

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Autoreferát disertační práce

Patofyziologická charakterizace autoimunitních puchýřnatých kožních chorob

MUDr. Jana Krabcová

Školitel: Doc. MUDr. Monika Arenbergerová, Ph.D.

Praha 2020

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České Republiky

Obor, předseda oborové rady: Fyziologie a patofyziologie člověka, prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA.

Školící pracoviště: Dermatovenerologická klinika FNKV a 3. LF UK Praha

Autor: MUDr. Jana Krabcová (roz. Jankásková)

Školitel: Doc. MUDr. Monika Arenbergerová, Ph.D.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne..... v hod., kde.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Obsah:

1. ÚVOD.....	8
1.1. Bulózní pemphigoid.....	11
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE.....	12
2.1. Hypotéza.....	12
2.2. Cíle práce.....	12
3. MATERIÁLY A METODIKY.....	13
3.1. Komplement fixační test	13
3.2. Detekce jednotlivých subtypů IgG protilátky.....	15
4. VÝSLEDKY.....	17
4.1. Komplement fixační test jako spolehlivá diagnostická metoda.....	17
4.2. Zvýšení senzitivity nepřímé imunofluorescence detekcí IgG1, IgG3, IgG4 a jejich kombinace.....	20
5. DISKUZE A ZÁVĚRY.....	22
6. POUŽITÁ LITERATURA.....	29
7. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA.....	39
7.1. Publikace se vztahem k disertační práci.....	39
7.2. Publikace bez vztahu k disertační práci.....	40

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 autoprottilátek 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 Immunoglobulin G by indirect immunofluorescence 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 immunofluorescence. 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 immunofluorescence 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 being confirmed.

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 popsal již Hippokrates. 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). 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).

Za normálního fyziologického stavu je nedůležitější vlastností imunitního systému vytvoření tolerance vůči vlastním tkáním. Porušení tzv. klonální delecce a imunologické tolerance, tedy zabránění schopnosti eliminace, a naopak poškozování i zdravých funkčních buněk, vyústí ve vznik tzv. autoimunitních onemocnění (Fölsch UR et al., 2003). Autoprotilátky jsou protilátky, které jsou namířené proti antigenům vlastního těla, autoantigenům. 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. Příčin vzniku autoimunitních onemocnění je nespočet, většinou se jedná o kombinaci vnitřních faktorů, jako je dědičnost, a faktorů zevního prostředí. 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 (Gawkrodger DJ, 1987).

Tkáňově vázané protilátky detekujeme pomocí metody přímé imunofluorescence (DIF), tkáň je vždy odebrána 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 krytkou, 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 zasychají 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.

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). 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. 1). 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, vytváří se subepidermální puchýř.

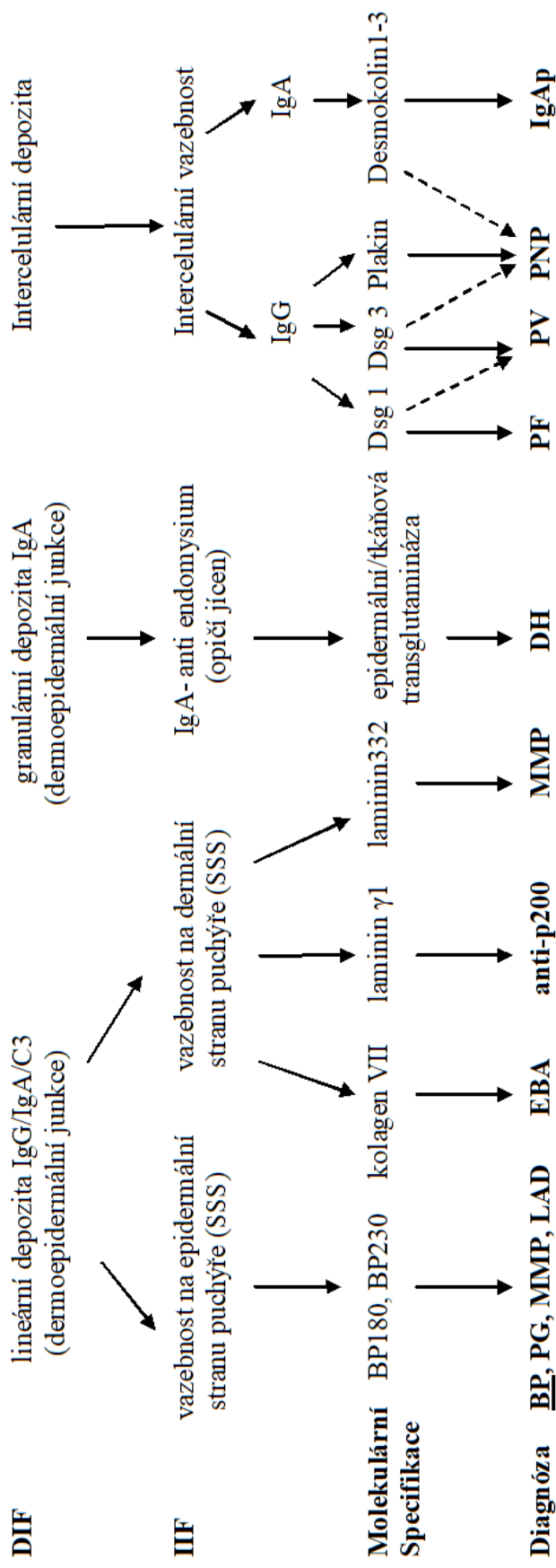
Vzhledem k velmi širokému spektru všech AIBD se tato disertační práce zaměřuje především na současně používanou diagnostiku, vyšetřovací metody a hlavním cílem je popsat nové vyšetřovací metody a diagnostické markery u nejčastějšího subtypu AIBD – bulózního pemphigoidu.

AUTOIMUNITNÍ PUCHÝRNATÉ KOŽNÍ CHOROBY (AIBD)

INTRAEPIDERMÁLNÍ PUCHÝŘ

SUBEPIDERMÁLNÍ PUCHÝŘ

Histopatologie



Obr. č. 1 : Histopatologické rozdělení AIBD: subepidermální formace puchýře u bulózního pemphigoidu (BP), pemphigoidu gestationis (PG), jizvického pemphigoidu (MMP), lineární IgA-dermatózy (LAD), epidermolýsis bullosa acquisita (EBA), anti-p200 pemphigoidu (anti-p200) a morbus herpetiformis Dühring (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, Herli M, Payne AS, Sitaru C. Molecular diagnosis in autoimmune skin blistering conditions)

1.1. Bulózní pemphigoid

Nejnámějším 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). Teprve v roce 1964 Beutner a Jordan objevili, že autoprotilátky typické pro BP jsou stanovené metodou DIF a IIF jsou lokalizované v oblasti bazální membrány (Beutner EH, Jordan RE, 1964).

BP se vyskytuje hlavně 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 (Alpsoy E et al., 2015, Jung M. et al., 1999, Bertram F et al., 2009). U pacientů starších 80 let se incidence stoupá až k 150–330/ milion obyvatel/rok (Kershenovich R et al., 2014).

Autoprotilátky u BP jsou produkovány proti hemidesmosomálním antigenům BP180 (BPAG2, kolagen XVII, velikost antigenu je 180 kDa) a BP230 (BPAG1, o velikosti 230 kDa), které spojují bazální keratinocyty epidermis k bazální membráně (Baum S et al., 2014).

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 bazální membrány epidermis metodou přímé imunofluorescence (DIF), detekce cirkulujících protilátek IgG pomocí nepřímé imunofluorescence (IIF) na opičím či králičím jícnu nebo na tkáňovém substrátu štěpným 1M NaCl (salt split skin – SSS), detekce antigenů BP180/ BP230 pomocí ELISA. Pomocí nám může i typický klinický obraz.

Pro stanovení BP jsou známá diagnostická kritéria. Povinným kritériem je lineární depozita IgG a C3 složky komplementu v oblasti dermoepidermální junctione 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 eozinofily. 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).

Jednotlivé sérologické testy obvykle prokážou správnou diagnózu BP u 60–80 % pacientů. Jen kombinace několika metod vede k zachytu většího procenta pacientů se správnou diagnózou BP. Proto je třeba vyvíjet nové diagnostické metody, které by přispěly k zvýšení sensitivity.

2. 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 sensitivity 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.

2.1. Hypotéza

Rozšíření spektra klasických vyšetřovacích metod o dvě další vyšetření zvýší diagnostickou sensitivity 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.

2.2. Cíle práce

Cílem této práce je ukázat a vysvětlit princip nových metod v diagnostice bulózního pemfigoidu. 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 nasbírali 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 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.

3. MATERIÁL A METODIKY

3.1. Komplement fixační test

V našem výzkumu se jedná o jednotlivě centrovanou, retrospektivní, případovou studii s použitím 300 sér pacientů s diagnózou BP. Konkrétně se jednalo 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. 1). Kontrolní séra byla použita od pacientů s podezřením na AIBD dle klinického obrazu, kde diagnóza BP byla pomocí klasických diagnostických metod vyloučena.

Tab. č. 1: Distribuce pacientů s diagnózou bulózního pemphigoidu a kontrolní skupiny pro testování herpes gestationis factoru testem nepřímou imunofluorescencí.

	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

Při každém běhu samotného testu byla použita pozitivní a negativní kontrolní séra, tzv. vnitřní kontrola, k vyloučení možné chyby špatně stanovené diagnózy. Všechna séra, 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 patientského 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 osvětlení 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.

Pro srovnání jednotlivých titrů byl použit Mann-Whitneyův non-parametrický, nepárový test. Pro komparaci senzitivity a specifity byl využit Mc Nemarův test. Jednotlivé hodnoty senzitivity a specifity, 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/>).

3.2. Stanovení subtypů protilátky IgG

Jedná se o retrospektivní, centrovanou a neintervenční analýzu sér. 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. 2). 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.

Tab. č. 2: 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

V pilotní studii jsme testovali 3 rozdílné substráty pro IIF mikroskopii – opičí jícen, králíčí jícen a SSS. SSS vykazoval velmi nízkou specifitu, králíčí jícen naopak velmi nízkou senzitivitu. Jen opičí jícen jako substrát pro zhotovení potřebných preparátů měl dostatečnou senzitivitu i specifitu, proto byl použit jako substrát. 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 králíčího jícnu i SSS.

IIF v našem případě detekujeme jednotlivé subtypy IgG protilátky, konkrétně IgG1, IgG3 a IgG4. Jako prevence možné vazby i nespecifických ostatních nevyšetřovaných protilátek jsme použili neutralizační agens, které vyváže tyto nepotřebné 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 30 minut, 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 jícnu, opět v termostatu uchována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C, která stejně jako v případě metody CFT byla pravidelně kontrolována. 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 nanášeny 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.

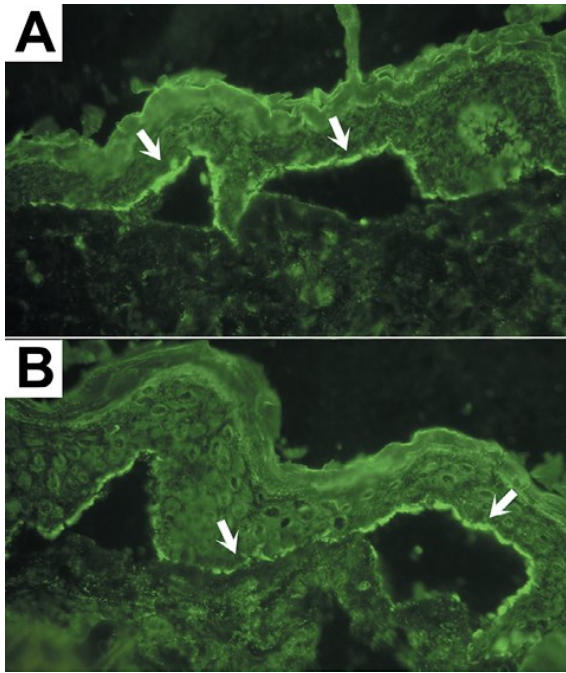
Zde bylo také zajištěno zaclonění proti dennímu světlu pro správnou následnou vizualizaci fluorescenčního činidla. Byl testován i koktejl všech 3 testovaných protilátek (směs IgG1, IgG3, IgG4) ve shodném ředění, tj. 1:64 a nanesen na stejnou sadu preparátů, tím jsme se snažili zvýšit senzitivitu protilátky 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.

Stejně jako v experimentu s CFT byl v hodnocení senzitivity a specificity použit 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.

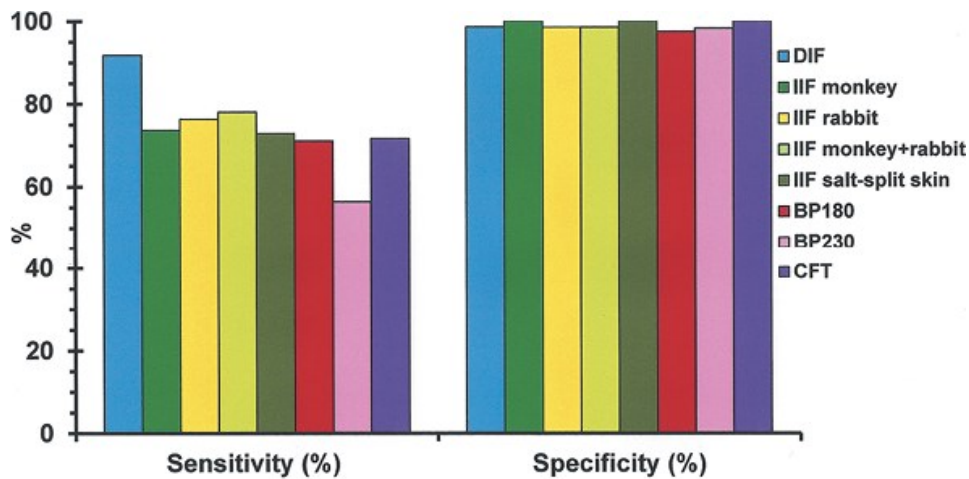
4. VÝSLEDKY

4.1. Komplement fixační test jako spolehlivá diagnostická metoda

Správný výsledek CFT (pozitivní vs. negativní) byl stanoven pouze při správnosti pozitivní a negativní vnitřní kontroly v každém jednotlivém běhu. 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 vrstvy 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 keratinocytům (Obr. č. 2).



Obr. č. 2 (A i B): příklad pozitivního výsledku CFT. Lineární depozice C3 složky komplementu je viděna na epidermální straně bazální membrány na zdravé lidské SSS. Detekce probíhá pomocí polyklonální králičí humánní C3 protilátce značené FITC. Zvětšeno 200x.



Obr. č. 3: srovnání senzitivity a specifcity u různých diagnostických metod u pacient s BP spolu s 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).

Tab. č. 3: počet pacientů, sensitivita, specificita, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty všech imunopatologických metod. Kalkulace 95% konfidenčního intervalu (95% CI) byla provedena pomocí GraphPad kalkulátoru, jak popsáno v metodách.

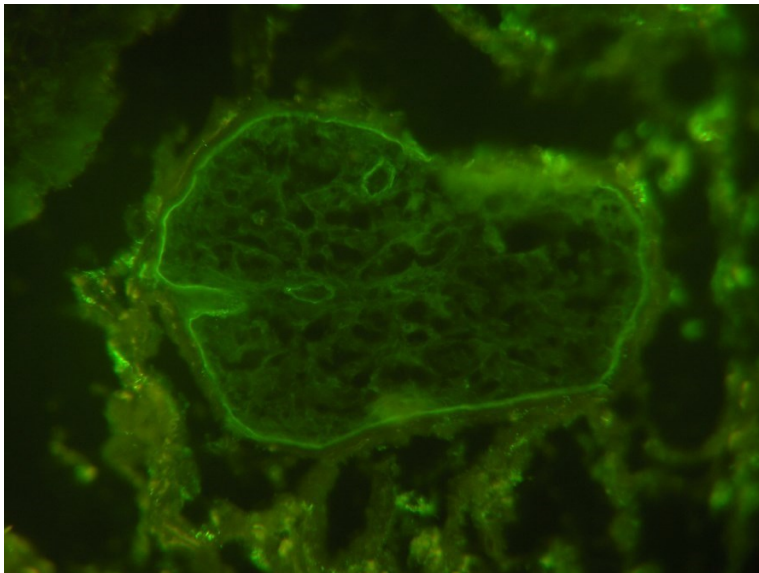
Vyšetření	Počet pacientů s BP	Počet kontrolních sér	Sensitivita	Specificita	Pozitivní prediktivní hodnota	Negativní prediktivní hodnota
DIF	220	70	91.82% (95%CI: 0.8738-0.9508)	98.57% (95% CI: 0.9230-0.9996)	99.51% (95% CI: 0.9729-0.9999)	79.31% (95% CI: 0.6929-0.8725)
IIF opičí jícen	300	136	73.67% (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)

Rozdíl mezi sensitivitou CFT a BP230 pomocí ELISA byl signifikantní ($p < 0,0001$), ale nezaznamenali jsme signifikantní rozdíl mezi CFT a ostatními serologickými 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. 3, Tab. č. 3). Nedošlo k signifikantní odchylce mezi specificitou CFT s jinými serologickými metodami.

Ačkoliv sensitivita jednotlivých serologických metod je nižší než 80 %, kombinace sensitivity BP180, BP230 a CFT dosáhla 90,7 % protože CFT detekoval 20 ze 46 pacientů s BP (43,5 %), kteří byli serologicky negativní pro obě BP180 i BP230 ELISA. Sensitivita 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 serologickými testy se vyšplhala sensitivita až na 95,3 %, kde 5 ze 14 pacientů (35,7 %) s BP bylo pozitivních pro CFT, ale negativních pomocí ostatních serologických metod. CFT byl pozitivní u 7 z 18 pacientů s BP (38,9 %), u nichž byla DIF hodnocena jako a epidermální negativní.

4.2. Zvýšení sensitivity nepřímé imunofluorescence detekcí IgG1, IgG3, IgG4 a jejich kombinace

Pomocí metody nepřímé imunofluorescence byl testován vzorek 64 pacientů s BP (31 mužů, 33 žen v průměrném věku 75,8 let) a 43 kontrol (10 mužů, 33 žen ve věku průměrně 52,8 let). V této skupině byla testována přítomnost subtypů protilátky IgG, konkrétně IgG1, IgG3, IgG4 a koktejlu všech výše uvedených subtypů. Pod fluorescenčním mikroskopem byl hodnocen výsledek testů – o pozitivitě hovoříme při jasné lineární depozici jednotlivých IgG subtypů při BM jícnu v oblasti epitelů a mukózních papil minimálně v 1/3 celkového povrchu (Obr. č. 4). Všechny preparáty stejně jako u CFT byly zaslepeně kontrolovány nezáujatým hodnotitelem, který na výzkum dohlížel.



Obr. č. 4: Jasně fluoreskující lineární depozita subtypu protilátky IgG1 při bazální membráně na substrátu opičího jícnu v ředění 1:64, zvětšeno 200x.

Většina BP sér (57 z 64–89 %) a kontrolní séra byla negativní pro BP 230 ELISA. Dále 34 z celkového množství 64 testovaných sér BP vykazalo pozitivitu 53 %. Žádné z kontrolních testovaných sér nevykazalo 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, průkazem lineárních epidermálně lokalizovaných depozit IgG v IIF na SSS a typickým standardním histologickým (v HE barvení) a klinickým obrazem odpovídajícím 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 lineární depozity podél bazální membrány a hodnoceno ve výsledku jako pozitivní či negativní. Pro kalkulaci sensitivity a specificity jsme využili 95% konfidenci interval (Tab. č. 4). IgG1 vykazuje obecně v našem výzkumu jasnější fluorescenci než IgG4, i to může vysvětlovat fluorescenci u preparátů v šedé zóně.

Tab. č. 4: Sensitivita, specificita, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty všech IgG subtypů pomocí metody IIF. Všechna 64 sér byla původně falešně negativní dle klasické IIF na opičím jícnu.

Vyšetření	Sensitivita v % (95% CI)	Specificita v % (95% CI)	Positivní prediktivní hodnota 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 (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 na 1:64.

Zajímavé je, že 12 z 64 sér (18,8 %) BP sér vykazuje negativitu u použití koktejlu protilátek, ale pozitivitu minimálně jednoho subtypu 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 sensitivita 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 IgG4 s pozitivitou 21 sér z 44 případů (47,7 %), odlišnost však není signifikantní ($p=0,1356$). IgG3 byla ze všech 3 subtypů IgG nejméně často pozitivní, 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 %) (Tabulka č. 6). Vyjma koktejlu bylo 20 ze 40 sér (50 %) pozitivních pro více než 1 subtyp.

5. DISKUZE A ZÁVĚRY

Autoimunitní puchýřnatá onemocnění jsou širokou skupinou chorob asociovanou s autoimunitou a tvorbou specifických autoprottilátek proti strukturálním komponentám mezi jednotlivými sousedními keratinocyty v epidermis či mezi bazálními keratinocyty a bazální membránou oddělující epidermis od dermis. AIBD rozdělujeme na dvě základní skupiny – s intraepidermální či se subepidermální ztrátou adheze, a tak v mikroskopickém obrazu vytvoření puchýře intraepidermálně či v oblasti dermoepidermální junkce. 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 autoprottilátek 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 krytky puchýře v oblasti epidermis, který postihuje kůži těla či sliznice. Podstatou onemocnění skupiny pemphigu je imunitní reakce namířena proti intraepidermálním glykoproteinům ze skupiny kadherinů, jako jsou desmoglein 1 (Dsg1) a 3 (Dsg3), desmokolín 1 (Dsc1), desmoplakin I a II, plakoglobin, periplakin, plektin či envoplakin. U subepidermální skupiny AIBD se specifické autoprotilátky vážou na strukturální proteiny v oblasti dermoepidermální junkce. Tyto specifické proteiny zprostředkovávají adhezi hemidesmosomů bazálních keratinocytů (BP180, BP230, plektin, $\alpha\beta 4$ integrin, CD151) k proteinům v lamina lucida či lamina densa (kolagen VII) bazální membrány. Autoprotilátky u BP jsou produkovány proti hemidesmosomálním antigenům – transmembránovému antigenu BP180 (BPAG2, kolagen XVII) a intracelulárnímu plakinu BP230 (BPAG1).

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.

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, Jordan RE, 1964).

Podstatu histologického obrazu činí mechanismus imunitní reakce u BP, 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.

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, Alpsy E et al., 2015). U pacientů starších 80 let incidence stoupá až k 150–330/ milion obyvatel/rok (Kershenovich R et al., 2014).

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 erythematoses. 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 vysvětluje aktivaci 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. Carrhuthers 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 korelaci mezi komplement fixačními protilátkami IgG a aktivitou onemocnění. Proto v této publikaci docházejí k výsledku, že autoprottilátka 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 použit 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 Fuligni 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).

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 specifity. 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 nejpříjemnější.

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 autoprotílátka 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 protílátky IgG pomocí IIF na opičím jícnu jako substrátu, ale také pozitivita IgG3 subtypu ukazuje signifikantní zlepšení senzitivity při ponechání vysoké specifity.

V naší studii jsme zkoumali detekci jednotlivých subtypů IgG vázajících se nespecificky na tkáň opičím jícnu, proto bylo potřeba ostatní nezkoumané protílátky zablokovat pomocí blokačního agens. IgG2 nebylo zkoumáno pro příliš nízkou specifitu. I v literatuře se o IgG2 protílátce 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 protílátku IgG2 opomenuli. Na základě správné diagnostiky BP pomocí pozitivita DIF, klasické IIF či ELISA, je v literatuře popsána IgG4 jako predominantní protílátka, následována IgG1, IgG2, IgG3 (Bernard P et al., 1990, Lamb PM et al., 2008). IgG4 je popisována jako často jediná a nejčastěji detekovatelná protílátka 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 klasické 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, specifická 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 neutrofilů a vzniku puchýře u humanizovaných BP180-NC16A myši (Zuo Y et al., 2016). Zda tento poznatek u myši 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 zařazena vedle klasických 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 původně negativních při klasické IIF) může být doporučena jako doplňková standardní metoda při analýze sér na BP případech, kde selhala klasická IIF.

6. 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. Alpsyoy 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. **Anhalt 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 immunofluorescence 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-Swidorski A, Diaz LA, Fairley JA.** Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris have 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, L Lazarova Z, Darling TN et al.** Anti-epligrin cicatricial pemphigoid: Clinical findings, immunopathogenesis, and significant associations. *Medicine (Baltimore).* 2003; 177-186.
- 22. Feliciani C, Caldarola G, Kneisel A, Podstawa E, 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 antigen (type VII collagen) is present in human colon and patients with Crohn's disease have autoantibodies to type VII collagen. *J Invest Dermatol* 2002; 1059-1064.
- 35. Chimanovitch I, Schmidt E, Messer G, Döpp R, Partsch 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, Bystryjn 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 gestationis. 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 directed against the pemphigus 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.** Hormonal 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 and 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 paraneoplastic 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 blistering 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.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

7.1. Publikace se vztahem k disertační práci

1. publikace in extenso: Jankásková J, Horváth ON, Varga R Ruzicka T, Sárdy M. Complement Fixation Test: An Update of an Old Method for Diagnosis of Bullous Pemphigoid. *Acta Derm. Venereol.* 2016 Feb:197-201.
- IF 3,653

Review- Horváth ON, Jankásková J, Walker A, Sárdy M. [Pemphigoid diseases. Autoimmune diseases in the elderly]. *Hautarzt.* 2015 Aug; 583-8.
- IF 0,661

Review- Jankásková J, Horváth ON, Walker A, Sárdy M. Bullöses Pemphigoid- Autoimmunserologie und direkte Immunofluoreszenz sichern die Diagnose, Hautnah Dermatologie, November 2015, Jg.31, Nr.6: 24-27.

- bez IF

2. publikace in extenso: Jankásková J, Horváth ON, Varga R, Arenberger P, Schmidt E, Ruzicka T, Sárdy M. Increased sensitivity and high specificity of indirect immunofluorescence in detecting IgG subclasses for diagnosis of bullous pemphigoid. Clin. Exp. Dermatol. 2018 Apr:248-253.

- IF 1,589

7.2. Publikace bez vztahu k disertační práci

Krabcová J. [Androgenetic alopecia in women]. Cas Lek Cesk. 2017 Summer;156:141-144. Czech.

- bez IF