnostiky BP, nejsou však schopné stanovit přesný molekulární cíl autoprotilátek. ELISA detekuje reaktivitu BP180 a BP230 antigenů protilátek jakou součásti hemidesmosomů v oblasti dermoepidermální junkce. Hlavním epitopem antigenu BP180 je extracelulární doména NC16A, která se vyskytuje asi v 82 % nemocných s BP. BP230 ELISA využívá rekombinantní doménu s N a C – koncem. **Stanovení hladiny antigenu BP180 ELISA koreluje s aktivitou onemocnění**, při aktivním vzplanutí onemocnění je hodnota mnohonásobně zvýšena, zatímco při remisi se hodnosta BP180 snižuje. Pokud je redukce titru BP180 v prvních 60 dnech nižší než 20 %, je riziko recidivy vyšší, pokud je však titr BP180 150. den léčby nízký, pravděpodobnost recidivy je pouze 10 % (Fichel F et al., 2014). Na rozdíl od BP180 hladina BP230 není signifikantním markerem aktivity BP (Ishii K, 2015). Metodika specifických testů ELISA, která detekuje BP antigeny BP180 a BP230, pomáhá ostatním diagnostickým testům při stanovení diagnózy BP využitím autoimunitních molekulárních mechanismů v plně rozvinutém aktivním stádiu BP s floridními lézemi (Feliciani C et al., 2009). V diagnostice BP pomocí ELISA se užívají komerčně vyráběné sety.

5. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Stávající klasické laboratorní metody umožňují diagnostiku BP, která však není schopná zachytit sto procent všech nemocných, kde klinický obraz lékaři nabízí možnost podezření na některé z autoimunitních puchýřnatých chorob. Tato skutečnost zahrnuje široké pole možností ve zkoumání a popisu nových diagnostických markerů, které mohou vést ke zvýšení senzitivity při zachování vysoké specificity. Tento výzkum je zaměřen na charakterizaci dalších diagnostických markerů u pacientů s verifikovanou diagnózou BP, které mohou být součástí klasického screeningu, a pomoci tak při diagnostice nejednoznačných případů a předejít tak stanovení chybné diagnózy a následně i chybného léčebného postupu.

5.1. Hypotéza

Rozšíření spektra klasických vyšetřovacích metod o dvě další vyšetření zvýší diagnostickou sensitivitu u pacientů s BP:

1. Komplement fixační test (CFT) je metoda popisující vazbu protilátky IgG a C3 složky komplementu na bazální membránu keratinocytů u BP.

2. Specifikace jednotlivých subtypů protilátky IgG (IgG1, IgG3, IgG4) a jejich vazba na struktury bazální membrány mikroskopicky vykazuje lineární depozita v oblasti subepidermální junkce.

5.2. Cíle práce

Cílem této práce je ukázat a vysvětlit princip nových metod v diagnostice bulózního pemphigoidu. Jednotlivé dosavadní vyšetřovací metody či kombinace těchto metod jsou schopné odhalit většinu případů, často podpořenou typickým klinickým obrazem. Naším cílem je však stanovit na velké skupině pacientů s již předem diagnostikovaným BP nové markery, a tak doplnit klasické vyšetřovací metody, které jsou v dnešní době rutinně při

diagnóze používány. Zaměřili jsme se na patofyziologickou podstatu imunitní reakce u BP v oblasti bazální membrány.

Na LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie v Mnichově jsme si položili základní otázku, co dělat u pacientů, kde metody s nižší senzitivitou nejsou schopné dostatečně dobře přispět k diagnostice BP a detekovat dostatečné množství pacientů s BP. Byl použit široký soubor pacientů s předem verifikovanou diagnózou BP pomocí minimálně 2 klasických diagnostických metod, tj. charakteristický histologický obraz, detekce tkáňově vázaných IgG či C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány metodou DIF, detekce cirkulující IgG metodou IIF či stanovení antigenu BP180 nebo BP230 metodu ELISA. To vše doplněno o typický klinický obraz.

Z tohoto velkého souboru jsme vybrali jen ty pacienty, kteří byli pomocí klasické IIF detekcí cirkulujících IgG protilátek negativní či v šedé zóně, ač diagnóza BP byla stanovena pomocí jiných diagnostických metod než klasické IIF. U CFT jsme použili nepřímou imunofluorescenci k diagnostice pacientů s potvrzenou diagnózou BP k vizualizaci lineární depozice C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány keratinocytů. Po vizualizaci fluorescenčním činidlem se snažíme pozorovat lineární depozita IgG a C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány v laboratorních podmínkách.

V literatuře se často hovoří o důležitosti protilátky IgG, která je esenciální v diagnostice BP, senzitivita cirkulující IgG pomocí nepřímé imunofluorescence je však relativně nízká. Již od 60. let 20. století je známo, že IgG autoprotilátka se skládá z několika subtypů, které jsou či nejsou schopné aktivovat komplement. V této práci je popisován výzkum založený na detekci jednotlivých subtypů protilátky IgG (konkrétně IgG1, IgG3, IgG4, protilátka IgG2 nebyla zkoumána pro příliš nízkou specificitu, která byla pospána i v dřívějších publikacích), snažíme se zlepšit senzitivitu testu IIF při udržení vysoké specificity testu, a pomoci tak při diagnostice BP. Jako další možnost jsme vyzkoušeli, jaké je zastoupení jednotlivých subtypů protilátky IgG vztaženo ke koktejlu složeného ze všech 3 zkoumaných subtypů protilátky IgG.

6. MATERIÁL A METODIKY

Vzhledem k nárůstu nemocných s klinickým obrazem puchýřů je potřeba přesnější a rychlejší diagnostika. Dosavadní metody nejsou dostačující, kombinací všech známých vyšetřovacích metod nejsme stále schopni detekovat sto procent pacientů, proto je potřeba vyvíjet nové metodické postupy či markery, které by dosavadní diagnostiku zlepšily. Takovou možností je použití komplement fixačního testu u pacientů s BP či testování afinity jednotlivých subtypů IgG jako hlavní autoprotilátky v patogenezi BP.

6.1. Komplement fixační test

Další diagnostickou metodou, která byla v 70. letech 20. století objevena a v minulosti v rámci diagnostiky AIBD využívána k úzké diagnostice pemphigoid gestationis (dříve známý jako herpes gestationis), je tzv. komplement fixační test (herpes gestationis factor test – CFT), který aktivuje složky komplementového systému.

Komplement je fyziologická součást nespecifické imunity člověka. Řadí se mezi humorální složku neadaptivního imunitního systému, která reaguje na přítomnost škodlivé látky rychle, řádově v minutách. Na rozdíl od specifické neboli adaptivní složky imunity není schopna si vytvořit tzv. imunologickou paměť, nevytvoří se tedy paměťové imunitní buňky při prvním setkáním se s antigenem. Jako komplement se označuje skupina asi 30 sérových či membránových proteinových struktur, které jsou jako součást vrozené imunity schopné reagovat s dalšími složkami imunitního systému člověka. Hlavními zástupci komplementu jsou složky označené jako C1 až C9, které se navzájem v přesném sledu kaskádovitě aktivují. Nejdůležitější komponentou, která je u AIBD standardně laboratorně detekována, je složka C3, konkrétně její subtyp C3b, který má schopnost se pevně vázat na buněčné povrchy.

Dalšími důležitými funkcemi komplementu je proces opsonizace, chemotaxe a osmotická lýza napadených buněk. Pod pojmem opsonizace rozumíme proces, při kterém se zvyšuje účinnost fagocytózy cizorodého patogenu, například bakterie. Dochází ke kovalentní vazbě C3b složky komplementu a specifických protilátek (hlavně ze skupiny IgG), které tak společně vytvoří komplex antigen-protilátka. Tento komplex je schopný naprogramovaně patogen eliminovat. Další funkcí komplementu je proces chemotaxe, která se vyznačuje

typickým chemoatraktivním pohybem po chemotaktickém gradientu pomocí specifických mediátorů, cytokinů, které jsou v tomto případě označovány jako chemokiny. Chemotakticky reagují C3a, C5a a C4a složky komplementu. V neposlední řadě je důležitá schopnost osmotické lýzy. Dochází k vytvoření lytického membránového komplexu C5 – C9, což je terminální složka celé komplementové kaskády, která způsobí zničení určitých patogenů a buněk vytvořením komunikačního kanálu jdoucí skrz buněčnou membránu atakované buňky.

Aktivace komplementu pro zničení choroboplodného zárodku probíhá třemi způsoby. Nejznámější cestou aktivace je klasická cesta, která je aktivována protilátkami, pomocí spuštění komplexu antigen – protilátka. Vazba protilátky na povrch patogenu způsobí odhalení vazebného místa pro C1 složku. C1 aktivuje proteolýzou složky C2 a C4, které vytvoří tzv. C3 – konvertázu. Klasická C3 – konvertáza složená ze složek C4b a C2a štěpí C3 protein na C3a a C3b, a tak způsobí vznik již dříve zmíněného komplexu antigen – protilátka. Dalším důležitým proteolytickým enzymem je C5 – konvertáza, složená ze subtypů C4b, C2a a C3b, která štěpí protein C5 na složky C5a C5b. Fragmenty C3a a C5a, méně i C4a, slouží jako anafylatoxiny a chemotaktické faktory pro fagocytující buňky, které se tak mohou účastnit zlikvidování probíhajícího zánětu v těle.

Alternativní cestou aktivace komplementu rozumíme přímé štěpení složky C3 na C3a a C3b přímým účinkem patogenu. C3b působí zpětnovazebně jako alternativní C3 konvertáza a aktivuje samotnou C3 složku komplementu. Tak dochází k mnohonásobnému zesilování původního podnětu. Tento děj pozorujeme jak na povrchu cizorodých patogenů, tak i na površích vlastních buněk, tento zpsob aktivace komplementu vyvolá proces autoimunitní reakce. To je podstatou vzniku autoimunitních onemocnění.

Aktivace lektinovou cestou je podobná aktivaci klasickou cestou, tedy specifickou protilátkou, která je zde nahrazena sérovým lektinem, tzv. lektin vážící manózu (MBL). Ten se váže specificky na povrch patogenu přímo, bez závislosti na protilátkách. Jeho funkce je podobná složce C1, která hraje klíčovou roli v aktivaci klasickou cestou, která štěpí složky C4 a C2.

Subtyp C5b, aktivován pomocí C5 – konvertázy, tvoří vazbu s dalšími složkami komplementu za vytvoření membránového lytického komplexu. Komplex složek C5b, C6, C7, C8 a C9

utvoří v buněčné membráně napadených buněk komunikující pór. To vede k unikání cytoplazmatických komponent, a tak k poruše osmotické rovnováhy a samotná buňka zaniká.

Skupina komplementu je na jednu stranu účinná v boji s nežádoucím patogenem, může však neřízeně poškozovat i buňky tělu vlastní procesem autolýzy. K zabránění tomuto nežádoucímu a nebezpečnému procesu slouží inhibitory komplementu, které blokují aktivaci jednotlivých složek komplementu na určitých úrovních, a tím zamezí aktivaci komplementové kaskády (Hořejší V, Bartůňková J, 2002).

Komplement fixační test je metoda využívající nepřímé imunofluorescence k detekci C3 složky komplementu nanesené na kožním substrátu, který je štěpený jednomolárním roztokem NaCl (SSS), a fixovaný pomocí protilátky IgG (Jordon RE et al., 1976, Katz SI et al., 1976, Carruthers JA, Ewins AR, 1978, Millns JL et al., 1979, Kurihara S et al., 1980). Již v minulosti výzkumy prokázaly potencionální pomoc CFT při diagnostice BP (Jordon RE et al., 1976, Fuligni A et al., 1990) na úzké skupině pacientů. V pozdějších letech se v odborné literatuře o CFT nemluví, tato metoda nebyla dále rozvíjena a blíže zkoumána.

Herpes gestationis factor test (CFT) je test, který byl popsán poprvé v 70. letech 20. století. Byl dokumentován na velmi malém souboru pacientů s PG, BP a SLE. Byla hledána souvislost mezi aktivitou onemocnění, tedy vznikem floridních lézí, a lineární depozicí C3 složky komplementu. Bylo dokázáno, že u PG je využit alternativní způsob aktivace komplementu, zatímco u BP byla aktivována klasická cesta. V dalších publikacích byl tento poznatek implementován na širší skupinu pacientů, vždy se však nejednalo o velký reprezentativní vzorek pacientů s prokázanou diagnózou BP, řádově šlo vždy jen o několik jednotek či desítek pacientů. Vzhledem k tomu, že v ČR není velké centrum pro diagnostiku puchýřnatých onemocnění, bylo náročné najít kliniku, kde se shromažďují pacienti s podezřením na AIBD. Takový typ kliniky jsem ve spolupráci a doporučením vedení Dermatovenerologické kliniky FNKV našla na LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie v Mnichově pod vedením prof. T. Ruzicky, kde se nachází velká autoimunitní laboratoř a specializovaná ambulance pro puchýřnaté choroby pod vedením prof. Sárdyho (momentálně již přednosta Dermatologické kliniky na Semmelweisově univerzitě v Budapešti). Tým profesora Sárdyho nasbíral stovky sér od pacientů s BP, která sloužila jako podklad mého výzkumu. Na vzorku 300 pacientů jsme široce implementovali metodu CFT jako staronového markeru, který by mohl pomoci v upřesnění diagnostiky BP u

pacientů kromě již dobře známých klasických diagnostických metod, a který by potvrzoval správnost diagnózy BP jako doplňkové metody.

Je důležité podotknout, že CFT u pacientů s BP je metoda využívající modifikovanou IIF na SSS, nemá nic společného s CFT rutinně používaném v infektologii při diagnostice infekcí jako jsou např. brucelóza či syphilis, tzv. Bordett-Wassermannův test, kde je využíván kromě externě dodávaného komplementu a jeho antigenů také komplement vlastní tkáně, který je nejprve preinkubován s protilátkami proti ovčím červeným krvinkám a následně zafixován (Heizmann W et al., 1985, Wassermann A et al., 1906). Pokud je komplement takto zafixován, není již schopný lyzovat ovčí erytrocyty. Metoda CFT užitá v našem případě v diagnostice AIBD nezávisí na množství antigenů či komplementu samotného, protože pacientská séra nejsou ovlivněna vlastním systémem komplementu, a podíl externě dodaného komplementu a externích antigenů není zcela standardizován. Průkaz pozitivity CFT u pacientů s BP probíhá pomocí vizualizace komplementové podložky C3, která je navázána na bazální membránu tkáňového substrátu SSS. Proto jsme schopni detekovat jen protilátky cílené specificky proti bazální membráně v oblasti DEJ s vysokou mírou specificity. Naproti tomu v infektologii u Bordett-Wassermannova testu je falešná pozitivita komplement fixačního testu relativně běžná.

6.1.1. Pacienti

Pomocí metody CFT jsme testovali hluboce zmražená séra od 300 pacientů BP, jejichž diagnóza byla stanovena pozitivitou minimálně 2 dalších laboratorních metod. V našem výzkumném souboru se jednalo konkrétně o 151 mužů a 149 žen s průměrným věkem 76,9 let. Všechna tato séra byla nasbírána na LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Mnichov, Německo, mezi listopadem 2008 až prosincem 2014. Krev byla odebrána jen od těch nemocných, kde byla s jistotou stanovena diagnóza bulózního pemphigoidu a kterým zatím nebyla nasazena žádná celková či lokální imunosupresivní terapie. Diagnóza byla postavena na specifickém klinickém obraze v kombinaci s minimálně 2 dalšími pozitivními metodami (histologie, DIF, IIF na opičím nebo králičím jícnu či SSS, detekcí BP180 a BP230 pomocí ELISA). Jako kontrolní skupina byla použita séra od 136 pacientů, konkrétně se jednalo o 52 mužů, 84 žen s průměrným věkem 60,2 let (Tab. č. 3).

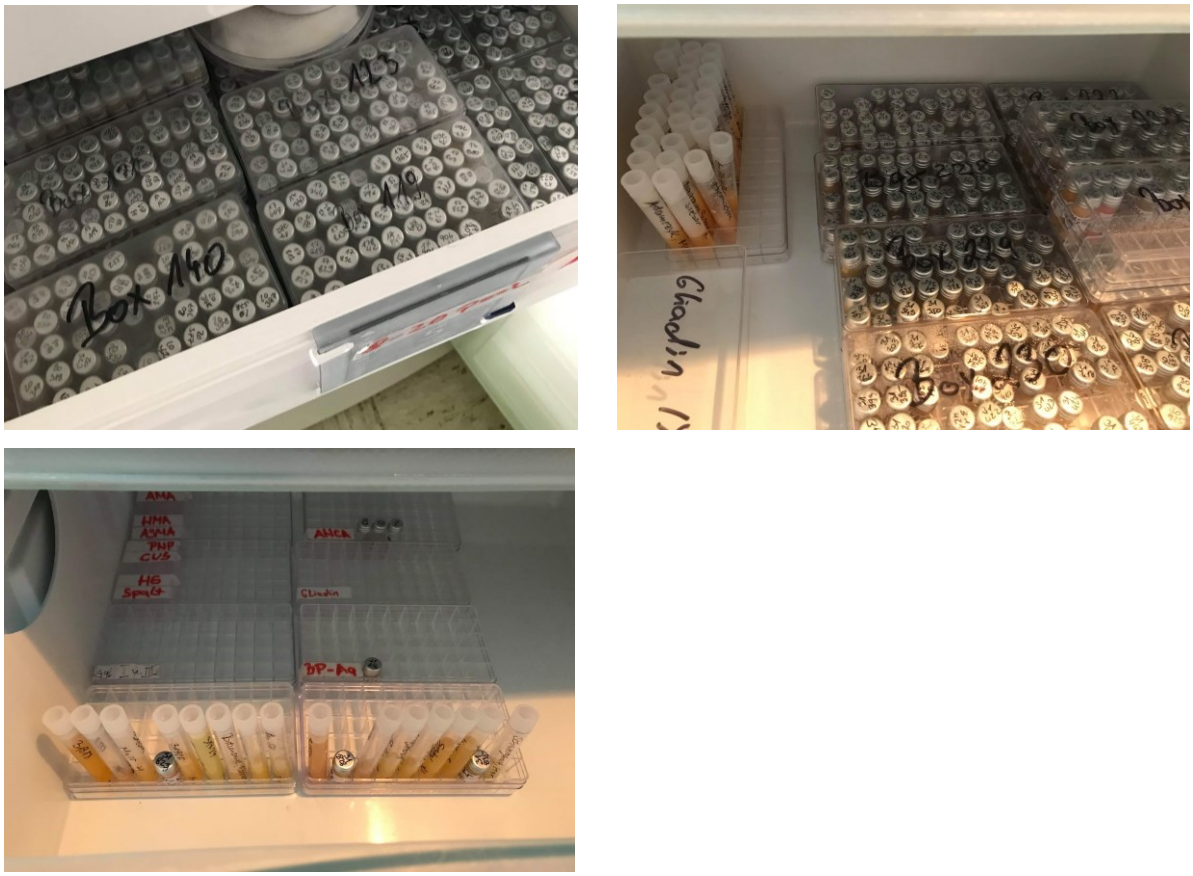
Kontrolní séra byla použita od pacientů s podezřením na AIBD dle klinického obrazu, kde diagnóza BP byla pomocí klasických diagnostických metod vyloučena.

V našem výzkumu se jedná o monocentrickou, retrospektivní, případovou studii s použitím 300 sér pacientů s diagnózou BP a 136 kontrolních sér.

Tab. č. 3: Distribuce pacientů s diagnózou bulózního pemphigoidu a kontrolní skupiny pro testování komplement fixačního testu metodou nepřímé imunofluorescence.

	Pacienti	Muži (% z celku)	Ženy (% z celku)	Věk	Průměrný věk
BP	300	151 (50,3)	149 (49,7)	8,7-96,4	76,9
Kontroly	136	52 (38,2)	84 (61,8)	16,7-93,0	60,2

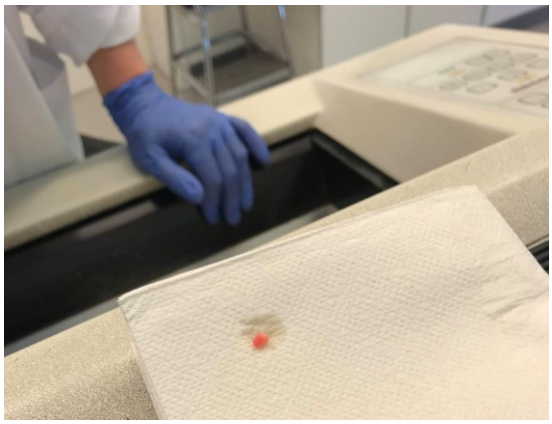
Všechna BP séra a kontrolní séra byla uchovávána v laboratoři a hluboce zmražena na - 80°C. Byla tříděna chronologicky tak, jak materiál přišel k vyšetření, a označena specifickým originálním číselným kódem. Pod tímto číselným kódem byla založena jak v papírové formě s žádankou k vyšetření, tak i do elektronické databáze do počítače, aby se zamezilo pozdější záměně a séra bylo možno zpětně bez problému dohledat. Při správné identifikaci a dvojím ověření vzorku byla séra před samotným testováním přenesena do laboratoře, uchovávána v chladničce při teplotě +4 °C a připravena k laboratornímu zpracování. Těsně před samotným vyšetřením byla vyjmuta z lednice a ponechána při pokojové teplotě. Ihned po použití v jednotlivých bězích byla vrácena do lednice, resp. zpět hluboce zmražena na - 80 °C (Obr. č. 11).

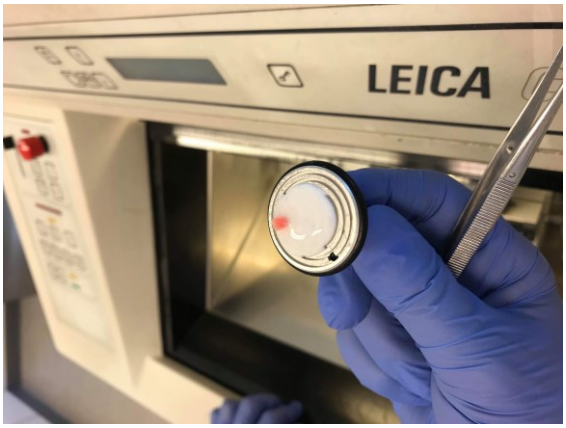


Obr. č. 11: Chronologicky seřazená séra od BP pacientů. Dle svého pořadového čísla byla séra vybrána z mrazicího boxu při teplotě -80 °C (vlevo nahoře), přenesena do klasické lednice v laboratoři (vpravo nahoře a vlevo dole) a těsně před samotným testováním ponechána při pokojové teplotě k úplnému rozmražení.

6.1.2. Metodika

Lidská tkáň byla odebrána zdravému pacientovi bez BP, ihned po odběru byla čerstvá tkáň zmražena a nanesena jako substrát na terčík, který byl umístěn do kryostatu a nařezán na tenké plátky. Tyto substráty byly naneseny na čistá podložní sklíčka ve formě tenkých kryostatových řezů (Obr. č. 12).

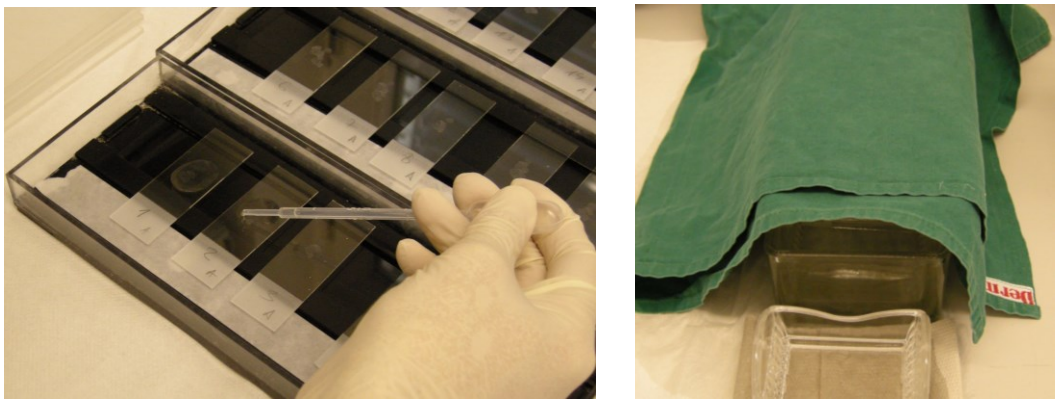




Obr. č. 12: Tkáňový vzorek a kryostat. Čerstvý odebraný tkáňový vzorek (vlevo nahoře) od zdravého pacienta použitý jako substrát. Tkáňový substrát ve zmraženém stavu (vpravo nahoře) štěpený roztokem 1 mol/l NaCl (SSS) je pomocí kryostatu (vlevo dole) nakrájen na tenké plátky. Ty jsou pak naneseny na podložní sklíčko.

Při každém běhu samotného testu byla použita pozitivní a negativní kontrolní séra, tzv. vnitřní kontrola, k vyloučení možné chyby špatně stanovené diagnózy. Všechna séra (Obr. č. 13), tzn. od BP pacientů, tak i kontrolní séra, byla ředěna v poměru 1:2 s PBS (phosphate buffered saline – solný roztok pufrovaný fosfátem) při ideálním pH 7,4 a inkubována dále na nezafixované mražené zdravé lidské tkáni (salt split skin – SSS). Inkubace pacientského séra s PBS na preparátech probíhala po dobu 30 minut při teplotě 37 °C v temné komoře, teplota byla kontinuálně udržována pomocí termostatu, k jakémukoliv vychýlení od stanovené teploty nedošlo. Kontrola teploty byla rovněž provedena před každým během dvěma nezávislými pozorovateli. Přesný čas byl nastaven na stopkách, aby nedošlo k urychlení nebo naopak k prodloužení inkubační doby vzorků v temných komorách. Takto připravené

preparáty byly po vypršení doby vyjmuty z termostatu. Po omytí v PBS s 0,005 % Tween-20 jako oplachového roztoku třikrát po sobě v časovém odstupu deseti minut byl aplikován mix 3 předem připravených a rozmražených sér od pacientů s vyloučenou AIBD, který sloužil jako externí zdroj komplementu. Cíleně byla použita směs 3 různých sér k dosažení dostatečného množství komplementových antigenů. Tento mix byl nanesen na připravené preparáty a inkubován na podložním sklíčku v ředění 1: 5 s barbitálovým pufrem (1 mmol/l Na-5,5-dietylbarbiturát, 0,3 mmol/l CaCl2, 1,7 mmol/l MgCl2, 146 mmol/l NaCl, pH 7,2±0,2) po dostatečnou dobu, tedy opět 30 minut. Po dalším oplachu byla aplikována polyklonální králičí/humánní protilátka proti C3 složce komplementu označená fluorescenčním činidlem – fluorescein isothiokyanátem (FITC – Dako, Glostrup, Dánsko, #F0201) ředěná 1: 100 v PBS a inkubována na preparátech po dobu dalších 30 minut v tmavé a vlhké komoře. Vzhledem k tomu, že FITC je vysoce fotosenzitivní činidlo, je potřeba zdůraznit důležitost použití tmavé komory. Pokud by totiž došlo k osvitu slunečním světlem, intenzita fluorescence by se snížila a následné vyšetření ve fluorescenčním mikroskopu by mohlo být falešně negativní i u pozitivního séra. Po poslední periodě oplachu byly takto připravené preparáty zafixovány fixačním činidlem (2,5% 1,4-diazabicyklooktan, 0,1% natrium azid, 10% PBS v glycerinu) k vizualizaci. Po zafixování byla umístěna krycí sklíčka. Preparáty tak byly připraveny k prohlížení a hodnocení ve fluorescenčním mikroskopu.



Obr. č. 13: Sada preparátů v jednom běhu. Nanášení činidla na jednotlivé testované preparáty včetně pozitivní i negativní kontroly (vlevo). Uchovávání jednotlivých preparátů ve vlhké a temné komoře (vpravo) (okno se zataženou roletou a preparáty zakryty medicínskou rouškou).

6.1.3. Statistické vyhodnocení

Pro srovnání jednotlivých titrů byl použit Mann-Whitneyův non-parametrický, nepárový test. Pro komparaci senzitivity a specificity byl využit Mc Nemarův test. Jednotlivé hodnoty senzitivity a specificity, stejně tak jako pozitivní a negativní prediktivní hodnoty jsou počítány spolu s 95% intervalem spolehlivosti (95%CI). Pro statistickou kalkulaci celého testu byl použit GraphPad Prism verze 4.03 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, nebo on-line statistická kalkulačka GraphPad na stránce http://www.graphpad.com/quickcalcs/).

6.2. Detekce jednotlivých subtypů IgG protilátky

U pacientů s BP je již od 60. let 20. století popisováno, že přítomnost cirkulující protilátky IgG hraje významnou roli jako základní protilátka, která tvoří depozita v oblasti BM (Beutner EH, Jordon RE, 1964, Jordon RE et al., 1967). Už tehdy bylo dokumentováno, že metodou nepřímé imunofluorescence použitím komplementu dochází k tomu, že ne každá protilátka IgG fixuje komplement. Rozeznáváme 4 základní subtypy protilátky IgG – IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Je popsáno, že subtypy IgG1- 3 fixují komplement a IgG4 podsložka tuto schopnost nemá. V roce 1988 byl popsán výzkum na 29 pacientech s BP před zahájením terapie. Pomocí nepřímé imunofluorescence a myší monoklonální protilátky proti IgG byla zjišťována fixace IgG subtypů k C3 složce komplementu. IgG1- 3 byla pozitivní u všech pacientů s BP fixující komplement, IgG4 však komplement u žádného pacienta nefixovala. Dále u všech pacientů s BP byla potvrzena přítomnost C3 složky komplementu. IgG4 se zdá být nejdominantnější podsložkou, následovanou IgG1 a IgG2, nejméně často se vyskytující byla popsána IgG3 (Bird P et al., 1986, Jones CC et al., 1988, Kelly SE et al., 1989).

Na základě správné diagnostiky BP pomocí pozitivity DIF, klasické IIF či ELISA, je v literatuře popsána IgG4 jako predominantní protilátka, následována IgG1, IgG2, IgG3 (Bird P et al., 1986, Yamada H et al., 1989, Bernard P et al., 1990, Lamb PM et al., Shirakata Y et al., 1990, Soh H et al., 1991, Bernard P et al., 1991, Döpp R et al., 2000, Al-Karawi KS, 2002). IgG4 je popisována jako často jediná a nejčastěji detekovatelná protilátka v prodromálním stádiu BP (Lamb PM et al., 2008).

Zuo et al. publikoval, že protilátka IgG4 anti-NC16A inhibuje vazbu IgG1 a IgG3 na NC16A region BP180, a tím dojde k blokaci fixace komplementu, infiltraci neutrofily a vzniku puchýře u humanizovaných BP180-NC16A myší (Zuo Y et al., 2016). Zda tento poznatek u myší může být vztažen i na lidskou populaci, zatím není známo.

IIF je diagnostickou metodou BP, jejíž senzitivita je relativně nízká, udává se 60–80 % (Di Zenga G et al., 2012, Sárdy M et al., 2013). U pacientů s BP je známo, že subtypy IgG hrají důležitou roli (IgG1-3 jako komplement fixační protilátka, IgG4 nefixující komplement), IgG1 a IgG4 se zdají být patogeneticky důležitější než ostatní subtypy protilátky IgG (Bernard P et al., 1990, Di Zengo G et al., 2012). Nízká senzitivita IIF může být následkem příliš nízké a nedetekovatelné sérové koncentrace cirkulujících protilátek IgG nebo insuficientní reaktivitou komerčně vyráběných humánních konjugátů detekujících minoritní podtřídy jako IgG3, IgG4.

V našem výzkumu jsme se zaměřili na detekci jednotlivých subtypů protilátek IgG (IgG1, IgG3, IgG4) u 64 pacientů s verifikovaným BP, kteří byli negativní dle klasické IIF, to vše srovnáno se skupinou 43 kontrolních pacientů.

6.2.1. Pacienti

Při IIF detekci jednotlivých subtypů IgG protilátek jsme testovali celkem 64 pacientů s BP (31 mužů, 33 žen) v průměrném věku 75,8 let a 43 kontrolních sér od pacientů (10 mužů, 33 žen) ve věku průměrně 52,8 let (Tab. č. 4). Všechna BP séra byla dle předchozích výsledků negativní metodou klasické IIF na opičím či králičím jícnu. Tato séra byla shromážděna mezi lety 2008 a 2015 na LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Mnichov, Německo. Krev od BP pacientů byla odebrána pacientům před nasazením jakékoliv celkové či lokální imunosupresivní terapie. Kontrolní séra, stejně jako v případě CFT, byla od pacientů s podezřením na AIBD, kde však diagnóza BP byla dostupnými vyšetřovacími metodami vyloučena. Diagnóza BP u našich sér byla již v minulosti stanovena, stejně jako při CFT, pozitivitou minimálně 2 laboratorních testů (histologie, DIF, IIF na opičím, králičím jícnu či SSS, detekcí BP180 a BP230 pomocí ELISA) a doplněna typickým klinickým obrazem. Byly použity komerční sety pro hodnocení BP180 a BP230 ELISA dle návodu výrobce (Medical and Biological Laboratories Co. Ltd., Nagoya, Japonsko).

I v tomto případě se jedná o retrospektivní, monocentrickou a neintervenční analýzu sér od 64 pacientů s BP a 43 negativních kontrolních sér.

Tab. č. 4: Distribuce pacientů s diagnózou bulózního pemphigoidu a kontrolní skupiny pro testování jednotlivých IgG subtypů pomocí IIF na opičím jícnu.

	Pacienti	Muži (% z celku)	Ženy (% z celku)	Věk	Průměrný věk
BP	64	31 (48,4)	33 (21,6)	27,2-93,7	75,8
Kontroly	43	10 (23,3)	33 (76,7)	22-90	52,8

6.2.2. Metodika

V pilotní studii jsme testovali 3 rozdílné substráty pro IIF mikroskopii – opičí jícen, králičí jícen a SSS. SSS vykazoval velmi nízkou specifitu, králičí jícen naopak velmi nízkou senzitivitu. Jen opičí jícen jako substrát pro zhotovení potřebných preparátů měl dostatečnou senzitivitu i specifitu, předmětem našeho výzkumu však nebylo zjištění důvodu této skutečnosti. Proto jsme jako substrát v našem výzkumu použili opičí jícen. Všech 64 sér bylo původně negativních pomocí IIF na opičím jícnu použitím standardních vyšetřovacích metod, tzn. detekcí séra celkové protilátky IgG. Všechny naše zkoumané kontroly byly negativní při IIF na všech substrátech, tzn. použitím tkáně opičího nebo králičího jícnu i SSS.

Standardní metoda IIF na opičím či králičím jícnu využívá detekci cirkulující IgG protilátky vázající se na epidermální část vyšetřované tkáně. Standardně se séra ředí v poměru 1:20 v PBS a poté se nanáší vazebné sekundární humánní protilátky IgG v ředění 1:50 nebo 1:80 v PBS a dále jsou vizualizované inkubací s vizualizačním činidlem FITC (#504032, Inova Diagnostics, San Diego, USA, nebo #F1641 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

IIF v našem případě detekujeme jednotlivé subtypy IgG protilátky, konkrétně IgG1, IgG3 a IgG4 (Tabulka č. 4). Jako prevence možné vazby i nespecifických ostatních nevyšetřovaných protilátek je potřeba použít nejprve neutralizační agens, které vyváže tyto nespecifické

protilátky, konkrétně se jedná o humánní Iso-aglutinin (Neutr-AB II, #213424, Medion Grifols Diagnostics, Švýcarsko) pro preinkubaci všech sér v ředění 1:1 na 30minut, jak je doporučeno dle návodu. Zamezíme tak falešnému zachycení jiných cirkulujících sérových protilátek, které by mohly výsledek testu, jakkoliv modifikovat. Všechna BP a kontrolní séra (opět součástí každého běhu je vnitřní pozitivní a negativní kontrola použitím sér s předem vyloučenou diagnózou AIBD) byla ředěna v poměru 1:10 s PBS, tzn. nynější celkové ředění je 1:20. Pomocí kryostatu byla nakrájena v tenké vrstvě tkáň, vytvořením nezafixovaných, čerstvě řezaných tkáňových preparátů z opičích a králičích jícnů, opět v termostatu uchována po dobu 30 minut při teplotě 37°C, která stejně jako v případě metody CFT byla pravidelně kontrolována laborantem i vyšetřovatelem k vyloučení chybného provedení testu, a tedy k možnému falešně negativnímu výsledku. Následuje opět oplachová perioda 3x10 minut s PBS-0,005% Tween-20 (PBST). Další blokáda nechtěných vazeb jiných protilátek využívá normální myší sérum (#sc-45051, Santa Cruz Biotechnology, USA) k vyvázání těchto nepotřebných a nespecifických protilátek, po dobu 30 minut při teplotě 37 °C v ředění 1:100 v PBST. Po další oplachové periodě byly naneseny sekundární protilátky (myší monoklonální – nyní již značené FITC – konkrétně byly použity humánní IgG1, IgG3, IgG4 protilátky, #F0767, #F4641, #F9890, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ředěné 1:64 s PBST a inkubované na preparátech ve vlhké a temné komoře po dobu 30 minut. Zde bylo také zajištěno zaclonění proti dennímu světlu pro správnou následnou vizualizaci fluorescenčního činidla. Byl testován i koktejl všech 3 testovaných protilátek (směs IgG1, IgG3, IgG4) ve shodném ředění, tj. 1:64 a nanesen na stejnou sadu preparátů, tím jsme se snažili zvýšit senzitivitu protilátky IgG. Po poslední periodě oplachu následuje nanesení fixačního média (2,5%-diazabicyclooktan, 0,1% Na-azid, 10% PBST ředěném v glycerinu) na podložní sklíčka ke konečné vizualizaci preparátů. Po zafixování byla přiklopena krycí sklíčka. Preparáty tak byly připraveny k prohlížení a hodnocení ve fluorescenčním mikroskopu.

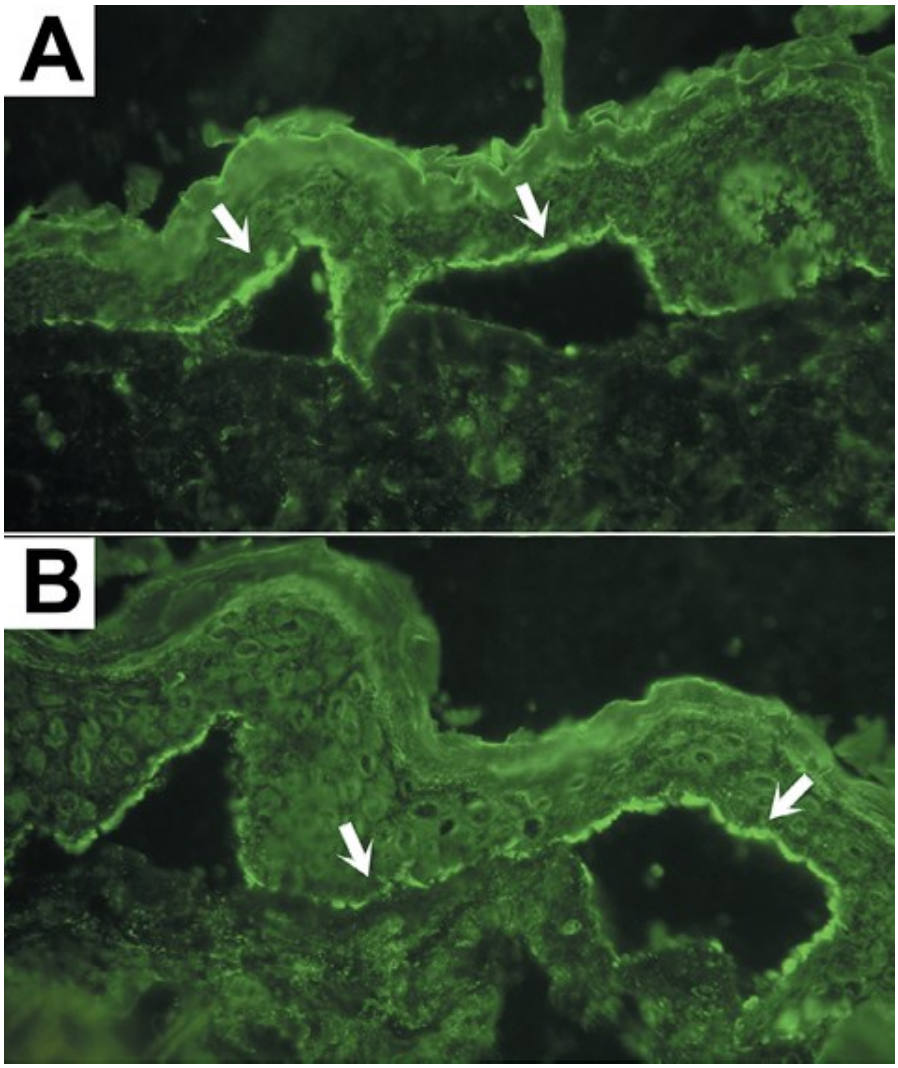
6.2.3. Statistické vyhodnocení

Stejně jako v experimentu s CFT byl v hodnocení senzitivity a specificity použit párový Mc-Nemarův test. Statistická kalkulace pozitivní a negativní prediktivní hodnoty spolu s 95% intervalem spolehlivosti proběhla shodně jako v případě metody CFT pomocí GraphPad Prism verze 4.03 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, nebo on-line statistická kalkulačka GraphPad na stránce http://www.graphpad.com/quickcalcs/).

7. VÝSLEDKY

7.1. Komplement fixační test jako spolehlivá diagnostická metoda

Pro komplement fixační test byla zkoumána séra od 300 pacientů s verifikovaným bulózním pemphigoidem, která byla nasbírána mezi lety 2008 až 2014 na LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie v Mnichově. Diagnóza BP byla stanovena pouze na základě pozitivního výsledku 2 a více laboratorních vyšetřovacích metod, byly tak eliminovány vzorky od pacientů, kteří vykazovali pozitivitu jen 1 vyšetřovací metody či se nacházeli v šedé zóně. Konkrétně se jednalo o 151 mužů a 149 žen od pacientů s BP ve věku mezi 8 a 96 lety, tj. s průměrným věkem 76,9 let a celkem bylo nasbíráno 136 negativních kontrol (52 mužů a 84 žen ve věku 16 až 93 roků, v průměrném věku 60,2 let). Každý běh testovaných sér byl zhotoven spolu s vnitřní pozitivní a negativní kontrolou k ověření správnosti laboratorní techniky. Vzorky se poté hodnotily ve fluorescenčním mikroskopu ve zcela temné vyšetřovně se zataženými zatemňovacími roletami, aby proběhlo hodnocení intenzity fluorescence jednotlivých preparátů dostatečně přesně a nedošlo tak k chybné interpretaci výsledků. Všechny preparáty byly zaslepeně kontrolovány nezaujatým supervizorem, který se osobně nepodílel na zhotovení jednotlivých testovaných vzorků, který na celý výzkum dohlížel a všechny výsledky ještě jednou hodnotil. Správný výsledek CFT (pozitivní vs. negativní) byl stanoven pouze při správnosti pozitivní a negativní vnitřní kontroly v každém jednotlivém běhu. Pokud tomu tak nebylo, celý běh včetně pozitivní a negativní kontroly musel být bezprostředně opakován a tento chybný běh nebyl hodnocen a zaznamenán. Pozitivní preparáty se vyznačovaly jasným žlutavě – zeleným lineárním světélkujícím depozitem C3 složky komplementu v oblasti dermoepidermální junkční zóny – subepidermálně, tedy pod epidermis v oblasti bazální membrány a oddělující vrstvu epidermis od dermis. Při separaci keratinocytů v oblasti dermoepidermální junkce byl vždy pozorován jasně fluoreskující pás pouze na epidermální straně puchýře, tedy směrem k bazálním keratinoctyů (Obr. č. 14). Pokud hodnotitel ani supervizor nebyli schopni jasně definovat lineární depozitum nebo v případě granulární či nejasné lineární fluorescence, byl tento preparát hodnocen a zaznamenán jako negativní. Pokud se jasně zeleno – žlutavá luminiscence nacházela v jiných oblastech epidermis či dermis než subepidermálně, případně vytvářila obraz intraepidermální sítě, opět byl vzorek hodnocen jako negativní.

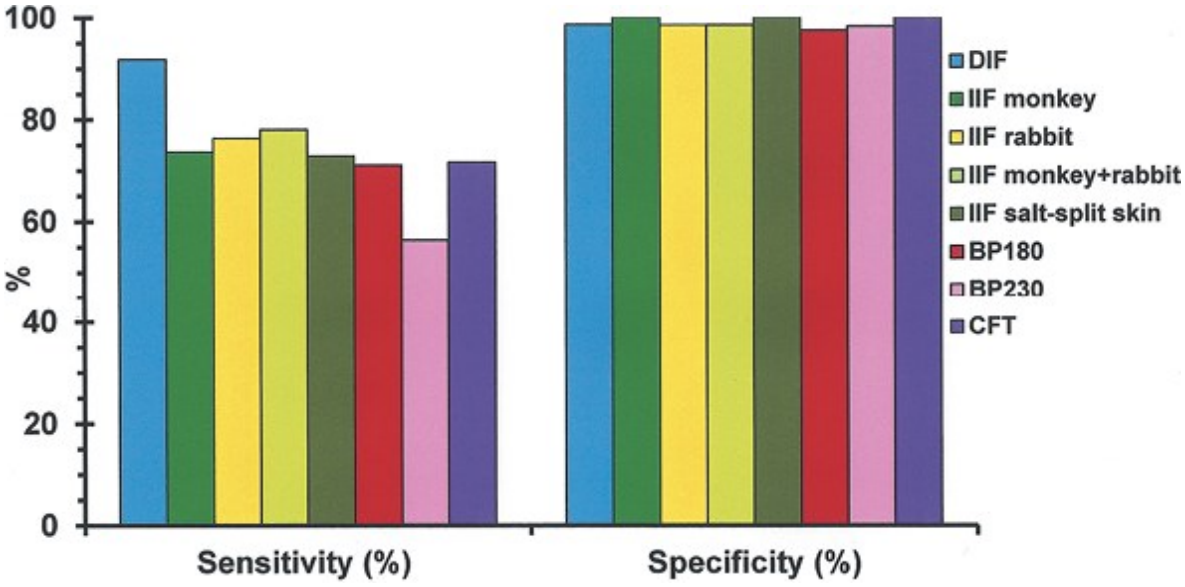


Obr. č. 14 (A i B): příklad pozitivního výsledku CFT. Lineární depozice C3 složky komplementu je zřetelná na epidermální straně bazální membrány na zdravé lidské SSS. Detekce probíhá pomocí polyklonální králičí humánní C3 protilátky značené fluorescenčním činidlem FITC. Zvětšeno 200x.

Dle našich výsledků byl CFT pozitivní u 215 pacientů s BP, celková senzitivita komplement fixačního testu dosáhla 71,7 %. Negativní výsledek byl pozorován u 85 pacientů, tedy u 28,3 %. Senzitivita u DIF, BP180, BP230, IIF na opičím jícnu, IIF na králičím jícnu, IIF na SSS v porovnání u naší kohorty vyšla 91,8 %, 71 %, 56,4 %, 73,7 %, 76,3 %, 78 % a 72,9 % (Obr. č. 15, Tab. č. 5).

Tab. č. 5: senzitivita a specificita vyšetřovacích metod včetně komplement fixačního testu (CFT).

Vyšetřovací metoda	Senzitivita (%)	Specificita (%)
DIF	91,82	98,57
IIF opičí jícen	73,67	100
IIF králičí jícen	76,33	98,53
IIF opičí + králičí jícen	78	98,53
IIF SSS	72,87	100
BP180	71,04	97,46
BP230	56,36	98,26
CFT	71,67	100



Obr. č. 15: srovnání senzitivity a specificity u ostatních standardních diagnostických vyšetřovacích metod u pacientů s BP doplněno o výsledky komplement fixačního testu (CFT). Pozn. IIF monkey (IIF na opičím substrátu), IIF rabbit (IIF na králičím substrátu), IIF salt split skin (IIF na substrátu štěpeném 1 mol/l NaCl).

Rozdíl mezi senzitivitou CFT a BP230 pomocí ELISA byl signifikantní ($p < 0,0001$), ale nezaznamenali jsme signifikantní rozdíl mezi CFT a ostatními sérologickými testy. Titry protilátek BP180 a BP230 pomocí ELISA se mezi pacienty s BP a kontrolami signifikantně lišily ($p < 0,0001$). Všechna kontrolní séra byla negativní pro CFT, dosáhli jsme tak 100% specificity. Specificita DIF, BP180, BP230, IIF na opičím jícnu, IIF na králičím jícnu, IIF na SSS dosáhla 98,6 %, 97,5 %, 98,3 %, 100 %, 98,5 %, 98,5 % a 100 % (Obr. č. 15, Tabulka č. 5 a 6). Nedošlo k signifikantní odchylce mezi specificitou CFT s jinými sérologickými metodami.

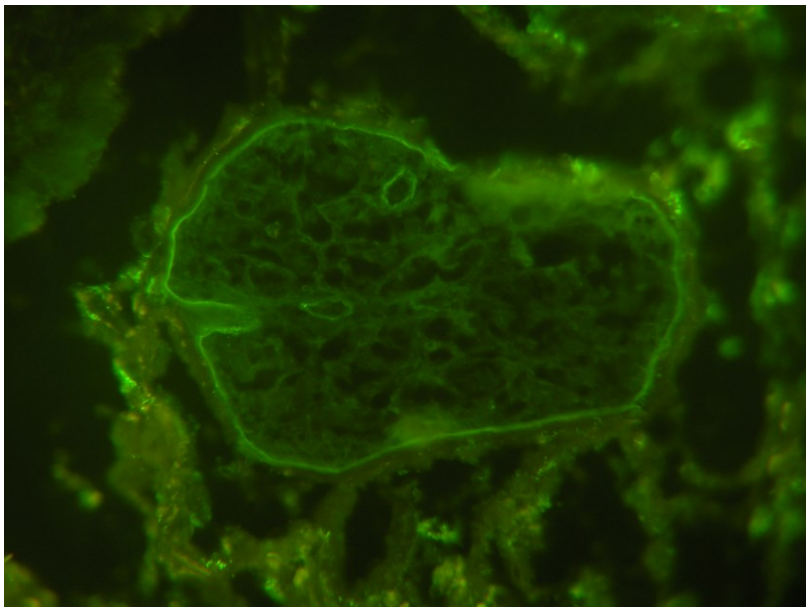
Tab. č. 6: Počet pacientů, senzitivita, specificita, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty všech imunopatologických metod. Kalkulace 95% konfidenčního intervalu (95% CI) byla provedena pomocí GraphPad kalkulátoru, jak popsáno v metodách.

Vyšetření	Počet pacientů s BP	Počet kontrolních sér	Senzitivita	Specificita	Pozitivní prediktivní hodnota	Negativní prediktivní hodnota
DIF	220	70	91.82% (95%CI: 0.8738- 0.9508)	98.57% (95% CI: 0.9230- 0.9996)	99.51% (95% CI: 0.9729- 0.9999)	79.31% (95% CI: 0.6929- 0.8725)
IIF opičí jícen	300	136	73.67% (95% CI: 0.6830- 0.7856)	100.0% (95% CI: 0.9732- 1.00)	100.0% (95% CI: 0.9834- 1.00)	63.26% (95% CI: 0.5643- 0.6971)
IIF králičí jícen	300	136	76.33% (95% CI: 0.7111- 0.8103)	98.53% (95% CI: 0.9479- 0.9982)	99.13% (95% CI: 0.9691- 0.9989)	65.37% (95% CI: 0.5842- 0.7186)
IIF opičí + králičí jícen	300	136	78.00% (95% CI: 0.7288- 0.8256)	98.53% (95% CI: 0.9479- 0.9982)	99.15% (95% CI: 0.9697- 0.9990)	67.00% (95% CI: 0.6002- 0.7347)
IIF SSS	287	58	72.87% (95% CI: 0.6728- 0.7788)	100.0% (95% CI: 0.9384- 1.00)	100.0% (95% CI: 0.9825- 1.00)	42.65% (95% CI: 0.3421- 0.5141)
BP180	297	118	71.04% (95% CI: 0.6552- 0.7614)	97.46% (95% CI: 0.9275- 0.9947)	98.60% (95% CI: 0.9596- 0.9971)	57.21% (95% CI: 0.5006- 0.6415)
BP230	291	115	56.36% (95% CI: 0.5045- 0.6214)	98.26% (95% CI: 0.9386- 0.9979)	98.80% (95% CI: 0.9572- 0.9985)	47.08% (95% CI: 0.4063- 0.5361)
CFT	300	136	71.67% (95% CI: 0.6620-0.7670)	100.0% (95% CI: 0.9732- 1.00)	100.0% (95% CI: 0.9830- 1.00)	61.54% (95% CI: 0.5478- 0.6798)

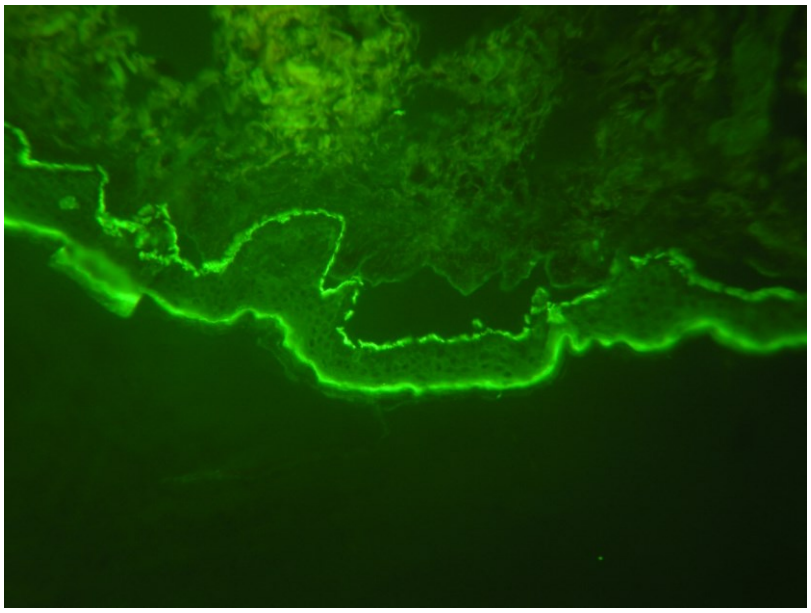
Ačkoliv senzitivita jednotlivých sérologických metod je nižší než 80 %, kombinace senzitivity BP180, BP230 a CFT dosáhla 90,7 % protože CFT detekoval 20 ze 46 pacientů s BP (43,5 %), kteří byli sérologicky negativní pro obě BP180 i BP230 ELISA. Senzitivita CFT v kombinaci s IIF na opičím a králičím jícnu stoupla na 88,7 %, kde CFT je pozitivní u 31 z 66 pacientů s BP (47,0 %), kteří byli negativní pro obě IIF metody. **Kombinací CFT se všemi sérologickými testy se vyšplhala senzitivita až na 95,3 %, kde 5 ze 14 pacientů (35,7 %) s BP bylo pozitivních pro CFT, ale negativních pomocí ostatních sérologických metod. CFT byl pozitivní u 7 z 18 pacientů s BP (38,9 %), ačkoliv DIF byla hodnocena jako negativní.**

7.2. Zvýšení senzitivity nepřímé imunofluorescence detekcí IgG1, IgG3, IgG4 a jejich kombinace

Pomocí metody nepřímé imunofluorescence byl testován vzorek 64 pacientů s prokázanou diagnózou BP, který byl nasbírán mezi lety 2008 a 2015 na LMU Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie v Mnichově. Konkrétně se jednalo o 31 mužů a 33 žen ve věku 27 až 93 let (v průměrném věku 75,8 let) a 43 kontrolních sér (10 mužů a 33 žen mezi 22 až 90 lety, tedy ve věku průměrně 52,8 let). V této skupině byla testována přítomnost jednotlivých subtypů protilátky IgG, konkrétně se testovaly protilátky IgG1, IgG3, IgG4 a koktejl všech výše uvedených subtypů. Stejně jako u metody CFT byla součástí každého běhu spolutestována pozitivní a negativní vnitřní kontrola pro správnost interpretace výsledků. V případě fluorescence negativní kontroly či temného pole u pozitivní kontroly nebyl celý běh hodnocen a opakován. Ve fluorescenčním mikroskopu byl hodnocen výsledek preparátů v temné komoře při zatažených zatemňovacích roletách k odlišení jasné zeleno – žlutavé fluorescence od ojedinělé luminiscence. O pozitivitě hovoříme při jasné lineární depozici jednotlivých IgG subtypů při bazální membráně jícnu v oblasti epitelií a mukózních papil minimálně v 1/3 celkového povrchu (Obr. č. 16 a 17). Všechny preparáty stejně jako u CFT byly zaslepeně kontrolovány nezávislým hodnotitelem, který se osobně nezapojoval do laboratorního provedení preparátů a který celý výzkum supervizoval. Pokud došlo k nesouhlasu výsledků mezi autorem a supervizorem, běh byl opakován a přehodnocen i přes správnou fluorescenci pozitivní a negativní kontroly. Pokud i při zopakování daného běhu se výsledek obou hodnotitelů lišil, přiklonili jsme se k hodnocení supervizora.



Obr. č. 16: Jasně fluoreskující lineární depozita subtypu protilátky IgG1 při bazální membráně na substrátu opičího jícnu v ředění 1:64, zvětšeno 200x.



Obr. č. 17: Jasně fluoreskující lineární depozita subtypu protilátky IgG4 při bazální membráně/ epidermální straně štěpeného preparátu opičího jícnu v ředění 1:32, zvětšeno 200x.

Byla zkoušena různá ředění titrů jednotlivých protilátek IgG k dosažení ideální intenzity konečné fluorescence vzorků při hodnocení jednotlivých preparátů pod fluorescenčním mikroskopem, konkrétně jsme testovali titr v poměru 1:32, 1:64 a 1:128. V případě titru 1:32 se zdála být celková fluorescence až příliš diskrétní, mohlo by tak dojít k falešné negativitě testu při výsledném hodnocení a zkreslení evaluace senzitivity celé metody, naopak titr 1:128 neukázal téměř žádnou odlišnost od titru 1:64, co se týče intenzity fluorescence, která byla v některých případech až příliš intenzivní, naopak bylo potřeba použít ve srovnání s titrem 1:64 větší množství fluorescenčního materiálu, tím by byl každý běh výrazně finančně náročnější. Proto jsme se přiklonili k ideálnímu titru 1:64.

Většina BP sér (57 z 64–89 %) a kontrolní séra byla negativní pro BP 230 ELISA. Dále 34 z celkového množství 64 testovaných BP sér vykázalo pozitivitu 53 %. Žádné z kontrolních testovaných sér nevykázalo pozitivitu pro BP180 ELISA. DIF byla v našem vzorku pozitivní u 59 pacientů (92,2 %) a negativní v 1 případě (1,5 %), u 4 pacientů (6,3 %) nebyla DIF vyšetřena. V 1 případě, kde byla DIF negativní, byla diagnóza BP stanovena pozitivitou jiných metod – pozitivitou BP230 ELISA, přítomností lineárních epidermálních depozit IgG IIF na SSS, typickým histologickým (barveno hematoxylinem-eoseinem) a klinickým obrazem odpovídaly diagnóze BP. DIF bylo provedeno u 9 kontrol, které byly všechny negativní. U 4 pacientů, kde DIF nebyla vůbec vyšetřena, byla BP180 ELISA vysoce pozitivní (titr> 27U/ml, norma <9U/ml) spolu s typickou histologií a klinickým obrazem, u jednoho pacienta byla BP230 ELISA a IIF na SSS dodatečně provedena s pozitivním výsledkem.

Rozporuplné výsledky v IIF pomocí jednotlivých subtypů protilátky IgG byly časté. Ze všech 64 sér pacientů s BP se nacházelo 9 (14,1 %) pro IgG1, 5 (7,8 %) pro IgG3, 1 (1,6 %) pro IgG4 a 11 (17,2 %) pro koktejl všech IgG v šedé zóně (nejednoznačná síla intenzity fluorescence nebo nejednoznačná distribuce signálu). Vždy bylo bráno v potaz majoritní zastoupení lineárního depozita podél bazální membrány a hodnoceno jako pozitivní či negativní. Pro kalkulaci senzitivity a specificity jsme využili 95% interval konfidence (Tab. č. 7). IgG1 vykazuje obecně v našem výzkumu jasnější fluorescenci než IgG4, i to může vysvětlovat fluorescenci u preparátů, které se nacházely v šedé zóně.

Tab. č. 7: Senzitivita, specificita, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty všech IgG subtypů pomocí metody IIF na opičím jícnu. Kalkulace 95% konfidenčního intervalu (95% CI) byla provedena pomocí GraphPad kalkulátoru, jak popsáno v metodách.

Vyšetření	Senzitivita v % (95% CI)	Specificita v % (95% CI)	Pozitivní prediktivní hodonota v % (95% CI)	Negativní prediktivní hodnota v % (95% CI)
IgG1 IIF	45.3 (32.8-58.3)	100 (91.8-100)	100 (88.1-100)	55.1 (43.4-66.4)
IgG3 IIF	18.8 (10.1-30.5)	100 (91.8-100)	100 (73.5-100)	45.3 (35.0-55.8)
IgG4 IIF	32.8 (21.6-45.7)	100 (91.8-100)	100 (83.9-100)	50.0 (39.0-61.0)
Koktejl IgG IIF	48.4 (35.8-61.3)	97.7 (87.7-99.9)	96.9 (83.8-99.9)	56.0 (44.1-67.5)
Celkem všech uvedených výše	**62.5 (49.5-74.3)**	**97.7 (87.7-99.9)**	**97.8 (88.2-99.9)**	**67.7 (54.7-79.1)**
DIF	98.3 (91.1-100)	100 (66.4-100)	100 (93.9-100)	90.0 (55.5-99.8)
BP180 ELISA	54.7 (41.8-67.2)	100 (75.3-100)	100 (90.0-100)	31.0 (17.6-47.1)
BP230 ELISA	10.9 (4.5-21.3)	100 (75.3-100)	100 (59.0-100)	18.6 (10.3-29.7)

Dle našich výsledků jsme se setkali s pozitivitou z 64 BP sér u 29 pacientů (45,3 %) u IgG1, 12 (18,8 %) u IgG3, 21 (32,8 %) u IgG4 a 31 (48,8 %) kombinací všech 3 protilátek (koktejl IgG1, IgG3, IgG4). Senzitivita se tak vyšplhala na 45,3 %, 18,8 %, 32,8 % a 48,4 %. Jen 1 kontrolní sérum bylo hodnoceno jako falešně pozitivní použitím koktejlu IgG. Specificita dosáhla tak u všech jednotlivých protilátek 100 %, v případě koktejlu ze všech 3 subtypů (IgG1, IgG3 a IgG4) 97,7 %.

V našem výzkumu nevidíme významnou korelaci použitého množství protilátek a jednotlivých subtypů IgG protilátek, významnou korelaci pozorujeme jen u zkoumaného titru ředění IgG, který byl stanoven, jak již je popsáno výše, na 1:64.

Tab. č. 8: Distribuce jednotlivých subtypů protilátek IgG z 64 testovaných pacientů s BP stanovených pomocí nepřímé imunofluorescence na opičím jícnu.

IgG subtypy	**Počet sér (% z celku)**
Jen IgG1	9 (14,1)
Jen IgG3	4 (6,3)
Jen IgG4	7 (10,9)
IgG1+ IgG3	6 (9,4)
IgG1+ IgG4	12 (18,8)
IgG3+ IgG4	0 (0,0)
IgG1+ IgG3+ IgG4	2 (3,1)
Jen koktejl	4 (6,3)
Bez barvení	20 (31,3)
Celkem	64 (100)

Zajímavé je, že dle našich výsledků 12 z 64 sér (18,8 %) BP vykazuje negativitu u použití koktejlu protilátek, ale pozitivitu minimálně jednoho subtypu IgG, což si vysvětlujeme nedokonalou korelací koktejlu protilátek s jednotlivými subtypy protilátky IgG. Dále 4 z 64 BP sér (6,3 %) byly pozitivní jen po nanesení IgG koktejlu, pro samotné jednotlivé IgG subtypy byly však negativní. Označení pozitivního výsledku znamená pozitivitu minimálně jednoho subtypu IgG, negativita znamená nedostatečnou imunofluorescenci u všech subtypů IgG včetně koktejlu IgG. 44 z 64 BP sér bylo pozitivních, proto se totální senzitivita vyšplhala na 68,8 % při specificitě 97,7 %. Predominance cirkulující IgG1 protilátky byla viděna v 29 sérech z pozitivních 44 případů (65,9 %), dále následuje subtyp IgG4 s výslednou

pozitivitou 21 sér ze 44 případů (47,7 %), odlišnost však není signifikantní (p= 0,1356). IgG3 vykazovala ze všech 3 subtypů IgG nejméně často jasnou zeleno – žlutavou lineární fluorescenci při epidermální straně BM, detekovala jen 12 z všech 44 pozitivních sér (27,3 %), ale jen pouhá 4 séra byla pozitivní čistě pro IgG3. Naopak samotné IgG1 vykazovalo pozitivitu u 9 sér (20,5 %), samotné IgG4 u 7 sér (15,9 %) (Tab. č. 8). Vyjma koktejlu bylo 20 ze 40 sér (50 %) pozitivních pro více než 1 subtyp.

8. DISKUZE A ZÁVĚRY

Autoimunitní puchýřnatá onemocnění jsou širokou skupinou chorob asociovaných s autoimunitou a tvorbou specifických autoprotilátek proti strukturálním komponentám mezi jednotlivými sousedními keratinocyty v epidermis či mezi bazálními keratinocyty a bazální membránou oddělující epidermis od dermis. Typický klinický obraz AIBD postihující kůži vede často ke stanovení předpokládané diagnózy, některé tvoří eflorescence i na sliznicích, některé se hojí u postiženého jedince pomocí jizev. Základní eflorescencí všech AIBD je vezikula či bula s napjatou či plihou krytbou, s čirým obsahem na erytematózním podkladě či normální kůži. Sekundárně u těchto onemocnění může dojít k zakalení obsahu puchýře, puchýře praskají a tvoří se eroze až rozsáhlé macerace.

AIBD rozdělujeme na dvě základní skupiny – s intraepidermální či se subepidermální ztrátou adheze, a tak v laboratorním obrazu vytvoření puchýře v epidermis neboli intraepidermálně či v oblasti dermoepidermální junkce, tedy mezi bazálními keratinocyty a přilehlé bazální mebrány dermis. Vazba protilátek na cílové struktury vede v dané oblasti k poruše adheze, puchýř vznikne buď intraepidermálně při onemocněních skupiny pemfigu či subepidermálně v oblasti dermoepidermální junkce při onemocněních skupiny pemphigoidu. Detekce autoprotilátek vázaných v tkáni či cirkulujících v séru je esenciální v diagnostice autoimunitních puchýřnatých chorob.

Specifické autoprotilátky u intraepidermálního typu AIBD, u skupiny onemocnění skupiny pemphigu, reagují s antigeny strukturálních proteinů epidermis, desmosomů, dojde tak k vytvoření fragilní plihé krytby puchýře v oblasti epidermis, který postihuje kůži těla či sliznice. Při intraepidermální akantolýze se oddělí jednotlivé vrstvy epidermis, u různých typů intraepidermálních AIBD se vrstvy epidermis oddělují na různých úrovních, aniž by byly poškozeny strukturální proteiny v oblasti dermoepidermální junkce, bazální membrána tedy pevně lpí k bazální vrstvě keratinocytů epidermis.

Rozlišujeme několik typů pemphigů – pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, paraneoplastický pemphigus a další vzácnější formy (pemphigus erythematosus, IgA pemphigus, endemický pemphigus, léky indukovaný pemphigus, pemphigus herpetiformis, pemphigus vegetans).

Podstatou onemocnění skupiny pemphigu je imunitní reakce namířená proti intraepidermálním glykoproteinům ze skupiny kadherinů. Typickými představiteli kadherinů jsou desmoglein 1 (Dsg1) a 3 (Dsg3), desmokolin 1 (Dsc1), desmoplakin I a II, plakoglobin, periplakin, plektin či envoplakin. Jejich extracelulární část spojuje sousední keratinocyty v epidermis, intracelulární část je součástí keratinových filament cytoskeletu buňky.

V histopatologickém obraze tkáně odebrané přímo z floridní léze je popisována ztráta adheze jednotlivých keratinoctyů či skupin keratinocytů intraepidermálně se současným zachováním struktur v oblasti dermoepidermální junkce. Zlatým standardem všech AIBD je vyšetření kůže, které se provádí tzv. perilesionálním odběrem vzorku tkáně nemocného metodou přímé imunofluorescence. Pod fluorescenčním mikroskopem pozorujeme jasnou zeleno – žlutou intraepidermální síť způsobenou přítomností intercelulárních depozit imunoreaktantů vázaných ve tkáni. Naopak specifické cirkulující protilátky jsou zachyceny metodou nepřímé imunofluorescence použitím humánní kůže nebo jiné senzitivní tkáně jako substrátu. Pro tyto účely se nejčastěji využívá opičí či králičí jícen. Molekulární charakterizace jednotlivých intraepidermálních strukturálních proteinů a jejich cDNA (complementary DNA) zkoumá metoda ELISA. ELISA u skupiny pemphigu využívá nejčastěji rekombinantní antigen Dsg1 a Dsg3 k detekci autoprotilátek v pacientově séru.

U subepidermální skupiny AIBD se specifické autoprotilátky vážou na strukturální proteiny v oblasti dermoepidermální junkce, tedy přímo nasedající vrstvy keratinocytů epidermis a bazální membrány. Tyto specifické proteiny zprostředkovávají adhezi hemidesmosomů bazálních keratinocytů (BP180, BP230, plektin, α6β4 integrin, CD151) k proteinům v lamina lucida či lamina densa (kolagen VII) bazální membrány.

U pemphigoidu rozeznáváme nejčastěji se vyskytující typ bulózní pemphigoid (BP), dále pemhigoid gestationis (herpes gestationis), jizvící pemhigoid a další vzácnější formy (lineární IgA dermatóza, bulózní systémový lupus erythematosus, anti-laminin 332 pemphigoid, anti-p200/laminin γ1 pemphigoid, α5 kolagen VII pemphigoid). Mezi další subepidermální AIBD patří epidermolysis bullosa acquisita a dermatitis herpetiformis Duhring.

Podstatu histologického obrazu činí mechanismus imunitní reakce, kde dojde k oddělení vrstev epidermis od bazální membrány, a tak se vytvoří subepidermální puchýř, adheze celých vrstev keratinocytů a samotných buněk intraepidermálně je však neporušena. Při

imunofluorescenčním vyšetřením pozorujeme lineární či granulární depozita protilátek IgG, IgA či C3 složky komplementu.

Nejznámějším a nejčastějším typem onemocnění skupiny pemphigoidu vyskytující se hlavně u starší populace je bulózní pemphigoid (BP), který je také nejčastějším typem všech AIBD. BP byl poprvé popsán jako samostatné onemocnění odlišné od pemphigu v roce 1953 (Lever W., 1953). Walter F Lever jako první na světě odlišil nejen BP od pemphigu, ale také odlišil dermatitis herpetiformis Duhring a další AIBD. Od této doby se hovoří o pojmu imunodermatologie a o autoimunitních bulózních chorobách. Teprve v roce 1964 Beutner a Jordan objevili, že autoprotilátky typické pro BP jsou stanovené metodou DIF a IIF a jsou lokalizované v oblasti bazální membrány (Beutner EH, Jordon RE, 1964).

Etiologie vzniku BP není ve většině případů známá, popisuje se celá řada možných spouštěčů onemocnění, jako jsou UV záření, RTG záření, některé léky, nebo vakcinace u dětí (Otten JV et al., 2014).

BP se vyskytuje nejvíce u starší populace, nejčastější nástup onemocnění je v 6. - 8. dekádě života (Feliciani C et al., 2009). Lehká predominance je popisována u ženského pohlaví. Incidence BP roste s rostoucím věkem, pohybuje se v rozmezí 2,5 - 41,8 nových případů/milion/rok (Jung M. et al., 1999, Bertram F et al., 2009, Alpsoy E et al., 2015). U pacientů starších 80 let incidence stoupá až k 150–330/ milion obyvatel/rok (Kershenovich R et al., 2014).

Autoprotilátky u BP jsou produkované proti hemidesmosomálním antigenům – transmembránovému antigenu BP180 (BPAG2, kolagen XVII) a intraceluárnímu plakinu BP230 (BPAG1).

Diagnóza BP je založená na pozitivitě minimálně dvou specifických markerů, které považujeme za klasické či standardní vyšetřovací metody – histologický průkaz, detekce tkáňově vázané protilátky IgG a C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány epidermis metodou DIF, detekce cirkulujících protilátek IgG pomocí IIF na opičím či králičím jícnu nebo na tkáňovém substrátu SSS, detekce antigenů BP180/ BP230 pomocí ELISA. Dalo by se shrnout, že mezi standardně používané diagnostické metod BP patří

histopatologický rozbor a imunofluorescenční vyšetření. Ke stanovení správné diagnózy nám může pomoci i typický klinický obraz.

Dosavadní diagnostické metody ke stanovení onemocnění BP nejsou dostačující, kombinací všech známých vyšetřovacích metod nejsme stále schopni detekovat sto procent pacientů, proto je potřeba vyvíjet nové laboratorní postupy, které se k tomuto ideálu co nejvíce přiblíží.

V roce 1973 byla poprvé v literatuře popsána účast komplementu ve vztahu k puchýřnatým onemocněním. Provost TT. a Thomasi TB. popsali tzv. herpes gestationis factor test (jinak nazývaný complement fixation factor test, komplement fixační test – CFT) využívající identifikaci cirkulující protilátky metodou nepřímé imunofluorescence, kde po vizualizaci sekundární protilátky pomocí specifického fluorochromu (FITC) dochází k lineární depozici C3 složky komplementu podél bazální membrány keratinocytů, a to celé bez přítomnosti imunoglobulinů. Depozita C3 složky komplementu byla popsána během akutního vzplanutí puchýřnatého onemocnění a síla fluorescence závisela na stáří puchýře. U pacientů s BP byla prokázána také lineární depozice C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány, kromě toho se také jevila pozitivita u IgG, C1, C4 a C5 složky komplementu. Tato diagnostická metoda, která byla v 70. letech objevena, byla několikrát využita jen k úzké diagnostice pemphigoid gestationis. Zmínění autoři testovali několik málo pacientů s PG, BP a systémovým lupus erythematodes. Dle jejich výsledků byla u 2 PG pacientek nalezena depozita C3 a C5 v oblasti DEJ, za absence C1q a C4 složky komplementu a Ig, což vysvětlují aktivací alternativní cesty komplementu. U 6 BP pacientek byla popsána depozita složek C1q, C3, C4, C5 a protilátky Ig, kde je typicky popsána aktivace klasickou cestou. Z této publikace tedy vyplývá, že u pacientů s BP dochází v patofyziologickém procesu k aktivaci komplementové kaskády jak alternativní, tak klasickou cestou (Provost TT, Thomasi TB, 1973). Dále v této práci dokazují, že ne všechny imunoglobuliny jsou schopné fixovat komplement a vytvořit tak společný komplex antigen-protilátka. Těmito typy, které komplement fixační schopnost nemají, jsou IgA, IgE a IgG4 (Sandberg AL et al., 1970, Götze O, Müller-Eberhard HJ, 1971, Ishizaka T et al., 1972).

O 3 roky později, v roce 1976, probíhaly výzkumy fixační schopnosti komplementu CFT u herpes gestationis, kde protilátka IgG nebyla vždy detekována pomocí metody DIF či IIF (Jordon RE et al., 1976, Katz SI et al., 1976). Je publikováno, že CFT je založená na rozdílné metodice oproti jiným sérologickým testům a detekuje protilátky IgG v nízkém titru, které

jsou namířené proti antigenům bazální membrány. Došlo tedy k rozporu, zda má CFT komplement fixační schopnost, což vede k depozici C3 složky komplementu i bez přítomnosti imunoglobulinu G či zda komplement fixační test je samotná protilátka IgG (Katz SI et al., 1976).

V publikaci autorů J.A. Carrhuters a A.R. Erwins je popsáno, že u 7 pacientů s pemphigoid gestationis ve fluorescenčním mikroskopu při použití nepřímé imunofluorescence svítí lineární depozita C3 bez detekce IgG. Pokud došlo k zahřátí preparátů nad 56 °C po dobu minimálně 30 min, CFT byl negativní (Carrhuthers JA, Erwin AR, 1978).

Naopak v roce 1980 Kurihara S. došel k závěru, že titr protilátek IgG fixující komplement je vysoký u pacientů, kteří nejsou zatím léčeni, titr postupně klesá s délkou trvání onemocnění a může být i negativní v období remise, kde cirkulující protilátky mizí (Kurihara S et al., 1980). To vysvětluje pozitivní korelací mezi komplement fixačními protilátkami IgG a aktivitou onemocnění. Proto v této publikaci docházejí k výsledku, že autoprotilátka IgG je samotná komplement fixační protilátka, tzv. HG factor, který je stanovený pomocí komplement fixačního testu.

Tato diskrepance je vysvětlována tím, že IgG protilátka se skládá z několika heterogenních subtypů, kde ne všechny jsou schopné aktivovat komplement. Proto v některých případech k vizualizaci lineární depozice C3 složky komplementu není IgG detekována (Sams WM, Schur PH, 1973).

CFT je tedy metoda využívající modifikovanou IIF, která detekuje C3 složku komplementu nanesenou na kožním substrátu a fixovanou pomocí protilátky IgG (Jordon RE et al., 1976, Katz SI et al., 1976, Carruthers JA, Ewins AR, 1978, Millns JL et al., 1979, Kurihara S et al., 1980). Již v minulosti výzkumy prokázaly potencionální přínos CFT při diagnostice BP (Jordon RE et al., 1976, Fuligni A et al., 1990) na úzké skupině pacientů. V pozdějších letech se v odborné literatuře o CFT již dále nemluví, tato metoda nebyla dále rozvíjena a blíže zkoumána.

CFT a diagnostika BP nebyla spojována a popisována po více než 25 let, všechny předchozí studie se zaměřovaly buď jen na pemphigoid gestationis nebo na úzký vzorek pacientů s BP bez další specifikace testu. Mezi takové studie patří publikace z roku 1975, kde byl CFT pou-

žit k diagnostice 46 sér od nemocných s BP s výslednou senzitivitou testu pouhých 54,3 %, ačkoliv použitá séra byla vysoce pozitivní klasickou metodou IIF na substrátu normální kůže (Jordon RE et al., 1975). V roce 1990 Fuglini zkoumal 15 sér od BP pacientů, kteří byli sérologicky negativní pomocí klasické IIF na substrátu opičího jícnu, CFT byl pozitivní však jen v 33 % (u 5 pacientů). Od 90. let se v literatuře však nevyskytují další informace týkající se CFT a BP, možná kvůli zavedení komerčně vyráběných ELISA setů, které přišly na trh v roce 1990.

Předpokládali jsme, že CFT je odlišný od ostatních sérologických metod a je uzpůsoben k detekci protilátek IgG s nízkým titrem proti antigenům bazální membrány. Zdá se, že u pacientů, kteří jsou sérologicky negativní či v šedé zóně, je CFT schopen detekovat malé množství jednotlivých subtypů protilátky IgG (IgG1, IgG2 a/nebo IgG3).

Nasbírali jsme rozsáhlý soubor 300 pacientů s verifikovanou diagnózou BP a 136 kontrol, kde byla diagnóza bezpečně vyloučena pomocí dostupných diagnostických metod, které jsou doposud známé a rutinně používané ke stanovení diagnózy BP. Dokázali jsme, že CFT vykazuje vysokou senzitivitu (71,7 %) se zachováním 100% specificity, tímto se nepříliš liší od ostatních sérologických metod. CFT ukázal rostoucí senzitivitu v kombinaci s dalšími metodami, kombinací CFT a jiných sérologických metod (IIF na opičím či králičím jícnu, BP180/ BP230 ELISA) se senzitivita zvýší až na 95,3 % bez současného snížení specificity, která zůstává na 100 %. V neposlední řadě jsme došli k závěru, že CFT je schopen diagnostikovat 30–50 % pacientů s BP, kteří byli negativní pomocí ostatních sérologických metod. Naše studie byla limitována retrospektivním původem sběru dat. V některých případech tedy nebylo možné provést správnou korelaci mezi diagnostickými daty a klinickým obrazem daného pacienta.

K potvrzení naší hypotézy jsme zkoumali rozsáhlý soubor pacientů s BP a kontrolních sér a došli jsme k závěru, že kombinací CFT a dalších diagnostických metod (histologický průkaz, detekce tkáňově vázané protilátky IgG a C3 složky komplementu v oblasti bazální membrány epidermis metodou DIF, detekce cirkulujících protilátek IgG pomocí IIF na opičím či králičím jícnu nebo na tkáňovém substrátu SSS, detekce antigenů BP180/ BP230 pomocí ELISA) je možno dosáhnout nárůstu senzitivity při zachování velmi vysoké specificity. Tak je možné predikovat zařazení CFT mezi ostatní metody jako sekundární screeningovou metodu, kdy klasická IIF na opičím či králičím jícnu nebo na SSS je negativní, dochází

k zvýšení senzitivity o 10-15 % detekcí průměrně 50 % BP protilátek, které jsou nedetekovatelné pomocí klasické IIF. Vzhledem k tomu, že jsme našli i séra, kde CFT byl jasně pozitivní i přes negativní výsledky ostatních diagnostických metod, můžeme říci, že pozitivní prediktivní hodnota u CFT je vysoká, a CFT může také sloužit jako konfirmační metoda u pacientů s nejednoznačnou diagnózou či kde se BP dle typického klinického obrazu předpokládá. Mezi další experimentální metody v diagnostice BP patří ELISA, imunoblotting, imunoelektronová mikroskopie a imunoprecipitace. CFT metoda je ovšem z ekonomického hlediska nejpřijatelnější.

Je jen několik málo studií popisující důležitost cirkulujících IgG subtypů v diagnostice BP (Kumar V et al., 1996, Lamb PM et al., 2008), žádná však nepopisuje specifitu této metody a vzorek publikovaný v těchto článcích je nevelký (25, resp. 30 pacientů). Proto důležitost IIF v literatuře byla jen okrajová.

V literatuře se již od 60. let 20. století uvádí, že IgG autoprotilátka je esenciální v imunopatologii BP a skládá se z několika subtypů (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), které jsou či nejsou schopné aktivovat komplement. Detekovali jsme s predominancí hlavně IgG1 a IgG4 subtypy protilátky IgG pomocí IIF na opičím jícnu jako substrátu, ale také pozitivita IgG3 subtypu ukazuje signifikantní zlepšení senzitivity při ponechání vysoké specificity.

V naší studii jsme zkoumali detekci jednotlivých subtypů IgG vázajících se nespecificky na tkáň opičího jícnu, proto bylo potřeba ostatní nezkoumané protilátky zablokovat pomocí blokačního agens. IgG2 nebylo zkoumáno pro příliš nízkou specifitu. I v literatuře se o IgG2 protilátce ve vztahu k BP příliš nehovoří (Bird P et al., 1986, Yamada H et al., 1989, Bernard P et al., 1990, Shirakata Y et al., 1990, Bernard P et al., 1991, Soh H et al., 1991, Kumar V et al., 1996, Zhou A et al., 1998, Döpp R et al., 2000, Al-Karawi KS, 2002, Lamb PM et al., 2008), proto jsme i v našem výzkumu protilátku IgG2 opomenuli. Na základě správné diagnostiky BP pomocí pozitivity DIF, klasické IIF či ELISA, je v literatuře popsána IgG4 jako predominantní protilátka, následována IgG1, IgG2, IgG3 (Bernard P et al., 1990, Lamb PM et al., 2008). IgG4 je popisována jako často jediná a nejčastěji detekovatelná protilátka v prodromálním stádiu BP (Lamb PM et al., 2008). V našem případě, kdy jsme vyloučili původně pozitivní séra dle klasické IIF a zaměřili se čistě na negativní séra dle klasické IIF, můžeme hovořit o predominanci IgG1 a IgG4.

Senzitivita klasické či tradiční IIF na opičím jícnu se pohybuje v rozmezí 60-80 % (Di Zengo G et al., 2012, Sárdy M et al., 2013). Senzitivita tradiční IIF na opičím jícnu se nachází na hodnotě 73,2 % dle předchozích studií (Sárdy M et al., 2013). Podle našich výsledků asi 30-50 % falešně negativních sér stanovených pomocí klasické IIF na opičím jícnu může být správně diagnostikováno použitím jednotlivých IgG subtypů. Senzitivita dvojstupňového testu (klasická IIF s následnou IIF s použitím IgG subtypů u pacientů falešně negativních při klasické IIF) by se nyní mohla v našem případě posunout až na 80-87 %. Kumar et al. vyšetřoval 25 falešně negativních sér s nárůstem senzitivity z 68,5 % na 91 %, Lamb et al. popisuje 30 pacientů v prodromálním stádiu BP s nárůstem senzitivity z 36,6 % na 56,6 %. V obou studiích jde o výzkum monoklonálních anti-IgG subtypů na opičím jícnu, specificita těchto testů však není zkoumána.

Limitací výzkumu, stejně jako v případě CFT, je opět retrospektivnost dat a v některých případech subjektem ovlivněné hodnocení preparátů. Tuto subjektivnost jsme se snažili snížit kontrolou výsledných vzorků nejen hodnotitelem, ale i nezávislým supervizorem.

Zuo et al. publikoval, že protilátka IgG4 anti-NC16A inhibuje vazbu IgG1 a IgG3 na NC16A region BP180, a tím dojde k blokaci fixace komplementu, infiltraci neutrofily a vzniku puchýře u humanizovaných BP180-NC16A myší (Zuo Y et al., 2016). Zda tento poznatek u myší může být vztažen i na lidskou populaci zatím není známo a tento fakt nebyl ani předmětem našeho výzkumu. Detekce cirkulujících IgG subtypů může hrát do budoucna významnou roli v patogenezi, prognóze a terapeutické relevanci BP.

Platí, že diagnostika BP se zakládala na pozitivitě minimálně 2 diagnostických metod podpořených typickým klinickým obrazem. Po vizualizaci ve fluorescenčním mikroskopu jsme zjistili, že u široké skupiny BP pacientů je možné vidět jasně fluoreskující lineární depozita C3 složky komplementu. Z toho vyplývá, že CFT může být zařazen vedle klasických sérologických metod mezi ostatní diagnostické testy a konkurovat jiným vysoce senzitivním diagnostickým testům, jako jsou DIF či histologický obraz. CFT může sloužit k diagnostice nejen pacientů s pemphigoid gestationis, ale také obecně u pacientů s bulózním pemphigoidem.

Průzkumem velkého vzorku pacientů s BP jsme došli k závěru, že CFT může být důležitou metodou u pacientů, kteří jsou buď negativní či se nacházejí v šedé zóně použitím ostatních

sérologických metod, DIF či histologického rozboru. Jeho vysoká specificita a pozitivita při vysoké pozitivní prediktivní hodnotě neočekává falešně negativní výsledek. Zlatým standardem může být CFT použitý jako sekundární konfirmační test u sérologicky nejednoznačných případů. Tím se naše hypotéza potvrdila. Proto můžeme říci, že metoda CFT může být zařazena mezi klasické diagnostické metody a přispět tak k upřesnění nejednoznačných případů.

Dále platí, že stanovení jednotlivých subtypů protilátky IgG hraje významnou roli v imunopatologii BP s predominancí IgG1 a IgG4 a může pomoci při přesnější diagnostice BP. Dále jsme došli k závěru, že IgG3 není predominantní protilátka při diagnostice BP, může být však použita jako součást koktejlu všech IgG. Použití dvojstupňového testu (klasická IIF s následnou IIF s využitím detekce jednotlivých IgG subtypů u pacientů falešně negativních při klasické IIF) může být doporučena jako doplňková standardní metoda na BP případech, kde selhala klasická IIF.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

1. Aoyama Y, Asai K, Hioki K, Funato M, Kondo N, Kitajima Y. Herpes gestationis in a mother and newborn: immunoclinical perspectives based on a weekly follow-up of the enzyme-linked immunosorbent assay index of a bullous pemphigoid antigen noncollagenous domain. Arch Dermatol. 2007; 1168-72.

2. Al-Karawi KS. Immunoglobulin G subclass distribution of bullous pemphigoid autoantibodies and complement fixation studies. Saudi Med J. 2002; 1492.

3. Alpsoy E, Akman-Karakas A, Uzun S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. Arch Dermatol Res. 2015; 291-8.

4. Altmeyer P, Altmeyers Enzyklopädie: Ihr Facharztportal & Enzyklopädie, on-line Enzyklopädie.

5. Amamgai M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T. The clinical phenotype of pemphigus is defined by the antidesmoglein autoantibody profile. J Am Acad Dermatol. 1999; 167- 170.

6. Anthalt GJ, Kim SC, Stanley JR et al. Paraneoplastic pemphigus, An autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. N Engl J Med. 1990; 1729-1735.

7. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. N Engl J Med. 1982; 1189-96.

8. Aspinall R, Pitts D, Lapenna A, Mitchell W. Immunity in the elderly: the role of the thymus. J Comp Pathol. 2010; 111-5.

9. Baum S, Sakka N, Artsi O, Trau H, Barzilai A. Diagnosis and classification of autoimmune blistering diseases. Autoimmun Rev. 2014; 482-489.

10. Bedocs PM, Kumar V, Mahon MJ. Pemphigoid gestationis: a rare case and review.

Arch Gynecol Obstet. 2009; 235-8.

11. Bernard P, Aucouturier P, Denis F, Bonnetblanc JM. Immunoblot analysis of IgG subclasses of circulating antibodies in bullous pemphigoid. Clin Immunol Immunopathol. 1990; 484.

12. Bernard P, Prost C, Aucouturier P, Durepaire N, Denis F, Bonnetblanc JM. The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. J Invest Dermatol. 1991; 259.

13. Bertram F, Bröcker EB, Zillikens D, Schmidt E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. J Dtsch Dermatol Ges. 2009; 434-40.

14. Beutner EH, Jordon RE. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect imunofluorescence staining. Proc Soc Exp Biol Med. 1964; 505-10.

15. Bird P, Friedmann PS, Ling N, Bird AG, Thompson RA. Subclass distribution of IgG autoantibodies in bullous pemphigoid. J Invest Dermatol. 1986; 21.

16. Carruthers JA, Ewins AR. Herpes gestationis: studies on the binding characteristics, activity and pathogenetic significance of the complement-fixing factor. Clin Exp Immunol. 1978; 38-44.

17. Castro LA, Lundell RB, Krause PK, Gibson LE. Clinical experience in pemphigoid gestationis: report of 10 cases. J Am Acad Dermatol. 2006; 823-8.

18. Ding X, Aoki V, Mascaro JMJ, Lopez-Swiderski A, Diaz LA, Fairley JA. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris how distinct autoantibody profiles. J Invest Dermatol. 1997; 592- 596.

19. Di Zenzo G, Della Torre R, Zambruno G, Borradori L. Bullous pemphigoid: from the clinic to the bench. Clin Dermatol. 2012; 3.

20. Döpp R, Schmidt E, Chimanovitch I, Leverkus M, Bröcker 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; 577.

21. Egan CA, Llazarova Z, Darling TN et al. Anti-epligrin cicatricial pemphigoid: Clinical findings, immunopathogenesis, and signifcant associations. Medicine (Baltimore). 2003; 177-186.

22. Feliciani C, Caldarola G, Kneisel A, Podstawa E, Pfütze M, Pfützner W, Hertl M. IgG autoantibody reactivity against bullous pemphigoid (BP) 180 and BP230 in elderly patients with pruritic dermatoses. Br J Dermatol. 2009; 306-12.

23. Fichel F, Barbe C, Joly P et al. Clinical and immunological factors associated with bullous pemphigoid relapse during the first year of treatment: a multicenter, prospective study. JAMA Dermatol. 2014; 25-33.

24. Fölsch UR, Kochsiek K, Schmidt RF a kolektiv, Patologická fyziologie, ISBN 80-247-0319-X, 2003.

25. Fuligni A, Geti V, Di Blasi A, Cottoni F, Fabbri P. The so-called herpes gestationis factor in bullous pemphigoid. G Ital Dermatol Venereol. 1990; 301-3.

26. Gawkrodger DJ. Autoimmunity and skin disease. Br Med J. ABC of dermatology. 1987; 1471-74.

27. 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; 5742-50.

28. Götze O, Müller-Eberhard HJ. The c3-activator system: an alternate pathway of complement activation. J Exp Med. 1971; 90-108.

29. Hailey H, Hailey H. Familiar benign chronic pemphigus. Arch Dermatol. 1939; 679-85.

30. Hashimoto T, Kiyokawa C, Mori O et al. Human desmocollin 1 (Dsc 1) is an autoantigen for the subcorneal pustular dermatosis type of IgA pemphigus. J Invest Dermatol. 1997; 127-131.

31. Holmes RC, Black MM, Dann J, James DC, Bhogal B. A comparative study of toxic erythema of pregnancy and herpes gestationis. Br J Dermatol. 1982; 499-510.

32. Hořejší V, Bartůňková J, Základy imunologie, ISBN 80-7254-215-X, 2002.

33. Huilaja L, Mäkikallio K, Tasanen K. Gestational pemphigoid. Orphanet J Rare Dis. 2014; 136.

34. Chen M, O´Toole EA, Sanghavi J, et al. The epidermolysis bullosa acquisita atigen (type VII collagen) is present in human colon and patients with Crohn´s disease have autoantibodies to tye VII collagen. J Invest Dermatol 2002; 1059-1064.

35. Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G, Döpp R, Partscht K, Bröcker EB, Giudice GJ, Zillikens D. IgG1 and IgG3 are the major immunoglobulin subclasses targeting epitopes within the NC16A domain of BP180 in pemphigoid gestationis. J Invest Dermatol. 1999; 140-2.

36. Ishii K. Importance of serological tests in diagnosis of autoimmune blistering diseases. J Dermatol. 2015; 3-10.

37. Ishizaka T, Sian CM, Ishizaka K. Complement fixation by aggregated IgE through alternate pathway. J Immunol. 1972; 848-51.

38. Jamora MJJ, Jiao D, Bystryn J. Antibodies to desmoglein and 1 and 3, and the clinical phenotype of pemphigus vulgaris. J Am Acad Dermatol 2003; 976- 977.

39. Janqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Základy histology. ISBN 80-85787-37-7. 1992; 64-68.

40. Jenkins RE, Hern S, Black MM. Clinical features and management of 87 patients with pemphigoid gestationis. Clin Exp Dermatol. 1999; 255-9.

41. Jones CC, Hamilton RG, Jordon RE. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. J Clin Immunol. 1988; 43-9.

42. Jordon RE. Pemphigus: a historical perspective. International pemphigus and pemphigoid foundation. www.pemphigus.org. 2003

43. Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, Blumental G, Hale WL, Lever WF. Basement zone antibodies in bullous pemphigoid. JAMA. 1967; 751-6.

44. Jordon RE, Heine KG, Tappeiner G, Bushkell LL, Provost TT. The immunopathology of herpes gestationis. Immunofluorescence studies and characterization of "HG factor". J Clin Invest. 1976; 1426-31.

45. Jung M, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. J Am Acad Dermatol. 1999; 266-8.

46. Katz SI, Hertz KC, Yaoita H. Herpes gestationis. Immunopathology and characterization of the HG factor. J Clin Invest. 1976; 1434-41.

47. Katzenellenbogen I, Frumkin A. Herpes gestations. Harefuah. 1971; 13-6.

48. Kelly SE, Bhogal BS, Wojnarowska F, Whitehead P, Leigh IM, Black MM. Western blot analysis of the antigen in pemphigoid gestationis. Br J Dermatol. 1990; 445-9.

49. Kelly SE, Cerio R, Bhogal BS, Black MM. The distribution of IgG subclasses in pemphigoid gestationis: PG factor is an IgG1 autoantibody. J Invest Dermatol. 1989; 695-8.

50. Kelly SE, Firth PA, Millard PR, et al. A clinicopathological study of mucous involvement in linear IgA disease. Br J Dermatol. 1988; 161-170.

51. Kershenovich R, Hodak E, Mimouni D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. Autoimmunity Reviews 13; 2014: 477- 481.

52. Kneisel A, Hertl M. Bullöses Pemphigoid- Diagnostik und Therapie. Bullous pemphigoid: diagnosis and therapy. Wien Med Wochenschr. 2014; 363-71.

53. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. J Dtsch Dermatol Ges. 2011; 844-56.

54. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: diagnosis and therapy. J Dtsch Dermatol Ges. 2011; 927-47.

55. Korman NJ, Eyre RW, Zone J, Stanley JR. Drug induced pemphigus: autoantibodies direected against the pemhigus antigen complexes are present in penicillamine and captopril-induced pemphigus. J Invest Dermatol 1991; 273-276.

56. Kumar V, Valeski JE, Chorzelski TP, Jablonska S. Significance of IgG-subclass antibody determinations in bullous pemphigoid. J Clin Lab Anal. 1996; 432.

57. Kurihara S, Nishikawa T, Sugawara M, Hatano H. Correlation between complement-fixing pemphigoid antibody titres and disease activity. J Dermatol. 1980; 127-30.

58. Lamb PM, Patton T, Deng JS. The predominance of IgG4 in prodromal bullous pemphigoid. Int J Dermatol. 2008; 150.

59. Lever WF. Pemphigus. Medicine (Baltimore). 1953, 1-123.

60. Lipozenčić J, Ljubojevic S, Bukvić-Mokos Z. Pemphigoid gestationis. Clin Dermatol. 2012; 51-5.

61. Ljubojevic S, Lipozencic J. Autoimmune bullous diseases associations. Clin Dermatol. 2012; 17-33.

62. Lynch FW, Albrecht RJ. Homonal factors in herpes gestationis. Arch Dermatol. 1966; 446-7.

63. Mihai Sidonia, Sitaru Cassian. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. J Cell Mol Med. Vol 11, No. 3, 2007; 462- 481.

64. Millns JL, Meurer M, Jordon RE. The complement system in bullous pemphigoid. VI. C3 fixing activity in the absence of detectable antibody. Clin Immunol Immunopathol. 1979; 475-83.

65. Mimouni D, Anhalt GJ, Lazarova Z, et al. Paraneoplastic pemphigus in children ans adolescents. Br J Dermatol. 2002; 725-737.

66. Morgan JK. Herpes gestationis influenced by an oral contraceptive. Br J Dermatol. 1968; 456-8.

67. Murakami H, Amagai M, Higashiyama M, Hashimoto K, Chorzelski TP, Bhogal BS, Jenkins RE, Black MM, Zillikens D, Nishikawa T, Hashimoto T. Analysis of antigens recognized by autoantibodies in herpes gestationis. Usefulness of immunoblotting using a fusion protein representing an extracellular domain of the 180 kD bullous pemphigoid antigen. J Dermatol Sci. 1996 Nov; 112-7.

68. Nguyen VT, Ndoye A, Bassler KD, et al. Classification, clinical manifestation, and immunopathological mechanisms of the epithelial variant of paraneoplastic autoimmune multiorgan syndrome: A reappraisal of paraneoplasgtic pemphigus. Ach Dermatol. 2001; 193-206.

69. Nikolskaia OV, Nousari CH, Anhalt GJ. Paraneoplastic pemphigus in association with Castelman´s disease. Br J Dermatol. 2003; 1143-1151.

70. Osmundsen PE. Herpes gestationis. Report on 5 cases. Dermatologica. 1966; 393-9.

71. Otten JV, Hashimoto T, Hertl M, Payne AS, Sitaru C. Molecular diagnosis in autoimmune skin blistering conditions. Curr Mol Med. 2014; 69-95.

72. Provost TT, Tomasi TB Jr. Evidence for complement activation via the alternate pathway in skin diseases, I. Herpes gestationis, systemic lupus erythematosus, and bullous pemphigoid. J Clin Invest. 1973; 1779-87.

73. Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, et al., The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo salvagem), N Engl J Med. 1989; 1463-1469.

74. Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R. Pemphigus: etiology, pathogenesis, inducing or triggering factors: facts and controversies. Clin Dermatol. 2013; 374- 81.

75. Salavec M. Diagnostika a terapie autoimunitních puchýřnatých chorob. Dermatol pro praxi. 2010, 3; 148-155.

76. Salavec M, Boštíková N. Poruchy epidermální a dermoepidermální adheze a vezikulózní a bulózní nemoci. Čes Dermatovenerol. 2018, 8, č. 4; 212-219.

77. Salavec M. Pemfigus - skupina onemocnění. Čes Dermatovenerol. 2018, 8, č. 4; 220-227.

78. Salavec M. Bulózní pemfigoid. Čes Dermatovenerol. 2018, 8, č. 4; 228-236.

79. Salavec M. Jizvící pemfigoid. Čes Dermatovenerol. 2018, 8, č. 4; 238-242.

80. Salavec M. Získaná bulózní epidermolýza – epidermolysis bullosa acquisita. Čes Dermatovenerol. 2018, 8, č. 4; 244-248.

81. Salavec M, Boštíková N. Těhotenský pemphigoid – pemphigoid gestationis. Čes Dermatovenerol. 2019, 9, č. 1; 53-55.

82. Sams WM Jr, Schur PH. Studies of the antibodies in pemphigoid and pemphigus. J Lab Clin Med. 1973; 249-54.

83. Sandberg AL, Osler AG, Shin HS, Oliveira B. The biologic activities of guinea pig antibodies. II. Modes of complement interaction with gamma 1 and gamma 2-immunoglobulins. J Immunol. 1970; 329-34.

84. Sárdy M, Kostaki D, Varga R, Peris K, Ruzicka T. Comparative study of direct and indirect immunofluorescence and of bullous pemphigoid 180 and 230 enzyme-linked

immunosorbent assays for diagnosis of bullous pemphigoid. J Am Acad Dermatol. 2013; 748-53.

85. Semkova K, Black M. Pemphigoid gestationis: current insights into pathogenesis and treatment. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2009; 138-44.

86. Senear FE, Usher B. Unusual type of pemphigus combining features of lupus erythematosus. Arch Dermatol. 1926; 761

87. Shimanovich I, Bröcker EB, Zillikens D. Pemphigoid gestationis: new insights into the pathogenesis lead to novel diagnostic tools. BJOG. 2002; 970-6.

88. Shirakata Y, Shiraishi S, Sayama K, Miki Y. Subclass characteristics of IgG autoantibodies in bullous pemphigoid and pemphigus. J Dermatol. 1990; 661.

89. Shornick JK, Meek TJ, Nesbitt LT Jr, Gilliam JN. Herpes gestationis in blacks. Arch Dermatol. 1984; 511-3.

90. Schmidt E, Goebeler M, Hertl M, et al. S2k guideline for the diagnosis of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid. J Dtsch Dermatol Ges. 2015; 713.

91. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. Lancet. 2013; 320.

92. Silbernagel S, Lang F, Atlas patofyziologie člověka, ISBN 80-7169-968-3, 2001

93. Sitaru C, Goebeler M, Zillikens D. Bullöse Autoimmundermatosen (I): Pathogenese und Diagnostik. JDDG. 2004; 123-39.

94. Soh H, Hosokawa H, Miyauchi H, Izumi H, Asada Y. The distribution of IgG subclass autoantibodies in bullous pemphigoid analysed by immunofluorescence and immunoblotting. Arch Dermatol Res. 1991; 400.

95. Štork J et al., Dermatovenerologie, ISBN 9788072623716, 2008, 195- 212

96. Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Schuler G, Borradori L, Hertl M. Autoreactive T and B cells from bullous pemphigoid (BP) patients recognize epitopes clustered in distinct regions of BP180 and BP230. J Immunol. 2006; 2015-23.

97. Tsurata D, Ishii N et al. IgA pemphigus. Clin Dermatol. 2011; 437-42.

98. Van Beek N, Knuth-Rehr D, Altmeyer P, Assaf C, Babilas P, Bayerl C, Benoit S, Dippel E, Effendy I, Eming R, Fischer M, Glaenz T, Gläser R, Goebeler M, Gollnick H, Götze S, Gross G, Hadaschik E, Herbst R, Hermes B, Homey B, Hunzelmann N, Jünger M, Kapp A, Kern JS, Körber A, Luger T, Mechtel D, Megahed M, Moll I, Peters KP, Pfeiffer C, Ring J, Röcken M, Sárdy M, Seitz CS, Stadler R, Steinbrink K, Sticherling M, Szeimies RM, Tronnier M, Ulrich J, Vogt T, Wagner N, Welzel J, Wenzel J, Wozel G, Zouboulis CC, Zillikens D, Schmidt E. Diagnostics of autoimmune bullous diseases in German dermatology departments. J Dtsch Dermatol Ges. 2012; 492-9.

99. Vassileva S, Drenovska K, Manuelyan K. Autoimmune bistering dermatoses as systemic diseases. Clinics in Dermatology 2014; 364- 375.

100. Vaughan Jones SA, Hern S, Nelson-Piercy C, Seed PT, Black MM. A prospective study of 200 women with dermatoses of pregnancy correlating clinical findings with hormonal and immunopathological profiles. Br J Dermatol. 1999; 71-81.

101. Yamada H, Hashimoto T, Nishikawa T. IgG subclasses of intercellular and basement membrane zone antibodies: the relationship to the capability of complement fixation. J Invest Dermatol. 1989; 585-7.

102. Zhou S, Wakelin SH, Allen J, Wojnarowska F. Blister fluid for the diagnosis of subepidermal immunobullous diseases: a comparative study of basement membrane zone autoantibodies detected in blister fluid and serum. Br J Dermatol. 1998; 27.

103. Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A et al. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. J Invest Dermatol. 1996; 1333-1338.